

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-500663

(P2015-500663A)

(43) 公表日 平成27年1月8日(2015. 1. 8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 P 7/44 (2006.01)	C 1 2 P 7/44 Z N A	4 B O 2 4
C 1 2 P 7/24 (2006.01)	C 1 2 P 7/24	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 147 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2014-548982 (P2014-548982)	(71) 出願人	513317127
(86) (22) 出願日	平成24年12月21日 (2012. 12. 21)		インビスタ テクノロジーズ エス. アー
(85) 翻訳文提出日	平成26年8月11日 (2014. 8. 11)		. エール. エル.
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/071472		スイス連邦 ザンクト ガレン クロイツ
(87) 国際公開番号	W02013/096898		アッカーシュトラッセ 9 ツヴァイクニ
(87) 国際公開日	平成25年6月27日 (2013. 6. 27)		ーダーラスンク ザンクト ガレン
(31) 優先権主張番号	61/578, 265	(74) 代理人	100102978
(32) 優先日	平成23年12月21日 (2011. 12. 21)		弁理士 清水 初志
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100102118
(31) 優先権主張番号	61/578, 272		弁理士 春名 雅夫
(32) 優先日	平成23年12月21日 (2011. 12. 21)	(74) 代理人	100160923
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山口 裕孝
(31) 優先権主張番号	61/578, 289	(74) 代理人	100119507
(32) 優先日	平成23年12月21日 (2011. 12. 21)		弁理士 刑部 俊
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 ナイロン-7、ナイロン-7, 7、およびポリエステルを生産するための生物変換方法

(57) 【要約】

本発明の態様は、単離された酵素の存在下またはそれらの酵素を発現する組換え宿主細胞の存在下での二官能性または三官能性C7アルカンの生合成のための方法に関する。二官能性または三官能性C7アルカンは、ナイロン-7、ナイロン-7,x、ナイロン-x,7およびポリエステルの生産における中間体として有用である。

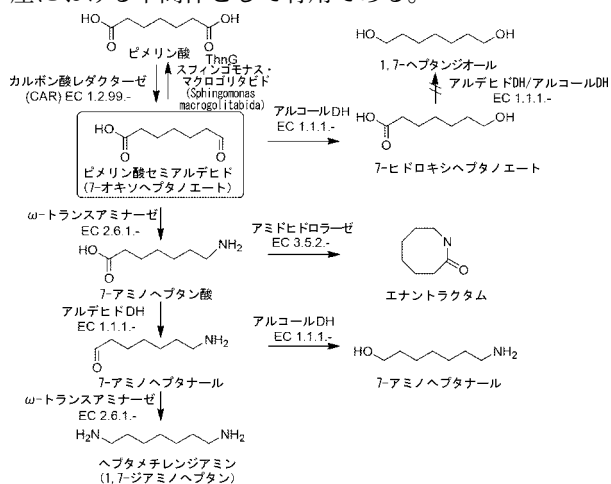
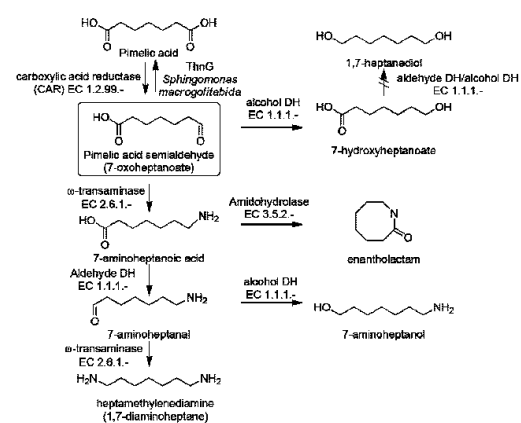


FIG. 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

2,6ジアミノピメレート (2,6 DAP) および α -アミノピメレート (AAP) から選択される化合物を、2,6 DAPの6-アミノ-2-ヘプテン二酸 (6A2HA) への還元的脱アミノ化またはAAPの2-ヘプテン二酸 (2 HDA) への還元的脱アミノ化を触媒する酵素と接触させる段階を含む、化合物を変換する方法であって、ここで6A2HAまたは2 HDAが生成される、方法。

【請求項 2】

化合物が2,6 DAPである、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

6A2HAを、6A2HAのAAPへのエノエート還元を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでAAPが生成される、請求項2記載の方法。

10

【請求項 4】

AAPを、AAPの2 HDAへの還元的脱アミノ化を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで2 HDAが生成される、請求項3記載の方法。

【請求項 5】

2 HDAを、2 HDAのピメリン酸 (PA) へのエノエート還元を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでPAが生成される、請求項4記載の方法。

【請求項 6】

PAを、PAのピメリン酸セミアルデヒド (PAS) へのカルボン酸還元を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでPASが生成される、請求項5記載の方法。

20

【請求項 7】

PASを、PASの7-アミノヘプタン酸 (7 AHA) へのセミアルデヒドアミノ化を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで7 AHAが生成される、請求項6記載の方法。

【請求項 8】

7 AHAを、7 AHAのエナントラクタム (ENTL) へのアミド加水分解を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでENTLが生成される、請求項7記載の方法。

【請求項 9】

7 AHAを、7 AHAの7-アミノヘプタナール (7 AHT) へのアルデヒド脱水素化を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでAHTが生成される、請求項7記載の方法。

【請求項 10】

7 AHTを、1,7-ジアミノヘプタン (1,7 DAH) を生成するための7 AHTへのアミノ基の転移を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで1,7 DAHが生成される、請求項9記載の方法。

30

【請求項 11】

2 HDAを、2-ヘプテン二酸-補酵素A (2 HDA-CoA) を生成するための2 HDAへの補酵素A (CoA) の転移を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで2 HDA-CoAが生成される、請求項4記載の方法。

【請求項 12】

2 HDA-CoAを、2 HDA-CoAのピメロイルCoA (PCoA) へのエノエート還元を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでPCoAが生成される、請求項11記載の方法。

40

【請求項 13】

PCoAを、PCoAのPAへのチオエステル加水分解を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでPAが生成される、請求項12記載の方法。

【請求項 14】

PAを、PAのPASへのカルボン酸還元を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでPASが生成される、請求項13記載の方法。

【請求項 15】

PASを、PASの7 AHAへのセミアルデヒドアミノ化を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで7 AHAが生成される、請求項14記載の方法。

【請求項 16】

50

7 AHAを、7 AHAのENTLへのアミド加水分解を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでENTLが生成される、請求項15記載の方法。

【請求項 17】

7 AHAを、7 AHAの7 AHTへのアルデヒド脱水素化を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで7 AHTが生成される、請求項15記載の方法。

【請求項 18】

7 AHTを、1,7 DAHを生成するための7 AHTへのアミノ基の転移を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで1,7 DAHが生成される、請求項17記載の方法。

【請求項 19】

AAPを、 α -ケトピメレート (AKP) を生成するためのAAPへのアミノ基の転移を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでAKPが生成される、請求項4記載の方法。

10

【請求項 20】

AKPを、AKPの α -ヒドロキシピメレート (AHP) へのケトン還元を触媒する1つまたは複数の酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでAHPが生成される、請求項19記載の方法。

【請求項 21】

AHPを、 α -ヒドロキシピメレート (AHP-CoA) を生成するためのAHPへのCoAの転移を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでAHP-CoAが生成される、請求項20記載の方法。

【請求項 22】

20

AHP-CoAを、AHP-CoAの2 HDA-CoAへの脱水を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで2 HDA-CoAが生成される、請求項21記載の方法。

【請求項 23】

2 HDA-CoAを、2 HDA-CoAのPCoAへのエノエート還元を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでPCoAが生成される、請求項22記載の方法。

【請求項 24】

PCoAを、PCoAのPAへのチオエステル加水分解を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでPAが生成される、請求項23記載の方法。

【請求項 25】

PAを、PAのPASへのカルボン酸還元を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでPASが生成される、請求項24記載の方法。

30

【請求項 26】

PASを、PASの7 AHAへのセミアルデヒドアミノ化を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで7 AHAが生成される、請求項25記載の方法。

【請求項 27】

7 AHAを、7 AHAのENTLへのアミド加水分解を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでENTLが生成される、請求項26記載の方法。

【請求項 28】

7 AHAを、7 AHAの7 AHTへのアルデヒド脱水素化を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで7 AHTが生成される、請求項26記載の方法。

40

【請求項 29】

7 AHTを、1,7 DAHを生成するための7 AHTへのアミノ基の転移を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで1,7 DAHが生成される、請求項28記載の方法。

【請求項 30】

AHPを、AHPの2 HDAへの脱水を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで2 HDAが生成される、請求項20記載の方法。

【請求項 31】

2 HDAを、2 HDAのピメリン酸 (PA) へのエノエート還元を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでPAが生成される、請求項30記載の方法。

【請求項 32】

50

PAを、PAのPASへのカルボン酸還元を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでPASが生成される、請求項31記載の方法。

【請求項 3 3】

PASを、PASの7 AHAへのセミアルデヒドアミノ化を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで7 AHAが生成される、請求項32記載の方法。

【請求項 3 4】

7 AHAを、7 AHAのENTLへのアミド加水分解を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでENTLが生成される、請求項33記載の方法。

【請求項 3 5】

7 AHAを、7 AHAの7 AHTへのアルデヒド脱水素化を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで7 AHTが生成される、請求項33記載の方法。

10

【請求項 3 6】

7 AHTを、1,7 DAHを生成するための7 AHTへのアミノ基の転移を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで1,7 DAHが生成される、請求項35記載の方法。

【請求項 3 7】

2 HDAを、2 HDA-CoAを生成するための2 HDAへのCoAの転移を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで2 HDA-CoAが生成される、請求項30記載の方法。

【請求項 3 8】

2 HDA-CoAを、2 HDA-CoAのPCoAへのエノエート還元を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでPCoAが生成される、請求項37記載の方法。

20

【請求項 3 9】

PCoAを、PCoAのPAへのチオエステル加水分解を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでPAが生成される、請求項38記載の方法。

【請求項 4 0】

PAを、PAのPASへのカルボン酸還元を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでPASが生成される、請求項39記載の方法。

【請求項 4 1】

PASを、PASの7 AHAへのセミアルデヒドアミノ化を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで7 AHAが生成される、請求項40記載の方法。

【請求項 4 2】

30

7 AHAを、7 AHAのENTLへのアミド加水分解を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでENTLが生成される、請求項41記載の方法。

【請求項 4 3】

7 AHAを、7 AHAの7 AHTへのアルデヒド脱水素化を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで7 AHTが生成される、請求項41記載の方法。

【請求項 4 4】

7 AHTを、1,7 DAHを生成するための7 AHTへのアミノ基の転移を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで1,7 DAHが生成される、請求項43記載の方法。

【請求項 4 5】

AKPを、AKPの α -ケトスベレート（AKS）への α -ケト酸鎖伸長を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでAKSが生成される、請求項19記載の方法。

40

【請求項 4 6】

AKSを、 α -アミノスベレート（AAS）を生成するためのAKSへのアミノ基の転移を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでAASが生成される、請求項45記載の方法。

【請求項 4 7】

AASを、AASの7 AHAへの α -アミノ酸脱カルボキシル化を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで7 AHAが生成される、請求項46記載の方法。

【請求項 4 8】

7 AHAを、7 AHAのENTLへのアミド加水分解を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでENTLが生成される、請求項47記載の方法。

50

【請求項 49】

7 AHAを、7 AHAの7 AHTへのアルデヒド脱水素化を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで7 AHTが生成される、請求項47記載の方法。

【請求項 50】

7 AHTを、1,7 DAHを生成するための7 AHTへのアミノ基の転移を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで1,7 DAHが生成される、請求項49記載の方法。

【請求項 51】

AKSを、AKSのPASへの α -ケト酸脱カルボキシル化を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでPASが生成される、請求項45記載の方法。

【請求項 52】

PASを、PASの7 AHAへのセミアルデヒドアミノ化を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで7 AHAが生成される、請求項51記載の方法。

【請求項 53】

7 AHAを、7 AHAのENTLへのアミド加水分解を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでENTLが生成される、請求項52記載の方法。

【請求項 54】

7 AHAを、7 AHAの7 AHTへのアルデヒド脱水素化を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで7 AHTが生成される、請求項52記載の方法。

【請求項 55】

7 AHTを、1,7 DAHを生成するための7 AHTへのアミノ基の転移を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで1,7 DAHが生成される、請求項54記載の方法。

【請求項 56】

PCoAを、PCoAのPASへの還元を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでPASが生成される、請求項23記載の方法。

【請求項 57】

PASを、PASの7 AHAへのセミアルデヒドアミノ化を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで7 AHAが生成される、請求項56記載の方法。

【請求項 58】

7 AHAを、7 AHAのENTLへのアミド加水分解を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでENTLが生成される、請求項57記載の方法。

【請求項 59】

7 AHAを、7 AHAの7 AHTへのアルデヒド脱水素化を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで7 AHTが生成される、請求項57記載の方法。

【請求項 60】

7 AHTを、1,7 DAHを生成するための7 AHTへのアミノ基の転移を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで1,7 DAHが生成される、請求項59記載の方法。

【請求項 61】

PCoAを、PCoAのPASへの還元を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでPASが生成される、請求項38記載の方法。

【請求項 62】

PASを、PASの7 AHAへのセミアルデヒドアミノ化を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで7 AHAが生成される、請求項61記載の方法。

【請求項 63】

7 AHAを、7 AHAのENTLへのアミド加水分解を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでENTLが生成される、請求項62記載の方法。

【請求項 64】

7 AHAを、7 AHAの7 AHTへのアルデヒド脱水素化を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで7 AHTが生成される、請求項62記載の方法。

【請求項 65】

7 AHTを、1,7 DAHを生成するための7 AHTへのアミノ基の転移を触媒する酵素と接触さ

10

20

30

40

50

せる段階をさらに含み、ここで1,7 DAHが生成される、請求項64記載の方法。

【請求項 6 6】

6A2HAおよび2 HDAから選択される化合物を、6A2HAのAAPへのエノエート還元または2 HDAのPAへのエノエート還元を触媒する酵素と接触させる段階を含み、ここでAAPまたはPAが生成される、化合物を変換する方法。

【請求項 6 7】

PCoAおよびピメロイル-[acp] (PACP) から選択される化合物を、PCoAまたはPACPのPAへのチオエステラ-ゼ加水分解を触媒する酵素と接触させる段階を含み、ここでPAが生成される、化合物を変換する方法。

【請求項 6 8】

PAを、PAのPASへのカルボン酸還元を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでPASが生成される、請求項67記載の方法。

【請求項 6 9】

PASを、PASの7 AHAへのセミアルデヒドアミノ化を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで7 AHAが生成される、請求項68記載の方法。

【請求項 7 0】

7 AHAを、7 AHAのENTLへのアミド加水分解を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでENTLが生成される、請求項69記載の方法。

【請求項 7 1】

7 AHAを、7 AHAの7 AHTへのアルデヒド脱水素化を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで7 AHTが生成される、請求項69記載の方法。

【請求項 7 2】

7 AHTを、1,7 DAHを生成するための7 AHTへのアミノ基の転移を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで1,7 DAHが生成される、請求項71記載の方法。

【請求項 7 3】

AKPを、AKPのAHPへのケトン還元を触媒する1つまたは複数の酵素と接触させる段階を含み、ここでAHPが生成される、化合物を変換する方法。

【請求項 7 4】

AKPが α -ケトアジペートまたは α -ケトグルタレートの鎖伸長によって生成される、請求項73記載の方法。

【請求項 7 5】

AHPをPAまたはPCoAに変換する段階をさらに含む、請求項73記載の方法。

【請求項 7 6】

α -ケト酸鎖の伸長によってAKPをAKSに変換する段階を含む、化合物を変換する方法。

【請求項 7 7】

AKPが α -ケトアジペートまたは α -ケトグルタレートの鎖伸長によって生成される、請求項76記載の方法。

【請求項 7 8】

PASを、PASの7 AHAへのセミアルデヒドアミノ化を触媒する酵素と接触させる段階を含み、ここで7 AHAが生成される、化合物を変換する方法。

【請求項 7 9】

PASが、2,6 DAP、AKG、PCoAまたはPACPからの変換によって得られる、請求項78記載の方法。

【請求項 8 0】

PCoAおよびPACPから選択される化合物を、該化合物のPASへの還元を触媒する酵素と接触させる段階を含み、ここでPASが生成される、化合物を変換する方法。

【請求項 8 1】

PASを、PASの7-ヒドロキシヘプタン酸 (7 HHA) へのアルコール脱水素化を触媒する酵素と接触させる段階を含み、ここで7 HHAが生成される、化合物を変換する方法。

【請求項 8 2】

10

20

30

40

50

前記酵素、または前記1つまたは複数の酵素が、精製された酵素である、請求項1～81のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8 3】

前記酵素、または前記1つまたは複数の酵素が、細胞溶解物または部分精製された細胞溶解物中に存在する、請求項1～81のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8 4】

前記酵素、または前記1つまたは複数の酵素が、該酵素を組換え発現する細胞中に存在する、請求項1～81のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8 5】

酵素がアンモニアリアーゼを含む、請求項1または2記載の方法。

10

【請求項 8 6】

アンモニアリアーゼが、EC 4.3.1におけるアンモニアリアーゼである、請求項85記載の方法。

【請求項 8 7】

EC 4.3.1におけるアンモニアリアーゼが、EC 4.3.1.1、EC 4.3.1.2、EC 4.3.1.3、EC 4.3.1.9、EC 4.3.1.12、EC 4.3.1.13、EC 4.3.1.23、またはEC 4.3.1.24を含む、請求項86記載の方法。

【請求項 8 8】

酵素がエン酸レダクターゼを含む、請求項3、5、12、23、31、38、および66のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項 8 9】

エン酸レダクターゼがEC 1.3.1におけるエン酸レダクターゼを含む、請求項88記載の方法。

【請求項 9 0】

エン酸レダクターゼが以下のものである、請求項88記載の方法：

(a) EC 1.3.1におけるものであって、EC 1.3.1.8；EC 1.3.1.9；EC 1.3.1.10、EC 1.3.1.31；EC 1.3.1.38；EC 1.3.1.39；EC 1.3.1.44；もしくはEC 1.3.1.62におけるピメロイル-CoAデヒドロゲナーゼ、例えばPimC／PimDもしくはThnJ／ThnKなどを含む；または

(b) EC 1.3、例えばEC 1.3.8.1；EC 1.3.99.3；EC 1.3.99.B10；もしくはシントロファス・アシディトロフィカス (*Syntrophus aciditrophicus*) 2,3-ジデヒドロピメリル-CoAレダクターゼおよびそれらのホモログにおけるものである。

30

【請求項 9 1】

酵素がカルボン酸レダクターゼまたはNAD依存性非アシル化アルデヒドデヒドロゲナーゼを含む、請求項6、14、25、32、40、および68のいずれか一項記載の方法。

【請求項 9 2】

カルボン酸レダクターゼが、EC 1.2.99におけるカルボン酸レダクターゼ、またはNAD依存性非アシル化アルデヒドデヒドロゲナーゼ、例えばスフィンゴモナス (*Shingomonas*) 属種もしくはカプリアビダス (*Cupriavidus*) 属種におけるThnGなどを含む、請求項91記載の方法。

【請求項 9 3】

EC 1.2.99におけるカルボン酸レダクターゼがEC 1.2.99.6を含み、NAD依存性非アシル化アルデヒドデヒドロゲナーゼがスフィンゴモナスにおけるThnGである、請求項92記載の方法。

40

【請求項 9 4】

酵素がω-トランスアミナーゼを含む、請求項7、15、26、33、52、57、62、69および78のいずれか一項記載の方法。

【請求項 9 5】

ωトランスアミナーゼがEC 2.6.1におけるトランスアミナーゼを含む、請求項94記載の方法。

【請求項 9 6】

50

EC 2.6.1における ω -トランスアミナーゼが、EC 2.6.1.18；EC 2.6.1.19；EC 2.6.1.11；EC 2.6.1.13；EC 2.6.1.39；EC 2.6.1.48；EC 2.6.1.62を含む、請求項95記載の方法。

【請求項 97】

酵素がチオエステラーゼ、酸-チオールリガーゼまたはCoAトランスフェラーゼを含む、請求項13、24、39、56、61、および67のいずれか一項記載の方法。

【請求項 98】

チオエステラーゼがEC 3.1.2におけるチオエステラーゼを含む、請求項97記載の方法。

【請求項 99】

EC 3.1.2におけるチオエステラーゼが以下のものを含む、請求項98記載の方法：

EC 3.1.2.18；EC 3.1.2.19；もしくはEC 3.1.2.20由来のCoA-チオエステルに対して作用するチオエステラーゼ；

YciA、tesBもしくはAcot13の遺伝子産物；または

EC 3.1.2.14およびEC 3.1.2.21由来の[acp]-チオエステルに対して作用するチオエステラーゼ。

【請求項 100】

酸-チオールリガーゼがEC 6.2.1における酸-チオールリガーゼを含む、請求項97記載の方法。

【請求項 101】

EC 6.2.1における酸-チオールリガーゼが、EC 6.2.1.3；EC 6.2.1.5；EC 6.2.1.14；またはEC 6.2.1.23由来のCoAエステルに対して作用するCoAシンテターゼ、ならびにEC 6.2.1.14（BioWなど）およびEC 6.2.1.20におけるアシル-[acp]-シンテターゼを含む、請求項100記載の方法。

【請求項 102】

CoAトランスフェラーゼがEC 2.8.3におけるCoAトランスフェラーゼを含む、請求項97記載の方法。

【請求項 103】

EC 2.8.3におけるCoAトランスフェラーゼが、EC 2.8.3.12；EC 2.8.3.13またはEC 2.8.3.14またはThnHの遺伝子産物を含む、請求項102記載の方法。

【請求項 104】

酵素がアミノ酸アミノトランスフェラーゼまたは脱アミノ基デヒドロゲナーゼを含む、請求項10、18、19、29、36、44、46、50、60、65および72のいずれか一項記載の方法。

【請求項 105】

アミノ酸アミノトランスフェラーゼがEC 2.6.1におけるアミノトランスフェラーゼを含む、請求項104記載の方法。

【請求項 106】

EC 2.6.1におけるアミノ酸アミノトランスフェラーゼが、EC 2.6.1.21；EC 2.6.1.39；EC 2.6.1.42；またはEC 2.6.1.67を含む、請求項105記載の方法。

【請求項 107】

1つまたは複数の酵素がカルボニルレダクターゼを含む、請求項20または73記載の方法。

【請求項 108】

カルボニルレダクターゼが、EC.1.1.1.184、EC 1.1.1.79、EC 1.1.1.B3；EC 1.1.1.B4；またはEC 1.1.99.2.もしくはEC 1.1.99.6由来の2-ヒドロキシグルタルイルデヒドロゲナーゼ（dehydrogenase）／ α ケトグルタル酸（ketoglutarate）レダクターゼを含む、請求項107記載の方法。

【請求項 109】

酵素が α -ケト酸デカルボキシラーゼまたはアセト乳酸シンターゼを含む、請求項47または51記載の方法。

【請求項 110】

酵素が、脂肪-アシル-CoAレダクターゼまたは脂肪-アシル-[acp]レダクターゼまたはア

10

20

30

40

50

ルデヒドデヒドロゲナーゼを含む、請求項56、61または80記載の方法。

【請求項111】

脂肪-アシル-CoAレダクターゼ、脂肪-アシル-[acp]レダクターゼまたはアルデヒドデヒドロゲナーゼが、EC 1.2.1におけるレダクターゼである、請求項110記載の方法。

【請求項112】

EC 1.2.1における脂肪-アシル-CoAレダクターゼ脂肪-アシル-[acp]レダクターゼまたはアルデヒドデヒドロゲナーゼが、EC 1.2.1.3；EC 1.2.1.4；EC 1.2.1.20；EC 1.2.1.22；EC 1.2.1.50；EC 1.2.1.57；EC 1.2.1.63；またはEC 1.2.1.76を含む、請求項111記載の方法。

【請求項113】

酵素がアルデヒドデヒドロゲナーゼ、カルボン酸レダクターゼまたは非アシル化アルデヒドデヒドロゲナーゼを含む、請求項9、15、28、35、43、49、55、59、64および71のいずれか一項記載の方法。

【請求項114】

アルデヒドデヒドロゲナーゼがEC 1.2.1を含み、カルボン酸レダクターゼまたは非アシル化アルデヒドデヒドロゲナーゼが、EC 1.2.99におけるカルボン酸レダクターゼ、またはThnGなどの非アシル化アルデヒドデヒドロゲナーゼを含む、請求項113記載の方法。

【請求項115】

EC 1.2.1におけるアルデヒドデヒドロゲナーゼがEC 1.2.1.3、EC 1.2.1.4またはEC 1.2.1.63を含み、カルボン酸レダクターゼがEC 1.2.99.6を含み、かつ、非アシル化アルデヒドデヒドロゲナーゼがスフィンゴモナス属種またはカプリアビダス属種由来のThnGを含む、請求項114記載の方法。

【請求項116】

酵素がCoAトランスフェラーゼまたは酸-チオールリガーゼを含む、請求項11、21および37のいずれか一項記載の方法。

【請求項117】

CoAトランスフェラーゼがEC 2.8.3におけるCoAトランスフェラーゼを含み、酸チオールリガーゼがEC 6.2.1を含む、請求項116記載の方法。

【請求項118】

EC 2.8.3におけるCoAトランスフェラーゼが、EC 2.8.3.12；EC 2.8.3.13もしくはEC 2.8.3.14またはThnHの遺伝子産物を含み、EC 6.2.1における酸-チオールリガーゼがEC 6.2.1.3；EC 6.2.1.5；EC 6.2.1.14；およびEC 6.2.1.23を含む、請求項117記載の方法。

【請求項119】

酵素が、EC 3.5.2、例えば3.5.2.11などにおけるアミドヒドロラーゼである、請求項8、16、27、34、42、48、53、58、63および70のいずれか一項記載の方法。

【請求項120】

酵素がヒドロリアーゼを含む、請求項22または30記載の方法。

【請求項121】

ヒドロリアーゼがEC 4.2.1におけるヒドロリアーゼを含む、請求項120記載の方法。

【請求項122】

EC 4.2.1におけるヒドロリアーゼが、EC 4.2.1.2；EC 4.2.1.59；4.2.1.61；4.1.2.17または4.1.2.18を含む、請求項121記載の方法。

【請求項123】

α -ケト酸鎖伸長が、AksA、AksD、AksEおよびAksFを含む酵素のセットのうち1つまたは複数によって触媒される、請求項45、74、76および77のいずれか一項記載の方法。

【請求項124】

AksAがEC 2.3.3におけるAksA酵素を含む、請求項123記載の方法。

【請求項125】

EC 2.3.3におけるAksA酵素が、EC 2.3.3.13または2.3.3.14を含む、請求項124記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 2 6】

AksDおよびAks Eがいずれも、EC 4.2.1.114におけるAksD/E酵素を含む、請求項123記載の方法。

【請求項 1 2 7】

AksDがEC 4.2.1.114における酵素を含み、Aks EがEC 4.2.1.36における酵素を含む、請求項123記載の方法。

【請求項 1 2 8】

AksFがEC 1.1.1におけるAksF酵素を含む、請求項123記載の方法。

【請求項 1 2 9】

EC 1.1.1.におけるAksF酵素がEC 1.1.1.87を含む、請求項128記載の方法。

10

【請求項 1 3 0】

α -ケト酸鎖伸長酵素の1つまたは複数がメタン生成細菌に由来する、請求項45、74、76および77のいずれか一項記載の方法。

【請求項 1 3 1】

酵素がアルコールデヒドロゲナーゼまたはアルデヒドレダクターゼを含む、請求項81記載の方法。

【請求項 1 3 2】

アルコールデヒドロゲナーゼがEC 1.1.1.1、EC 1.1.1.2またはEC 1.1.1.21を含む、請求項131記載の方法。

【請求項 1 3 3】

20

アルコールデヒドロゲナーゼが、ザイモモナス・モビリス (*Zymomonas mobilis*) 由来のadhA、ザイモモナス・モビリス由来のadhB、クロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) 由来のブタノールデヒドロゲナーゼ、サッカロミセス (*Saccharomyces*) ADHIV、およびS.セレビシエ (*S.cerevisiae*) 由来のADH6から選択される、請求項131記載の方法。

【請求項 1 3 4】

PCoAまたはPACPがアセチル-CoAまたはベンゾイル-CoAから誘導される、請求項67または80記載の方法。

【請求項 1 3 5】

アセチル-CoAが、セルロース系原材料、糖類、グリセロール、または脂肪酸を含む再生可能な原材料から誘導される、請求項134記載の方法。

30

【請求項 1 3 6】

アセチル-CoAがSynGas、メタンまたはメタノールから誘導される、請求項134記載の方法。

【請求項 1 3 7】

ベンゾイル-CoAが多環式芳香族炭化水素から誘導される、請求項134記載の方法。

【請求項 1 3 8】

2,6 DAPが、ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼを欠くりジン産生生物によって生産される、請求項1、2および79のいずれか一項記載の方法。

【請求項 1 3 9】

40

2,6 DAPが再生可能な原材料から誘導される、請求項1、2、79および138のいずれか一項記載の方法。

【請求項 1 4 0】

再生可能な原材料が糖類を含む、請求項139記載の方法。

【請求項 1 4 1】

生体誘導 (bioderived) ナイロン-7、ナイロン-7,xまたはナイロン-x,7。

【請求項 1 4 2】

PASまたはAASから誘導される7 AHAを重合させる段階を含む工程によって生産されるナイロン-7。

【請求項 1 4 3】

50

PAおよび1,7 DHAを重合させる段階を含む工程によって生産されるナイロン-7,7であって、PAがPCoA、PACP、または2 HDAから誘導され、1,7 DHAが7 AHAから誘導される、ナイロン-7,7。

【請求項 1 4 4】

- (i) 請求項2～7；
- (ii) 請求項2～4および11～15；
- (iii) 請求項2～4および19～26；
- (iv) 請求項2～4、19～20および30～33；
- (v) 請求項2～4、19～20、30および37～41；
- (vi) 請求項2～4、19および45～47；
- (vii) 請求項2～4、19、45および51～52；
- (viii) 請求項2～4、19～23および56～57；
- (ix) 請求項2～4、19～20、30、37～38および61～62；
- (x) 請求項67～69；
- (xi) 請求項73～75；
- (xii) 請求項76～77；
- (xiii) 請求項78～79；または
- (xiv) 請求項80、

10

の方法段階を含む方法によって作製される7 AHAを重合させる工程によって生産されるナイロン-7。

20

【請求項 1 4 5】

1,7 DHAが以下の方法段階：

- (a) 請求項2～7および9～10；
- (b) 請求項2～4、11～15および17～18；
- (c) 請求項2～4、19～26および28～29；
- (d) 請求項2～4、19～20、30～33および35～36；
- (e) 請求項2～4、19～20、37～41および43～44；
- (f) 請求項2～4、19、45～47および49～50；
- (g) 請求項2～4、19、45、51～52および54～55；
- (h) 請求項2～4、19～23および56～60；
- (i) 請求項2～4、19～20、37～38および61～65；
- (j) 請求項67～69および71～72；
- (k) 請求項73～75；
- (l) 請求項76～77；
- (m) 請求項78～79；または
- (n) 請求項80、

30

を含む方法によって作製され、かつ

PAが以下の方法段階：

- (o) 請求項2～5；
- (p) 請求項2～4および11～13；
- (q) 請求項2～4および19～24；
- (r) 請求項2～4、19～20および30～31；
- (s) 請求項2～4、19～20、30および37～39；
- (t) 請求項67；または
- (u) 請求項73～75、

40

を含む方法によって作製される、1,7 DHAおよびPAを重合させる段階を含む工程によって生産されるナイロン7,7。

【請求項 1 4 6】

宿主細胞の実質的に純粋な培養物であって、そのうちの実質的な数が、7 AHA；PA；1,7 DAH；ENTL；および7 HHAから選択される1つまたは複数のポリマー単量体の生合成に関与

50

する1つまたは複数の酵素をコードする1つまたは複数の外因性核酸を含み、酵素が、アンモニアリアーゼ、エン酸レダクターゼ、カルボン酸レダクターゼ、 ω -トランスアミナーゼ、チオエステラーゼ、酸-チオールリガーゼまたはCoAシンテターゼ (synthtase)、CoAトランスフェラーゼ、アシル-[acp]チオエステラーゼ、アシル-[acp]シンテターゼ、アミノ酸アミノトランスフェラーゼ、脱アミノ基デヒドロゲナーゼ、カルボニルレダクターゼ、 α -ケト酸デカルボキシラーゼ、アセト乳酸シンターゼ、 α -アミノ酸デカルボキシラーゼ、脂肪-アシル-CoAレダクターゼ、アシル-[acp]-レダクターゼ、アルデヒドデヒドロゲナーゼ、アルデヒドオキシダーゼ、アミドヒドロラーゼ、ヒドロリアーゼ、および α -ケト酸鎖伸長を触媒する酵素からなる群より選択される、宿主細胞の実質的に純粋な培養物。

10

【請求項 1 4 7】

細胞が原核細胞である、請求項146記載の培養物。

【請求項 1 4 8】

原核細胞が、大腸菌 (*Escherichia coli*) 種などの大腸菌属 (*Escherichia*) ; クロストリジウム・ルジュングダーリイ (*Clostridium ljungdahlii*)、クロストリジウム・オートエタノゲヌム (*Clostridium autoethanogenum*) またはクロストリジウム・クルイベリ (*Clostridium kluyveri*) 種などのクロストリジウム属 (*Clostridia*) ; コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) 種などのコリネバクテリウム属 (*Corynebacteria*) ; カプリアビダス・ネカトル (*Cupriavidus necator*) またはカプリアビダス・メタリデュランス (*Cupriavidus metallidurans*) 種などのカプリアビダス属 (*Cupriavidus*) ; シュードモナス・フルオレセンス (*Pseudomonas fluorescens*)、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) またはシュードモナス・オレオボランス (*Pseudomonas oleovorans*) 種などのシュードモナス属 (*Pseudomonas*) ; デルフチア・アシドボランス (*Delftia acidovorans*) 種などのデルフチア属 (*Delftia*) ; 枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 種などのバシラス属 (*Bacillus*) ; デルブリュッキ菌 (*Lactobacillus delbrueckii*) などのラクトバシラス属 (*Lactobacillus*) ; ならびに、ラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) 種などのラクトコッカス属 (*Lactococcus*) からなる群より選択される、請求項147記載の培養物。

20

【請求項 1 4 9】

細胞が真核細胞である、請求項146記載の培養物。

30

【請求項 1 5 0】

真核細胞が、以下のものからなる群より選択される、請求項149記載の培養物：クロコウジカビ (*Aspergillus niger*) 種などのアスペルギルス属 (*Aspergillus*) ; サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 種などのサッカロミセス属 (*Saccharomyces*) ; C.トロピカリス (*C. tropicalis*)、C.アルビカンス (*C. albicans*)、C.クロアカエ (*C. cloacae*)、C.グイリエルモンディイ (*C. guillermondii*)、C.インターメディア (*C. intermedia*)、C.マルトサ (*C. maltosa*)、C.パラプシロシス (*C. parapsilosis*) またはC.ゼイレノイデス (*C. zeylenoides*) 種などのカンジダ属 (*Candida*) ; ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) 種などのピキア属 (*Pichia*) ; ヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 種などのヤロウイア属 (*Yarrowia*) ; イサタケンキア・オリエンタリス (*Issathenkia orientalis*) 種などのイサタケンキア属 (*Issatchenkia*) ; デバリオミセス・ハンセニイ (*Debaryomyces hansenii*) 種などのデバリオミセス属 (*Debaryomyces*) ; アークスラ・アデニニボランス (*Arxula adeninivorans*) 種などのアークスラ属 (*Arxula*) ; クルイベロミセス・ラクティス (*Kluyveromyces lactis*) 種などのクルイベロミセス属 (*Kluyveromyces*) ; エクソフィアラ属 (*Exophiala*) ; ケカビ属 (*Mucor*) ; トリコデルマ属 (*Trichoderma*) ; クラドスポリウム属 (*Cladosporium*) ; ファネロケーテ属 (*Phanerochaete*) ; クラドフィアロフォラ属 (*Cladophiala*) ; ペシロミセス属 (*Paecilomyces*) ; スケドスポリウム属 (*Scedosporium*) ; およびオフィオストマ属 (*Ophiostoma*) 。

40

【請求項 1 5 1】

50

アンモニアリアーゼがEC 4.3.1におけるアンモニアリアーゼを含む、請求項146記載の培養物。

【請求項 1 5 2】

EC 4.3.1におけるアンモニアリアーゼが、EC 4.3.1.1；EC 4.3.1.2；EC 4.3.1.3；EC 4.3.1.9；EC 4.3.1.12；EC 4.3.1.13；EC 4.1.3.14；EC 4.1.3.23またはEC 4.3.1.24を含む、請求項151記載の培養物。

【請求項 1 5 3】

エン酸レダクターゼがEC 1.3.1におけるエン酸レダクターゼを含む、請求項146記載の培養物。

【請求項 1 5 4】

10

エン酸レダクターゼが以下のものである、請求項153記載の培養物：

(a) EC 1.3.1におけるものであり、EC 1.3.1.8；EC 1.3.1.9；EC 1.3.1.10、EC 1.3.1.31；EC 1.3.1.38；EC 1.3.1.39；EC 1.3.1.44；もしくはEC 1.3.1.62におけるピメロイル-CoAデヒドロゲナーゼ、例えばPimC／PimDもしくはThnJ／ThnKなどを含む；または

(b) EC 1.3、例えばEC 1.3.8.1；EC 1.3.99.3；EC 1.3.99.B10におけるもの、もしくはシントロファス・アシディトロフィカス (*Syntrophus aciditrophicus*) 2,3-ジデヒドロピメリル-CoAレダクターゼおよびそれらのホモログ。

【請求項 1 5 5】

カルボン酸レダクターゼが、EC 1.2.99におけるカルボン酸レダクターゼ、または非アシル化アルデヒドデヒドロゲナーゼを含む、請求項146記載の培養物。

20

【請求項 1 5 6】

EC 1.2.99におけるカルボン酸レダクターゼがEC 1.2.99.6を含み、非アシル化アルデヒドデヒドロゲナーゼが、スフィンゴモナスにおけるスフィンゴモナス (*Spingomonas*) およびカプリアビダス属種に由来するThnG、またはそれらのホモログを含む、請求項155記載の培養物。

【請求項 1 5 7】

ω-トランスアミナーゼがEC 2.6.1におけるトランスアミナーゼを含む、請求項156記載の培養物。

【請求項 1 5 8】

EC 2.6.1におけるω-トランスアミナーゼが、EC 2.6.1.18；EC 2.6.1.19；EC 2.6.1.1；EC 2.6.1.13；EC 2.6.1.39；EC 2.6.1.48；EC 2.6.1.48；またはEC 2.6.1.62を含む、請求項157記載の培養物。

30

【請求項 1 5 9】

チオエステラーゼがEC 3.1.2におけるチオエステラーゼを含む、請求項146記載の培養物。

【請求項 1 6 0】

EC 3.1.2におけるチオエステラーゼが、EC 3.1.2.18；EC 3.1.2.19；もしくはEC 3.1.2.20由来のCoA-チオエステルに対して作用するチオエステラーゼ；YciA、tesBもしくはAco t13の遺伝子産物；またはEC 3.1.2.14およびEC 3.1.2.21由来の[acp]-チオエステルに対して作用するチオエステラーゼを含む、請求項159記載の培養物。

40

【請求項 1 6 1】

酸-チオールリガーゼがEC 6.2.1における酸-チオールリガーゼを含む、請求項146記載の培養物。

【請求項 1 6 2】

EC 6.2.1における酸-チオールリガーゼが、EC 6.2.1.3；EC 6.2.1.14；またはEC 6.2.1.23由来のCoAエステルに対して作用するCoAシンテターゼ、ならびにEC 6.2.1.14 (*BioW*など) およびEC 6.2.1.20におけるアシル-[acp]-シンテターゼを含む、請求項161記載の培養物。

【請求項 1 6 3】

CoAトランスフェラーゼが、EC 2.8.3におけるCoAトランスフェラーゼまたはThnHの遺伝

50

子産物およびそれらのホモログを含む、請求項146記載の培養物。

【請求項164】

EC 2.8.3におけるCoAトランスフェラーゼが、EC 2.8.3.12；EC 2.8.3.13；EC 2.8.3.14；またはThnHの遺伝子産物を含む、請求項163記載の培養物。

【請求項165】

アミノ酸アミノトランスフェラーゼがEC 2.6.1におけるアミノトランスフェラーゼを含む、請求項146記載の培養物。

【請求項166】

EC 2.6.1におけるアミノ酸アミノトランスフェラーゼが、EC 2.6.1.21；EC 2.6.1.39；EC 2.6.1.42；またはEC 2.6.1.67を含む、請求項165記載の培養物。

10

【請求項167】

カルボニルレダクターゼが、EC.1.1.1.184；EC 1.1.1.79；EC 1.1.1.B3；EC 1.1.1.B4、またはEC 1.1.99.2.もしくはEC 1.1.99.6由来の2-ヒドロキシグルタリルデヒドロゲナーゼ／ α ケトグルタル酸 (ketoglutarate) レダクターゼを含む、請求項146記載の培養物。

【請求項168】

脂肪-アシル-CoAレダクターゼ、脂肪-アシル-[acp]レダクターゼまたはアルデヒドデヒドロゲナーゼが、EC 1.2.1におけるレダクターゼを含む、請求項146記載の培養物。

【請求項169】

EC 1.2.1における脂肪-アシル-CoAレダクターゼ、脂肪-アシル-[acp]レダクターゼまたはアルデヒドデヒドロゲナーゼが、EC 1.2.1.3；EC 1.2.1.4；EC 1.2.1.20；EC 1.2.1.22；EC 1.2.1.50；EC 1.2.1.57；EC 1.2.1.63；またはEC 1.2.1.76.を含む、請求項168記載の培養物。

20

【請求項170】

アルデヒドデヒドロゲナーゼが、EC 1.2.1におけるアルデヒドデヒドロゲナーゼを含む、請求項146記載の培養物。

【請求項171】

EC 1.2.1におけるアルデヒドデヒドロゲナーゼがEC 1.2.1.3；EC 1.2.1.4またはEC 1.2.1.63を含む、請求項170記載の培養物。

【請求項172】

ヒドロリアーゼが、EC 4.2.1におけるヒドロリアーゼを含む、請求項146記載の培養物。

30

【請求項173】

EC 4.2.1におけるヒドロリアーゼが、EC 4.2.1.2；EC 4.2.1.59；EC 4.2.1.61；EC 4.1.2.17またはE.C. 4.1.2.18を含む、請求項172記載の培養物。

【請求項174】

α -ケト酸鎖伸長を触媒する酵素が、AksA、AksD、AksEおよびAksF酵素を含む酵素のセットから選択される1つまたは複数の酵素を含む、請求項146記載の培養物。

【請求項175】

AksAがEC 2.3.3におけるAksA酵素を含む、請求項174記載の培養物。

40

【請求項176】

EC 2.3.3におけるAksA酵素が、EC 2.3.3.13またはE.C. 2.3.3.14を含む、請求項175記載の培養物。

【請求項177】

AksDおよびAks Eがいずれも、EC 4.2.1.114におけるAksD／E酵素を含む、請求項174記載の培養物。

【請求項178】

EC 4.2.1におけるAksD酵素がEC 4.2.1.36を含む、請求項177記載の培養物。

【請求項179】

AksFがEC 1.1.1におけるAksF酵素を含む、請求項174記載の培養物。

50

【請求項 180】

EC 1.1.1.におけるAksF酵素がEC 1.1.1.87を含む、請求項179記載の培養物。

【請求項 181】

アルコールデヒドロゲナーゼがEC 1.1.1.1またはEC 1.1.1.2またはEC 1.1.1.21を含む、請求項146記載の培養物。

【請求項 182】

アルコールデヒドロゲナーゼが、ザイモモナス・モビリス由来のadhA、ザイモモナス・モビリス由来のadhB、クロストリジウム・アセトブチリカム由来のブタノールデヒドロゲナーゼ、サッカロミセスADHIV、およびS.セレビスエ由来のADH6から選択される、請求項146記載の培養物。

【請求項 183】

7 AHA ; PA ; 1,7 DAH ; ENTL ; および7 HHAから選択される1つまたは複数のポリマー単量体の生合成に参与する1つまたは複数の外因性核酸をコードする1つまたは複数の外因性核酸を含む単離された細胞であって、酵素が、アンモニアリアーゼ、エン酸レダクターゼ、カルボン酸レダクターゼ、 ω -トランスアミナーゼ、チオエステラーゼ、酸-チオールリガーゼまたはCoAシンテターゼ (synthtase)、CoAトランスフェラーゼ、アシル-[acp]チオエステラーゼ、アシル-[acp]シンテターゼ、アミノ酸アミノトランスフェラーゼ、脱アミノ基デヒドロゲナーゼ、カルボニルレダクターゼ、 α -ケト酸デカルボキシラーゼ、アセト乳酸シンターゼ、 α -アミノ酸デカルボキシラーゼ、脂肪-アシル-CoAレダクターゼ、アシル-[acp]-レダクターゼ、アルデヒドデヒドロゲナーゼ、アルデヒドオキシダーゼ、アミドヒドロラーゼ、ヒドロリアーゼおよび α -ケト酸鎖伸長を触媒する酵素からなる群より選択される、単離された細胞。

【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、2011年6月30日出願の米国特許仮出願第61/503,043号；すべて2011年12月21日出願の米国特許仮出願第61/578,265号、同第61/578,272号、および同第61/578,289号；ならびに2012年6月29日出願の国際出願PCT/US2012/44984の恩典を主張するものであり、これらはすべてその全体が、本明細書中に完全に明記されているかのごとくに参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

発明の分野

本発明の態様は、1つまたは複数の単離された酵素の存在下または1つまたは複数の酵素を発現する組換え宿主細胞の存在下で二官能性または三官能性C7アルカンを生合成生産するための方法に関する。二官能性または三官能性C7アルカンは、例えばナイロン-7、ナイロン-7,xおよび/またはナイロン-x,7の生産における中間体として有用である。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

化学工業による持続可能な活動の推進は、エネルギー使用量を減少させること、原料を再利用すること、および物品の生産の間に生成される副産物を低減することに焦点が置かれている。しかし、化学工業は基本的な原材料として石油と天然ガスに強く依存する。主要な石油化学工程に関連した最適化の状態を考慮すると、エネルギー、排出物、およびコストを現在のレベルより低く抑えるためには原材料の使用および製造設計における大幅な変更が必要である。バイオテクノロジーは、植物由来の糖類のような再生可能な炭水化物、または脂肪酸のような他の再生可能な原材料からの工業化学中間体および最終産物の生産のための新たなアプローチを提供する。加えて、バイオテクノロジーはまた、バイオディーゼル生産からのグリセロールのような廃棄物もしくは価値の低い一連の物質を利用する方法、またはベンゼン、トルエンおよび多環式芳香族炭化水素 (PAH) などの石油化学

由来の原材料を、既存の化学工程よりも環境に対して有害でないバイオプロセスにおける有用な生成物に変換する方法も提供する。

【0004】

米国特許第2010/0203600号（特許文献1）および国際公開公報第2011/031147号（特許文献2）は、それらの全体が参照により本明細書に組み入れられる。特に様々な再生可能および非再生可能な原材料からナイロン-7、ナイロン-7,x、ナイロン-x,7およびポリエステル化学中間体ならびに最終産物としてのナイロン-7、ナイロン-7,x、ナイロン-x,7およびポリエステルを導くコスト効率のよい生合成経路が当技術分野において必要とされている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】米国特許第2010/0203600号

【特許文献2】国際公開公報第2011/031147号

【発明の概要】

【0006】

本開示は、少なくとも一部には、ナイロン-7、ナイロン-x,7、ナイロン-7,xおよびポリエステルを生産するのに有用な中間体（単量体）である二官能性または三官能性C7アルカンを生合成するための酵素系および組換え宿主の開発に基づく。特に、本明細書で述べるように、ナイロン-7、ナイロン-7,x、ナイロン-x,7およびポリエステルの生産において有用な中間体は、植物由来の糖類およびグリセロールなどの再生可能な原材料から、またはベンゼンもしくはシクロヘキサンカルボキシレートなどの石油化学由来の原材料から生合成によって生成することができる。一部の態様では、二官能性または三官能性C7アルカンの生成は、最終的には共通の中間体であるピメリン酸セミアルデヒド（7-オキシヘプタノエートとしても知られる）を介して進行するが、ピメリン酸セミアルデヒドを生成するために使用できる多数の異なる原材料および多数の方法が存在する。図1は、様々な二官能性C7アルカンへのピメリン酸セミアルデヒドの生物転換を示す概略図である。

【0007】

例えば、ピメリン酸セミアルデヒドは、ピメロイル-補酵素A（CoA）、ピメロイル- [アシルキャリアータンパク質（acp）]、ピメリン酸（ヘプタン1,7-ジオエートとしても知られる）または α -ケトスベレートから誘導することができる。本明細書で述べるように、ピメロイルCoA、ピメロイル- [acp]、およびピメリン酸セミアルデヒドは、天然の代謝経路における中間体としてピメロイルCoA、ピメロイル- [acp]、またはピメリン酸セミアルデヒドを形成する多数の様々な天然の代謝経路を含む、多数の供給源から誘導することができる。

【0008】

加えて、ピメロイルCoAおよびピメリン酸はまた、対応するエノエート2-ヘプテン二酸またはその対応するCoAエステルである2ヘプテンジオイルCoAから誘導することもできる。一部の態様では、これらのC7 2-エノエートはD,L-ジアミノピメレートまたは2-オキシピメレートから誘導される。一部の態様では、二官能性C7アルカン（例えば7アミノヘプタン酸）の生成は α -ケトスベレートまたは α -アミノスベレートを介して進行し、これらはD,L-ジアミノピメレートから誘導することができる。他の態様では、 α -ケトスベレートまたは α -アミノスベレートは α -ケトピメレートから誘導される。

【0009】

より具体的には、本明細書は、ナイロン-7、ナイロン-7,7およびポリエステルの製造に有用な中間体を生産するために化合物を変換する様々な方法を提供する。任意の1つの方法のすべての可能な段階を実施する必要はなく、所望化合物が得られたときに方法のいずれかを終了することができる。したがって、例えばピメリン酸、7-アミノヘプタン酸、エナントラクタム、1,7-ジアミノヘプタンまたは7-ヒドロキシヘプタン酸の生成後に任意の方法を終了することができる。

10

20

30

40

50

【0010】

化合物を変換する第1の方法は、2,6ジアミノピメレート（2,6 DAP）および α -アミノピメレート（AAP）から選択される化合物を、6-アミノ-2-ヘプテン二酸（6A2HA）または2-ヘプテン二酸（2 HDA）が生成されるように、2,6 DAPの6A2HAへの還元的脱アミノ化またはAAPの2 HDAへの還元的脱アミノ化を触媒する酵素と接触させる段階を含み得る。

【0011】

化合物は2,6 DAPであってよく、第1の方法は、6A2HAを、AAPが生成されるように、6A2HAのAAPへのエノエート還元を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み得る。

【0012】

AAPを、2 HDAが生成されるように、AAPの2 HDAへの還元的脱アミノ化を触媒する酵素と接触させることができる。

10

【0013】

2 HDAを、ピメリン酸（PA）が生成されるように、2 HDAのPAへのエノエート還元を触媒する酵素と接触させることができる。

【0014】

PAを、ピメリン酸セミアルデヒド（PAS）が生成されるように、PAのPASへのカルボン酸還元を触媒する酵素と接触させることができる。

【0015】

PASを、7-アミノヘプタン酸（7 AHA）が生成されるように、PASの7 AHAへのセミアルデヒドアミノ化を触媒する酵素と接触させることができる。

20

【0016】

7 AHAを、エナントラクタム（ENTL）が生成されるように、7 AHAのENTLへのアミド加水分解を触媒する酵素と接触させることができる。

【0017】

化合物を変換する第2の方法は、7 AHAの生成までの第1の方法のすべての段階を実施した後、7 AHAを、7-アミノヘプタナール（7 AHT）が生成されるように、7 AHAの7 AHTへのアルデヒド脱水素化を触媒する酵素と接触させる段階を含み得る。

【0018】

7 AHTを、1,7-ジアミノヘプタン（1,7 DAH）が生成されるように、1,7 DAHを生成するための7 AHTへのアミノ基の転移を触媒する酵素と接触させることができる。

30

【0019】

化合物を変換する第3の方法は、2 HDAの生成までの第1の方法のすべての段階を実施した後、2 HDAを、2-ヘプテン二酸-補酵素A（2 HDA-CoA）が生成されるように、2 HDA-CoAを生成するための2 HDAへの補酵素A（CoA）の転移を触媒する酵素と接触させる段階を含み得る。

【0020】

2 HDA-CoAを、ピメロイルCoA（PCoA）が生成されるように、2 HDA-CoAのPCoAへのエノエート還元を触媒する酵素と接触させることができる。

【0021】

PCoAを、PAが生成されるように、PCoAのPAへのチオエステル加水分解を触媒する酵素と接触させることができる。

40

【0022】

PAを、PASが生成されるように、PAのPASへのカルボン酸還元を触媒する酵素と接触させることができる。

【0023】

PASを、7 AHAが生成されるように、PASの7 AHAへのセミアルデヒドアミノ化を触媒する酵素と接触させることができる。

【0024】

7 AHAを、ENTLが生成されるように、7 AHAのENTLへのアミド加水分解を触媒する酵素と接触させることができる。

50

【0025】

化合物を変換する第4の方法は、7 AHAの生成までの第3の方法のすべての段階を実施した後、7 AHAを、7 AHTが生成されるように、7 AHAの7 AHTへのアルデヒド脱水素化を触媒する酵素と接触させる段階を含み得る。

【0026】

7 AHTを、1,7 DAHが生成されるように、1,7 DAHを生成するための7 AHTへのアミノ基の転移を触媒する酵素と接触させることができる。

【0027】

化合物を変換する第5の方法は、AAPの生成までの第1の方法のすべての段階を実施した後、AAPを、 α -ケトピメレート (AKP) が生成されるように、AKPを生成するためのAAPへのアミノ基の転移を触媒する酵素と接触させる段階を含み得る。

10

【0028】

AKPを、 α -ヒドロキシピメレート (AHP) が生成されるように、AKPのAHPへのケトン還元を触媒する1つまたは複数の酵素と接触させることができる。

【0029】

AHPを、 α -ヒドロキシピメレートCoA (AHP-CoA) が生成されるように、AHP-CoAを生成するためのAHPへのCoAの転移を触媒する酵素と接触させることができる。

【0030】

AHP-CoAを、2 HDA-CoAが生成されるように、AHP-CoAの2 HDA-CoAへの脱水を触媒する酵素と接触させることができる。

20

【0031】

2 HDA-CoAを、PCoAが生成されるように、2 HDA-CoAのPCoAへのエノエート還元を触媒する酵素と接触させることができる。

【0032】

PCoAを、PAが生成されるように、PCoAのPAへのチオエステル加水分解を触媒する酵素と接触させることができる。

【0033】

PAを、PASが生成されるように、PAのPASへのカルボン酸還元を触媒する酵素と接触させることができる。

【0034】

PASを、7 AHAが生成されるように、PASの7 AHAへのセミアルデヒドアミノ化を触媒する酵素と接触させることができる。

30

【0035】

7 AHAを、ENTLが生成されるように、7 AHAのENTLへのアミド加水分解を触媒する酵素と接触させることができる。

【0036】

化合物を変換する第6の方法は、7 AHAの生成までの第5の方法のすべての段階を実施した後、7 AHAを、7 AHTが生成されるように、7 AHAの7 AHTへのアルデヒド脱水素化を触媒する酵素と接触させる段階を含み得る。

【0037】

7 AHTを、1,7 DAHが生成されるように、1,7 DAHを生成するための7 AHTへのアミノ基の転移を触媒する酵素と接触させることができる。

40

【0038】

化合物を変換する第7の方法は、AHPの生成までの第5の方法のすべての段階を実施した後、AHPを、2 HDAが生成されるように、AHPの2 HDAへの脱水を触媒する酵素と接触させる段階を含み得る。

【0039】

2 HDAを、ピメリン酸 (PA) が生成されるように、2 HDAのPAへのエノエート還元を触媒する酵素と接触させることができる。

【0040】

50

PAを、PASが生成されるように、PAのPASへのカルボン酸還元を触媒する酵素と接触させることができる。

【0041】

PASを、7 AHAが生成されるように、PASの7 AHAへのセミアルデヒドアミノ化を触媒する酵素と接触させることができる。

【0042】

7 AHAを、ENTLが生成されるように、7 AHAのENTLへのアミド加水分解を触媒する酵素と接触させることができる。

【0043】

化合物を変換する第8の方法は、7 AHAの生成までの第5の方法のすべての段階を実施した後、7 AHAを、7 AHTが生成されるように、7 AHAの7 AHTへのアルデヒド脱水素化を触媒する酵素と接触させる段階を含み得る。

10

【0044】

7 AHTを、1,7 DAHが生成されるように、1,7 DAHを生成するための7 AHTへのアミノ基の転移を触媒する酵素と接触させることができる。

【0045】

化合物を変換する第9の方法は、2 HDAの生成までの第7の方法のすべての段階を実施した後、2 HDAを、2 HDA-CoAが生成されるように、2 HDA-CoAを生成するための2 HDAへのCoAの転移を触媒する酵素と接触させる段階を含み得る。

【0046】

2 HDA-CoAを、PCoAが生成されるように、2 HDA-CoAのPCoAへのエノエート還元を触媒する酵素と接触させることができる。

20

【0047】

PCoAを、PAが生成されるように、PCoAのPAへのチオエステル加水分解を触媒する酵素と接触させることができる。

【0048】

PAを、PASが生成されるように、PAのPASへのカルボン酸還元を触媒する酵素と接触させることができる。

【0049】

PASを、7 AHAが生成されるように、PASの7 AHAへのセミアルデヒドアミノ化を触媒する酵素と接触させることができる。

30

【0050】

7 AHAを、ENTLが生成されるように、7 AHAのENTLへのアミド加水分解を触媒する酵素と接触させることができる。

【0051】

化合物を変換する第10の方法は、7 AHAの生成までの第9の方法のすべての段階を実施した後、7 AHAを、7 AHTが生成されるように、7 AHAの7 AHTへのアルデヒド脱水素化を触媒する酵素と接触させる段階を含み得る。

【0052】

7 AHTを、1,7 DAHが生成されるように、1,7 DAHを生成するための7 AHTへのアミノ基の転移を触媒する酵素と接触させることができる。

40

【0053】

化合物を変換する第11の方法は、AKPの生成までの第5の方法のすべての段階を実施した後、AKPを、 α -ケトスベレート (AKS) が生成されるように、AKPのAKSへの α -ケト酸鎖伸長を触媒する酵素と接触させる段階を含み得る。

【0054】

AKSを、 α -アミノスベレート (AAS) が生成されるように、AASを生成するためのAKSへのアミノ基の転移を触媒する酵素と接触させることができる。AASを、7 AHAが生成されるように、AASの7 AHAへの α -アミノ酸脱カルボキシル化を触媒する酵素と接触させることができる。

50

【0055】

7 AHAを、ENTLが生成されるように、7 AHAのENTLへのアミド加水分解を触媒する酵素と接触させることができる。

【0056】

化合物を変換する第12の方法は、7 AHAの生成までの第11の方法のすべての段階を実施した後、7 AHAを、7 AHTが生成されるように、7 AHAの7 AHTへのアルデヒド脱水素化を触媒する酵素と接触させる段階を含み得る。

【0057】

7 AHTを、1,7 DAHが生成されるように、1,7 DAHを生成するための7 AHTへのアミノ基の転移を触媒する酵素と接触させることができる。

10

【0058】

化合物を変換する第13の方法は、AKSの生成までの第11の方法のすべての段階を実施した後、AKSを、PASが生成されるように、AKSのPASへの α -ケト酸脱カルボキシル化を触媒する酵素と接触させる段階を含み得る。

【0059】

PASを、7 AHAが生成されるように、PASの7 AHAへのセミアルデヒドアミノ化を触媒する酵素と接触させることができる。

【0060】

7 AHAを、ENTLが生成されるように、7 AHAのENTLへのアミド加水分解を触媒する酵素と接触させることができる。

20

【0061】

化合物を変換する第14の方法は、7 AHAの生成までの第13の方法のすべての段階を実施した後、7 AHAを、7 AHTが生成されるように、7 AHAの7 AHTへのアルデヒド脱水素化を触媒する酵素と接触させる段階を含み得る。

【0062】

7 AHTを、1,7 DAHが生成されるように、1,7 DAHを生成するための7 AHTへのアミノ基の転移を触媒する酵素と接触させることができる。

【0063】

化合物を変換する第15の方法は、PCoAの生成までの第5の方法のすべての段階を実施した後、PCoAを、PASが生成されるように、PCoAのPASへの還元を触媒する酵素と接触させる段階を含み得る。

30

【0064】

PASを、7 AHAが生成されるように、PASの7 AHAへのセミアルデヒドアミノ化を触媒する酵素と接触させることができる。

【0065】

7 AHAを、ENTLが生成されるように、7 AHAのENTLへのアミド加水分解を触媒する酵素と接触させることができる。

【0066】

化合物を変換する第16の方法は、7 AHAの生成までの第15の方法のすべての段階を実施した後、7 AHAを、7 AHTが生成されるように、7 AHAの7 AHTへのアルデヒド脱水素化を触媒する酵素と接触させる段階を含み得る。

40

【0067】

7 AHTを、1,7 DAHが生成されるように、1,7 DAHを生成するための7 AHTへのアミノ基の転移を触媒する酵素と接触させることができる。

【0068】

化合物を変換する第17の方法は、PCoAの生成までの第9の方法のすべての段階を実施した後、PCoAを、PASが生成されるように、PCoAのPASへの還元を触媒する酵素と接触させる段階を含み得る。

【0069】

PASを、7 AHAが生成されるように、PASの7 AHAへのセミアルデヒドアミノ化を触媒する

50

酵素と接触させることができる。

【0070】

7 AHAを、ENTLが生成されるように、7 AHAのENTLへのアミド加水分解を触媒する酵素と接触させることができる。

【0071】

化合物を変換する第18の方法は、7 AHAの生成までの第17の方法のすべての段階を実施した後、7 AHAを、7 AHTが生成されるように、7 AHAの7 AHTへのアルデヒド脱水素化を触媒する酵素と接触させる段階を含み得る。

【0072】

7 AHTを、1,7 DAHが生成されるように、1,7 DAHを生成するための7 AHTへのアミノ基の転移を触媒する酵素と接触させることができる。

【0073】

化合物を変換する第19の方法は、6A2HAおよび2 HDAから選択される化合物を、AAPまたはPAが生成されるように、6A2HAのAAPへのエノエート還元または2 HDAのPAへのエノエート還元を触媒する酵素と接触させる段階を含み得る。AAPまたはPAの生成後に、第1から第18の方法において上述したAAPまたはPAの生成後の段階のいずれかを実施できることが理解される。

【0074】

化合物を変換する第20の方法は、PCoAおよびピメロイル-[acp] (PACP) から選択される化合物を、PAが生成される、PCoAまたはPACPのPAへのチオエステラ-ゼ加水分解を触媒する酵素と接触させる段階を含み得る。

【0075】

PAを、PASが生成されるように、PAのPASへのカルボン酸還元を触媒する酵素と接触させることができる。

【0076】

PASを、7 AHAが生成されるように、PASの7 AHAへのセミアルデヒドアミノ化を触媒する酵素と接触させることができる。

【0077】

7 AHAを、ENTLが生成されるように、7 AHAのENTLへのアミド加水分解を触媒する酵素と接触させることができる。

【0078】

化合物を変換する第21の方法は、7 AHAの生成までの第20の方法のすべての段階を実施した後、7 AHAを、7 AHTが生成されるように、7 AHAの7 AHTへのアルデヒド脱水素化を触媒する酵素と接触させる段階を含み得る。

【0079】

7 AHTを、1,7 DAHが生成されるように、1,7 DAHを生成するための7 AHTへのアミノ基の転移を触媒する酵素と接触させることができる。

【0080】

化合物を変換する第22の方法は、AKPを、AHPが生成されるように、AKPのAHPへのケトン還元を触媒する1つまたは複数の酵素と接触させる段階を含み得る。AKPは、 α -ケトアジペートまたは α -ケトグルタレートの鎖伸長によって生成することができた。AHPを、次にPAまたはPCoAに変換することができる。PAまたはPCoAの生成後に、第1から第18の方法において上述したPAまたはPCoAの生成後の段階のいずれかを実施できることが理解される。

【0081】

化合物を変換する第23の方法は、 α -ケト酸鎖の伸長によってAKPをAKSに変換する段階を含み得る。AKPは、 α -ケトアジペートまたは α -ケトグルタレートの鎖伸長によって生成することができた。AKSの生成後に、第1から第18の方法において上述したAKSの生成後の段階のいずれかを実施できることが理解される。

【0082】

化合物を変換する第24の方法は、PASを、7 AHAが生成されるように、PASの7 AHAへのセ

10

20

30

40

50

ミアルデヒドアミノ化を触媒する酵素と接触させる段階を含み得る。PASは、2,6 DAP、AKG、PCoAまたはPACPからの変換によって得ることができた。AHAの生成後に、第1から第18の方法において上述したAHAの生成後の段階のいずれかを実施できることが理解される。

【0083】

化合物を変換する第25の方法は、PCoAおよびPACPから選択される化合物を、PASが生成されるように、化合物のPASへの還元を触媒する酵素と接触させる段階を含み得る。PASの生成後に、第1から第18の方法において上述したPASの生成後の段階のいずれかを実施できることが理解される。さらに、PCoAの生成を導く第1から第18までおよび第22の方法において述べた段階のいずれかを、第25の方法の前に実施することができる。

【0084】

化合物を変換する第26の方法は、PASを、7-ヒドロキシヘプタン酸（7 HHA）が生成されるように、PASの7 HHAへのアルコール脱水素化を触媒する酵素と接触させる段階を含み得る。PASの生成を導く第1から第18までならびに第20、第22、第23および第25の方法において述べた段階のいずれかを、第26の方法の前に実施できることが理解される。

【0085】

前述した方法のいずれにおいても、酵素は精製形態で 사용할 ことができる。あるいは、酵素は細胞溶解物または部分精製された細胞溶解物の形態で 使用できる。加えて、酵素は、該酵素を組換え発現する細胞中に存在し得る。

【0086】

前述した方法において、還元的脱アミノ化を触媒する酵素はアンモニアリアーゼを含み得る。アンモニアリアーゼは、EC 4.3.1、例えばEC 4.3.1.1、EC 4.3.1.2、EC 4.3.1.3、EC 4.3.1.9、EC 4.3.1.12、EC 4.3.1.13、EC 4.3.1.14、EC 4.3.1.23、またはEC 4.3.1.24に認められる。

【0087】

前述した方法において、2-エノエート還元を触媒する酵素はエン酸レダクターゼを含みうる。エン酸レダクターゼは、EC 1.3.1、例えばEC 1.3.1.8；EC 1.3.1.9；EC 1.3.1.10、例えばFabIの遺伝子産物など；EC 1.3.1.31；EC 1.3.1.38；EC 1.3.1.39；EC 1.3.1.44、例えばterもしくはtdterの遺伝子産物など（Nishimaki et al., J. Biochem., 1984, 95, 1315 -1321；Shen et al., Appl. Environ. Microbiol., 2011, 77(9), 2905 -2915；Bond-Watts et al., Biochemistry, 2012, 51, 6827 -6837）；またはEC 1.3.1.62におけるピメロイル-CoAデヒドロゲナーゼ、例えばPimC／PimDもしくはThnJ／ThnKなどに認められる。また、エン酸レダクターゼが、EC 1.3、例えばEC 1.3.8.1；EC 1.3.99.3；EC 1.3.99.B10またはシントロファス・アシディトロフィカス（*Syntrophus aciditrophicus*）2,3-ジデヒドロピメリル-CoAレダクターゼおよびそれらのホモログなどに認められてもよい。エン酸レダクターゼは、トランス-2-エノイル-ジカルボン酸、またはジカルボン酸のチオエステル、例えば2-ヘプテン二酸-CoA（トランス-2,3-ジデヒドロピメリル（pimlyl）-CoA）または2-ヘプテン二酸-[acp]（トランス-2,3-ジデヒドロピメリル（pimlyl）-[acp]）に対して作用してもよい。

【0088】

前述した方法において、カルボン酸還元を触媒する酵素はカルボン酸レダクターゼを含みうる。カルボン酸レダクターゼは、EC 1.2.99、例えばEC 1.2.99.6に認められる。カルボン酸レダクターゼはまた、NAD依存性非アシル化アルデヒドデヒドロゲナーゼ、例えばスフィンゴモナス属種およびカプリアビダス（*Cupriavidus*）属種におけるThnGなどに属してもよい。

【0089】

前述した方法において、セミアルデヒドアミノ化を触媒する酵素はω-トランスアミナーゼを含みうる。ω-トランスアミナーゼは、EC 2.6.1、例えばEC 2.6.1.18；EC 2.6.1.19；EC 2.6.1.11；EC 2.6.1.13；EC 2.6.1.39；EC 2.6.1.48；またはEC 2.6.1.62などに認められる。前述した方法において、CoAチオエステルのチオエステル加水分解を触媒する酵素は、チオエステラーゼ、酸-チオールリガーゼまたはCoAトランスフェラーゼを含みう

10

20

30

40

50

る。チオエステラーゼは、EC 3.1.2、例えば、YciA、tesBもしくはAcot13の遺伝子産物；EC 3.1.2.2；EC 3.1.2.18；EC 3.1.2.19；またはEC 3.1.2.20などに認められる。酸-チオールリガーゼ／CoAシンテターゼは、EC 6.2.1、例えば、EC 6.2.1.3；EC 6.2.1.5、EC 6.2.1.14；またはEC 6.2.1.23などに認められる。CoAトランスフェラーゼは、EC 2.8.3、例えばEC 2.8.3.12；EC 2.8.3.13もしくはEC 2.8.3.14、または（or or）ピメリン酸へのCoAの可逆的転移を触媒するThnHの遺伝子産物に認められる。

【0090】

前述した方法において、アシル-キャリアー-タンパク質（[ACP]）チオエステルのチオエステル加水分解を触媒する酵素は、EC 3.1.2、例えばEC 3.1.2.14またはEC 3.1.2.21由来のアシル-[ACP]チオエステラーゼ、EC 6.2.1、例えばEC 6.2.1.14由来のアシル-[ACP]-シンテターゼ（synthtase）、例えばBioWなど；およびEC 6.2.1.20に認められる。

10

【0091】

前述した方法において、 α -アミノ基の転移を触媒する酵素はアミノ酸アミノトランスフェラーゼを含みうる。アミノ酸アミノトランスフェラーゼは、EC 2.6.1、例えばEC 2.6.1.39；EC 2.6.1.42もしくはEC 2.6.1.21におけるL-もしくはD-選択的アミノトランスフェラーゼ、またはEC 2.6.1.67由来の2-アミノヘキサノ酸アミノトランスフェラーゼでありうる。 α アミノ基の転移を触媒する酵素はまた、クラスEC 1.4.1.-由来のデヒドロゲナーゼ、例えば、用いられる補因子によるが、EC 1.4.1.2；EC 1.4.1.3；もしくはEC 1.4.1.4に属するグルタミン酸デヒドロゲナーゼなど、またはEC 1.4.1.16由来のジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼでもありうる。

20

【0092】

前述した方法において、ケトン還元を触媒する酵素は、EC 1.1.1.-または1.1.99,におけるカルボニルレダクターゼでありうる。カルボニルレダクターゼは、EC 1.1.1.184；EC 1.1.1.79；EC 1.1.1.B3；EC 1.1.1.B4、またはEC 1.1.99.2.もしくはEC 1.1.99.6由来の2-ヒドロキシグルタルルデヒドロゲナーゼ／ α ケトグルタル酸（ketoglutarate）レダクターゼを含みうる。

【0093】

前述した方法において、 α -ケト酸脱カルボキシ化を触媒する酵素は、EC 4.1.1、例えば4.1.1.1；4.1.1.7；4.1.1.72における α -ケト酸デカルボキシラーゼ；またはクラスEC 2.2.1.6もしくはEC 2.2.2.6におけるアセト乳酸シンターゼでありうる。

30

【0094】

前述した方法において、 α -アミノ酸脱カルボキシ化を触媒する酵素は、クラスEC 4.1.1.-由来の α -アミノ酸デカルボキシラーゼでありうる。 α -アミノ酸デカルボキシラーゼは、EC 4.1.1.11；EC 4.1.1.15；EC 4.1.1.16；EC 4.1.1.18；EC 4.1.1.20、EC 4.1.1.45；およびEC 4.1.1.86を含みうる。

【0095】

前述した方法において、ジカルボン酸（dicarbylic acid）のCoAエステルの、対応するセミアルデヒドへの（例えば、PCoAのPASへの）還元を触媒する酵素は、脂肪-アシル-CoAレダクターゼでありうる。脂肪-アシル-CoAレダクターゼは、EC 1.2.1.-、例えば、EC 1.2.1.3；EC 1.2.1.10；EC 1.2.1.22；EC 1.2.1.50；EC 1.2.1.57およびEC 1.2.1.76に認められる。

40

【0096】

前述した方法において、[ACP]チオエステルの、対応するセミアルデヒドへの（例えば、PACPのPASへの）還元を触媒する酵素は、上記のCoAエステルおよび[ACP]エステルに対して作用する脂肪-アシル-CoAレダクターゼ、または例えばEC 1.2.1.80由来のアシル-アシル-キャリアー-タンパク質レダクターゼでありうる。

【0097】

前述した方法において、カルボン酸へのアルデヒド脱水素化を触媒する酵素は、アルデヒドデヒドロゲナーゼまたはアルデヒドオキシダーゼでありうる。アルデヒドデヒドロゲナーゼは、EC 1.2.1、例えばEC 1.2.1.3；EC 1.2.1.4またはEC 1.2.1.63に認められる。

50

また、アルデヒドデヒドロゲナーゼ／カルボン酸レダクターゼが、EC 1.2.99、例えば、EC 1.2.99.6に認められてもよい。また、カルボン酸レダクターゼが、NAD依存性非アシル化アルデヒドデヒドロゲナーゼ、例えばスフィンゴモナス属種およびカプリアビダス属種におけるThnGなどに属してもよい。アルデヒドオキシダーゼは、EC 1.2.3、例えば1.2.3.1に認められる。

【0098】

前述した方法において、7-アミノヘプタン酸のエナントラクタムへの閉環を触媒する酵素は、EC 3.5.2、例えば3.5.2.11のアミドヒドロラーゼでありうる。

【0099】

前述した方法において、（例えば、AHPまたはAHP-CoAの）脱水を触媒する酵素はヒドロリアーゼでありうる。ヒドロリアーゼは、EC 4.2.1、例えばEC 4.2.1.2；EC 4.2.1.59；4.2.1.61；4.2.1.17または4.2.1.18に認められる。デヒドラターゼが、クロストリジウム（clostrida）およびフソバクテリウムで記載されていて、活性化因子（HgdCAB）とともに発現される、EC番号がまだ指定されていない2-ヒドロキシグルタルル-CoAデヒドラターゼ、または嫌気性細菌の2-ヒドロキシアシル-CoAデヒドラターゼであってもよい。

【0100】

前述した方法において、 α -ケト酸鎖伸長を触媒する酵素は、AksA、AksD、AksEおよびAksFを含む酵素のセットのうち1つまたは複数（one of more）を含みうる。AksAは、EC 2.3.3、例えばEC 2.3.3.13または2.3.3.14に認められる。AksDは、EC 4.2.1、例えばEC 4.2.1.36に認められる。AksFは、EC 1.1.1、例えばEC 1.1.1.87に認められる。 α -ケト酸鎖伸長酵素の1つまたは複数（例えば、2つもしくはそれ以上、3つもしくはそれ以上、4つもしくはそれ以上、5つもしくはそれ以上、6つもしくはそれ以上、7つもしくはそれ以上、8つもしくはそれ以上、9つもしくはそれ以上、10もしくはそれ以上、12もしくはそれ以上、14もしくはそれ以上、18もしくはそれ以上、または20もしくはそれ以上）が、メタン生成細菌由来でありうる。

【0101】

前述した方法において、アルコール脱水素化を触媒する酵素はアルコールデヒドロゲナーゼを含みうる。アルコールデヒドロゲナーゼは、EC 1.1.1.1またはEC 1.1.1.2または1.1.1.21を含みうる。また、これが、例えば、ザイモモナス・モビリス由来のadhA、ザイモモナス・モビリス由来のadhB、クロストリジウム・アセトブチリカム由来のブタノールデヒドロゲナーゼ、サッカロミセスADHIV、およびS.セレビスエ由来のADH6であってもよい。前述した方法において、アルコール脱水素化を触媒する酵素はアルコールオキシダーゼでありうる。アルコールオキシダーゼはクラスEC 1.1.3.13に認められる。

【0102】

本明細書の方法において使用されるPCoAまたはPACPは、アセチル-CoAもしくはベンゾイル-CoAから、またはビオチン生合成、ベンゾエート分解、シクロヘキサンカルボキシレート経路、もしくはマロニル-CoAの縮合もしくは（olr）脂肪酸 ω -酸化といった任意の代謝経路から誘導することができる。アセチル-CoAは、セルロース系原材料、糖類、グリセロールまたは脂肪酸を含む再生可能な原材料から誘導することができる。さらに、アセチル-CoAを、SynGas、メタンまたはメタノールから誘導することもできる。ベンゾイル-CoAは多環式芳香族炭化水素から誘導することができる。PCoAまたはPACPまたはPAから誘導することに加えて、PASをテトラリン分解経路から誘導することもできる。

【0103】

本明細書の方法において使用される2,6 DAPは、ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼを欠くりジン産生生物によって産生されうる。2,6 DAPは、糖類、グリセロール、脂肪酸、合成ガス、メタンまたはメタノールを含む、任意の発酵性炭素源から誘導される。

【0104】

本明細書は、生体誘導（bioderived）ナイロン-7、ナイロン-7、xナイロン-x,7およびポリエステルを特徴とする。これはまた、7 AHAを重合させる段階を含む工程によって生成されるナイロン-7も含み、ここで7 AHAはPASまたはAASから誘導される。また、PAと1,7

10

20

30

40

50

DHAを重合させる段階を含む工程によって生成されるナイロン-7,7も本明細書によって提供され、ここでPAはPCoA ; PACP ; または2 HDAから誘導され、1,7 DHAは7 AHAから誘導される。本明細書はまた、7 AHAの生成を導く上記の方法のいずれかによって作製された7 AHAを重合させる段階を含む工程によって生成されるナイロン-7も具現化する。本発明のもう1つの局面は、1,7 DHAとPAを重合させる段階を含む工程によって生成されるナイロン7,7であり、ここで1,7 DHAは、1,7 DHAの生成を導く上記の方法のいずれかによって作製され、PAは、PAの生成を導く上記の方法のいずれかによって作製される。

【0105】

本明細書はまた、宿主細胞の実質的に純粋な培養物であって、そのうちの相当な数が、7 AHA ; PA ; 1,7 DAH ; ENTL ; および7 HHAから選択される1つまたは複数のポリマー単量体の生合成に關与する1つまたは複数の酵素をコードする1つまたは複数の外因性核酸を含み、かつ発現する培養物も提供する。これらの酵素は、脂肪-アシル-CoAレダクターゼ、アシル-[acp]レダクターゼ、チオエステルヒドロラーゼ、アンモニアリアーゼ、エン酸レダクターゼ、アミノ酸アミノトランスフェラーゼ、CoAトランスフェラーゼ、酸-チオールリガーゼ、ヒドロリアーゼ、カルボニルレダクターゼ、カルボン酸レダクターゼ、 ω -トランスアミナーゼ、 α -ケト酸デカルボキシラーゼ、アルデヒドデヒドロゲナーゼ、脱アミノ基デヒドロゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、アルデヒドオキシダーゼ、アルコールオキシダーゼ、アミドヒドロラーゼ、脱カルボキシ化アセト乳酸シンターゼ、ならびに α -ケト酸鎖伸長を触媒する酵素、例えばAksA、AksD、AksEおよびAksFなどを含む。本明細書で用いる場合、「相当な数」とは、培養物中の細胞の少なくとも10%（例えば、少なくとも：20%；30%；40%；50%；60%；70%；75%；80%；85%；90%；95%；97%；98%；99%；またはさらには100%）である。

【0106】

培養物の細胞は、限定されることなく、大腸菌 (*Escherichia coli*) 種などの大腸菌属 (*Escherichia*) ; クロストリジウム・ルジュングダーリイ (*Clostridium ljungdahlii*)、クロストリジウム・オートエタノゲナム (*Clostridium autoethanogenum*) またはクロストリジウム・クルイベリ (*Clostridium kluyveri*) 種などのクロストリジウム属 (*Clostridia*) ; コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) 種などのコリネバクテリウム属 (*Corynebacteria*) ; カプリアビダス・ネカトル (*Cupriavidus necator*) またはカプリアビダス・メタリデュランス (*Cupriavidus metallidurans*) 種などのカプリアビダス属 (*Cupriavidus*) ; シュードモナス・フルオレセンス (*Pseudomonas fluorescens*)、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) またはシュードモナス・オレオボランス (*Pseudomonas oleovorans*) 種などのシュードモナス属 (*Pseudomonas*) ; デルフチア・アシドボランス (*Delftia acidovorans*) 種などのデルフチア属 (*Delftia*) ; 枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 種などのバシラス属 (*Bacillus*) ; デルブリュッキ菌 (*Lactobacillus delbrueckii*) などのラクトバシラス属 (*Lactobacillus*) ; ならびに、ラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) 種などのラクトコッカス属 (*Lactococcus*) などの原核細胞でありうる。

【0107】

あるいは、培養物の細胞は、真核細胞、例えば、酵母細胞などの真菌細胞でもありうる。酵母細胞は、限定されることなく、クロコウジカビ (*Aspergillus niger*) 種などのアスペルギルス属 (*Aspergillus*) ; サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 種などのサッカロミセス属 (*Saccharomyces*) ; *C. トロピカリス* (*C. tropicalis*)、*C. アルビカンス* (*C. albicans*)、*C. クロアカエ* (*C. cloacae*)、*C. グイリエルモンディイ* (*C. guilliermondii*)、*C. インターメディア* (*C. intermedia*)、*C. マルトサ* (*C. maltosa*)、*C. パラプシロシス* (*C. parapsilosis*) または *C. ゼイレノイデス* (*C. zeylenoides*) 種などのカンジダ属 (*Candida*) ; ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) 種 (*species*) などのピキア属 (*Pichia*) ; ヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 種などのヤロウイア属 (*Yarrowia*) ; イサタケンキア・オリエンタリス (*Issatchenkia orientalis*) 種などのイサタケンキア属 (*Issatchenkia*) ; デバリオミセス・ハンセニイ (*De*

baryomyces hansenii) 種などのデバリオミセス属 (Debaryomyces) ; アークスラ・アデニニボランス (Arxula adenoinivorans) 種などのアークスラ属 (Arxula) ; クルイベロミセス・ラクティス (Kluyveromyces lactis) 種などのクルイベロミセス属 (Kluyveromyces) ; エクソフィアラ属 (Exophiala) ; ケカビ属 (Mucor) ; トリコデルマ属 (Trichoderma) ; クラドスポリウム属 (Cladosporium) ; ファネロケーテ属 (Phanerochaete) ; クラドフィアロフォラ属 (Cladophialophora) ; ペシロミセス属 (Paecilomyces) ; スケドスポリウム属 (Scedosporium) ; およびオフィオストマ属 (Ophiostoma) などの酵母または真菌のものでありうる。

【0108】

細胞によって発現されうる外因性酵素は以下の通りである。アンモニアリアーゼは、EC 4.3.1、例えばEC 4.3.1.1; EC 4.3.1.2; EC 4.3.1.3; EC 4.3.1.9; EC 4.3.1.12; EC 4.3.1.13; EC 4.3.1.14、EC 4.3.1.23またはEC 4.3.1.24におけるアンモニアリアーゼを含みうる。エン酸レダクターゼは、EC 1.3.1、例えばEC 1.3.1.8; EC 1.3.1.9; EC 1.3.1.10、EC 1.3.1.31; EC 1.3.1.38; EC 1.3.1.39; EC 1.3.1.44におけるエン酸レダクターゼ、またはEC 1.3.1.62におけるピメロイル-CoAデヒドロゲナーゼ、例えばPimC/PimDまたはThnJ/ThnKなどを含みうる。エン酸レダクターゼはまた、EC 1.3、例えばEC 1.3.8.1もしくはEC 1.3.99.3; EC 1.3.99.B10などの中にあるか、またはシントロファス・アシディトロフィカス2,3-ジデヒドロピメリル-CoAレダクターゼおよびそれらのホモログであってもよい。カルボン酸レダクターゼは、EC 1.2.99、例えばEC 1.2.99.6におけるカルボン酸レダクターゼを含む。カルボン酸レダクターゼはまた、NAD依存性非アシル化アルデヒドデヒドロゲナーゼ、例えばスフィンゴモナス属種およびカプリアビダス属種におけるThnGなどに属してもよい。 ω -トランスアミナーゼは、EC 2.6.1、例えばEC 2.6.1.18; EC 2.6.1.19; EC 2.6.1.11; EC 2.6.1.13; EC 2.6.1.39EC 2.6.1.48またはEC 2.6.1.62におけるトランスアミナーゼを含みうる。チオエステラーゼは、EC 3.1.2、例えばYciA、tesBまたはAcot13の遺伝子産物; EC 3.1.2.2; EC 3.1.2.18; EC 3.1.2.19; またはEC 3.1.2.20などにおけるチオエステラーゼを含みうる。アシル-[acp]チオエステルに対して作用するチオエステラーゼは、EC 3.1.2.14、例えば、FatA、FatB; およびEC 3.1.2.21などを含む。酸-チオールリガーゼまたはCoAシンテターゼ (synthtase) は、EC 6.2.1、例えばEC 6.2.1.3; EC 6.2.1.5; EC 6.2.1.14; またはEC 6.2.1.23における酸-チオールリガーゼを含みうる。CoAトランスフェラーゼは、EC 2.8.3、例えばEC 2.8.3.12; EC 2.8.3.13もしくはEC 2.8.3.14におけるCoAトランスフェラーゼ、または (or or) CoAのピメリン酸への可逆的転移を触媒するThnHの遺伝子産物を含みうる。

【0109】

アシル-[acp]-チオエステラーゼは、EC 3.1.2、例えば3.1.2.14およびEC 3.1.2.21におけるチオエステラーゼを含む。アシル-[acp]シンテターゼは、EC 6.2.1、例えばEC 6.2.1.14における酸-チオールリガーゼ、例えばBioWなど; およびEC 6.2.1.20を含みうる。アミノ酸アミノトランスフェラーゼは、EC 2.6.1、例えばEC 2.6.1.39; EC 2.6.1.21; EC 2.6.1.42; およびEC 2.6.1.67におけるアミノトランスフェラーゼを含みうる。脱アミノ基デヒドロゲナーゼは、EC 1.4.1、例えば1.4.1.2; EC 1.4.1.3; EC 1.4.1.4; およびEC 1.4.1.16由来のデヒドロゲナーゼを含みうる。カルボニルレダクターゼは、EC.1.1.1.184 EC 1.1.1.79、EC 1.1.1.B3; EC 1.1.1.B4におけるレダクターゼ、またはEC 1.1.99.2.もしくはEC 1.1.99.6由来の2-ヒドロキシグルタルルデヒドロゲナーゼ/ α ケトグルタル酸 (ketoglutarate) レダクターゼを含みうる。

【0110】

α -ケト酸デカルボキシラーゼは、EC 4.1.1、例えば4.1.1.1; 4.1.1.7; 4.1.1.72における α -ケト酸デカルボキシラーゼ; またはクラスEC 2.2.1.6におけるアセト乳酸シンターゼを含みうる。 α -アミノ酸デカルボキシラーゼは、EC 4.1.1.11; EC 4.1.1.15; EC 4.1.1.16; EC 4.1.1.18; EC 4.1.1.20、EC 4.1.1.45; およびEC 4.1.1.86を含みうる。

【0111】

脂肪-アシル-CoAレダクターゼは、EC 1.2.1、例えばEC 1.2.1.3; EC 1.2.1.10; EC 1.2

.1.22 ; EC 1.2.1.50 ; および EC 1.2.1.76.における脂肪-アシル-CoAレダクターゼを含みうる。アシル-[acp]-レダクターゼは、例えば、EC 1.2.1.80由来のアシル-アシル-キャリアー-タンパク質レダクターゼを含みうる。

【0112】

アルデヒドデヒドロゲナーゼは、EC 1.2.1、例えばEC 1.2.1.3 ; EC 1.2.1.4またはEC 1.2.1.63におけるアルデヒドデヒドロゲナーゼを含みうる。アルデヒドデヒドロゲナーゼ／カルボン酸レダクターゼはまた、EC 1.2.99、例えばEC 1.2.99.6にあってもよい。カルボン酸レダクターゼはまた、NAD依存性非アシル化アルデヒドデヒドロゲナーゼ、例えばスフィンゴモナス属種およびカプリアビダス属種におけるThnGなどに属してもよい。アルデヒドデヒドロゲナーゼ／カルボン酸レダクターゼはまた、NAD依存性非アシル化アルデヒドデヒドロゲナーゼ、例えばスフィンゴモナス属種およびカプリアビダス属種におけるThnGなどに属してもよい。アルデヒドオキシダーゼは、EC 1.2.3、例えば1.2.3.1に認められる。アミドヒドロラーゼは、EC 3.5.2、例えば3.5.2.11由来のアミドヒドロラーゼでありうる。

【0113】

ヒドロリアーゼは、EC 4.2.1、例えばEC 4.2.1.2 ; EC 4.2.1.59 ; 4.2.1.61 ; 4.2.1.17または4.2.1.18におけるヒドロリアーゼを含む。デヒドラターゼはまた、クロストリジウム (clostrida) およびフソバクテリウムで記載されていて、活性化因子 (HgdCAB) とともに発現される、EC番号がまだ指定されていない2-ヒドロキシグルタルル-CoAデヒドラターゼ、または嫌気性細菌の2-ヒドロキシアシル-CoAデヒドラターゼであってもよい。

【0114】

α -ケト酸鎖伸長を触媒する酵素は、AksA、AksD、AksEおよびAksF酵素を含む1つまたは複数の酵素を含みうる。AksAは、EC 2.3.3、例えばEC 2.3.3.13または2.3.3.14におけるAksA酵素を含みうる。AksDは、EC 4.2.1、例えばEC 4.2.1.36におけるAksD酵素を含みうる。AksFは、EC 1.1.1、例えばEC 1.1.1.87におけるAksF酵素を含みうる。アルコールデヒドロゲナーゼは、例えば、EC 1.1.1.1またはEC 1.1.1.2またはEC 1.1.1.21を含みうる。加えて、アルコールデヒドロゲナーゼは、例えば、ザイモモナス・モビリス由来のadhA、ザイモモナス・モビリス由来のadhB、クロストリジウム・アセトブチリカム由来のブタノールデヒドロゲナーゼ、サッカロミセスADHIV、およびS.セレビシエ由来のADH6も含みうる。アルコールオキシダーゼは、クラスEC 1.1.3.13に認められる。

【0115】

本明細書の別の局面は、7 AHA、PA、1,7 DAH、ENTL、および7 HHAから選択される1つまたは複数のポリマー単量体の生合成に関与する1つまたは複数の外因性核酸をコードする1つまたは複数の外因性核酸を含み、かつ発現する、単離された細胞である。酵素は、アンモニアリアーゼ、エン酸レダクターゼ、カルボン酸レダクターゼ、 ω -トランスアミナーゼ、チオエステラーゼ、酸-チオールリガーゼまたはCoAシンテターゼ (synthtase)、CoAトランスフェラーゼ、アシル-[acp]チオエステラーゼ、アシル-[acp]シンテターゼ、アミノ酸アミノトランスフェラーゼ、脱アミノ基デヒドロゲナーゼ、カルボニルレダクターゼ、 α -ケト酸デカルボキシラーゼ、アセト乳酸シンターゼ、 α -アミノ酸デカルボキシラーゼ、脂肪-アシル-CoAレダクターゼ、アシル-[acp]-レダクターゼ、アルデヒドデヒドロゲナーゼ、アルデヒドオキシダーゼ、アミドヒドロラーゼ、ヒドロリアーゼ、および α -ケト酸鎖伸長を触媒する酵素を含む。細胞および酵素は、宿主細胞の実質的に純粋な培養物に関して上述したもののいずれかでありうる。

【0116】

他の目的および利点は、本明細書に記載する以下の詳細な説明の検討から当業者には明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0117】

【図1】図1は、ピメリン酸セミアルデヒドの、ナイロン7、ナイロン7,7およびナイロン7,xの生成、ならびにポリエステルの生成のために有用な種々の二官能性C7アルカンへの生

物変換を示す概略図である。

【図2】図2は、いずれも示されているような天然に存在する経路の中間体であるピメロイル-CoA、ピメロイル-[acp]または α -ケトスベレートからの、ならびにテトラリン分解からの、ピメリン酸セミアルデヒドの形成の概略図である。

【図3】図3は、 α -ケト酸鎖伸長における一連の反応の概略図である。鎖伸長には3つの基本的な反応が関与する：クエン酸同族体を形成する α -ケト二酸とアセチル-CoAとの間の縮合、クエン酸同族体のイソクエン酸同族体への異性化、およびイソクエン酸同族体の、付加的なメチレン基を含む α -ケト二酸への酸化的脱カルボキシル化 [Howell198: Howell DM, Harich K, Xu H, White RH (1998). Alpha-keto acid chain elongation reactions involved in the biosynthesis of coenzyme B (7-mercaptoheptanoyl threonine phosphate) in methanogenic Archaea." *Biochemistry*, 37(28);10108-17]。 α -ケトグルタレートから α -ケトスベレートへの一連の鎖伸長（3回）に続いて、ピメリン酸セミアルデヒドへの α -ケト酸の脱カルボキシル化が起こる。これらの反応は、TCAサイクルI（原核生物）におけるクエン酸シンターゼ、アコニターゼおよびイソクエン酸デヒドロゲナーゼによって触媒される反応、ならびにリジン合成Vにおける(R)-ホモクエン酸シンターゼ、ホモアコニターゼおよび(-)-トレオ-イソホモクエン酸デヒドロゲナーゼによって触媒される反応に類似する [Howell, 1998, 前記]。

【図4】図4は、3つのマロニル-CoAの縮合を介したピメロイル-CoAの形成の概略図である。

【図5】図5は、枯草菌由来のBioIによる長鎖脂肪酸の[acp]チオエステルの酸化的切断によるピメリン酸の形成の概略図である。ピメリン酸またはそのCoAチオエステルもしくは[acp]チオエステルは、ビオチン合成経路II中の7-ケト-8-アミノペラルゴネート合成における前駆体である。7-ケト-8-アミノペラルゴネートはビオチン合成の鍵となる中間体である。宿主生物におけるピメロイル-CoAの分解は、7-ケト-8-アミノペラルゴン酸シンターゼ (E.C. 2.3.1.47) をコードする遺伝子であるBioFの欠失または不活性化によって阻止することができる。

【図6】図6は、ビオチン合成経路I中の7-ケト-8-アミノペラルゴネート合成におけるピメロイル-[acp]またはそのメチルエステルの形成の概略図である。ビオチン合成における鍵となる中間体。ピメリン酸またはピメリン酸セミアルデヒドは、太字で示すaaaS（アシル-ACPシンターゼ）、FatA（脂肪アシル-ACPチオエステラーゼA）、FatB（脂肪アシル-ACPチオエステラーゼB）、またはアシル-[acp]レダクターゼの作用によってこれらの前駆体から調製することができる。

【図7】図7は、ベンゾエートまたはシクロヘキサンカルボキシレートの分解からのピメロイルCoAの形成を示すスキームである。

【図8】図8は、スフィンゴモナス属およびコリネバクテリウム属種のテトラリン分解経路におけるピメリン酸セミアルデヒドの形成を示すスキームである。

【図9】図9は、メタン生成細菌によるクロトネートからのシクロヘキサンカルボキシレート経路におけるピメロイルCoAの形成を示すスキームである。Mouttaki et al., *Applied and Environmental Microbiology*, pages 930-938 (2001) 参照。

【図10A】図10Aは、D,L-ジアミノピメレートを出発点とする、2-アミノヘプタン二酸を介したピメリン酸セミアルデヒドおよび7-アミノヘプタン酸への構築した経路の例を示す概略図である。2-アミノヘプタン二酸からピメリン酸セミアルデヒドへは、アンモニリアーゼによる2-ヘプテン二酸への還元的脱アミノ化を介した経路、または後ほどピメリン酸もしくはそのCoAエステルに変換することができる α -ケト酸の形成を介した経路の2つがある。あるいは、2-アミノヘプタン二酸から誘導される α -ケトピメレートは、1回の鎖伸長によって α -ケトスベレートを形成し、これを脱カルボキシル化してピメリン酸セミアルデヒドを形成することができるか、または脱カルボキシル化によって直接7-アミノヘプタン酸を導く、 α -アミノスベレートに変換することができる。 α -ケトピメレートは α -ケトアジペートから誘導することもでき、 α -ケトアジペートは、 α -ケトグルタレートから2回の連続的な α -ケト酸鎖の伸長を介して誘導することができる。

【図10B】図10Bは、ヒドロリアーゼによる、 α -ヒドロキシピメレートまたはそのCoAエステルはいずれかの、それぞれ2-ヘプテン二酸またはその対応するCoAエステルである α -ヒドロキシピメロイル-CoAへの変換を示す概略図である。同様に、2-ヘプテン二酸またはその対応するCoAエステルを、遊離酸またはCoA活性化チオエステルに対して作用するエン酸レダクターゼによって、それぞれピメリン酸またはピメロイル (pimeoyl) -CoAに還元させることができる。同様の様式で、 α -ヒドロキシピメレートまたは2-ヘプテン二酸の活性化は、CoAチオエステルに向かうのではなく、その代わりにアシル-[acp]-シンターゼによって[acp]チオエステルに向かう可能性がある。ヒドロリアーゼは α -ヒドロキシピメロイル-[acp]からの水の除去を触媒することができ、エン酸レダクターゼは2-ヘプテン二酸-[acp]の二重結合を還元することができる。ピメロイル-CoAまたはピメロイル-[acp]は、その後に、CoAもしくは[acp]の再利用のためにトランスフェラーゼもしくは酸-チオールリガーゼによって加水分解されるか、またはチオエステラーゼによってピメリン酸を生成する。

10

【図11A】図11Aは、シトロバクター・アマロナティカス (*Citrobacter amalonaticus*) のアンモニアリアーゼタンパク質の発現物からの可溶性および不溶性画分に関するSDS-PAGE分析を示す。

【図11B】図11Bは、クロストリジウム・テタノモーファム (*Clostridium tetanomorphum*) (I5) およびアスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) (I6) のアンモニアリアーゼタンパク質の発現物からの可溶性および不溶性画分に関するSDS-PAGE分析を示す。

【図12】図12は、ノカルジア属種のカルボン酸レダクターゼ遺伝子の発現物からの可溶性および不溶性画分に関するSDS-PAGE分析を示す。

20

【図13】図13は、ノカルジアCARレダクターゼ活性によるピメリン酸、アジピン酸、および安息香酸のピメリン酸セミアルデヒド、アジピン酸セミアルデヒド、およびベンズアルデヒドへの還元起因する経時的な吸光度の変化を示す。安息香酸を陽性対照とし、空ベクターを有する生体触媒を含む反応混合物を陰性対照として用いた。

【図14】図14は、インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) の YciAチオエステラーゼタンパク質 (I8) の発現物からの可溶性画分および不溶性画分に関するSDS-PAGE分析を示す。

【図15】図15は、アミノトランスフェラーゼIlvE- ω Vf融合物 (pING2022) およびIlvE-Ad最適化 ω 融合物 (pING2030) タンパク質のSDS-PAGE分析を示す。

30

【図16】図16は、ピルビン酸ナトリウムおよび7-アミノヘプタン酸の生物転換の結果を、7-アミノヘプタン酸基質およびL-アラニン生成物の測定濃度で示す。

【図17】図17は、48時間後および96時間後の6種の生物転換体におけるL-およびD-2-アミノスベリン酸エナンチオマー濃度からのHPLC結果の概要を示す。

【図18】図18は、大腸菌GadA (I29)、大腸菌LysA (I30)、大腸菌 GadA ilvE (I31) および大腸菌LysA ilvE (I32) タンパク質の発現物のビーズ溶解からの可溶性および不溶性画分に関するSDS-PAGE分析を示す。

【図19】図19は、2-アミノスベレートの脱カルボキシル化からの7-アミノヘプタン酸の形成を示す。

【図20】図20は、MJ0277タンパク質とcomD (SEQ ID 41) /comE (SEQ ID 42) タンパク質との間で有意の相同性を示す、ClustalWアルゴリズムを使用したタンパク質アラインメントを示す。

40

【図21】図21は、MJ0277の、ラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) 由来のLACLAアセト乳酸シンターゼ (SEQ ID 43) に対する相同性を示す。

【図22】図22は、LACLAアセト乳酸シンターゼ、メタノセラ・パラディコラ (*Methanocella paludicola*) 由来のcomD/comEおよび仮説上のアセト乳酸シンターゼMJ0277における機能性ドメインの分析が、これらすべてがリン酸チアミン結合部位を含む類似の構造を有することを明らかにしたことを示す。

【図23】図23は、IlvE- ω Vf融合遺伝子を含む、pING2022ベクターのマップを表示する。

50

【図 2 4】図24は、IlvE-Ad最適化ω融合遺伝子を含むpING2030ベクターのマップを表示する。

【図 2 5】図25は、SEQ.ID 1~40を記載する。

【図 2 6】図26は、サーモコッカス・コダカラエンシス (*Thermococcus kodakaraensis*) (41/42) の酸チオールリガーゼ (EC 6.2.1.5)、アシダミノコッカス・フェルメンタンス (*Acidominococcus fermentans*) (43/44) のCoAトランスフェラーゼ (EC 2.8.3.12)、およびシュードモナス・メンドシナ (*Pseudomonas mendocina*) (45) 由来の酸-チオールリガーゼ (EC 6.2.1.14) による、ピメロイル-CoAからのピメリン酸の形成の棒グラフを表示する。

【図 2 7】図27は、選択したエン酸レダクターゼによる、トランス-2-ヘキセン二酸からのアジピン酸の形成 (A) およびトランス-2,3-ジデヒドロアジポイルCoAからのアジポイルCoAの形成を描写する。

【発明を実施するための形態】

【0118】

発明の詳細な説明

一般に、本開示は、ナイロン-7、ナイロン-7,xおよびナイロン-x,7の生産、ならびにポリエステル生産における中間体として有用な二官能性または三官能性C7アルカンを生合成的に生産するための方法および材料に関する。

【0119】

一部の態様では、1つまたは複数（例えば2つ以上、3つ以上、4つ以上、5つ以上、6つ以上、7つ以上、8つ以上、9つ以上、10以上、11以上、12以上、13以上、14以上、15以上、16以上、17以上、18以上、19以上、20以上、またはさらにそれ以上）の単離された酵素（例えばアンモニアリアーゼ、エン酸レダクターゼ、アミノトランスフェラーゼ、CoAトランスフェラーゼ、チオエステラーゼ、酸-チオールリガーゼ、ヒドロリアーゼ、カルボニルレダクターゼ、チオエステラーゼ、カルボン酸レダクターゼ、脂肪アシルCoAレダクターゼ、ω-トランスアミナーゼ、α-ケト酸デカルボキシラーゼ、α-ケト酸鎖の伸長を触媒する酵素、アシル-ACPシンテターゼ、FatA（脂肪アシル-ACPチオエステラーゼA）、FatB（脂肪アシル-ACPチオエステラーゼB）、またはアシル-[acp]レダクターゼ）は、二官能性または三官能性C7アルカンを生合成的に生産するために使用できる。そのような酵素は、該酵素をコードする外因性核酸を発現する組換え細胞または該酵素を天然に発現する非組換え細胞から単離することができる。

【0120】

一部の態様では、1つまたは複数（例えば2つ以上、3つ以上、4つ以上、5つ以上、6つ以上、7つ以上、8つ以上、9つ以上、10以上、11以上、12以上、13以上、14以上、15以上、16以上、17以上、18以上、19以上、20以上、またはさらにそれ以上）の酵素（例えばアンモニアリアーゼ、エン酸レダクターゼ、アミノトランスフェラーゼ、CoAトランスフェラーゼ、チオエステラーゼ、酸-チオールリガーゼ、ヒドロリアーゼ、カルボニルレダクターゼ、チオエステラーゼ、カルボン酸レダクターゼ、ThnG、脂肪アシルCoAレダクターゼ、ω-トランスアミナーゼ、α-ケト酸デカルボキシラーゼ、α-アミノ酸デカルボキシラーゼ、アセト乳酸シンテターゼ、アミドヒドロラーゼ、α-ケト酸鎖の伸長を触媒する酵素、アシル-[acp]-チオエステラーゼ、アシル-[acp]シンテターゼ、BioW、アルコールデヒドロゲナーゼ、アルコールオキシダーゼ、アルデヒドデヒドロゲナーゼ、アルデヒドオキシダーゼ、FatA、FatB、またはアシル-[acp]レダクターゼの1つまたは複数（上記のような）をコードする1つまたは複数（例えば2つ以上、3つ以上、4つ以上、5つ以上、6つ以上、7つ以上、8つ以上、9つ以上、10以上、11以上、12以上、13以上、14以上、15以上、16以上、17以上、18以上、19以上、20以上、またはさらにそれ以上）の外因性核酸を含む組換え宿主、またはそのような組換え宿主もしくは前記酵素を天然に発現する非組換え細胞から調製された溶解物を、二官能性または三官能性C7アルカンを生合成的に生産するために使用できる。組換え宿主はまた、代謝中間体を二官能性または三官能性C7アルカンの生産へと迂回させるために1つまたは複数の内因性酵素の欠失を有していてもよい。

【0121】

本明細書で述べるように、生合成的に生産された二官能性または三官能性C7アルカンは、ナイロン-7、ナイロン-7,xまたはナイロン-x,7、ならびにポリエステルを生産するために使用できる。「ナイロン-7」という用語は、単量体7-アミノヘプタン酸の重合によってまたはエナントラクタムの開環縮合によって生成されるポリアミドである。ナイロン-7は、「ポリエナントアミド」または「ポリヘプタンアミド」としても知られる。

【0122】

「ナイロン-x,7」という用語は、ヘプタン-1,7-二酸（ピメリン酸またはピメレートとしても知られる）とジアミンの重合によって生成されるポリアミドのファミリーを指す。整数xは、ヘプタン1,7-二酸が反応するジアミン中の炭素原子の数を示す。一部の態様では、整数xは3より大きい整数、例えば5より大きい、7より大きい、または9より大きい整数である。例えば、ナイロン-5,7は、ヘプタン1,7-二酸と1,5-ペンタンジアミンを反応させることによって生成される。ナイロン7,7は、ヘプタン1,7-二酸と1,7-ジアミノヘプタンを反応させることによって生成される。

10

【0123】

「ナイロン-7,x」という用語は、ヘプタメチレンジアミンとジカルボン酸の重合反応によって生成されるポリアミドのファミリーを指す。整数xは、ヘプタメチレンジアミンが反応するジカルボン酸中の炭素原子の数を示す。例えば、ナイロン-7,5は、ヘプタメチレンジアミン（1,7-ジアミノヘプタンまたは1,7-ヘプタンジアミンとしても知られる）とペンタン-1,5-二酸との反応によって生成される。一部の態様では、整数xは3より大きい整数、例えば5より大きい、7より大きいまたは9より大きい整数である。

20

【0124】

「ポリエステル」という用語は、主鎖にエステル官能基を含むポリマーのカテゴリーを指す。ポリエステルは、ホモポリマー、例えばカプロラク톤の開環縮合によって生成されるポリカプロラクトンであり得る。コポリマーポリエステルは、多官能性アルコールと酸のエステル化縮合によって形成される。例えば、アジピン酸とエチレングリコールを使用してポリエチレンアジペートを生成する。そのようなコポリマーにおいてアジピン酸の代わりにピメリン酸を使用することができる。あるいは、7-ヒドロキシヘプタン酸を使用してポリエナントラク톤を生成することができる。

30

【0125】

本発明の前記および他の局面を、本明細書で述べる態様に関してここでより詳細に説明する。本発明は種々の形態で具体化することができ、本明細書で記述する態様に限定されると解釈されるべきでないことが認識されるべきである。むしろ、これらの態様は、本開示が詳細かつ完全であるように、および本発明の範囲を当業者に伝えるために提供されるものである。

【0126】

1.1 定義

本明細書で本発明の説明において使用される用語は、特定の態様を説明することだけを目的とし、本発明の限定を意図しない。本発明の態様の説明および付属の特許請求の範囲において使用される場合、単数形の「1つ」および「その」は、文脈上明らかに指示されない限り、複数形態も含むことが意図されている。また、本明細書で使用される場合、「および/または」は、関連する列挙項目の1つまたは複数のありとあらゆる組合せを指し、それらを包含する。特に定義されない限り、説明において使用される技術および学術用語を含むすべての用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。

40

【0127】

本明細書で使用される場合、1つの「酵素」または複数の「酵素」という用語は、反応を触媒することができるタンパク質触媒を指す。本明細書において、この用語は単離された酵素だけを意味するのではなく、その酵素を発現する宿主細胞も含む。したがって、酵素CによるAのBへの変換は、酵素Cを発現する宿主細胞によるAのBへの変換も包含すると解

50

釈されるべきである。

【0128】

本明細書で使用される場合、「二官能性C7アルカン」という用語は、7個の炭素原子と2個の官能基を有する直鎖または分枝鎖の飽和または不飽和炭化水素を指す。官能基は、炭化水素鎖上の任意の場所に位置してよい。一部の態様では、官能基は炭化水素鎖の末端に位置する（例えば各々の末端に1個の官能基）。この用語はまた、エナントラクタムなどの環式化合物も包含することが意図されている。例示的な二官能性C7アルカンは、ピメロイルCoA、ピメロイル- [acp]、ヘプタン-1,7-二酸（ピメリン酸またはピメレート）、7-アミノヘプタン酸、7-ヒドロキシヘプタン酸、ヘプタメチレンジアミン、1,7-ヘプタンジオール、7-アミノヘプタノール、7-アミノヘプタナール、エナントラクタム、ピメリン酸セミアルデヒド（7-オキソヘプタノエートとしても知られる）、2-ヘプテン二酸、および2-ヘプテン二酸CoAを含むが、それらに限定されるわけではない。

10

【0129】

本明細書で使用される場合、「～オエート (-oate)」および「～オイン酸 (-oic acid)」という用語、例えばヘプタノエートおよびヘプタン酸は、交換可能に使用される。さらに、「～エート」、「～オエート」および「～オイン酸」は、その中性またはイオン化形態およびいわゆる「両性イオン性」形態のいずれかの化合物を指すために全体を通じて交換可能に使用することができる。

【0130】

本明細書で使用される場合、「三官能性C7アルカン」という用語は、7個の炭素原子と3個の官能基を有する直鎖または分枝鎖の飽和または不飽和炭化水素を指す。官能基は、炭化水素鎖上の任意の場所に位置してよい。一部の態様では、3個の官能基のうちの2個は炭化水素鎖の末端に位置する（例えば各々の末端に1個の官能基）。例示的な三官能性C7アルカンは、2-オキソピメレート（ α -ケトピメレート）、2-アミノピメレート（ α -アミノピメレート）、2-ヒドロキシピメレート（ α -ヒドロキシピメレート）、および2-ヒドロキシピメレートCoA（ α -ヒドロキシピメレートCoA）を含むが、それらに限定されるわけではない。

20

【0131】

本明細書で使用される場合、「官能基」という用語は、アミン基、カルボン酸基、アルデヒド基、アルコール基、補酵素A基またはケト基を指す。「アミン基」という用語は、 -NH_2 ラジカルを指す。「カルボン酸基」という用語は、 -COOH ラジカルを指す。「アルデヒド基」という用語は、 -C(=O)H ラジカルを指す。「アルコール基」という用語は、 -OH ラジカルを指す。「ケト基」という用語は、 C(=O) ラジカルを指す。

30

【0132】

「補酵素A基」という用語は、活性な酵素系を形成する多くの酵素（アポ酵素）の活性のために存在する必要がある、有機補因子または補欠分子族（酵素の非タンパク質部分）を指す。補酵素Aはある種の縮合酵素において機能し、アセチルまたは他のアシル基の転移および脂肪酸の合成と酸化、ピルビン酸の酸化および他のアセチル化において作用する。

【0133】

「acp」または「アシルキャリアータンパク質」という用語は、アセチル補酵素Aおよびマロニル補酵素Aからアセチル基およびマロニル基を取り、それらを縮合によって連結して β -ケト酸アシルキャリアータンパク質を形成し、二酸化炭素およびスルフヒドリル形態のアシルキャリアータンパク質を放出するタンパク質（典型的には脂肪酸合成において活性である）を指す。

40

【0134】

二官能性または三官能性C7アルカン上の官能基は、同じであるかまたは異なっているがよい。例えば、二官能性C7アルカンに関する一部の態様では、両方の官能基がアミン基であってよく、両方の官能基がカルボン酸基であってよく、または両方の官能基がアルコール基であってよい。

50

【0135】

一部の態様では、二官能性C7アルカン上の官能基の一方はアミン基であり、他方はカルボン酸基である。一部の態様では、二官能性C7アルカン上の官能基の一方はアルコール基であり、他方はカルボン酸基である。一部の態様では、二官能性C7アルカン上の官能基の一方はアルコール基であり、他方はアミン基である。

【0136】

三官能性C7アルカンに関する一部の態様では、官能基の2個はカルボン酸基であり、1個の官能基はケト基またはヒドロキシル基またはアミノ基である。

【0137】

「異種の」という用語は、宿主細胞と同じ種の細胞に由来しない任意の核酸またはポリペプチドを指すために本明細書で使用される。したがって、本明細書で使用される場合、「同種の」核酸またはタンパク質は、宿主細胞と同じ種の細胞において生じるまたは宿主細胞と同じ種の細胞によって産生されるものである。

【0138】

核酸および特定の宿主細胞に関して本明細書で使用される「外因性」という用語は、自然界で認められるその特定の細胞においては生じない（およびその特定の細胞からは得ることができない）任意の核酸を指す。それゆえ、非天然の核酸は、ひとたび宿主細胞に導入された場合、宿主細胞にとって外因性とみなされる。非天然の核酸は、全体としての核酸が自然界には存在しないことを条件として、自然界で認められる核酸サブ配列または核酸配列のフラグメントを含み得ることに留意することが重要である。例えば、発現ベクター内にゲノムDNA配列を含む核酸分子は、全体としてのその核酸分子（ゲノムDNAプラスベクターDNA）は自然界には存在しないので、非天然の核酸であり、それゆえひとたび宿主細胞に導入された場合、宿主細胞にとって外因性である。それゆえ、全体として自然界には存在しない任意のベクター、自律複製プラスミドまたはウイルス（例えばレトロウイルス、アデノウイルスまたはヘルペスウイルス）は、非天然の核酸であるとみなされる。したがってPCRまたは制限エンドヌクレアーゼ処理によって生成されるゲノムDNAフラグメントならびにcDNAは、それらが自然界では認められない別個の分子として存在するので、非天然の核酸であるとみなされる。また、プロモーター配列およびポリペプチドをコードする配列（例えばcDNAまたはゲノムDNA）を自然界では認められない配置で含む任意の核酸は非天然の核酸であることになる。天然に存在する核酸は特定の細胞にとって外因性であり得る。例えば、酵母xの細胞から単離された染色体全体は、ひとたびその染色体が酵母yの細胞に導入された場合、酵母yの細胞に関しては外因性核酸である。

【0139】

「外因性」核酸が「同種の」または「異種の」核酸であり得ることは上記から明らかである。これに対し、核酸または遺伝子（または核酸もしくは遺伝子によってコードされるタンパク質）および特定の細胞に関して本明細書で使用される「内因性」という用語は、自然界で認められるようにその特定の細胞中に存在する（およびその特定の細胞から得ることができる）任意の核酸または遺伝子を指す。

【0140】

本明細書で使用される場合、「組換え宿主」という用語は、そのゲノムが少なくとも外因性核酸配列によって増大している宿主を指す。そのような核酸配列は、天然では宿主中に存在しない核酸（すなわち異種核酸）、通常はRNAに転写されないまたはタンパク質に翻訳されない（「発現されない」）DNA配列、および非組換え宿主に導入することを所望する他の核酸配列（例えば特定の核酸配列の発現を変化させる調節領域）を含むが、それらに限定されるわけではない。典型的には本明細書で述べる組換え宿主のゲノムは、1つまたは複数の外因性核酸の安定な導入を介して増大されることが認識される。一般に、外因性核酸は、もともとはDNAの受容者である宿主中には存在しない（すなわち異種核酸である）が、例えばコードされる生成物の生産を増強するためまたは核酸の発現パターンを変化させるために、所与の宿主から核酸を単離することおよびその後、その核酸の1つまたは複数の付加的なコピーを同じ宿主に導入することは本発明の範囲内である。一部の場

合、外因性核酸は、例えば相同組換えまたは部位指定突然変異によって、内因性遺伝子またはDNA配列を修飾するまたはさらには置換する。内因性遺伝子の修飾または置換は、特定のコードされる生成物、例えば酵素の欠失を生じさせ得る。適切な組換え宿主を以下で述べる。組換え宿主はまた、宿主細胞のゲノムには組み込まれないが、細胞中にエピソームとして存在する（および好ましくは複製する）核酸を含み得る。

【0141】

本明細書で使用される場合、「プロモーター」は、遺伝子が転写されることを可能にするDNA配列を指す。プロモーターはRNAポリメラーゼによって認識され、次にそれが転写を開始させる。それゆえ、プロモーターは、RNAポリメラーゼによって直接結合されるかまたはRNAポリメラーゼの動員に参与するDNA配列を含む。プロモーター配列はまた、遺伝子クラスター中の遺伝子の転写レベルを増強する（ゆえに「エンハンサー」の名称）タンパク質（すなわち転写因子のセットに酷似する、トランス作用因子）と結合することができるDNAの1つまたは複数の領域である、「エンハンサー領域」も含み得る。エンハンサーは、典型的にはコード領域の5'末端に位置するが、プロモーター配列から離れていてもよく、例えば遺伝子のイントロン領域内または遺伝子のコード領域の3'側であってもよい。

【0142】

本明細書で使用される場合、「作動可能に連結された」は、発現制御配列が関心対象のコード配列の発現を有効に制御するように遺伝子構築物に組み込まれることを意味する。

【0143】

1.2 原材料

様々な異なる原材料が二官能性または三官能性アルカンを生成するために使用できる。一部の態様では、組換え宿主細胞または細胞（例えば組換え宿主細胞）から調製された溶解物を、7-アミノヘプタン酸などの二官能性または三官能性C7アルカンを生成するために再生可能な原材料と接触させる。炭素源として使用し得る再生可能な原材料の例は、セルロース系原材料、植物由来の炭水化物および脂肪酸を含むが、それらに限定されるわけではない。一部の態様では、組換え宿主細胞を接触させる原材料は、グルコース、スクロース、キシロース、脂肪酸またはグリセロールである。

【0144】

上記で列挙したような再生可能な原材料に加えて、組換え宿主細胞を、炭素源として、SynGasとしても知られる合成ガスでの増殖のために改変することができる。この特定の態様では、本発明の組換え宿主細胞を、二官能性または三官能性C7アルカンを生成するためにSynGasまたは他の気体状炭素の利用のための効率的な代謝経路を提供するように遺伝子操作する。

【0145】

加えて、本明細書で述べる組換え宿主または組換え宿主細胞から調製された溶解物を芳香族炭化水素原材料と接触させることができる。再生可能な原材料ではなく芳香族炭化水素原材料を使用することは、そのような石油由来の材料をより環境に無害な化合物に変換し、環境への影響を低減する方法を提供する。適切な芳香族炭化水素原材料の例は、トルエン、ベンゼン、安息香酸およびシキメートを含むが、それらに限定されるわけではない。

【0146】

1.3. 酵素が触媒する段階を含む二官能性C7アルカンへの経路

上述したように、本発明の態様は、1つまたは複数の単離された酵素の存在下、該酵素を発現する組換え宿主細胞の存在下、または該酵素を発現する細胞（例えば組換え細胞）の細胞溶解物（または部分精製された溶解物）の存在下で二官能性または三官能性C7アルカンを生成するための方法に関する。一部の態様では、二官能性または三官能性C7アルカンの生成はピメレートまたはピメロイルCoAまたはピメロイル-[acp]から始まり、共通の中間体、すなわちピメリン酸セミアルデヒドを介して進行する。具体的には、一部の態様では、本発明は、ピメリン酸セミアルデヒドの7-アミノヘプタン酸へのセミアルデヒドアミノ化を触媒する酵素を使用することによって二官能性C7アルカン、7-アミノヘプタン酸

を生成する方法に関する。図1参照。ω-トランスアミナーゼなどのセミアルデヒドアミノトランスフェラーゼを使用することができる。例示的なトランスアミナーゼは、EC 2.6.1、例えばEC 2.6.1.18、EC 2.6.1.19、EC2.6.1.1、EC 2.6.1.13、EC 2.6.1.48、およびEC 2.6.1.62に分類されるトランスアミナーゼを含むが、それらに限定されるわけではない。一部の態様では、アミノトランスフェラーゼは、ビブリオ・フルビアリス (*V.fluvialis*)、バチルス・ウェイヘンステファネンシス (*B.weihehenstephanensis*)、緑膿菌 (*P.aeruginosa*)、枯草菌 (*B.subtilis*)、またはシュードモナス・シリング (*P.syringae*) 由来のEC 2.6.1.18に分類されるβ-アラニンアミノトランスフェラーゼである。その全体が参照により本明細書に組み入れられる、国際公開公報第2011/031147号参照。

【0147】

10

一部の態様では、7-アミノヘプタナールは、7-アミノヘプタン酸の7-アミノヘプタナールへのアルデヒド脱水素化を触媒する酵素を用いて生成できる。図1参照。EC 1.2.1、例えばEC 1.2.1.4またはEC 1.2.1.63に分類されるアルデヒドデヒドロゲナーゼを使用して、7-アミノヘプタン酸から7-アミノヘプタナールを生成することができる。アルデヒドデヒドロゲナーゼ/カルボン酸レダクターゼはまた、EC 1.2.99、例えばEC 1.2.99.6におけるものであってよい。カルボン酸レダクターゼはまた、NAD依存性非アシル化アルデヒドデヒドロゲナーゼ、例えばスフィンゴモナスおよびカプリアビダス属菌におけるThnGに属するものであってよい。

【0148】

20

一部の態様では、ヘプタメチレンジアミン (1,7-ジアミノヘプタンとしても知られる) は、アミノ基の転移を触媒する酵素を用いて7-アミノヘプタナールから生成できる。図1参照。適切なアミノトランスフェラーゼは、EC 2.6.1、例えば EC 2.6.1.18、EC 2.6.1.19、EC 2.6.1.11、EC 2.6.1.13、EC 2.6.1.39、EC 2.6.1.48、およびEC 2.6.1.62のアミノトランスフェラーゼを含むが、それらに限定されるわけではない。一部の態様では、アミノトランスフェラーゼは、ビブリオ・フルビアリス、バチルス・ウェイヘンステファネンシス、緑膿菌、枯草菌、またはシュードモナス・シリング由来のEC 2.6.1.18に分類されるβ-アラニンアミノトランスフェラーゼである。その全体が参照により本明細書に組み入れられる、国際公開公報第2011/031147号参照。

【0149】

30

一部の態様では、エナントラクタムは、7-アミノヘプタン酸のアミド加水分解を触媒する酵素を用いて7-アミノヘプタン酸から生成できる。図1参照。適切なアミドヒドロラーゼは、EC 3.5.2、例えばEC 3.5.2.12またはEC 3.5.2.11に分類されるアミドトランスフェラーゼを含む。

【0150】

一部の態様では、アルデヒドの還元を触媒する酵素を用いて、7-ヒドロキシヘプタノエートをピメリン酸セミアルデヒドから生成するか、または7-アミノヘプタノールを7-アミノヘプタナールから生成させる。図1参照。例えば、EC 1.1.1、例えばEC 1.1.1.2またはEC 1.1.1.21などに分類されるアルコールデヒドロゲナーゼを用いることができる。幅広い基質範囲を有する非常に多くのアルコールデヒドロゲナーゼが存在すること、および、EC 1.1.1.-、例えば1.1.1.B3またはEC 1.1.1.B4もしくは1.1.1.79などに由来するか、またはEC 1.1.99、例えば1.1.99.2もしくはEC 1.1.99.6などにおける他のデヒドロゲナーゼを、アルデヒドに対応するアルコールに還元させるために用いてもよいことは、当業者には理解されるであろう。あるいは、アルコールオキシダーゼを用いることもできる。アルコールオキシダーゼはクラスEC 1.1.3.13に認められる。

40

【0151】

一部の態様では、1,7ヘプタンジオールは、アルデヒドデヒドロゲナーゼおよびアルコールデヒドロゲナーゼを用いて7-ヒドロキシヘプタノエートから生成できる。適切なアルデヒドデヒドロゲナーゼは、EC 1.2.1 (例えば、EC 1.2.1.4またはEC 1.2.1.63またはEC 1.1.1.21) に分類されうる。図1参照。適切なアルコールデヒドロゲナーゼは、E.C. 1.1.1、例えばEC 1.1.1.1またはEC 1.1.1.2などに分類されうる。幅広い基質範囲を有する非

50

常に多くのアルコールデヒドロゲナーゼが存在すること、および、EC 1.1.1.-、例えば1.1.1.B3もしくはEC 1.1.1.B4もしくは1.1.1.79に由来するか、またはEC 1.1.99、例えば1.1.99.2またはEC 1.1.99.6などにおける他のデヒドロゲナーゼを、アルデヒドを対応するアルコールに還元させるために用いてもよいことは、当業者には理解されるであろう。あるいは、アルコールオキシダーゼを用いることもできる。アルコールオキシダーゼはクラスEC 1.1.3.13に認められる。同様に、幅広い基質特異性を有する膨大な数のアルデヒドデヒドロゲナーゼまたはカルボン酸レダクターゼが存在する。適切なアルデヒドデヒドロゲナーゼは、EC 1.2.1.3；EC 1.2.1.4；およびEC 1.2.1.63を含む。アルデヒドデヒドロゲナーゼ／カルボン酸レダクターゼはまた、EC 1.2.99、例えばEC 1.2.99.6に認められてもよい。アルデヒドデヒドロゲナーゼ／カルボン酸レダクターゼはまた、NAD依存性非アシル化アルデヒドデヒドロゲナーゼ、例えばスフィンゴモナス属種およびカプリアビダス属種におけるThnGなどに属してもよい。あるいは、アルデヒドオキシダーゼ、例えばEC 1.2.3.1由来のアルデヒドオキシダーゼなどを用いてもよい。

10

【0152】

C7二官能性または三官能性アルカンが宿主に毒性であり得る態様（例えば7-オキソヘプタノエートまたは7-アミノヘプタナールなどのセミアルデヒド）において、毒性化合物への変換は、単離された酵素または組換え宿主からの溶解物を用いてインビトロで実施できる。一部の態様では、毒性化合物は宿主によって生成され、その後エナントラクトムに変換される（単離された酵素、酵素を発現する宿主細胞を用いて、または化学変換によって）。

20

【0153】

1.5 ピメレートおよび/またはピメロイルCoAへの生合成経路

ピメレートおよび/またはピメロイルCoAは、以下を含む多数の異なる方法によって得ることができる：(i) α -ケト酸鎖伸長経路から生成される α -ケトスベレート、(ii) ビオチン生合成経路I、(iii) ビオチン生合成経路II、(iv) 3個のマロニルCoA分子の1個のピメロイルCoA分子への縮合、(v) ベンゾエート分解経路、(vi) シクロヘキサンカルボキシレート経路、(vii) D,L-ジアミノピメレート経路、および(viii) 出発炭素源がクロトネートである生合成経路。図2参照。ピメレートおよび/またはピメロイルCoAまたはピメロイル-[acp]へのこれらの経路は以下でさらに詳細に説明する。

【0154】

これらの経路のいずれにおいても、ピメレートは、チオエステルの加水分解を触媒する酵素を用いてピメロイルCoAから生成できる。例えば、チオエステルを加水分解することができる酵素は、チオエステラーゼ、酸-チオールリガーゼ、およびCoAトランスフェラーゼを含むが、それらに限定されるわけではない。適切なチオエステラーゼは、EC 3.1.2、例えば、YciA、tesB、もしくはAcot13の遺伝子産物、EC 3.1.2.2、EC 3.1.2.18、EC 3.1.2.19、またはEC 3.1.2.20に分類されるチオエステラーゼを含む。アシル-[acp]チオエステルに作用するチオエステラーゼには、EC 3.1.2.14、例えば、FatA、FatB、およびEC 3.1.2.21が含まれる。例えば、以下の酵素の1つが使用できる：EC 3.1.2に分類されるチオエステルヒドロラーゼ/アシルCoAチオエステラーゼ、例えばEC 3.1.2.19および3.1.2.18のADP依存性中鎖アシルCoAヒドロラーゼ、EC 3.1.2.20のアシルCoAヒドロラーゼ、またはYciA、tesB、もしくはAcot13の遺伝子産物、EC 3.1.2.14のオレオイル-[アシルキャリアータンパク質]ヒドロラーゼ。適切な酸-チオールリガーゼは、EC 6.2.1、例えばEC 6.2.1.3、EC 6.2.1.14、およびEC 6.2.1.23に分類される酸-チオールリガーゼを含む。適切なCoAトランスフェラーゼは、EC 2.8.3、例えばEC 2.8.3.6、EC 2.8.3.8、EC 2.8.3.12、EC 2.8.3.13、またはEC 2.8.3.14に分類されるCoAトランスフェラーゼ、または、CoAのピメリン酸への可逆的移行を触媒するThnHの遺伝子産物を含む。

40

【0155】

ヘプタン-1,7-二酸は、[acp]-チオエステルに作用する酵素、例えば、EC 3.1.2.14のアシル-[acp]チオエステラーゼ、例えば、fatAおよびfatB、またはEC 3.1.2.21の使用によって、ピメロイル-[acp]から得ることができる。あるいは、[acp]-チオエステルに作

50

用する酸チオールリガーゼ、例えば、EC 6.2.1.14およびEC 6.2.1.20を使用することができる。

【0156】

あるいは、ピメリン酸は、AaasS（アシル-ACPシンテターゼ）によるエステル結合の加水分解、次いでリパーゼ/エステラーゼによるメチル基の除去によってピメロイル-[acp]メチルエステルから得ることができる。

【0157】

ピメレートは、カルボン酸の還元を触媒する酵素を用いてピメリン酸セミアルデヒドに変換することができる。適切なレダクターゼは、EC 1.2.99に分類されるカルボン酸レダクターゼを含むが、それらに限定されるわけではない。カルボン酸レダクターゼはまた、NAD依存性非アシル化アルデヒドデヒドロゲナーゼ、例えば、スフィンゴモナスおよびカプリアピダス属菌におけるThnG、またはEC 1.2.1、例えば1.2.1.3、EC 1.2.1.10、EC 1.2.1.22、EC 1.2.1.50、EC 1.2.1.57、およびEC 1.2.1.76に分類される脂肪アシルCoAレダクターゼに属するものであってよい。一部の態様では、脂肪アシルCoAレダクターゼは、ピメロイルCoAまたはピメロイル-[acp]をピメリン酸セミアルデヒドに直接変換することができる。EC 1.2.99の例示的なカルボニルレダクターゼは、ノカルジア種（参照により本明細書に組み入れられる、Aimin, et al., Appl. Environ. Microbiol. 70:1874-1881 (2004)）またはストレプトミセス・グリセウス (*S. griseus*)（参照により本明細書に組み入れられる、Suzuki et al., J. Antibiot. (Tokyo) 60:380-387 (2007)）由来のEC 1.2.99.6を含むが、それに限定されるわけではない。EC 1.2.1の例示的な脂肪アシルCoAレダクターゼは、例えばクロロフレクサス・オーランティアカス (*C. aurantiacus*)（参照により本明細書に組み入れられる、Hugler, M, et al., J. Bacteriology 184:2404-2410 (2002)）、メタッロスパエラ・セドゥラ (*M. sedula*)（参照により本明細書に組み入れられる、Kockelkorn, D. and Fuchs, G., J. Bacteriology 191:6352-6362 (2009)）、またはスルフォロバス・トコダイ (*S. tokodai*)（参照により本明細書に組み入れられる、Alber, B. et al., J. Bacteriology 188:8551-8559 (2006)）由来のEC 1.2.1.75; および、例えばアシネトバクター属種 (*Acinetobacter* sp.)、マガモ (*A. platyrhynchos*)（参照により本明細書に組み入れられる、Ishige, T., et al., Appl. Environ. Microbiology 68:1192-1195 (2002)）、シロイヌナズナ (*A. thaliana*)（どちらも参照により本明細書に組み入れられる、Doan, T. T., et al., Journal Plant Physiology 166:787-796 (2009) および Hooks, M. A., et al., Plant J. 20:1-13 (1999)）; ヒト (*Homo sapiens*)（参照により本明細書に組み入れられる、McAndrew, R. P. et al., J. Biol. Chem. 283:9435-9443 (2008)）、マウス (*M. Musculus*)、*P. レイオグナチ* (*P. leiognathi*)、*P. ホスホレウム* (*P. phosphoreum*)、エンドウ (*P. sativum*)、またはシナウスイロイルカ (*S. chinesis*) 由来の1.2.1.50を含むが、それらに限定されるわけではない。EC 1.2.1における例示的なアシル-[acp]レダクターゼには、EC 1.2.1.80、例えば、シネココッカス・エロンガタス (*Synecoccus elongates*)（Shirmer, A. et al., (2010). Microbial biosynthesis of alkanes. Science, 329 (5991: 559-562) 由来のものが含まれる。

【0158】

1.5.1 α -ケト酸鎖の伸長

二官能性アルカンは、 α -ケトグルタレートから当技術分野にて公知の α -ケトアジペート、 α -ケトピメレートまたは α -ケトスベレートへの連続的な鎖伸長反応によって生成できる。例えば図3および国際公開公報第2010/068944号参照。次に、 α -ケト二酸 (C_n , $n=5 \sim 8$) または対応する 2-アミノ二酸の脱カルボキシル化により、 C_n-1 、例えば $C_4 \sim 7$ の α , ω -二官能性アルカンの前駆体が提供される。これらの連続的な α -ケト酸鎖伸長反応は、メタノカルドコッカス・ジャナスキイ (*Methanocaldococcus jannaschii*)、メタノコッカス・ボルタエ (*Methanococcus voltae*) およびメタノサルシナ・サーモフィラ (*Methanosarcina thermophila*) などのメタン生成細菌において明らかにされたように補酵素Bの生合成経路において起こる。

【0159】

α -ケトグルタレート (C5) から α -ケトスベレートへの3回の連続的な鎖伸長は、基質に対して3回 (およびEC 4.2.1.114 (AksD (3-イソプロピルリンゴ酸デヒドラターゼラージサブユニット) /AksE (3-イソプロピルリンゴ酸デヒドラターゼスモールサブユニット)) の場合は6回) 作用する同じ3つの酵素によって触媒され、各回に鎖の長さを増大させる。図3参照。これらの酵素は以下を含むが、それらに限定されるわけではない: EC 2.3.3.14: α -ケトグルタレート、 α -ケトアジペートおよび α -ケトピメレートに作用する、ホモクエン酸シンターゼ/AksA (α -イソプロピルリンゴ酸シンターゼ); EC 4.2.1.114: (R)-ホモシトレー、ジホモシトレートまたはトリホモシトレートの脱水反応、ならびにシス-ホモアコニテート、シス-(ホモ)₂アコニテートおよびシス-(ホモ)₃アコニテートの水和反応を触媒する、ホモアコニターゼまたはAksD/AksE; ならびにEC 1.1.1.87: ホモイソシトレート、スレオ-イソ (ホモ)₂シトレートおよびスレオ-イソ (ホモ)₃シトレートのNAD (P)⁺依存性酸化的脱カルボキシル化を触媒する、ホモイソクエン酸デヒドロゲナーゼまたはAksF (多官能性3-イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ/D-リンゴ酸デヒドロゲナーゼ)。

【0160】

例示的なAksA酵素は、EC 2.3.3、例えばEC 2.3.13または2.3.3.14におけるものを含むが、それらに限定されるわけではない。例示的なAksD酵素は、EC 4.2.1、例えばEC 4.2.1.36におけるものを含む。例示的なAksF酵素は、EC 1.1.1、例えばEC 1.1.1.87の酵素を含むが、それらに限定されるわけではない。

【0161】

一部の態様では、鎖伸長酵素は、AksA MTH1630、AksD MTH1631、AksE MTH0829またはAksF MTH1388である。例えば、参照により本明細書に組み入れられる国際公開公報第2010/104391号参照。

【0162】

この経路の利点は、宿主における3つの異種タンパク質の組換え発現しか必要としないことである。 α -ケトグルタレートから α -ケトアジペートへの鎖伸長は、アエロピュルム・ペルニクス (*Aeropyrum pernix*)、デイノコッカス・ラディオデュランス (*Deinococcus radiodurans*)、ピロコッカス・アビッシ (*Pyrococcus abyssi*)、ピロコッカス・ホリコシイ (*Pyrococcus horikoshii*)、スルホロブス・ソルファタリカス (*Sulfolobus solfataricus*)、スルホロブス・トコダイイ (*Sulfolobus tokodaii*) およびサーマス・サーモフィルス (*Thermus thermophilus*) を含む古細菌のリジン生合成V経路、ならびにユーグレナ・グラシリス (*Euglena gracilis*)、アスペルギルス属、ペニシリウム・クリソゲナム (*Penicillium chrysogenum*) およびサッカロミセス・セレビスエを含む酵母および真菌のリジン生合成IV経路においても起こる。

【0163】

リジン生合成IVおよびV経路において、 α -ケトグルタレートから α -ケトアジペートへの反応は、4つの酵素、すなわちEC 2.3.3.14: ホモクエン酸シンターゼ (hcs/LYS20/LYS21/nifV)、EC 4.2.1.114: メタン細菌HACN、EC 4.2.1.36: ホモアコニターゼヒドラターゼ、およびEC 1.1.1.87: ホモイソクエン酸デヒドロゲナーゼ (hicDHまたはLYS12) の連続的な作用によって触媒される。

【0164】

1.5.3 マロニルCoA縮合経路

一部の態様では、ある種の生物は3個のマロニルCoA分子を1個のピメロイルCoA分子に縮合することができるので、マロニルCoAをピメロイルCoAの供給源として使用することができる。図4参照。また、参照により本明細書に組み入れられる、Lin, S. and Cronan, J. E., *Molecular Biosystems* 7:1811-21 (2011) も参照のこと。したがって、ピメロイルCoAがマロニルCoAから生成される組換え宿主を生産することができる。一部の態様では、宿主細胞はアクロモバクター属 (*Achromobacter*) 以外の生物である。一部の態様では、ピメロイルCoAは、その後、ピメリン酸または他の二官能性C7アルカンに変換し得る。

【0165】

1.5.4 ビオチン生合成経路I（グラム陰性菌）およびII（グラム陽性菌）

一態様では、組換え宿主細胞は、グリセロールおよび/または脂肪酸から誘導されるアセチルCoAから、ピメリン酸および/またはピメロイル-[acp]、またはピメロイル-CoAを生産する。例えば、どちらも参照により本明細書に組み入れられる、Lin, S., Nature Chem. Biol. 6:682-688 (2010) ; および Cronan, J. E. and Lin, S., Current Opinion in Chem. Biology 15:1-7 (2011) を参照されたい。図5は、枯草菌におけるBioIによる長鎖脂肪酸-[acp]チオエステルの酸化切断を通じたピメロイル-[acp]の形成を示しており、これは、ビオチン生合成II（グラム陽性菌）における前駆体であるピメリン酸またはピメロイル-CoAに変換される。図6は、ビオチン生合成I（グラム陰性菌）におけるピメロイル-[acp]またはそのメチルエステルの形成を示す。図6はまた、ピメロイル-[acp]メチルエステルのピメリン酸モノメチルエステルへの変換のための経路も示す。ピメリン酸モノメチルエステルは、その後、例えばEC 3.1.1のリパーゼの存在下でピメリン酸（ヘプタン-1,7-二酸）に変換される。図6はまた、エステラーゼ（EC 3.1.1、例えば EC 3.1.1.85の酵素、BioH）の存在下でのピメロイル-[acp]メチルエステルのピメロイル-[acp]への変換も示す。ピメロイル-[acp]は、その後、アシル-[acp]-チオエステラーゼ、例えばEC 3.1.2.14の酵素、例えばFatAまたはFatBの存在下でピメリン酸（ヘプタン-1,7-二酸）に変換される。一部の態様では、本発明は、図6に示す酵素の1つまたは全部を含むピメリン酸（ヘプタン-1,7-二酸）を生産することができる組換え宿主細胞を企図する。一部の態様では、組換え宿主細胞は、ピメロイルCoAがビオチン生合成にシャトル（shuttle）することができないように、6-カルボキシヘキサノイルCoA（ピメロイルCoA）を7-ケト-8-アミノペラルゴン酸（KAPA）に変換することができる酵素であり、天然のビオチン生合成経路を有する宿主生物においてBioF遺伝子によってコードされる、7-ケト-8-アミノペラルゴン酸シンテターゼの欠失を有する。

【0166】

ピメロイル-[acp]メチルエステルはまた、BioI（例えば枯草菌由来のBioI）による長鎖アシル-[acp]および/または遊離脂肪酸の代謝の結果としても生成され得る。

【0167】

1.5.5 真核生物のビオチン生合成経路

ピメリン酸および/またはピメロイルCoAは真核生物のビオチン生合成経路からも得ることができる。例えば、どちらも参照により本明細書に組み入れられる、Roje, S., Phytochemistry 68:1904-1921 (2007) ; および Charles R. Hall, The Contribution of Horizontal Gene Transfer to the Evolution of Fungi (May 10, 2007)（未公表博士論文、Duke University）（Duke University Librariesのファイル）参照。真核生物経路において、アセチルCoAは、EC 2.3.1.9に分類される酵素を使用してアセトアセチルCoAに生物変換され；アセトアセチルCoAは、E.C.1.1.1.157に分類される酵素を使用して（S）-3-ヒドロキシブタノイルCoAに生物変換され；（S）-3-ヒドロキシブタノイルCoAは、EC 4.2.1.17に分類される酵素を使用してクロトニルCoAに生物変換され；クロトニルCoAは、EC 4.1.1.70に分類される酵素を使用してグルタコニル-1-CoAに生物変換され；グルタコニル-1-CoAは、EC 1.3.99.7に分類される酵素を使用してグルタリルCoAに生物変換され；グルタリルCoAは、EC 2.3.1.43に分類される酵素を使用して3-ケトピメリル CoAに生物変換され；3-ケトピメリル CoAは、EC 1.1.1.4259に分類される酵素を使用して3-ヒドロキシピメリルCoAに生物変換され；3-ヒドロキシピメリルCoAは、EC 4.2.1.-に分類される酵素を使用して2,3-ジデヒドロピメロイルCoAに生物変換され；そして 2,3-ジデヒドロピメロイルCoAは、EC 1.3.1.62に分類される酵素を使用してピメロイルCoAに生物変換される。ピメロイルCoAは、その後ピメリン酸に変換される。

【0168】

それゆえ、一部の態様では、本発明は、アセチルCoAをヘプタン-1,7-二酸に変換するための酵素を含む組換え宿主細胞を提供する。一部の態様では、組換え宿主細胞は、宿主生物が天然のビオチン生合成経路を有する場合、ピメロイルCoAまたはピメロイル-[acp]がビオチン生合成にシャトルされることができないように、6-カルボキシヘキサノイルCo

A (ピメロイルCoA) を7-ケト-8-アミノペラルゴン酸 (KAPA) に変換することができる酵素であり、宿主においてBioF遺伝子によってコードされる、7-ケト-8-アミノペラルゴン酸シンテターゼの欠失を有する。一部の態様では、脂肪酸-[acp]エステルの酸化的切断を介して形成されるピメロイル-[acp]を増加させるために、BioIを過剰発現させる。一部の態様では、BioIによる切断のために長鎖脂肪酸をそれらの対応する[acp]-チオエステルへと活性化させる[acp]-トランスフェラーゼ/シンテターゼを、宿主細胞において過剰発現させる。本発明の態様はまた、そのような組換え宿主細胞の使用を含む、ヘプタン-1,7-二酸を生産する方法も提供する。

【0169】

1.5.6 ベンゾイルCoA分解経路

本明細書において企図されるピメロイルCoAおよび/またはピメリン酸の1つの付加的な供給源は、図7に示すベンゾエート分解経路である。例えば、すべてが参照により本明細書に組み入れられる、Bernsteinb, J.R., et al., *Metabolic Eng'g* 10:131-140 (2008); Harwood, C.S., et al., *FEMS Microbiology Reviews* 22:439-458 (1999); および Harrison, F. H. and Harwood, C.S., *Microbiology* 151:727-736 (2005) 参照。多数の変換が図7に例示されており、その中でベンゾエートはEC 6.2.1.25に分類される酵素を使用してベンゾイルCoAに変換され、最終的にピメロイルCoAに変換される。ベンゾイルCoAは、EC 1.3.99.15に分類される酵素を使用してシクロヘキサ-1,5-ジエンカルボニルCoAに変換される。一部の態様では、シクロヘキサ-1,5-ジエンカルボニルCoAは、EC 4.2.1.100 に分類される酵素を使用して6-ヒドロキシシクロヘキサ-1-エン-1-カルボキシルCoAに生物変換され; 6-ヒドロキシシクロヘキサ-1-エン-1-カルボキシルCoAは、EC 1.1.1.-に分類される酵素を使用して6-ケトオキシシクロヘキサ-1-エン-1-カルボキシルCoAに生物変換され; 6-ケトオキシシクロヘキサ-1-エン-1-カルボキシルCoAは、EC 3.7.1.-に分類される酵素を使用して3-ヒドロキシピメリルCoAに生物変換され; 3-ヒドロキシピメリルCoAは、EC 4.2.1.-に分類される酵素を使用して6-カルボキシルヘキサ-2-エノイルCoAに生物変換され; 3-ヒドロキシピメリルCoAは、EC 1.3.1.62に分類される酵素を使用してピメロイルCoAに生物変換される。ピメロイルCoAは、次に、ピメリン酸 (ヘプタン-1,7-二酸) に変換される。一部の態様では、EC 4.2.1.-に分類される酵素を使用してシクロヘキサ-1,5-ジエンカルボニルCoAはシクロヘキサ-1-エン-1-カルボキシルCoAに生物変換され、シクロヘキサ-1-エン-1-カルボキシルCoAは2-ヒドロキシシクロヘキサ-1-カルボキシルCoAに生物変換され; 2-ヒドロキシシクロヘキサ-1-カルボキシルCoAは、E.C.1.1.1.-に分類される酵素を使用して2-ケトシクロヘキサ-1-カルボキシルCoAに生物変換され、そして2-ケトシクロヘキサ-1-カルボキシルCoAは、EC 3.1.2.-に分類される酵素 (例えば、EC 3.1.2.-に分類される酵素、 α -ケトシクロヘキサ-1-カルボキシルCoAヒドロラーゼRp-badI) を使用してピメロイルCoAに生物変換される。

【0170】

一部の態様では、ヘプタン-1,7-二酸を生産することができる組換え宿主細胞は、図7または本章で列挙される酵素の1つまたは複数を含む。

【0171】

1.5.7 2,6-ジアミノピメレート経路

ピメレートのさらに別の供給源は、2,6-ジアミノピメレートとしても知られるD,L-ジアミノピメレートである。D,L-ジアミノピメレートはリジンの生成における中間体である。一部の態様では、内因性リジン経路は、ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼの欠失を有する組換え宿主細胞を作製することにより、ピメレートを優先的に生産するように改変できる。例えば図10参照。D,L-ジアミノピメレートは、D,L-ジアミノピメレートの6-アミノ-2-ヘプテン二酸への還元的脱アミノ化を触媒する酵素によって不飽和モノアミノピメリン酸に生物変換することができる。D,L-ジアミノピメレートの還元的脱アミノ化を触媒する酵素の例は、EC 4.3.1、例えばEC 4.3.1.1、EC 4.3.1.2、EC 4.3.1.3、EC 4.3.1.9、EC 4.3.1.12、EC 4.3.1.13、EC 4.3.1.14; EC 4.3.1.23、およびEC 4.3.1.24に分類されるアンモニアリアーゼを含む。一部の態様では、アンモニアリアーゼは、C.アマロナティ

カス (*C.amalonaticus*)、*C.テタノモルフム* (*C.tetanomorphum*) または *A.オリゼ* 由来の EC 4.3.1.2 に分類されるメチルアスパラギン酸アンモニアリアーゼである。例えば、その全体が参照により本明細書に組み入れられる、Botting, *Biochemistry* 27:2953-2955 (1988); および Kato, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50:468-474 (1998) 参照。

【0172】

6-アミノ-2-ヘプテン二酸は、6-アミノ-2-ヘプテン二酸の2-アミノ-2-ヘプタン二酸 (2-アミノピメリン酸または α -アミノピメレートとしても知られる) へのエノエート還元を触媒する酵素を用いて、2-アミノ-2-ヘプテン二酸に生物変換することができる。6-アミノ-2-ヘプテン二酸のエノエート還元を触媒する酵素の例は、EC 1.3.1、例えば EC 1.3.1.8; EC 1.3.1.9; EC 1.3.1.10、EC 1.3.1.31; EC 1.3.1.38; EC 1.3.1.39; EC 1.3.1.44 など

10

に分類されるエン酸レダクターゼ、または EC 1.3.1.62 におけるピメロイル-CoA デヒドロゲナーゼ、例えば PimC/PimD もしくは ThnJ/ThnK などを含む。エン酸レダクターゼはまた、EC 1.3、例えば EC 1.3.8.1 もしくは EC 1.3.99.3; EC 1.3.99.B10、または シントロファス・アシディトロフィカス 2,3-ジデヒドロピメリル-CoA レダクターゼ および それらのホモログなどに認められてもよい。一部の態様では、エン酸レダクターゼは、それぞれ 枯草菌 または リコペルシコン・エスクレンタム (*L. esculentum*) に由来する、EC 1.3.1.31 における YqjM または OPR1/3 である。例えば、Stueckler, *Org. Lett.* 9: 5409-5411 (2007); Kitzing, *J. Biol. Chem.* 280: 27904-27913 (2005); Hall, *Angew. Chem. Int. Ed.* 46: 3934-3937 (2007); および Breithaupt, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 103: 14337-14342 (2006) を参照されたく、これらは全体が参照により本明細書に組み入れられる。

20

【0173】

2-アミノピメリン酸は、2-アミノピメリン酸の還元的脱アミノ化を触媒する酵素によって、対応する2-ヘプテン二酸 (2,3-ジデヒドロピメリン酸としても知られる) に変換することができる。2-アミノピメリン酸の還元的脱アミノ化を触媒する酵素の例は、上述したように、EC 4.3.1、例えば EC 4.3.1.1; EC 4.3.1.2; EC 4.3.1.3; EC 4.3.1.9; EC 4.3.1.12; EC 4.3.1.13; EC 4.3.1.14; EC 4.3.1.23; または EC 4.3.1.24 など に分類されるアンモニアリアーゼを含む。

【0174】

2-ヘプテン二酸は、CoA トランスフェラーゼ (例えば、EC 2.8.3、例えば EC 2.8.3.12; EC 2.8.3.13 もしくは EC 2.8.3.14 など に分類される CoA トランスフェラーゼ、または (or or) CoA のピメリン酸への可逆的転移を触媒する ThnH の遺伝子産物) および 酸チオールリガーゼ (例えば、EC 6.2.1、例えば EC 6.2.1.3; EC 6.2.1.5; EC 6.2.1.14; または EC 6.2.1.23 など に分類される 酸-チオールリガーゼ) を用いて、2-ヘプテン二酸-CoA に変換することができる。

【0175】

2-ヘプテン二酸-CoA は、続いて、2-ヘプテン二酸のエノエート還元を触媒する酵素、例えば、EC 1.3.1 に分類されるエン酸レダクターゼ酵素などによって、ピメロイル-CoA に変換される。ピメロイル-CoA は、上記のようにピメレートまたはピメリン酸セミアルデヒドに変換されうる。

【0176】

図10 および 図3 に示すように、 α ケトピメレートも、メタン生成細菌 (例えば、メタノバクテリウム・オートトロフィカム (*Methanobacterium autotrophicum*)) に存在するもののような鎖伸長酵素を用いて1回の鎖伸長を受けて α -ケト-スベレートを形成することができる。そのような鎖伸長酵素は、上記で論じたように AxsA、AxsD、および AxsE または F を非限定的に含む。例示的な AxsA 酵素は、EC 2.3.3 におけるものを非限定的に含む。EC 2.3.3 における例示的な酵素は、EC 2.3.13 または 2.3.3.14 を非限定的に含む。例示的な AxsD 酵素は、EC 4.2.1 におけるものを含む。EC 4.2.1 における例示的な酵素は、EC 4.2.1.36 を非限定的に含む。例示的な AxsF 酵素は、EC 1.1.1 における酵素を非限定的に含む。EC 1.1.1 における例示的な酵素は、EC 1.1.1.87 を非限定的に含む。そして、この場合、第4のセットの酵素はデカルボキシラーゼを含む。例示的なデカルボキシラーゼは、EC 4.1.1

40

50

におけるものを含む。EC 4.1.1における例示的なデカルボキシラーゼは、EC 4.1.1.11；EC 4.1.1.15；EC 4.1.1.17；EC 4.1.1.18；EC 4.1.1.19；EC 4.1.1.20およびEC 4.1.1.86を非限定的に含む。

【0177】

一部の態様では、アセチル-CoAをトリカルボン酸（TCA）サイクルに供給することができ、該サイクルにおいてアセチル-CoAはコハク酸（ブタン-1,4-二酸）に変換される。次にコハク酸は、TCAサイクルから、ピメリン酸を合成する経路に迂回し、それは2-オキソグルタレート（2-ヒドロキシ-1,2,4-ブタントリカルボン酸（ホモシトレート））（例えば、EC 2.3.3.14における酵素による）への生物変換から出発し；EC 4.2.1.36に分類される酵素を用いた、ホモシトレートのホモシスアコニターゼへの、およびホモシスアコニターゼのホモイソシトレートへの生物変換；EC 1.1.1.87に分類される酵素を用いたホモイソシトレートのオキサログルタレートへの生物変換；EC 1.1.1.87に分類される酵素を用いたオキサログルタレートの2-オキソアジペートへの生物変換、およびEC 1.2.4.2に分類される酵素を用いた2-オキソアジペートのグルタリル-CoAへの生物変換を行う。グルタリル-CoAは、上記で論じたようにピメロイル（pomeloyl）-CoAに変換することができる。ホモシトレートは最終的にピメロイル-CoAに変換され、その後、本明細書に記載したようにピメリン酸に変換される。

【0178】

α -ケト-スベレートは、 α -ケト酸デカルボキシラーゼによって脱カルボキシル化されてピメリン酸セミアルデヒドを形成すること、または、 α -アミノ酸デカルボキシラーゼによって脱カルボキシル化されると7-アミノヘプタン酸が直接導かれる、アミノ酸アミノトランスフェラーゼを用いて α -アミノスベレートに変換されうる。あるいは、ピメリン酸セミアルデヒドを、 ω -アミノトランスフェラーゼを用いて7-アミノヘプタン酸に変換することもできる。例示的な α -ケト酸デカルボキシラーゼは、EC 4.1.1、例えばEC 4.1.1.1；EC 4.1.1.7；およびEC 4.1.1.72におけるもの、またはクラスEC 2.2.1.6におけるアセト乳酸シンターゼを含む。

【0179】

例示的な α -アミノ酸デカルボキシラーゼは、EC 4.1.1.11；EC 4.1.1.15；EC 4.1.1.17；EC 4.1.1.18；EC 4.1.1.19；EC 4.1.1.20；EC 4.1.1.45およびEC 4.1.1.86におけるものを含む。一部の態様では、デカルボキシラーゼは、その全体が参照により本明細書に組み入れられるWO2011/031147号に記載されているように、L.ラクティス由来のEC 4.1.1.1におけるケトイソ吉草酸デカルボキシラーゼkivD；シュードモナス・プチダ（*P. putida*）由来のEC 4.1.1.7におけるベンゾイルギ酸デカルボキシラーゼmdIC A460IまたはBFD；S.セレビスエ由来のEC 4.1.1.1におけるピルビン酸デカルボキシラーゼイソ酵素1および2 Pdc1；Z.モビリス由来のピルビン酸デカルボキシラーゼPdc（I472A）；またはL.ラクティス由来のEC 4.1.1.72における分枝鎖 α -ケト酸デカルボキシラーゼkdcAを含む。例示的なアミノ酸アミノトランスフェラーゼは、EC 2.6.1、例えばEC 2.6.1.21；EC 2.6.1.39；EC 2.6.1.42；およびEC 2.6.1.67などにおけるものを含む。例示的な ω -アミノトランスフェラーゼは、EC 2.6.1、例えばEC 2.6.1.11；EC 2.6.1.13；EC 2.6.1.18；EC 2.6.1.19；EC 2.6.1.48；およびEC 2.6.1.62などにおけるものを含む。

【0180】

一態様では、 α -ケトピメレートを、 α -ヒドロキシピメレートへのケトン還元を触媒する1つまたは複数の酵素（例えばEC 1.1.1.184などのカルボニルレダクターゼ）と接触させることができ、今度はこれを、CoAの転移を触媒する酵素（例えば上述したCoAトランスフェラーゼ）を使用して α -ヒドロキシピメレートCoAに変換することができる。 α -ヒドロキシピメレートCoAは、 α -ヒドロキシピメレートCoAの脱水を触媒する酵素（例えば、EC 4.2.1.例えばEC 4.2.1.2、EC 4.2.1.17、EC 4.2.1.18、EC 4.2.1.59、およびEC 4.2.1.61に分類されるヒドロリアーゼ）で2-ヘプテン二酸CoAに変換することができる。2-ヘプテン二酸CoAは、2-ヘプテン二酸CoAのエノエート還元を触媒する酵素を使用してピメリン酸CoAに変換することができる。適切なエン酸レダクターゼは上述されている。

【0181】

一部の態様では、本発明は、D,L-ジアミノピメレートを実優先的にピメレートに変換するのに必要な1つまたは複数の酵素を含む組換え宿主細胞を提供する。

【0182】

1.5.8 クロトネート経路

ピメロイルCoAの供給源、および最終的にピメレートの供給源は、出発炭素源がクロトネートである生合成経路である。その生合成経路を図9に例示する。例えば、Mouttaki, H., et al., *Applied Environ. Microbiology* 73:930-938 (2001) 参照。クロトネートはアセチルCoAに分解される。図9に示す生合成経路において生成されるアセチルCoAの3分の2がアセテートに変換されることが報告されている。一部の態様では、本発明は、図9に示すように多数の代謝段階においてアセチルCoAがアセテートではなくアセトアセチルCoAに変換され、その後グルタコニルCoAに変換されるように、アセチルCoAをアセテートに変換する酵素（例えばリン酸アセチルトランスフェラーゼおよびアセテートキナーゼ）が欠失している組換え宿主細胞を提供する。グルタコニルCoAはその後グルタリルCoAに変換される。グルタリルCoAは、鎖伸長されて3-オキソピメリルCoAを形成する。還元、脱水および2度目の還元後、ピメリルCoAが得られる。

【0183】

図9に示す生合成経路において、ピメリルCoAは最終的にシクロヘキサンカルボキシレートに変換される。そのような生合成経路はシントロファス・アシディトロフィカス (*S. aciditrophicus*) において認められている。それゆえ、一部の態様では、本発明は、代謝経路がピメロイルCoAで終了するように、ピメロイルCoAをシクロヘキス-1-エン-1-カルボキシルCoAに変換し、最終的にシクロヘキサンカルボキシレートに変換する酵素をコードする遺伝子が「ノックアウト」されている組換え宿主細胞を提供する。

【0184】

1.5.9 テトラリン分解経路

一部の態様では、ピメリン酸セミアルデヒドは、スフィンゴモナスおよびコリネバクテリウム属種からのテトラリン（ベンゾシクロヘキサン）分解経路を使用して生産される。7-オキソヘプタン酸は、スフィンゴモナス・マクロゴリタビド (*Sphingomonas macrogotabid*) におけるテトラリン分解経路の中間体として生成される。Lopez-Sanchez, A., et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 76:110-118 (2010)。テトラリンは、ピルビン酸およびピメリン酸セミアルデヒドを生じる両方の芳香環の開裂によって代謝される。有機溶媒であるテトラリンは、ナフタレンから誘導される複雑な出発物質である。ナフタレンは現在コーラルタールから生産されるが、ナフタレン合成のための生合成経路がシロアリ、真菌および一部の種類の植物において生じることは公知である。Chen, J. et al., *Nature* 392:558-559 (1998); Daisy, B. H., et al., *Microbiology* 148:3737-3741 (2002); および Azuma, H., et al., *Phytochemistry* 42:999-1004 (1996)。ピメリン酸セミアルデヒドは、上記で論じたように7-アミノヘプタン酸または7-ヒドロキシヘプタン酸に変換することができる。

【0185】

1.11 2-オキソピメレートからのヘキサメチレンジアミン

本発明の一部の態様はまた、組換え宿主細胞を使用することを含む、2-オキソピメレートからヘキサメチレンジアミンを生成する方法も提供する。2-オキソピメレートは、メタン生成古細菌における補酵素B生合成経路の公知の中間体である。

【0186】

それゆえ本発明は、以下を含む組換え宿主細胞を提供する: 2-オキソピメレートを2-アミノピメレートに変換することができる酵素（例えばEC 2.6.1.67のアミノトランスフェラーゼ酵素）、2-アミノピメレートを2-アミノ-7-オキソヘプタノエートに変換することができる酵素（例えばEC 1.4.1のレダクターゼ酵素）、2-アミノ-7-オキソヘプタノエートを2,7-ジアミノヘプタノエートに変換することができる酵素（例えばEC 2.6.1の1-アミノトランスフェラーゼ酵素）、および2,7-ジアミノヘプタノエートをヘキサメチレンジアミンに変換することができる酵素（例えばEC 4.1.1のデカルボキシラーゼ酵素）。一部の

態様では、ヘキサメチレンジアミンを生産することができる組換え宿主細胞は、これらの酵素のいずれかまたは全部を含む。本発明の態様はまた、これらの組換え宿主細胞の使用を含む、ヘキサメチレンジアミンを生産する方法も提供する。

【0187】

一部の態様では、本発明は、糖類、脂肪酸、グリセロールおよびSynGasなどの再生可能な原材料からヘキサメチレンジアミンを生産するための方法を提供する。一部の態様では、ヘキサメチレンジアミンを生産することができる非天然の宿主細胞は、再生可能な原材料をヘキサメチレンジアミンに変換するのに必要な酵素のいずれかまたは全部を含む。

【0188】

2.2 組換え宿主細胞

本開示は、本明細書で述べる経路の1つにおいて化合物を生成するために使用される酵素の1つまたは複数（例えば2つ以上、3つ以上、4つ以上、5つ以上、6つ以上、7つ以上、8つ以上、9つ以上、10以上、11以上、12以上、13以上、14以上、15以上、16以上、17以上、18以上、19以上、20以上、またはさらにそれ以上）を組換え発現する組換え宿主細胞、および二官能性および三官能性C7アルカンを生成するためにそのような宿主細胞を使用する方法を特徴とする。例えば、宿主細胞は以下の1つまたは複数（上記のような）をコードする1つまたは複数（上記のような）の外因性核酸を含み得る：D,L-ジアミノピメレートまたは α -アミノピメレートの還元的脱アミノ化を触媒する酵素、2-ヘプテン二酸のピメリン酸へのエノエート還元を触媒する酵素、ピメリン酸のピメリン酸セミアルデヒドへのカルボン酸還元を触媒する酵素、ピメリン酸セミアルデヒドの7-アミノヘプタン酸へのセミアルデヒドアミノ化を触媒する酵素、7-アミノヘプタン酸のエナントラクタムへのアミド加水分解を触媒する酵素、7-アミノヘプタン酸の7-アミノヘプタナールへのアルデヒド脱水素化を触媒する酵素、1,7-ジアミノヘプタンを生成するための7-アミノヘプタナールへのアミノ基の転移を触媒する酵素、2-ヘプテン二酸CoAを生成するための2-ヘプテン二酸へのCoAの転移を触媒する酵素、2-ヘプテン二酸CoAのピメロイルCoAへのエノエート還元を触媒する酵素、ピメリン酸を生成するためのピメロイルCoAのチオエステル加水分解を触媒する酵素、ピメリン酸のピメリン酸セミアルデヒドへのカルボン酸還元を触媒する酵素、 α -ケトピメレートを生成するための α -アミノピメレートからのアミノ基の転移を触媒する酵素、 α -ケトピメレートの α -ヒドロキシピメレートへのカルボニル還元を触媒する酵素、 α -ヒドロキシピメレートCoAを生成するための α -ヒドロキシピメレートへのCoAの転移を触媒する酵素、 α -ヒドロキシピメレートの2-ヘプテン二酸への還元を触媒する酵素、 α -ケトピメレートの α -ケトスベレートへの α -ケト酸鎖伸長を触媒する酵素、 α -アミノスベレートを生成するための α -ケトスベレートへのアミノ基の転移を触媒する酵素、 α -アミノスベレートの7-アミノヘプタン酸への α -ケト酸脱カルボキシル化を触媒する酵素、ピメリン酸セミアルデヒドを生成するための α -ケトスベレートの α -ケト酸脱カルボキシル化を触媒する酵素、ピメリン酸を生成するための6-アミノ-2-ヘプテン二酸のエノエート還元を触媒する酵素、またはピメロイル-[acp]のピメリン酸へのチオエステル加水分解を触媒する酵素。組換え宿主細胞は、上記に列挙した酵素の1つまたは複数をコードする1つまたは複数（上記のような）の核酸からなる任意のサブグループを含み得る。

【0189】

典型的に使用される宿主細胞は多数の特性を有する：それらは、容易に遺伝的に修飾することができ、本発明の方法において使用される条件に耐性であり、工業的に有用な細胞密度に増殖する。

【0190】

任意で、宿主細胞は単細胞微生物であってよく、または細胞株の細胞であってよい。宿主細胞は野生型の遺伝子型であってよい。この場合、本発明の方法の1つまたは複数の段階を触媒するために使用される酵素は宿主細胞において天然に存在し、本発明の方法において工業的に使用できるレベルで発現される。代替法では、宿主細胞は、本発明の態様の方法において工業的に使用できるレベルで酵素を発現するように遺伝的に修飾されている

。酵素は、それが発現される細胞から調達され得る。代替法では、酵素は異なる株または種の細胞から調達される。

【0191】

1つの代替法では、宿主細胞は原核生物である。別の代替法では、宿主細胞は真核生物である。典型的には単細胞微生物が使用される。

【0192】

原核細胞という用語は、グラム陽性菌およびグラム陰性菌を含む。適切なグラム陰性菌の例は、大腸菌種などの大腸菌属；クロストリジウム・ルジューグダーリイ、クロストリジウム・オートエタノゲヌムまたはクロストリジウム・クルイベリ種などのクロストリジウム属；コリネバクテリウム・グルタミクム種などのコリネバクテリウム属；カプリアビダス・ネカトルまたはカプリアビダス・メタリデュランス種などのカプリアビダス属；シュードモナス・フルオレセンス、シュードモナス・プチダまたはシュードモナス・オレオボランス種などのシュードモナス属；デルフチア・アシドボランス種などのデルフチア属；枯草菌種などのバシラス属；デルブリュッキ菌などのラクトバシラス属；ならびに、ラクトコッカス・ラクティス種などのラクトコッカス属を含む。

【0193】

真核生物宿主細胞は、酵母および他の真菌に由来するもの、ならびに、例えば昆虫、マウス、ラット、霊長動物またはヒト細胞に由来するものを含む。適切な真核生物宿主細胞の例は、クロコウジカビ種などのアスペルギルス属；サッカロミセス・セレビスエ種などのサッカロミセス属；C.トロピカリス、C.アルビカンス、C.クロアカエ、C.グイリエルモンディイ、C.インターメディア、C.マルトサ、C.パラブシロシスまたはC.ゼイレノイデス種などのカンジダ属；ピキア・パストリス種（specues）などのピキア属；ヤロウイア・リポリティカ種などのヤロウイア属；イサタケンキア・オリエンタリス種などのイサタケンキア属；デバリオミセス・ハンセニイ種などのデバリオミセス属；アークスラ・アデニニボランス種などのアークスラ属；クルイベロミセス・ラクティス種などのクルイベロミセス属；エクソフィアラ属；ケカビ属；トリコデルマ属；クラドスポリウム属；ファネロケータ属；クラドフィアロフォラ属；ペシロミセス属；スケドスポリウム属；およびオフィオストマ属に由来する酵母および真菌を含む。

【0194】

宿主細胞は様々な異なる形態で提供され得る。細胞は休止細胞であってよい。すなわち細胞は培養で増殖され、培地から取り出された後、生物触媒として使用される。細胞は増殖後すぐに使用されてもよく、または使用時まで保存されてもよい。典型的な保存方法は凍結である。代替法では、細胞は使用時まで凍結乾燥される。さらなる代替法では、細胞は増殖中の細胞である。すなわち細胞は、培養されつつそれらの生物触媒作用を果たす。特定の生物触媒反応のための基質が、宿主細胞によって変換される細胞の膜を横断することができない場合、1つの代替法では、粗溶解物を使用してもよい。粗溶解物は、細胞の溶解後に生成される細胞成分の初期懸濁液である。細胞の溶解は、化学的または機械的手段を含む任意の手段によって実施し得る。溶解のさらなる方法は、当業者の一般的知識および本明細書の教示に照らして当業者に明らかである。別の代替法では、清澄化溶解物を使用し得る。清澄化溶解物は、粗溶解物を遠心分離して非溶解細胞および他の細胞デブリをペレット化することによって調製し得る。

【0195】

一部の態様では、組換え宿主細胞の実質的に純粋な培養物が提供される。本明細書で 사용되는場合、組換え宿主細胞の「実質的に純粋な培養物」は、培養物中の生細胞の総数の約40%未満（すなわち約35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、2%、1%、0.5%、0.25%、0.1%、0.01%、0.001%、0.0001%未満、またはさらにそれ未満）が組換え細胞以外の生細胞、例えば細菌、真菌（酵母を含む）、マイコプラズマ、または原生動物細胞である、その細胞の培養物である。これに関連して「約」という用語は、該当するパーセンテージが指定されるパーセンテージよりも15%前後であり得ることを意味する。それゆえ、例えば約20%は17%から23%であり得る。組換え細胞のそのような培養物は、細胞

および増殖、保存または輸送培地を含む。培地は、液体、半固体（例えばゼラチン状培地）または凍結であり得る。培養物は、液体培地中もしくは半固体培地中/上で増殖している細胞、または凍結保存もしくは輸送培地を含む保存もしくは輸送培地中で保存もしくは輸送されている細胞を含む。培養物は、培養容器または保存容器または基質（例えば培養皿、フラスコもしくはチューブまたは保存バイアルもしくはチューブ）中に存在する。

【0196】

一態様では、本開示の組換え細胞は、ろ過または遠心分離などの従来の方法によって発酵工程から採取し、高い活性を維持しつつドライペレットまたは乾燥粉末製剤に製剤化することができる。本明細書で開示される活性の1つまたは複数を示す乾燥粉末全組換え細胞組成物の生産のための工程は、噴霧乾燥、凍結乾燥、流動床乾燥、真空ドラム乾燥、または凝集等を含み得る。組成物は、本明細書で述べる生合成方法に適した貯蔵安定な乾燥生物触媒組成物であり得る。凍結乾燥、流動床乾燥または押出/球形ペレット化、次いで流動床乾燥を用いる方法などの乾燥方法は特に有用であり得る。これらの工程のための温度は、高い残留活性および立体選択性を維持するために100℃未満であり得るが、典型的には70℃未満であり得る。乾燥粉末製剤は、0～10%w/w、典型的には2～5%w/wの含水率を有すべきである。乾燥工程の間の組換え細胞の熱耐性を改善するためまたは乾燥特性を改善するために塩（例えばKCl）、糖類、タンパク質等のような安定化添加剤を含んでもよい。一部の態様では、部分精製または完全精製された酵素を、組換え宿主または組換えもしくは非組換え細胞の溶解物の代わりにまたはそれらと組み合わせて使用し得る。完全または部分精製された酵素は、本明細書で述べる組換え細胞または非組換え細胞のいずれかの完全または部分精製された溶解物であり得る。精製の方法は当技術分野において周知である。部分精製または完全精製は、関心対象の酵素が、その酵素によって触媒される反応に干渉し得る（例えば基質とも反応することによってまたは中間体もしくは所望生成物を望ましくない化合物に変換することによって）他の細胞成分から分離されるという利点を有する。しかし精製は任意の生物触媒調製にさらなる段階を追加し、そのためすべての場合に適切であるとは限らない。部分または完全精製された酵素の使用の適切性の決定は、本明細書の教示に従って十分に当業者の理解の範囲内である。

【0197】

一部の態様では、本発明の方法における変換の1つまたは複数は、好氣的条件下で生物触媒によって実施される。代替法では、本発明の方法における変換の1つまたは複数は嫌氣的条件下で実施される。さらなる代替法では、本発明の方法の一部の段階は好氣的条件下で実施され、別の一部の段階は嫌氣的条件下で実施される。

【0198】

2.3 全細胞生物触媒の修飾

本発明の方法において使用される生物触媒は、酵素が天然に存在する種の非修飾宿主細胞であり得る。典型的には、しかし、非天然の（すなわち組換えまたは遺伝子操作された）宿主細胞を生成するように宿主細胞を遺伝的に修飾する必要がある。

【0199】

2.4 宿主細胞ゲノムの染色体修飾

一部の態様では、全細胞生物触媒（すなわち宿主細胞）の染色体は修飾されている。この修飾は、染色体中の核酸の挿入、欠失または置換であり得る。細胞の染色体に修飾を行う方法は周知であり、例えばトランスポゾン突然変異誘発、Cre-Lox媒介性組換え、λ Red およびRecET媒介性組換えである。

【0200】

核酸の染色体への安定な組込みは、選択マーカーを必要とせずに核酸の維持を可能にするので好都合である。

【0201】

反復挿入を実施することにより、多数の異なる核酸を宿主細胞生物触媒の染色体に安定に組み込むことが可能である。安定な組込みとは、宿主細胞が改変を喪失せずに5世代を超えて培養され得ることを意味する。一般に、安定な遺伝的改変は、10世代を超えて存続

10

20

30

40

50

する修飾を含み、特に安定な修飾は約25世代を超えて存続し、より特定すると、安定な遺伝的修飾は、無期限を含む、50世代を超える。

【0202】

2.5 宿主細胞生物触媒のゲノムのエピソーム修飾

一部の態様では、宿主細胞ゲノムのエピソーム組成物を修飾する。エピソームにより、任意の自律複製するエレメント、例えばプラスミド（線状または環状であり得る）、コスミド、酵母人工染色体（YAC）等が意味される。エピソームエレメントはしばしばそれらの宿主細胞に代謝負荷をかけ、したがって、エピソームの少なくとも1つのコピーが細胞分裂後に各々の娘細胞中に存在することを確実にする何らかの能動的分配機構が存在しない場合は、選択マーカーを含む必要がある。

10

【0203】

2.6 導入核酸配列

細胞に導入される核酸は、多数のエレメントの1つまたは複数（例えば2つ以上、3つ以上、4つ以上、5つ以上、6つ以上、7つ以上、8つ以上、9つ以上、10以上、11以上、12以上、13以上、14以上、15以上、16以上、17以上、18以上、19以上、20以上、またはさらにそれ以上）を含み得る。典型的には、エレメントの1つは、二官能性または三官能性C7アルカンまたはそのような分子の前駆体を生産するために使用される酵素をコードする。一部の代替法では、核酸は、本発明の方法において機能する酵素ではないタンパク質をコードする。

【0204】

典型的には、プロモーターは核酸に作動可能に連結される。プロモーターの選択は意図される適用に依存し、当業者によって容易に決定され得る。例えば、酵素が触媒する反応が特定の宿主細胞に有害であり得る場合は、遺伝子発現が必要に応じて作動または停止され得るように、調節または誘導的プロモーターを使用することが望ましいと考えられる。あるいは、酵素が増殖のすべての段階で発現されることを確実にするために弱いまたは強力な構成的プロモーターのいずれかによって駆動される発現を有することが好ましいと考えられる。真核細胞系に適する例示的なプロモーターは、SV40初期プロモーター、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、マウス乳癌ウイルス（MMTV）ステロイド誘導性プロモーター、およびモロニー Maus 白血病ウイルス（MMLV）プロモーターを含む。例示的な酵母プロモーターは、3-ホスホグリセリン酸キナーゼプロモーター、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GAPDH）プロモーター、ガラクトキナーゼ（GAL1）プロモーター、ガラクトエピメラーゼプロモーター、およびアルコールデヒドロゲナーゼ（ADH）プロモーターを含む。酵母における他の適切なプロモーターは当業者に公知である。細菌細胞系に適する例示的なプロモーターは、T7、T3、SP6、lacおよびtrpプロモーターを含むが、それらに限定されるわけではない。

20

30

【0205】

発現を確実にすることが必要な場合、導入される核酸はまた、必要に応じて5'非翻訳領域（UTR）、3'UTR、エンハンサーおよび/またはターミネーター領域を含むように作動可能に連結され得る。そのようなエレメントは当業者に公知である。

【0206】

2.7 宿主細胞における複数の酵素の発現

一部の態様では、宿主細胞の単一株を使用して、本発明の方法において使用される複数（例えば2つ以上、3つ以上、4つ以上、5つ以上、6つ以上、7つ以上、8つ以上、9つ以上、10以上、11以上、12以上、13以上、14以上、15以上、16以上、17以上、18以上、19以上、20以上、またはさらにそれ以上）の酵素を発現させる。この場合、複数の酵素は同じ導入核酸によってコードされ得る。代替法では、酵素は別々の導入核酸フラグメント上にコードされ得る。酵素は、すべてが単一プロモーターから（例えば酵素をオペロンの形態で配置することによって）発現され得る。代替法では、酵素は複数の別々のプロモーターから発現され得る。一部の場合、複数の別々のプロモーターが同じ化学物質によって誘導され得る（例えば、複数の酵素の各々が酵素GALプロモーターから発現され得、したがって各

40

50

遺伝子をガラクトースで誘導できることを意味する)。他の適切なプロモーターは当技術分野において公知である。代替法では、本発明の方法において使用される酵素をコードする遺伝子の各々は異なるプロモーターの制御下にある。したがって、異なる酵素を異なる誘導化合物の使用を通して個別に導入することができる。別の代替法では、いくつかの酵素は同じプロモーターの制御下にあり、およびまたいくつかの酵素は異なるプロモーターの制御下にある、中間的なアプローチが使用される。この代替法は、多数の酵素経路が宿主細胞において生成されており、経路の各成員をその他の経路成員と協調して制御するが、各々の経路を別々に制御することが望ましい場合に特に好都合であり得る。

【0207】

さらに、複数の酵素が染色体から発現されるかまたはプラスミドから発現されるかに関して考慮することができる。酵素がプラスミドから発現される場合、好都合には各プラスミドが異なる起点および/または異なる選択マーカを含む。

【0208】

単一細胞における複数の酵素の発現は、共発現される酵素が反応経路において互いの直後に作用する場合、上流の酵素反応の生成物が直ちに下流の酵素による作用に利用可能となることを保証するので好都合である。これは、(i) 中間体の精製および第2の反応を実施する第2の反応容器の設置の必要性、または(ii) 生成物を、上流の酵素を含む細胞から下流の酵素を含む細胞によって作用され得る培地へと輸送する必要性を回避する。

【0209】

2.8 シャペロン系

細胞が非天然の条件下でタンパク質を発現するように遺伝子操作されている場合(例えば、ある種にネイティブであるタンパク質が天然のレベルより高いレベルで発現される場合、または代替法では、異なる種からのタンパク質が宿主細胞において発現される場合)、一部の 경우에는、そのタンパク質は活性形態では発現されない。その代わりに、誤って折りたたまれ、非機能性の「封入体」凝集物として蓄積され得る。この場合、タンパク質を発現するのに使用される細胞を、タンパク質の誤った折りたたみを防ぐことができるまたは凝集状態からタンパク質を再度折りたたむことができるシャペロンタンパク質をさらに発現するための遺伝子修飾に供し得る。そのようなシャペロンタンパク質を含むことは、細胞当たりの活性タンパク質の量を増大させ、それゆえ本発明の方法の全体的な効率を上昇させるので、好都合である。発現されるシャペロンは宿主細胞のシャペロンタンパク質であり得る。代替法では、シャペロンはタンパク質と同じ種/株に由来し得る。発現のための典型的なシャペロンタンパク質は、GroEL/GroESファミリーの成員、およびDnaJ/DnaK/GrpEファミリーの成員を含む。原型大腸菌のGroEL/GroESおよびDnaJ/DnaK/GrpEタンパク質のホモログが他の原核生物種において同定されており(例えば、参照)、真核生物ホモログも公知である(GroELおよびGroESは真核生物タンパク質Hsp60およびHsp10に対応し、DnaJ、DnaKおよびGrpEはそれぞれ真核生物タンパク質Hsp70、Hsp40およびHsp24に対応する)。これらのタンパク質は多数の種の酵母(例えばサッカロミセス・セレビシエ)において同定されている。本発明の方法において使用される酵素との共発現のための適切なシャペロンタンパク質の選択は、本明細書の教示に従って当業者に明らかである。

【0210】

2.9 宿主細胞の代謝遺伝子操作

代謝遺伝子操作は、化合物を生産する細胞の能力を高めるために宿主細胞におけるパラメータを最適化する工程である。本発明の方法において使用される宿主細胞は、任意で、上記で論じた二官能性C7アルカンの生産量を最適化するように遺伝子操作されている。

【0211】

化合物を生産する細胞の能力を高める代謝遺伝子操作は、主として2つの手段によって実施される。第一には、出発物質から所望生成物を生産する経路における酵素を最適化することである。二官能性C7アルカンの生産をもたらす多酵素経路において(図面に示し、前の章で述べたように)、当業者に公知の技術(例えば二次元電気泳動、同位体標識した前駆体の使用、および核磁気共鳴(NMR)分光法)を用いて経路の各中間体の濃度を測定

すること、それゆえいずれの酵素変換が律速段階であるか、すなわち反応スキーム中のどの段階が最も遅いかを決定することが可能である。これは、この中間体に作用する酵素が変換の全体的な速度を制限していることを示す、中間体の蓄積を観察することによって決定できる。この場合、この中間体が反応する速度が、それゆえ、増大されるべきである。これは多くの手段によって実施できる。第一に、制限している酵素の発現レベルを増大させ得る。任意で、これは、酵素をコードする遺伝子を強力なプロモーター、例えば酵素が大腸菌で発現されている場合はT7プロモーターまたは酵素が酵母で発現されている場合はTEFプロモーターの制御下に置くことによって達成され得る。第二の選択肢は、例えば遺伝子をマルチコピープラスミド上に置くことによって、または遺伝子の複数のコピーを宿主細胞の染色体に組み込むことによって（これらのコピーは染色体内の同じ位置にまたは染色体内の異なる位置に組み込み得る）、細胞中に存在する、酵素をコードする遺伝子のコピー数を増加させることである。

10

【0212】

二官能性C7アルカンの生産（図面に示し、前の章で述べたように）はまた、基質、中間体のいずれか、または生成物を、本発明の方法の目的である以外の代謝経路へと迂回させることができるいずれかの酵素を不活性化するかまたは酵素の活性を低減することによっても増大させることができる。それゆえ、二官能性C7アルカンの収率を高めるために酵素の活性を低下させ得る。したがって一部の態様では、本明細書で開示される組換え宿主細胞は、本発明の方法の出発物質、または二官能性C7アルカンを生産する反応経路において生成されるいずれかの中間体を、異なる望ましくない最終生成物へと迂回させることができる1つまたは複数の酵素の欠失を有し得る（例えば関心対象の酵素をコードする核酸を欠失させることによってまたは核酸の発現を低減することによって）。代替法では、酵素を欠失させず、その代わりに野生型酵素の速度より低い速度で基質、中間体または生成物に対して作用し得るように改変する。酵素が可逆的反応を触媒する場合は、酵素が所望の方向の反応においてのみ作用するように改変すべきである。

20

【0213】

例えば、一部の態様では、組換え宿主細胞は、ピメロイル-[acp]を7-ケト-8-アミノペラルゴン酸（KAPA）に変換するまたは6-カルボキシヘキサノイルCoA（ピメロイルCoA）をKAPAに変換することができる酵素の欠失（例えば7-ケト-8-アミノペラルゴン酸シンターゼ（E.C.2.3.1.47）をコードする遺伝子、BioFの欠失または不活性化）を有し得る。

30

【0214】

一部の態様では、組換え宿主細胞は、リジン栄養要求株を作り出す、ジアミノピメレートデカルボキシラーゼの欠失を有し得る。リジン栄養要求株は、リジンの直前駆体であるD,L-ジアミノピメレートへの炭素フラックスを調節解除するために特に有用であり得る。リジン栄養要求株は流加発酵を必要とする。

【0215】

2.10 増殖中の全細胞生物触媒

本発明の一部の態様では、本発明の方法において細胞が変換を実施する時点で増殖中（すなわち分裂中）である宿主細胞を使用する。これらの態様では、所望の二官能性C7アルカンの生産を最適化する条件下で細胞を培養する。本明細書で述べる組換え宿主細胞のいずれかを、本発明の生合成生成物を生産するおよび/または分泌するように培養することができる。本明細書で使用される場合、培養という用語は発酵槽およびバイオリアクターと等価である。

40

【0216】

2.10.1 培地

一部の場合、増殖に使用される炭素源は、栄養ブロス、例えばルリア培地または酵母抽出物培地の形態で提供される。また別の場合には、宿主細胞の増殖に適した規定培地（すなわち各成分の濃度が既知である培地）を使用し得る。1つの代替法では、増殖培地はグルコースを炭素源として含む。別の代替法では、培地中で宿主細胞によって使用される炭素源は、グルコース、スクロース、キシロース、脂肪酸およびグリセロールである。

50

【0217】

2.10.2 同じ培養物中での複数の株の増殖

一部の態様では、本発明の方法において変換を触媒する酵素は2つ以上の株/種の細胞において存在し、それらの2つ以上の株/種の細胞は同時に使用される。本発明の方法における変換が実施されるときに複数の株/種が増殖している（すなわち細胞が共培養下にある）場合、選択される株/種は、ある株がその他の株を打ち負かしてしまわないように選択されねばならない。そのような関係は、共培養物に人工的共生を導入することによって得ることができる。すなわち使用される2つの株/種は、各々必須栄養素に栄養要求性であるが、異なる栄養素について栄養要求性である。さらに、その他の株は、培養物の増殖培地が2つの必須栄養素を含まない場合に両方の株が培養物中で共に生存できるように、その栄養素を過剰に生産するように遺伝子操作されるべきである。適切な栄養要求株の選択は、本明細書の教示に従って十分に当業者の理解の範囲内である。

10

【0218】

2.10.3 発酵

本明細書で述べる培養条件は、ヘプタン-1,7-二酸、7-オキソヘプタン酸、7-ヒドロキシヘプタン酸、7-ヒドロキシヘプタナール、7-アミノヘプタン酸、ヘプタメチレンジアミン、1,7-ヘプタンジオール、7-アミノヘプタナール、7-アミノヘプタノールまたはエナントラクタムの製造のためにスケールアップすることができ、連続的に増殖させることができる。例示的な増殖手順は、例えば流加発酵およびバッチ分離、流加発酵および連続分離、または連続発酵および連続分離を含む。これらの工程のすべてが当技術分野において周知である。発酵手順は、商業的な量の二官能性および三官能性C7アルカンの生合成生産のために特に有用である。一般に、および非連続的な培養手順に関して、先に述べたヘプタン-1,7-二酸、7-オキソヘプタン酸、7-ヒドロキシヘプタン酸、7-ヒドロキシヘプタナール、7-アミノヘプタン酸、ヘプタメチレンジアミン、1,7-ヘプタンジオール、7-アミノヘプタナール、7-アミノヘプタノールまたはエナントラクタムの連続的および/またはほぼ連続的な生産は、対数期の増殖を維持するおよび/またはほぼ維持するのに十分な養分および培地の存在下で、本明細書で述べるヘプタン-1,7-二酸、7-オキソヘプタン酸、7-ヒドロキシヘプタン酸、7-ヒドロキシヘプタナール、7-アミノヘプタン酸、ヘプタメチレンジアミン、1,7-ヘプタンジオール、7-アミノヘプタナール、7-アミノヘプタノールまたはエナントラクタムを生産する組換え宿主細胞を培養する段階を含む。そのような条件下での連続培養は、例えば1日、2、3、4、5、6または7日またはそれ以上を含み得る。加えて、連続培養は、1週間、2、3、4または5週間またはそれ以上および数か月までを含み得る。あるいは、組換え細胞は、特定の適用に適する場合は、数時間培養することができる。連続的および/またはほぼ連続的な培養条件は、これらの例示的な期間の間のすべての時間間隔を含み得ることが理解されるべきである。本発明の宿主細胞を培養する時間は、所望の目的のために十分な量の生成物を生産するのに十分な期間である。

20

30

【0219】

発酵手順は当技術分野において周知である。簡単に述べると、先に述べたヘプタン-1,7-二酸、7-オキソヘプタン酸、7-ヒドロキシヘプタン酸、7-ヒドロキシヘプタナール、7-アミノヘプタン酸、ヘプタメチレンジアミン、1,7-ヘプタンジオール、7-アミノヘプタナール、7-アミノヘプタノールまたはエナントラクタムの生合成生産のための発酵は、例えば流加発酵およびバッチ分離、流加発酵および連続分離、または連続発酵および連続分離において利用できる。バッチ発酵および連続発酵手順の例は当技術分野において周知である。

40

【0220】

本明細書で述べるヘプタン-1,7-二酸、7-オキソヘプタン酸、7-ヒドロキシヘプタン酸、7-ヒドロキシヘプタナール、7-アミノヘプタン酸、ヘプタメチレンジアミン、1,7-ヘプタンジオール、7-アミノヘプタナール、7-アミノヘプタノールまたはエナントラクタムの生産体を、これらの実質的な量の連続生産のために使用する上記発酵手順に加えて、ヘプ

50

タン-1,7-二酸、7-オキソヘプタン酸、7-ヒドロキシヘプタン酸、7-ヒドロキシヘプタナール、7-アミノヘプタン酸、ヘプタメチレンジアミン、1,7-ヘプタンジオール、7-アミノヘプタナール、7-アミノヘプタノールまたはエナントラクタム生産体はまた、例えば生成物を他の化合物に変換するさらなる手順に同時に供することができるか、または生成物を発酵培養物から分離し、所望する場合は生成物を他の化合物に変換する化学的または生物触媒変換に連続的に供することができる。

【0221】

2.11 本発明の組成物

本発明はまた、本発明による組換え宿主細胞ならびにヘプタン-1,7-二酸、7-オキソヘプタン酸、7-ヒドロキシヘプタン酸、7-ヒドロキシヘプタナール、7-アミノヘプタン酸、ヘプタメチレンジアミン、1,7-ヘプタンジオール、7-アミノヘプタナール、7-アミノヘプタノールおよびエナントラクタムを含む組成物も提供する。本発明はまた、本発明による組換え宿主細胞および原材料を含む組成物も提供する。一部の態様では、原材料は再生可能な原材料であり、例えば原材料は、グルコース、スクロース、キシロース、脂肪酸およびグリセロールからなる群より選択される。一部の態様では、原材料は多環芳香族炭化水素、例えばベンゼン、トルエンまたはシキメートである。

【実施例】

【0222】

3.1 実施例

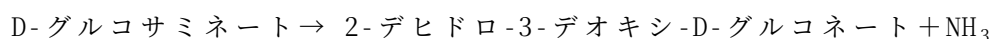
ここまで本発明を一般的に説明してきたが、本発明は以下の実施例を参照することによってより容易に理解され、これらの実施例は説明として提供されるものであり、限定を意図されない。本明細書で開示される例示的な態様に、本発明の精神および範囲から逸脱することなく様々な修正および変更を加え得ることが理解される。

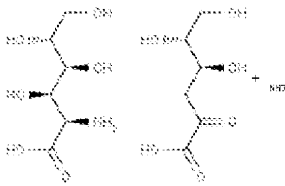
【0223】

3.1.1 アンモニアリアーゼ (EC 4.3.1.-) による2,6-ジアミノピメレートの2-アミノ-5,6-デヒドロピメリン酸 (6-アミノ-2-ヘプテン二酸) への変換および2-アミノヘプタン二酸の2-ヘプテン二酸への変換 (図10参照)

3.1.1.1 MAL酵素遺伝子標的の選択

2,6-ジアミノピメリン酸の、ナイロン-7,7の生産において使用されるピメリン酸への変換、およびピメリン酸の7-アミノヘプタン酸への変換に關与する経路を同定した後、これらの経路からの遺伝子標的を選択した。特に、酵素標的を、その広い基質特異性、広範囲の宿主における存在、クローン化され、外因性に発現され得ること、および合理的設計によるタンパク質遺伝子操作のために利用可能な結晶構造に基づき、メチルアスパラギン酸アンモニアリアーゼ (MAL; EC 4.3.1.2) を含むアンモニアリアーゼファミリー (EC 4.3.1) から選択した。シトロバクター・アマロナティカス、クロストリジウム・テタノモルフムおよびアスペルギルス・オリゼ由来のMAL遺伝子を選択した。C.アマロナティカスによってコードされるMAL酵素 (GeneBank AB005294; フラグメント1641-2882878596..879060NM_{-NM}) とC.テタノモルフム (GeneBank S48141; フラグメント756-1997) によってコードされるMAL酵素は有意の相違を有する (57%の同一性)。アスペルギルス・オリゼのMAL遺伝子 (GeneBank XM_001827609) は進化的に分岐しており (シトロバクター・アマロナティカスMAL と44%の同一性、クロストリジウム・テタノモルフムMALと39%の同一性)、異なる触媒特性および/または選択性を示し得る。2,6-ジアミノピメレートおよび2-アミノヘプタン二酸の還元的脱アミノ化のための潜在的な酵素である別の異例のアンモニアリアーゼは、シュードモナス・フルオレセンス (*Pseudomonas fluorescens*) (受託番号BAD69624) 由来のD-グルコサミン酸アンモニアリアーゼ (EC 4.3.1.9) である。これは、 α , β -脱離反応を触媒する異例のアンモニアリアーゼである:





【0224】

3.1.1.2 遺伝子標的を含む発現ベクターのクローニング

シトロバクター・アマロナティカス、クロストリジウム・テタノモルフムおよびアスペルギルス・オリゼ由来の選択したMAL遺伝子標的を、inABLE技術を使用してIPTG誘導性pET21-aバックボーンにクローニングし、I4（シトロバクター・アマロナティカスMAL遺伝子を有するpET21-a）、I5（クロストリジウム・テタノモルフムMAL遺伝子を有するpET21-a）、およびI6（アスペルギルス・オリゼMAL遺伝子を有するpET21-a）を生成した。最初に、ソフトウェア解析を用いて遺伝子およびベクターDNAをランケットされたパートに分割する。選択したMAL遺伝子およびpET21ベクター内の潜在的な制限酵素、例えばEarIの部位を同定し、突然変異を導入することによって分断した。コード配列内に位置するEarI制限部位を、コードされるタンパク質配列を改変するのを避けるために、例えばサイレント突然変異の組込みによって、分断した。生じたDNAはEarI部位を含まず、EarI（DNA 2.0を通して入手した）、長および短リンカーオリゴヌクレオチド（Sigma-Aldrichを通して入手した）ならびに長および短パートオリゴヌクレオチド（Sigma-Aldrichを通して入手した）によって隣接された対応するランケットパートを設計するソフトウェア解析のための入力配列を使用した。パートおよびリンカーオリゴヌクレオチドの5'末端を、適切な反応条件（6 μ Mオリゴ、1 PNK緩衝液、1mM ATP、10U T4キナーゼ、5mM DTT、5%（w/v）PEG 8000）下に37℃で30分間、T4キナーゼの存在下でプライマーをインキュベートすることによってリン酸化し、次いで65℃で20分間酵素を不活性化した。

【0225】

次に、リン酸化したリンカーオリゴおよびリン酸化したパートオリゴを、等モル量の各オリゴ（6 μ Mで50 μ L）を混合し、次にサーモサイクラーで混合物を65℃に加熱した後、温度を20℃まで徐々に低下させることによってアニーリングし、特異的な16bpの突出部を有する部分的二本鎖のパートオリゴおよび部分的二本鎖のリンカーオリゴ（融解温度75℃以上）を形成した。生じたアニーリングしたパートオリゴ（POA）およびアニーリングしたリンカーオリゴ（LOA）を、次に、TE緩衝液（トリス-EDTA）で1 μ Mの最終濃度に希釈した。

【0226】

次に、選択した遺伝子（シトロバクター・アマロナティカス、クロストリジウム・テタノモルフムおよびアスペルギルス・オリゼMAL）に対応するパート/リンカーフラグメントを、クローニングしたランケットパートのEarI消化、次いでそれらのそれぞれのアニーリングしたパートオリゴ（POA28、POA29またはPOA30）、それらのランケットパート（TP28、TP29またはTP30）、およびベクターバックボーンからのアニーリングしたリンカーオリゴ（LOA31）の連結という連続的なサイクルによって作製した。ベクターバックボーンに対応するパートリンカー融合物を、そのアニーリングしたパートオリゴ（POA31）、そのランケットパート（TP31）およびいずれかの遺伝子からのアニーリングしたリンカーオリゴ（LOA28、LOA29またはLOA30）の連結によって調製した。ランケットパートと比較して10倍および20倍モル過剰のLOAおよびPOAを、各々のEarI消化/連結サイクルの間のランケットパートとオリゴヌクレオチドの連結を促進するためにそれぞれ遺伝子およびベクター反応において使用した。反応は50 μ Lの総容量で実施し、サーモサイクラー（Eppendorf Mastercycler Gradient）でインキュベートした。EarI消化/連結のサイクルは、それぞれT4 DNAリガーゼを使用してEarI消化および連結のための最適温度に対応する、37℃と16℃の間で温度を交互に変化させることによって達成した。試料を0.7%アガロースゲルに負荷し、アガロースゲル分離およびゲル抽出（QIAGEN QIAquick Gel Extraction Kit）を介してパートリンカーを残留バックボーンから精製した。パートリンカーフラグ

メントの調製のためのアガロースゲル電気泳動後、予想されたサイズのフラグメントが認められた。適合する3bp突出部を示すアニーリングしたオリゴヌクレオチドと消化したフラグメントの連結は、切断不能のパート/リンカーフラグメントの形成を生じさせた。

【0227】

遺伝子パート/リンカー融合物を、次に、2パート集合を用いてそれらのそれぞれのベクターパート/リンカー融合物と組み合わせ、先に作製したパートリンカーを用いて大腸菌発現ベクターを構築した。遺伝子およびベクターパートリンカー融合物を等モル量（各々0.1pmol）で一緒に混合し、これは、各々のパートからのアニーリングしたパートオリゴヌクレオチドおよびアニーリングしたリンカーオリゴヌクレオチドにおいて形成された特異的な相補的突出部による予想されたDNAフラグメント集合体を生じさせた。反応物を室温で30分間インキュベートした後、2μlの集合体反応物および10μlのコンピテント細胞を使用して高効率の化学的にコンピテントなNEB10β大腸菌細胞の形質転換を実施した。形質転換した細胞をLB-Amp-寒天に塗布し、37℃で一晩インキュベートした。各集合体について500クローンを得た。次に2つのランダムなクローンを各集合体から採取し、QIAGEN QIAprep Miniprep Kitを使用して対応するベクターを単離した。

【0228】

正しい集合体、例えばpET21-aバックボーンへのシトロバクター・アマロナティカス遺伝子集合体の構築を確認するため、先に単離したベクターに関して制限分析を実施した。大腸菌発現ベクターへのシトロバクター・アマロナティカス遺伝子の集合体から得たクローンをPvuIおよびBmgBIを用いて分析し、挿入に関して陽性のクローンを同定した。大腸菌発現ベクターへのクロストリジウム・テタノモルフム遺伝子の集合から得たクローンをPstIおよびAlwNI（図30、表10）を用いて分析し、挿入に関して陽性のクローンを同定した。大腸菌発現ベクターへのアスペルギルス・オリゼ遺伝子の集合から得たクローンをSp hIおよびEcoRVを用いて分析し、挿入に関して陽性のクローンを同定した。各試料からの制限産物を、アガロースゲル電気泳動を用いて分析した。各集合体からの両方のクローンに関して予想されたバンドパターンを認め、シトロバクター・アマロナティカス、クロストリジウム・テタノモルフムおよびアスペルギルス・オリゼMAL遺伝子を保有する大腸菌発現ベクターの構築を確認した。陰性対照としてパート/リンカー融合物pET21-aパート/pET21-aリンカーを用いてI7陰性対照ベクター（pET21-a対照）の構築を実施し、陰性対照遺伝子不含構築物の作製からのクローンを、XmnIおよびAlwNIを用いて分析した。発現ベクターの適切な構築をさらに確認するため、ベクターバックボーンの3'末端と遺伝子の5'末端の間ならびに遺伝子の3'末端とベクターバックボーンの5'末端の間のパート接合部を各集合体からの2つのクローンの一方から配列決定した。

【0229】

3.1.1.3 大腸菌における外因性MAL遺伝子の発現

先に得られた大腸菌構築物を使用して、大腸菌におけるシトロバクター・アマロナティカス、クロストリジウム・テタノモルフムおよびアスペルギルス・オリゼMAL遺伝子の発現を検討した。ベクター（各集合体から10ngのDNA）を使用してエレクトロコンピテントBL21（DE3）大腸菌細胞を形質転換し、形質転換試料をLB-Amp-寒天に塗布した。37℃で一晩インキュベートした後、形質転換体を得た。

【0230】

単一クローンを各集合体プレートから採取し、出発培養物として5mlのLB-Amp培地に接種するために使用した。37℃および250rpmで一晩インキュベートした後、OD₆₀₀を測定した。2mLの各出発培養物（約4.5×10⁷~6.2×10⁷細胞）を使用して100mLのLB-Ampに接種し、0.6~0.8のOD₆₀₀に達するまで培養物を500mLのバッフル付き振とうフラスコにおいて37℃および250rpmでインキュベートした。pET21-aではT7プロモーターによって制御されるタンパク質発現を1mM IPTG（最終濃度）の添加によって誘導し、培養物を37℃および250rpmでさらにインキュベートした。1mLの各試料を誘導の前、誘導後4時間、および誘導後24時間に採取した。OD₆₀₀を測定することによって細胞増殖を調べた。誘導後24時間のインキュベーション後に残った残存培養物を50mLファルコンチューブに移し、5000rpmで10分

間の遠心分離によって採取して、細胞ペレットを-20℃で保存した。

【0231】

次に、各集合体からの各時点の試料をSDS-PAGE分析用に処理した。試料を13000rpmで2分間遠心分離した後、上清を取り、リゾチーム（15mg/mL）およびベンゾナーゼ（3.4U/ μ L）を添加したBugbusterタンパク質抽出試薬を用いて細胞を溶解した。次に溶解反応物を13000rpmで2分間遠心分離し、可溶性画分を新しいチューブに移して、不溶性画分を水に再懸濁した。20 μ Lの各画分を80 μ LのSDS試料緩衝液（SDS負荷緩衝液、9%DTTおよび水）と混合し、混合物をヒートブロックにおいて95℃で5分間加熱した。次に10 μ Lの各試料をSDS-PAGE 4~20%トリシングエルに負荷し、可溶性および不溶性画分のタンパク質含量を分析した。IPTG誘導後、予想されたサイズ（45kDa）のタンパク質バンドが可溶性画分において明瞭に見えた。陰性対照実験では対応するタンパク質を認めず、予想された45kDaのシトロバクター・アマロナティカスMALタンパク質および45kDaのクロストリジウム・テタノモルフMALタンパク質が、組み立てた発現ベクター構築物から大腸菌において可溶性タンパク質として成功裏に発現されたことを示唆した。誘導後、いずれの試料の不溶性画分においても有意のタンパク質を認めなかった。45kDaのアスペルギルス・オリゼMALタンパク質も、組み立てた発現ベクター構築物から大腸菌において発現されたが、これは不溶性タンパク質として発現された（誘導後、45kDaのバンドが不溶性画分において可視であった）（図11Aおよび11B参照）。

10

【0232】

アスペルギルス・オリゼMALタンパク質の溶解度を改善するため、誘導の温度および/または誘導物質の濃度を低下させた。これらは、一部の場合にはタンパク質合成の速度の低下およびそれゆえタンパク質折りたたみの効率上昇に起因してタンパク質溶解度の上昇をもたらすことが示されている。これらのパラメータを、上述したのと同じ発現および誘導手順を用いて低下させたが、SDS-PAGE分析は、アスペルギルス・オリゼMALタンパク質がまだ不溶性であったことを示す（誘導後に45kDaのバンドが不溶性画分において可視であった）。アスペルギルス・オリゼMALタンパク質を含む酵母発現ベクターは、タンパク質を可溶性形態で発現させるために使用し得る。

20

【0233】

シトロバクター・アマロナティカスまたはクロストリジウム・テタノモルフMAL遺伝子を発現する大腸菌の培養物を、酵素アッセイでの使用のための可溶性タンパク質の生産を増大させるようにスケールアップした。培養物を先に述べたように増殖させ、誘導して、採取した。簡単に述べると、先に調製した各々の形質転換プレートから単クローンを採取し、20mLのLB-Amp培地に出発培養物として接種した。37℃および250rpmで一晩インキュベートした後、OD₆₀₀を測定した。16mLの各出発培養物（約 4.4×10^8 細胞）を使用して800mLのLB-Ampに接種し、0.6~0.8のOD₆₀₀に達するまで培養物を2Lのバッフル付き振とうフラスコにおいて37℃および250rpmでインキュベートした。タンパク質発現を1mM IPTG（最終濃度）の添加によって誘導し、培養物を37℃および250rpmでさらにインキュベートした。誘導後24時間のインキュベーション後に、残存培養物を4本の50mLファルコンチューブに移し、5000rpmで10分間の反復遠心分離（各チューブにつき4回の遠心分離；各回当たり50mLの培地）によって採取して、細胞ペレットを-20℃で保存した。

30

40

【0234】

シトロバクター・アマロナティカス、クロストリジウム・テタノモルフおよびアスペルギルス・オリゼMALタンパク質を収集するためにガラスビーズ溶解を用いて細胞を分断した。誘導後24時間の試料からの細胞ペレットを、0.1mMトリス、1mg/mLペプスタチンAおよび200mM PMSFプロテアーゼ阻害剤からなるビーズ溶解緩衝液に再懸濁した。酸で洗った212~300 μ mのガラスビーズ（溶解緩衝液1mL当たり0.4g）を各チューブに添加し、並行して超音波処理水浴中で溶解した。4本のチューブの各々から250 μ Lの試料を超音波処理の前、細胞溶解の5分後および10分後に採取した。各時点からの250 μ L試料をプールして、1mLの総試料を得た。5000rpmで10分間遠心分離し、上清を新しいチューブに移して無細胞抽出物を調製した。等容量の水で10分間超音波処理した後に単離した細胞ペレットを再懸濁

50

した後、不溶性試料を調製した。残存ペレットおよび上清を-20℃で保存した。20 μlの各プール画分を80 μlのSDS試料緩衝液（SDS負荷緩衝液、9%DTTおよび水）と混合し、混合物をヒートブロックにおいて95℃で5分間加熱した。次に10 μlの各SDS試料調製物をSDS-PAGE 4~20%トリシンゲルに負荷し、可溶性および不溶性画分のタンパク質含量を分析した。シトロバクター・アマロナティカスMALおよびクロストリジウム・テタノモルフMALの発現物からの試料においてタンパク質バンドが明瞭に検出された。

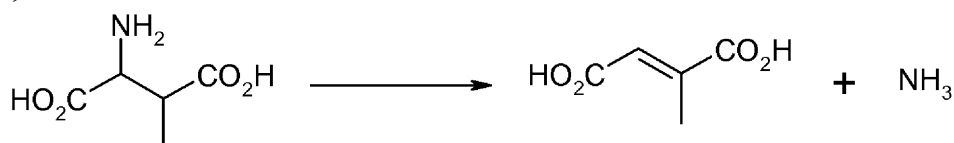
【0235】

3.1.1.4 外因性に発現されたMALの機能性

シトロバクター・アマロナティカス、クロストリジウム・テタノモルフおよびアスペルギルス・オリゼに由来するメチルアスパラギン酸アンモニアリアーゼの活性を、最初に、I4、I5およびI6株を用いてβ-メチルアスパルテートに対して検定した。本明細書で述べるその後の試験では、これらの株の活性を異なる基質、すなわち2-アミノピメレート、D、L-リジン、および最後に2,6-ジアミノピメリン酸に関して検定した。I17による2-アミノピメレートの陰性対照生物転換も実施した。

【0236】

3.1.1.4.1 β-メチルアスパルテートに対するI4、I5およびI6株の生物転換スクリーニング



I4、I5およびI6リアーゼ株の5g/Lまたは20g/L全細胞当量で6種の生物転換体を調製した。酵素濃度は全細胞当量に基づいて計算し、これは、遠心分離後のペレット化した細胞質量（湿細胞重量）を、溶解の間に細胞を再懸濁するのに使用した緩衝液の容量で除したものである。生物転換を、10mM DL-スレオ-βメチルアスパルテートを用いて3ml容量で実施した。

【0237】

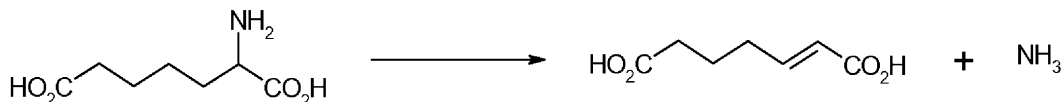
反応物を軌道インキュベータにおいて30℃でインキュベートし、1、5および18時間後にHPLCによる分析のために試料を取り出した。1mlのアリコート、熱に不安定なタンパク質を除去するための熱処理によって分析用に調製した。その後試料を10,000rpmで2分間遠心分離し、0.2ミクロンのフィルターを通してろ過した。試料の分析は、RIDおよびUV検出を用いて5mMの硫酸移動相でPhenomenex Rezexカラムを使用するHPLCによって実施した。試料中のメサコン酸の検出によってリアーゼ活性の確認を行った。各生物転換において形成されたメサコン酸の濃度を、Aldrichからの外部標準メサコン酸の測定によって決定した。

【0238】

すべてのI4およびI5株生物転換においてメサコン酸が検出され、リアーゼ酵素の機能的発現がこれらの細胞抽出物中に存在することを確認した。I6株では活性を認めず、これは、タンパク質が不溶性形態で発現されることを示した、発現タンパク質のSDS PAGE分析によって認められた結果と一致する。I4およびI5株から分析したすべての試料中のメサコン酸の収量は約5mMであり、これは、野生型酵素がL-エナンチオ選択的であるので、10mM DL-スレオ-βメチルアスパルテートに関して予想された活性と一致する。I4およびI5株では、ちょうど1時間のインキュベーション後に完全な変換が認められた。

【0239】

3.1.1.4.2 2-アミノピメレートに対するI4およびI5株の生物転換スクリーニング



2-アミノピメレートに対するI4およびI5酵素活性を調べるために、様々なレベルの酵素および基質濃度で（2変数、2レベル状況デザイン）8種の生物転換体を調製した。以下に

示す様々な負荷を用いて3ml容量で生物転換を実施した。

【0240】

14株5g/L;2-アミノピメレート濃度5mM

【0241】

14株5g/L;2-アミノピメレート濃度10mM

【0242】

14株20g/L;2-アミノピメレート濃度5mM

【0243】

14株20g/L;2-アミノピメレート濃度10mM

【0244】

15株5g/L;2-アミノピメレート濃度5mM

【0245】

15株5g/L;2-アミノピメレート濃度10mM

【0246】

15株20g/L;2-アミノピメレート濃度5mM

【0247】

15株20g/L;2-アミノピメレート濃度10mM

【0248】

生物転換体を軌道インキュベータにおいて30℃でファルコンチューブに入れた。7、14および21日後にアリコート（1ml）を生物転換体から取り出した。リアーゼ活性を観察する最大の可能性を提供するために長期間のインキュベーションを行った。1mlアリコートを、熱に不安定なタンパク質を除去するための熱処理によって分析用に調製した。その後試料を10,000rpmで2分間遠心分離し、0.2ミクロンのフィルターを通してろ過した。プレカラム誘導体化法を用いてHPLCによって試料の分析を実施した。この方法は、L-およびD-2-アミノピメレート誘導体のジアステレオマー対を形成するBoc-システインおよびオルトフタルアルデヒド試薬を用いてキラル付加物を形成する段階を含む。次にジアステレオマー（2-アミノピメレートのエナンチオマーである）を、338nmでC18カラムおよび5mMリン酸カリウム緩衝液pH 7.0およびアセトニトリル勾配を用いてHPLCによって分離することができる。各試料中のL-およびD-2-アミノピメレートシグナルのピーク面積を記録し、L-2-アミノピメレート標準品において認められた低下をD-2-アミノピメレートに対する%として表す。

【0249】

データは、L-2-アミノピメレートがすべての生物転換体において分解されていることを示す。鏡像体過剰率の増大は、L-βメチルアスパルテートに優先的に作用するこれらのリアーゼ酵素について予想された天然のL-エナンチオ選択性と一致する。より低い基質負荷（5mM）は、より高い基質負荷と比較してより大きなエナンチオ濃縮（すなわち利用可能な基質のより高い変換）も示し、これは予想されたリアーゼ活性と一致する。

【0250】

未反応の2-アミノピメレートの存在を質量分析によって確認した。M+H=176.09を試料において認め、C₇H₁₃NO₄についてシミュレートしたマススペクトルと合致した。フルスイープ（full sweep）マススペクトルで、エン酸生成物（M+H=159.06）を認めなかった。しかし、MSが20m/z幅の質量分離にわたって20秒間イオンを蓄積した場合、正しい生成物シグナルを認め、これはC₇H₁₀O₄についてシミュレートしたマススペクトルと合致した。

【0251】

rac-2-アミノピメリン酸出発物質の試料も分析した。この標準品に関して実施した同じMS方法を使用すると、2-アミノピメレートについての予想分子イオンを明瞭に示した。しかし、20m/z幅の質量分離にわたって20秒間MSイオン蓄積を反復すると（先の生物転換体試料に関して実施したように）、マスフラグメントとしてのエノ酸生成物の存在を明らかにした。

【0252】

10

20

30

40

50

3.1.1.4.3 I17株による2-アミノピメレートの陰性対照生物転換

3.1.1.4.1で述べた実験で使用したレベルに合致するように様々なレベルの細胞抽出物および基質を用いて4種の生物転換体を調製した。3mlの反応容量で以下に示すように生物転換を実施した。

【0253】

I17株5g/L;2-アミノピメレート濃度5mM

【0254】

I17株5g/L;2-アミノピメレート濃度10mM

【0255】

I17株20g/L;2-アミノピメレート濃度5mM

10

【0256】

I17株20g/L;2-アミノピメレート濃度10mM

【0257】

生物転換体を軌道インキュベータにおいて30℃でインキュベートし、8、13および21日後に試料を採取した。反応物の分析を、3.1.1.4.1で上述した実験において述べた方法に従ってHPLCによって実施した。

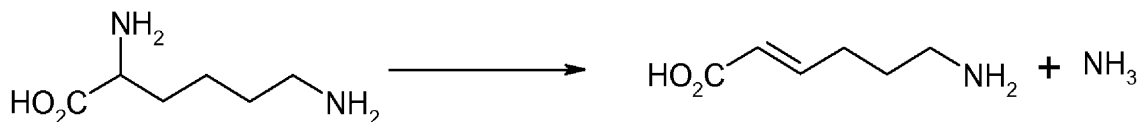
【0258】

データは、I17株においてL-エナンチオマーの多少の喪失が存在することを示す。しかし、L-エナンチオマーの相対的な減少は、特に2週間インキュベートした2番目の時点と比較した場合、I4およびI5株による等価の生物転換より少ない。以下に示す傾向は、生物転換におけるI4およびI5株が、細胞抽出物および基質負荷を検討する2×2の統計デザイン実験にわたってI17陰性対照株と比較すると、一貫してより高いレベルのL-2-アミノピメレート分解を有することを明らかに示す。

20

【0259】

3.1.1.4.4 DL-リジンを用いたI4およびI5 CFEの生物転換スクリーニング



2-アミノピメレートに対するリアーゼ活性を試験するために使用したのと同様の方法で8種の生物転換体を調製した。I4およびI5リアーゼ株を、様々な濃度の細胞抽出物およびDL-リジン基質を用いて以下のように試験した。

30

【0260】

I4株5g/L;DL-リジン濃度5mM

【0261】

I4株5g/L;DL-リジン濃度10mM

【0262】

I4株20g/L;DL-リジン濃度5mM

【0263】

I4株20g/L;DL-リジン濃度10mM

40

【0264】

I5株5g/L;DL-リジン濃度5mM

【0265】

I5株5g/L;DL-リジン濃度10mM

【0266】

I5株20g/L;DL-リジン濃度5mM

【0267】

I5株20g/L;DL-リジン濃度10mM

【0268】

生物転換体を軌道インキュベータにおいて30℃でファルコンチューブに入れた。7、14

50

および21日後にアリコート（1ml）を生物転換体から取り出した。リアーゼ活性を観察する最大の可能性を提供するために長期間のインキュベーションを行った。1mlアリコートを、熱に不安定なタンパク質を除去するための熱処理によって分析用に調製した。その後試料を10,000rpmで2分間遠心分離し、0.2ミクロンのフィルターを通してろ過した。DL-リジン試料を、エナンチオマー比を観測するためにキラルHPLCカラム（Chirobiotic T2 Astec）を用いて分析し、リアーゼ活性を決定した。試料を7、14および21日後に生物転換体から取り出した。

【0269】

結果は、5mMリジンを用いたすべての生物転換体においてL-リジンの喪失を示す。DL-リジンへのエナンチオ選択的作用には多少の変動が認められ、L-リジンの濃度はD-リジンの濃度を上回った。HPLCクロマトグラムにおける低いUV吸光度（210nmに設定した検出器）およびリジンの低いシグナル対ノイズ比のために、偽陽性L-リジン検出の可能性をこれらの結果から排除することはできない。しかし、概してDL-リジンからのL-リジンの分解は8種の生物転換体にわたって認められ、I4およびI5株において機能するリアーゼから生じる潜在的な溶解活性の予想される立体選択性と一致する。

【0270】

これらの生物転換体におけるリアーゼ活性の機能性を裏付けるさらなる証拠を集めるために、試料をMSによって分析し、試料中の所望のエン酸生成物を検出することを試みた。未反応リジンに対応するMSシグナル（ $M+H=176.09$ ）を試料中で認め、 $C_6H_{14}N_2O_2$ についてシミュレートしたマスペクトルと合致した。

【0271】

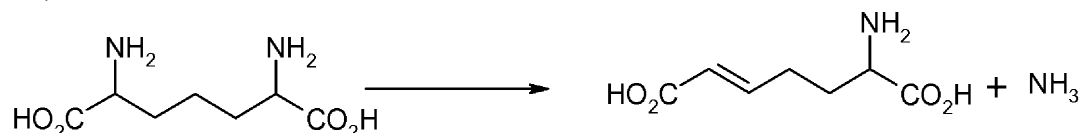
フルスイープマスペクトルで、エン酸生成物（ $M+H=130.09$ ）を認めなかった。しかし、アミノピメリン酸反応に関して、MSが20m/z幅の質量分離にわたって20秒間イオンを蓄積した場合、正しい生成物シグナルを認め、 $C_6H_{11}NO_2$ についてシミュレートしたマスペクトルと合致した。

【0272】

DL-リジン出発物質の試料も分析した。この標準品に関して実施した同じMS方法を使用すると、DL-リジンについて予想された分子イオンを明らかに示した。しかし、20m/z幅の質量分離にわたる20秒間のMSイオン蓄積を反復すると（先の生物転換体試料に関して実施したように）、マスフラグメントとしてのエン酸生成物の存在を明らかにした。

【0273】

3.1.1.4.5 メソ-2,6-ジアミノピメリン酸を用いたI4およびI5 CFEの生物転換スクリーニング



メソ-2,6-ジアミノピメリン酸に対するリアーゼ活性を試験するために6種の生物転換体を調製した。I4、I5およびI7株を5mM メソ-2,6-ジアミノピメリン酸を用いて試験し、様々な濃度の細胞出物を以下のように検査した。

【0274】

I4株5g/L; メソ-2,6-ジアミノピメリン酸濃度5mM

【0275】

I4株20g/L; メソ-2,6-ジアミノピメリン酸濃度5mM

【0276】

I5株5g/L; メソ-2,6-ジアミノピメリン酸濃度5mM

【0277】

I5株20g/L; メソ-2,6-ジアミノピメリン酸濃度5mM

【0278】

I17株5g/L; メソ-2,6-ジアミノピメリン酸濃度5mM

【0279】

I17株20g/L; メソ-2,6-ジアミノピメリン酸濃度5mM

【0280】

生物転換体を軌道インキュベータにおいて30℃でファルコンチューブに入れた。4日後にアリコート (1ml) を生物転換体から取り出し、HPLC分析までさらなる試料の取得を保留する。

【0281】

4日後に取得した試料をMSによって分析した。分析はメソ-2,6-ジアミノピメリン酸の存在を確認し、これは $C_7H_{14}N_2O_4$ についてシミュレートしたマスシグナルと合致した。

【0282】

生物転換体試料においてこのマススペクトルでは所望のエン酸シグナルを認めなかった。しかし、イオン蓄積を0.5秒間導入した場合、試料において対応するエン酸シグナル ($M+H=174.08$) を認めた。

【0283】

3.1.2 エン酸レダクターゼ (EC 1.3.1.31) またはエノイルCoAデヒドロゲナーゼ (EC 1.3.1.62) による2-アミノ-5,6-デヒドロピメリン酸 (6-アミノ-2-ヘプテン二酸) の2-アミノヘプタン二酸への変換および2-ヘプテン二酸またはそのCoAエステルのピメリン酸またはそのCoAエステルへの変換 (図10Aおよび10B参照)

3.1.2.1 エン酸レダクターゼ標的の選択

ピメリン酸の2つの不飽和中間体、すなわち2-アミノ-5,6-デヒドロピメリン酸および2-ヘプテン二酸の、それらの対応する飽和化合物、2-アミノヘプタン二酸およびピメリン酸への変換に関与する経路を同定した後、酵素標的を、エン酸レダクターゼファミリー (EC 1.3.1)、例えばEC 1.3.1.31、EC 1.3.1.8、EC 1.3.1.9、EC 1.3.1.10、EC 1.3.1.31、EC 1.3.1.38、EC 1.3.1.39、EC 1.3.1.44、またはEC 1.3.1.62におけるピメロイル-CoAデヒドロゲナーゼ、例えばPimC/PimDもしくはThnJ/ThnKから選択した。エン酸レダクターゼはEC 1.3、例えばEC 1.3.8.1またはEC 1.3.99.3、EC 1.3.99.B10もしくはシントロファス・アシディトロフィカス (*Syntrophus aciditrophicus*) 2,3-ジデヒドロピメリル-CoAレダクターゼおよびそのホモログであってよい。 α 、 β -不飽和カルボン酸に対するそれらの異なる基質特異性およびそれらの安定性に基づく (Stereocomplementary bioreduction of α , β -unsaturated dicarboxylic acids and dimethyl esters using enoate reductases - Enzyme- and substrate-based stereocontrol: Stueckler et al. *Org. Lett.* 2007, 9, 5409-5411)。

【0284】

特に、枯草菌由来のエン酸レダクターゼ遺伝子 (YqjM) (GeneBank D84432; フラグメント242791-243807) およびトマト (*Solanum lycopersicum*) 由来のエン酸レダクターゼ遺伝子 (OPR1およびOPR3) (それぞれ、GeneBank NM_001247852; フラグメント108-1238およびGeneBank NM_001246944; フラグメント94-1284) は以前にクローン化され、大腸菌において成功裏に発現されており、合理的設計を介したタンパク質遺伝子操作を可能にする、YqjMおよびOPR3酵素の結晶構造が報告されたことから、これらを選択した (The 1.3 Å crystal structure of the flavoprotein YqjM reveals a novel class of old yellow enzyme: Kitzing et al. *J. Biol. Chem.* 2005, 280, 27904-27913; Asymmetric bioreduction of activated alkenes using cloned 12-oxophytodienoate reductase isoenzymes OPR-1 and OPR-3 from *Lycopersicon esculentum* (Tomato): A striking switch of stereopreference: Hall et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, 46, 3934-3937; Crystal structure of 12-oxophytodienoate reductase 3 from tomato - Self inhibition by dimerization: Breithaupt et al. *PNAS* 2006, 103, 14337-14342)。加えて、シュードモナス・プチダ由来のXenA (EC 1.3.1.31)、ユーグレナ・グラシリス (*Euglena gracilis*) 由来のTER (EC 1.3.1.44)、ヒト (*Homo sapiens*) 由来のPECRおよびMECR、シュードモナス・プチダ由来のacdA (EC 1.3.99.-)、ウシ (*Bos Taurus*) 由来のACADS (EC 1.3.99.-)、ならびにロドシュードモナス・パルストリス (*Rhodopseudomonas palustris*) 由来のPimC/pimD (EC 1.3.1.62)

10

20

30

40

50

を、大腸菌における発現のために選択し、2-ヘプテン-二酸および2-ヘプテン二酸-CoAの還元に関して検討した。

標的遺伝子	GenBankアクセッション	
枯草菌 (YqjM)	D84432 フラグメント 242791-243807	
トマト (OPR1)	NM_001247852, フラグメント108-1238	
トマト (OPR3)	NM_001246944; フラグメント94-1284	10
シュードモナス・プチダ生体異物レダクターゼA (XenA、39.8kDa、363AA)	AAF02538.1	
ユーグレナ・グラシリス ミトコンドリア トランス-2- エノイル-CoAレダクターゼ (TER、43.8kDa、405AA)	AAW66853.1	
ヒトペルオキシソーム トランス-2-エノイル-CoAレダクターゼ (PECR、32.5kDa、303AA)	NP_060911.2	
ヒトミトコンドリア トランス-2-エノイル-CoAレダクターゼ (MECR、40.5kDa、373AA)	NP_057095.2	20
シュードモナス・プチダ アシル-CoAデヒドロゲナーゼ (acdA、41.6kDa、383AA)	NP_745629.1	
ウシ アシル-CoAデヒドロゲナーゼ (ACADS、44.6kDa、412AA)	NP_001029573.1	
ロドシュードモナス・パルストリス ピメロイル-CoA デヒドロゲナーゼ (PimC、大サブユニット、44.5kDa、396AA)	NP_949051.1	
ロドシュードモナス・パルストリス ピメロイル-CoA デヒドロゲナーゼ (PimD、小サブユニット、40.5kDa、389AA)	NP_949050.1	30

【0285】

2,3-二重結合の還元に関して潜在的候補である他のエン酸レダクターゼは、それらの広い基質特異性にゆえにクロストリジウム種由来のものである (Chiral compounds synthesized by biocatalytic reductions: Simon et al. Angew. Chem. Ed. Engl. 1985, 24, 539-553; Properties and mechanistic aspects of newly found redox enzymes from anaerobes suitable for bioconversions on preparatory scales: Simon et al. Pure & Appl. Chem. 1992, 64, 1181-1186)。しかし、これらの酵素は、酸素に対するそれらの高い感受性に起因して概念の初期実証のためにクローン化されず、発現されなかった (Enoate reductases of Clostridia - Cloning, sequencing and expression: Rohdich et al. J. Biol. Chem. 2001, 276, 5779-5787) が、嫌気性宿主における最終経路構築のための有用な触媒であり得る。特に、以下のエン酸レダクターゼは、標的である2-エノイルC7化合物における二重結合の還元のために有用であるはずである。

【0286】

クロストリジウム・クルイベリ (Clostridium kluyveri) 由来の enr 2-エン酸レダクターゼ (Y16137) EC 1.3.1.31: 全細胞のクロストリジウム・クルイベリは、分子水素の存在下で広範囲の2-エノエートを還元することが認められた。基質は、チグリン酸、アクリル酸、メタクリル酸、ジメタクリル酸、(E)-ペンテン酸、(E)-ヘキセン酸、ソルビン酸、ケイ皮酸 [19]、(E)-2-ブテン酸および (E)-2-メチル-2-ブテン酸、(E)-および (Z)

)-3-メチル-2-ペンテン酸、p-メトキシ-ケイ皮酸およびp-ニトロ-ケイ皮酸であった[Buhler,M.,Giesel,H.,Tischer,W.and Simon,H. (1980) Occurrence and the possible physiological role of 2-enoate reductases.FEBS Lett.109,244-246]。この酵素をコードする遺伝子の部分配列が同定された[Rohdich,F.,Wiese,A.,Feicht,R.,Simon,H.and Bacher,A. (2001) Enoate reductases of Clostridia.Cloning,sequencing,and expression.J. Biol.Chem.276,5779-5787]。C.クルイベリのゲノムは配列決定されているので、我々はこの遺伝子の完全な配列を見出した(YP_001394144.1、GENEBANK)。

【0287】

クロストリジウム・チロブチリカム(C.tyrobutyricum) (以前のクロストリジウム種La 1) 由来のenr 2-エン酸レダクターゼ(Y09960) EC 1.3.1.31: 2-エン酸レダクターゼは、(E)-ブテノエートで増殖するクロストリジウム種において見出され、均一に精製された。これは、(E)-2-メチルブテノエートおよびシンナメート[Elshahed MS,Bhupathiraju VK,Wofford NQ,Nanny MA,McInerney MJ. (2001) Metabolism of benzoate,cyclohex-1-ene carboxylate,and cyclohexane carboxylate by "Syntrophus aciditrophicus" strain SB in syntrophic association with H (2) -using microorganisms.Appl Environ Microbiol.67:1728-1738]、(E)- α -ホルミルアミノ-シンナメート、ならびに4-メチル-2-ペンテノエート[Buhler,M.,Giesel,H.,Tischer,W.and Simon,H. (1980) Occurrence and the possible physiological role of 2-enoate reductases.FEBS Lett.109,244-246]を受け入れた。enrレダクターゼをコードする遺伝子が同定され、酵素は嫌気的条件下で大腸菌において過剰発現された[Rohdich,F.,Wiese,A.,Feicht,R.,Simon,H.and Bacher,A. (2001) Enoate reductases of Clostridia.Cloning,sequencing,and expression.J. Biol.Chem.276,5779-5787]。

【0288】

ムーレラ・サーモアセチカ(Moorella thermoacetica) (以前のクロストリジウム・サーモアセチカム(Clostridium thermoaceticum)) 由来のenr 2-エン酸レダクターゼ(Y16136) EC 1.3.1.31: C.チロブチリカム由来のエン酸レダクターゼに対する抗血清は、好温性クロストリジウム・サーモアセチカムのタンパク質と交差反応した。このレダクターゼをコードする遺伝子が同定され、酵素は大腸菌において成功裏に過剰発現された[Rohdich,2001]。

【0289】

エン酸レダクターゼに加えて、ピメロイルCoAデヒドロゲナーゼ(EC 1.3.1.62)は、2-ヘプテン二酸および対応するCoAエステル中の二重結合の還元を触媒するはずである。ピメロイルCoAデヒドロゲナーゼ活性は、ベンゾエートとデスルフォビブリオ属種(Desulfovibrio sp.)のG11株との共培養物中またはクロトネートとの純粋培養中で増殖するシントロファス・アシディトロフィカス(Syntrophus aciditrophicus)の細胞抽出物において見出され、ベンゾエート分解経路に参与する(Elshahed MS,Bhupathiraju VK,Wofford NQ,Nanny MA,McInerney MJ. (2001) Metabolism of benzoate,cyclohex-1-ene carboxylate,and cyclohexane carboxylate by "Syntrophus aciditrophicus" strain SB in syntrophic association with H (2) -using microorganisms.Appl Environ Microbiol.67:1728-1738)。クロトネートからのシクロヘキサンカルボキシレート形成のための経路は、グルタコニル-CoAのグルタリル-CoAへの、および2,3-ジデヒドロピメリル-CoAのピメロイル-CoAへの還元を伴うと考えられている。この活性の原因となる酵素はS.アシディトロフィカスを除いて同定されていないが、デスルホコッカス・マルチバランス非脱カルボキシル化グルタリル-CoAデヒドロゲナーゼ(EC 1.3.99.B10)をクエリーとして用いるBLAST検索により、S.アシディトロフィカスにおいてアシル-CoAデヒドロゲナーゼと注釈されている6つの配列: YP_462067.1 (73%の同一性)、YP_460269.1 (39%)、YP_461117.1 (36%)、YP_460428.1 (34%)、YP_460268.1 (32%)およびYP_463031.1 (28%)が同定された。Wischgoll et al., (2009)は、いくつかのグルタロイル-Co-酵素Aデヒドロゲナーゼの配列を比較して、YP_462067.1とデスルホコッカス・マルチバランス遺伝子との一次構造類似性を同定し、そのことにより、前者も非脱カルボキシル化性であることが示された。

このデヒドロゲナーゼ反応は求めているものの反対であるが、提唱されるシクロヘキサンカルボキシレート形成経路は、エノイル-CoA還元がこの生物で起こることを示している。データベース上で見出される他の仮説上のピメロイルCoAデヒドロゲナーゼは、スフィンゴモナス・マクロゴリタビダ (*Sphingomonas macrogolitabida*) 由来の ThnJ (D9PTN0) および ThnK (D9PTM9) (β酸化経路によるテトラリン分解についての遺伝子クラスター中に見出された)、ロドシュードモナス・パルスストリス由来の PimC (Q6N3I0) および PimD (Q6N3I1) ならびにブラディリゾビウム属種 (*Bradyrhizobium* sp.) 由来の PimC (A5ES10) および PimD (A5ES09) を含む。2-ヘプテン二酸およびそのCoAエステルの還元を評価するための発現および生物変換用の選択に、PimC/PimDを含めた。

【0290】

本発明に有用な他のデヒドロゲナーゼは、デスルホコッカス・マルチボランス (*Desulfococcus multivorans*) 由来のGDHグルタリル補酵素Aデヒドロゲナーゼを含み、非脱カルボキシル化グルタコニル補酵素Aを形成するグルタリル補酵素Aデヒドロゲナーゼは、絶対嫌気性菌デスルホコッカス・マルチボランスにおいて特性づけられた[Wischgoll S, Demmer U, Warkentin E, Gunther R, Boll M, Ermler U. (2010) Structural basis for promoting and preventing decarboxylation in glutaryl-coenzyme A dehydrogenases. *Biochemistry*. 49:5350-5357]。この酵素を過剰発現させ、その結晶構造を決定した。このことにより、これは、天然のC5基質であるグルタコニル (glutacolonyl) -CoAおよびグルタリル-CoAのC7同等物 (2,3-ジデヒドロピメロイル-CoAおよびピメロイル-CoA) の可逆的酸化および還元を触媒するための、タンパク質工学に関する有用な標的となる。

【0291】

3.1.2.2 遺伝子標的を含む発現ベクターのクローニング

選択した枯草菌およびトマト由来のYqjM、OPR1および OPR3遺伝子標的を、次に、3.1.1.2章で詳述したようにinABLE技術を用いてIPTG誘導性pET21-aバックボーンにクローニングし、I1 (pET21-a中の枯草菌YqjM遺伝子)、I2 (pET21-a中のトマトOPR1遺伝子)、およびI3 (pET21-a中のトマトOPR3遺伝子) を作製した。

【0292】

簡単に述べると、選択した遺伝子およびベクターバックボーン内の潜在的EarI部位を、EarI消化/連結サイクルを含むパート/リンカー融合物調製への干渉を防ぐために分断した。枯草菌YqjMエン酸レダクターゼ遺伝子ではEarI部位を認めなかったが、トマトOPR1およびOPR3遺伝子ではそれぞれ1つおよび2つのEarI部位を検出し、制限部位にサイレント突然変異を組み込むことによってこれらを分断した。トマトOPR3遺伝子配列におけるEarI部位1および2の分断は不慮のEarI部位形成をもたらし、これは配列を合成した後で初めて発見された。残留EarI部位を、Stratagene からのQuikchange単一位点指定突然変異誘発キットを用いて除去した。残留EarI部位を分断するために順方向および逆方向プライマーを設計し、プライマーを、Quikchange反応の前に3.1.1.2章で述べたようにリン酸化した。Quikchangeおよび陰性対照反応物を以下のように調製した。

試薬	TP27 Quikchange	陰性 対照
10x Pfu turbo 反応 緩衝液	5 μl	5 μl
TP27	1 μl	1 μl
順方向プライマー	3 μl	3 μl
逆方向プライマー	3 μl	3 μl
dNTP 溶液	5 μl	5 μl
分子生物学グレードの 水	32 μl	33 μl
Pfu turbo 酵素	1 μl	-
総容量	50 μl	50 μl

反応をサーモサイクラーにおいて実施し (95℃、0.5分; 95℃、0.5分、55℃、1分、68℃

、10分の35サイクル;68℃、1分、4℃保持)、その後DpnI (1 μL) で処理して、メチル化親DNAを37℃で2時間消化した。消化反応物 (3 μL) を使用してTOP10エレクトロコンピテント大腸菌細胞を形質転換し、形質転換試料 (100 μL) をLB-Kan-寒天に塗布した。37℃で一晩インキュベートした後、Quikchange反応プレートで約100クローンを得たのに比して、陰性対照プレートでは皆無であった。10クローンをプレートから採取し、対応するプラスミドを精製して、EarI消化によって分析した。アガロースゲル上に300bpのバンドが存在しないことは、OPR3遺伝子内に位置するEarI部位が欠失していることを示した。EarI消化は、数個のクローンが残留EarI部位の除去に関して陽性であることを示した。DNA塩基配列決定によりクローンの配列を確認した。

【0293】

クローン3 (EarIの除去に関して陽性のクローン) からのベクターを使用して、エレクトロコンピテントTOP10大腸菌細胞を形質転換した。QIAGEN Hi-Speed Plasmid Purification Midi Kitを使用して、培養物から大きなDNAストックを調製し、その後QIAGEN PCR精製キットを用いてDNA試料を濃縮した。最終的なDNA濃度および試料の容量は、120 μl中470.0 ng/μl (DNA濃度199.8nM) であった。

【0294】

3つのEarI部位をベクターバックボーンpET21-aにおいて検出し、これらを、制限部位の最後のグアニジン塩基をチミンに突然変異させる (逆相補配列では最初のシトシンのアデニンへの突然変異に対応する) ことによって分断した。

【0295】

次に、EarIを含まない配列をパート設計ソフトウェアにおける入力配列として使用し、3.1.1.2章で論じたように、EarI部位によって隣接された対応するランケートパートを設計した。合成した枯草菌YqjM (TP25)、トマトOPR1 (TP26)、およびトマトOPR3 (TP27) ランケートパートをDNA2.0 pJ201ベクターに挿入した。クロラムフェニコール耐性遺伝子を含むフラグメントの導入によってpET21-aランケートパートベクターを完全合成し、ベクターTP31を作製した。

【0296】

inABLEオリゴヌクレオチドのリン酸化およびその後のアニーリングを、3.1.1.2章で述べたように実施した。

【0297】

次に、パート/リンカー融合物を、先に3.1.1.2章で述べたように、ランケートパートの5'末端をその対応するパートオリゴのアニールしたフラグメントと連結し、ランケートパートの3'末端をリンカーオリゴのアニールしたフラグメントと連結することによって調製した。枯草菌YqjM、トマトOPR1およびトマトOPR3遺伝子に対応するパートリンカー融合物を、それらのそれぞれのアニールしたパートオリゴ、それらのランケートパート、およびベクターバックボーンからのアニールしたリンカーオリゴの連結によって調製した。ベクターバックボーンに対応するパートリンカー融合物を、そのアニールしたパートオリゴ、そのランケートパート、およびどちらかの遺伝子からのアニールしたリンカーオリゴの連結によって調製した。陰性対照遺伝子を含まない集合体も、ベクターバックボーンのアニールしたパートオリゴ、そのランケートパート、およびそのアニールしたリンカーオリゴの連結によって調製し、ベクターバックボーンの自己集合体を生じさせた。

【0298】

ランケートパートに対して10倍および20倍モル過剰のリンカーおよびパートオリゴを、各々のEarI消化/連結サイクルの間のランケートパートとオリゴヌクレオチドの間の連結を促進するために遺伝子およびベクター反応において使用した。50 μLのEarI消化/連結反応物をサーモサイクラー (Eppendorf Mastercycler Gradient) でインキュベートし、温度を37℃と16℃の間で交互に変化させた。サイクルの完了後、試料を0.7%アガロースゲルに負荷し、パート/リンカー融合物の調製に関して予想されたサイズのフラグメント、例えば枯草菌YqjMパート/pET21-aリンカーおよびトマトOPR1パート/pET21-aリンカーならびに3kbベクターバックボーン;またはpET21-aパート/トマトOPR3リンカー-5.3kbお

10

20

30

40

50

よびトマトOPR3パート/pET21-aリンカー-1.2 kbならびにベクターバックボーンに対応する1.8kbバンドを認めた。次に正しいサイズのバンドをゲルから切り出し、QIAGEN QIAquick Gel Extraction Kitを使用してDNAをゲル抽出した。DNA濃度は、30 μ lの総容量で14.4 ng/ μ lから49.6 μ g/ μ lの範囲であった（DNA濃度範囲5.4nM～35.6nM）。

【0299】

遺伝子パート/リンカー融合物とそれらのそれぞれのベクターパート/リンカー融合物との組合せを、次に、3.1.1.2章で述べたように2パート集合を介して実施した。簡単に述べると、遺伝子パートリンカーとベクターパートリンカーを室温で30分間インキュベートした後、2 μ lの集合体反応物および10 μ lのコンピテント細胞を使用して高効率のOPR3化学的コンピテントNEB10 β 大腸菌細胞の形質転換を実施した。形質転換した細胞をLB-Amp-寒天に塗布し、37℃で一晩インキュベートした。各集合体について500クローンを得た。1つまたは2つのランダムなクローンを各集合体から選択し、QIAGEN QIAprep Miniprep Kitを使用して対応するベクターを単離した。

【0300】

3.1.1.2章で述べたように、ベクターの構築を確認するために制限を実施した。簡単に述べると、集合体I1から得たクローンをPstIおよびHincIIを用いて分析して、枯草菌YqjM遺伝子の大腸菌pET21-1発現ベクターへの挿入に関して陽性のクローンを同定し、集合体I2から得たクローンをPvuIおよびPsiIを用いて分析して、集合体I3から得たクローンをBglIIおよびMluIを用いて分析した。制限産物をアガロースゲルで泳動させて、各集合体から試験したクローンに関して予想されたバンドパターンを認め、枯草菌YqjM、トマトOPR1およびトマトOPR3エン酸レダクターゼ遺伝子を保有する大腸菌pET21-a発現ベクターの構築を確認した。加えて、ベクターバックボーンの3'末端と遺伝子の5'末端の間ならびに遺伝子の3'末端とベクターバックボーンの5'末端の間のパート接合部を配列決定し、構築を確認した。

【0301】

3.1.2.3 大腸菌における外因性エン酸レダクターゼ遺伝子の発現

最初に、クローン化したエン酸レダクターゼ遺伝子を、3.1.1.3章で上述したように1mM IPTGおよび37℃の誘導温度を用いて大腸菌で発現させた。簡単に述べると、各々培養物について誘導前および誘導後の様々な時点でOD₆₀₀を測定した。誘導後24時間のインキュベーション後に残った残存培養物を50mLファルコンチューブに移し、5000rpmで10分間の遠心分離によって採取して、SDS-PAGEを用いて試料のタンパク質含量を分析した。予想されたサイズ（35kDa）の大きなタンパク質バンドが、IPTG誘導後に枯草菌YqjMエン酸レダクターゼの発現試験からの可溶性画分において明瞭に見えた。IPTG誘導後にトマトOPR1エン酸レダクターゼの発現物からの不溶性画分において大きなバンドが見え、I2から発現された予想上の42kDa OPR1タンパク質が大腸菌において不溶性であることを示唆した。予想されたサイズ（44kDa）のタンパク質バンドが、トマトOPR3 エン酸レダクターゼI3のIPTG誘導後に可溶性部分ならびに不溶性画分で明瞭に検出され、予想された 44kDaのトマトOPR3エン酸レダクターゼタンパク質が大腸菌において部分的可溶性形態として発現されることを示唆した。

【0302】

文献における最適化された大腸菌でのトマトOPR1エン酸レダクターゼの機能的発現の報告に基づき、大腸菌でのトマトOPR1エン酸レダクターゼの溶解度を改善する試みとしてIPTG濃度（0.1～1mM IPTGの範囲）および誘導温度（16～37℃の範囲）についての条件を最適化した（Strassner et al.JBC 1999,274,p.35067-35073;Hall et al.Angew.Chem.Int.Ed.2007,46,p.3934-3937）。3.1.1.3章で述べたのと同じ発現プロトコルおよび同じSDS-PAGE試料調製物を溶解度最適化実験に使用した。

【0303】

各集合体からの各時点の試料を、次に、3.1.1.3章で述べたようにSDS-PAGE分析用に処理し、SDS-PAGEを用いて分析して、これは、誘導温度の16℃への低下および誘導物質濃度の0.1 mMへの低下が大腸菌において発現されるトマトOPR1エン酸レダクターゼを部分的に

可溶化するのに有効であることを示した。

【0304】

3つのエン酸レダクターゼを発現する大腸菌株を800ml培養物までスケールアップし、活性を検定した。

【0305】

他方のエン酸レダクターゼであるXenA、TER、PECR、MECR、ACADS、PimC/PimDを、標準的な手法を用いて大腸菌で発現させ、Histrapカラムで精製した。

【0306】

生物変換反応

C6基質（2-ヘキセン二酸および2,3-ジデヒドロアジポイル-CoA）およびC7基質（2-ヘプテン二酸および2,3-ジデヒドロピメロイル-CoA）の両方の、二重結合の還元を評価した。

【0307】

エノイル-CoAレダクターゼ活性に関する酵素アッセイは、公表された方法（Bergler H, et al., (1993). Protein EnvM is the NADH-dependent enoyl-ACP reductase (FabI) of *Escherichia coli*）に基づく。タンパク質EnvMは、大腸菌のNADH依存性エノイル-ACPレダクターゼ（FabI）である。反応は、酵素の補因子要求条件に応じて300 μ MのNADPH、NADHまたはFAD、および精製酵素（25~55 μ g/ml）を含むリン酸緩衝液（100mM、pH7.5）中で行った。反応は、基質である2,ヘプタン二酸（dioic acid）または2,3-ジデヒドロピメロイル（pimloyl）-CoAの添加によって開始した。反応物を30℃で4時間インキュベートし、2M HCL（10% v/v）の添加によって停止した。産物をLC-MSによって分析した。対照物は、基質を加えていない反応混合物、および不活性化した（5分間煮沸した）酵素を加えた反応混合物で構成した。

【0308】

アシル-CoAデヒドロゲナーゼ活性に関する酵素アッセイは、公表された方法（Le W, Abbas AS, Sprecher H, Vockley J and Schulz H (2000). Long-chain acyl-CoA dehydrogenase is a key enzyme in the mitochondrial β -oxidation of unsaturated fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1485: 121-128）に基づく。アッセイは、50mMリン酸カリウム緩衝液（pH 7.6）、36 μ Mジクロロフェノールインドフェノール、0.3mM N-エチルマレイミド、1.5mMフェナジンメトスルフェート、60 μ Mのアシル-CoAおよび酵素（25~55 μ g/ml）を含む1ml中で行った。反応はフェナジン（phenazine）メトスルフェートの添加によって開始した（Le et al., 2000）。

【0309】

反応は、基質（2,3-ジデヒドロピメリル（pimelyl）-CoAまたは2-ヘプテン二酸）（60 μ M）の添加によって開始した。反応は30℃で4時間実施し、続いて、最終容積の10%の2M HClの添加によって停止した。産物をLC-MSによって分析した。用いた対照物は、基質を加えていない反応物、および煮沸した酵素を加えた反応物とした。

【0310】

結果：ACADS、PimD、TERおよびXenAは、2-ヘキセン二酸のアジピン酸への還元を触媒した（図27A参照）。MECR、PER、TERおよびXenAは、トランス-2,30ジデヒドロアジポイル-CoAのアジポイル-CoAへの還元を触媒した（図27B参照）。これらの酵素による対応するC7基質の形成は、検討した反応条件下では全く観察されず、このことは、これらの酵素がC7 2-エノイル基質に対してより低い活性を有すること、および酵素の活性が有用となるように改良するために酵素工学が必要と考えられることを示している。

【0311】

3.1.3 脂肪酸アシルCoAレダクターゼ（アルデヒド形成FAR）（EC 1.2.1.50）またはアシル-[acp]レダクターゼ（EC 1.2.1.80）によるピメロイルCoAおよびピメロイル-[acp]のピメリン酸セミアルデヒドへの変換（図2参照）。

3.1.3.1 標的酵素の選択

脂肪アシルCoAレダクターゼは、クチクラワックス形成のために植物および他の高等真核生物におけるワックスエステル合成に関与する。古細菌および細菌では、これらの酵素

10

20

30

40

50

は長鎖アルカン生合成に参与するが、これらの生物におけるそれらの生理的機能はまだ必ずしも明らかではない。植物におけるワックスエステルの形成は、アシルCoAの伸長から始まって長鎖脂肪酸 (LFCA) (または脂肪アシルCoA) を形成し、次にこれが脱カルボニル経路またはアシルCoA還元経路によって還元される (Cheesbrough and Kolattukudy, 1984)。

【0312】

炭化水素が脱カルボニル化経路によって形成される。この経路は、アルデヒドを生成する脂肪アシルCoAレダクターゼ触媒反応によって開始され、次いでアルデヒドデカルボニラーゼによって触媒される脱カルボニル化により [Cn-1] アルカンを生じる (Cheesbrough and Kolattukudy, 1984)。

10

【0313】

脂肪アシルCoA還元経路もLCFAのアルデヒドへの還元によって開始され、次いでアルデヒドレダクターゼによるアルデヒドのさらなる還元によって均一な長さの第一級アルコールが生成される (Millar et al., 1999) (Kolattukudy, 1971)。同様の経路が原核生物において存在すると考えられる (Schirmer et al., 2010)。

【0314】

両方の経路が、可逆的反応において脂肪アシルCoAレダクターゼ (FAR; EC 1.2.1.50) によって触媒される長鎖アシルCoAのアルデヒドへの還元によって開始される。アシルCoA還元経路において、アルデヒドはアルコールへとさらに還元される。これは、生物によって1段階または2段階のいずれかで達成され得る。2段階還元はアシルCoAレダクターゼ触媒反応を使用して開始され、これが、脂肪アルデヒドレダクターゼによって触媒される2番目の還元のための脂肪アルデヒドを放出する。1段階還元は、アルデヒド中間体を放出せずにアシルCoAをアルコールに直接還元する、二官能性アシルCoAレダクターゼによって触媒される。したがって、脂肪アシルCoAレダクターゼは大きく2つの種類に分けられる: (1) アルコール形成アシルCoAレダクターゼおよび (2) アルデヒド生成アシルCoAレダクターゼ。原核生物および真核生物において両方の種類の例が存在する。標的はピメリン酸セミアルデヒドであるので、アルデヒド生成脂肪アシルCoAレダクターゼはピメロイルCoAの還元のための最も有望な候補である。

20

【0315】

予備的な文献およびデータベース検索は、配列相同性によって検討または同定されたアシルCoAレダクターゼの圧倒的多数が、真核生物および原核生物の両方においてアルコール形成FARであることを明らかにした。しかし、アルデヒド生成レダクターゼの初期の例の1つはアシネトバクター・カルコアセチカス (*Acinetobacter calcoaceticus*) -Acr1に由来した。それゆえ、この酵素の一次配列を他のアルデヒド生成酵素についてのデータベース検索で使用した。

30

【0316】

アシルCoAレダクターゼに関する一般的な規則として、より短いタンパク質 (295~350 アミノ酸) はアルデヒド生成酵素である傾向があり、一方より長いポリペプチド (500+ アミノ酸) はアルコール生成酵素であると考えられる。しかし、データベースに寄託された短い酵素の大部分は、配列データ以上のさらなる情報がない推定上または仮説上の注釈しかなく、この理由から、これらは考慮しなかった。

40

【0317】

以下の基準を用いて候補を選択した: (1) 酵素はアルデヒドだけを生成しなければならないまたはタンパク質遺伝子操作によってアルコール形成を排除する余地がない; (2) タンパク質の存在の証拠が存在しなければならない、すなわちタンパク質が細胞画分において同定および精製されているまたは単離されている; (3) アシルCoAまたはアシル-ACP基質を使用して酵素を試験した; (4) 酵素は、活性が多酵素複合体とは無関係に実証されていない限り、多酵素複合体の一部であってはならない。ひとたび候補が同定されれば、選択を順位づける付加的なデータを提供するためにさらなるバイオインフォマティクスおよび文献検索を実施した。

50

【0318】

表1は、公知のアルデヒド形成酵素（Acr1）に対して実施したデータベース検索の結果を示す。各々の候補物を精製し、インビトロで検定した。候補物を順位づけ、それらの適切性に従って分類した。最上位の酵素（1～3）はさらなる検討のための最良の候補物とみなされ、中間順位の酵素（4および5）は良好な候補物とみなされるが、さらなる調査を必要とし、そして下位に分類された酵素（6）は、タンパク質配列がないことおよび配列決定されたゲノムが欠如していることから、酵素活性データを得るためにさらなる努力を必要とする。

【0319】

（表1）様々な生物からの候補アルデヒド形成アシルCoAレダクターゼ

タンパク質名／ アクセッション 番号	生物	試験した 最短基質 （炭素 原子数）	アミノ 酸数	アルコール への還元	証拠の レベル*
P94129	アシネトバクター・ カルコアセティカス	14	295	なし	酵素 活性
YP_400611	シネココッカス・ エロンガタスPCC 7942	18	341	なし	酵素 活性
BAF92773 LuxC EC 1.2.1.50	フォトバクテリウム・ ホスホレウム	14	488	なし	酵素 活性
YP_959769	マリノバクター・ アクアエオレイVT8	8	661	あり、しかし トランケートする 可能性があり得る	酵素 活性
YP_959486	マリノバクター・ アクアエオレイVT8	ND	513	あり、しかし トランケートする 可能性があり得る	酵素 活性
AAB35106 （部分）	ボトリオコッカス ・ブラウニイ	16	26	なし	酵素 活性

* 証拠のレベル-酵素活性は、酵素が異種もしくは同種のいずれかで精製されたこと、または活性が粗抽出物または他の細胞画分において測定されたことを意味する。

【0320】

アシネトバクター・カルコアセティカスAcr1（P94129）（Reiser,S.,and Somerville,C.（1997）:Isolation of mutants of Acinetobacter calcoaceticus deficient in wax ester synthesis and complementation of one mutation with a gene encoding a fatty acyl coenzyme A reductase.J Bacteriol 179,2969-2975）：アルデヒド生成アシルCoAレダクターゼは精製されており、295アミノ酸を含み、分子量は32.5kDaである。この酵素は大腸菌で発現されており、無細胞抽出物はアシルCoAレダクターゼ活性を含むことが示された。C12からC24の範囲の長さのアシルCoA基質を検定した（奇数のCの基質は検定しなかった）。対応するアルデヒドが、C12基質を除くすべての場合に生成された。この酵素の基質範囲をさらに検討することおよびより短い長さのアシルCoAに関するその活性を試験することは価値があるであろう。ピメロイルCoAが基質ではない場合も、基質範囲を広げる指向性進化の余地がある。この酵素は、脂肪酸誘導体の生産増強についての特許（米国特許第20110256599号）において直接命名された。

【0321】

シネココッカス・エロンガタス（*Synechococcus elongatus*）PCC 7942（YP_400611）由来のAAR（Schirmer,A.,Rude,M.A.,Li,X.,Popova,E.,and Del Cardayre,S.B.（2010）.Microbial Biosynthesis of Alkanes.Science 329,559-562）：このアシル-ACPレダクターゼは藍色細菌*S.エロンガタス*中に存在し、AARと称される。この酵素はアルカン生合成に関与すると考えられる。大腸菌MG1655において発現され、精製されている。CoAおよびACPの

両誘導体が基質である。したがって、オクタデカナールが、脂肪アルコールの形成を伴わずにオレオイルCoAおよびオレオイル-ACPから形成される。しかし、オレオイル-ACPは、オレオイルCoAについての130 μ MのKMと比較して8 μ MのKMを有する、好ましい基質であった。この酵素はNADPH依存性であり、活性にはマグネシウムを必要とする。他の基質は試験してない。アルデヒド形成についての選択性およびCoA誘導体に関する活性は、この酵素をピメロイルCoA還元に関して試験するための良好な候補物にしている。さらに、密接に関連する生物においてこの遺伝子の多数のオルソログが存在する (Schirmer et al., 2010) が、AARが最もよく検討されている。以下の特許は、(Schirmer et al., 2010) からの研究に関連する: 国際公開公報第2009/140695号および国際公開公報第2009/140696号。

【0322】

フォトバクテリウム・ホスホレウム (*Photobacterium phosphoreum*) 由来のLuxC (BAF92773) (Boylan, M., Miyamoto, C., Wall, L., Graham, A., and Meighen, E. (1989). Lux C, D and E genes of the *Vibrio fischeri* luminescence operon code for the reductase, transferase, and synthetase enzymes involved in aldehyde biosynthesis. *Photochemistry and photobiology* 49, 681-688; Lee, C. Y., and Meighen, E. A. (1997). Cysteine-286 as the site of acylation of the Lux-specific fatty acyl-CoA reductase. *Biochim Biophys Acta* 1338, 215-222; Wang, X., and Kolattukudy, P. E. (1995). Solubilization and purification of aldehyde-generating fatty acyl-CoA reductase from green alga *Botryococcus braunii*, *FEBS Lett* 370, 15-18): LuxCは、脂肪アシルCoAレダクターゼ、脂肪アシルシンテターゼおよび脂肪アシルチオエステラーゼからなる多酵素複合体 (LuxCDE) の一部であり、生物発光に関与する。LuxCは広く検討された酵素であり、大腸菌においてクローニングされ、発現され、精製されている。この酵素は、C14基質、テトラデカノイルCoA (ミリストイルCoA) に対してアシルCoAレダクターゼ活性を示し、テトラデカノイルCoAは対応するアルデヒド、テトラデカナールに還元される。他の基質は試験していない。LuxCはインビボでマルチサブユニット複合体の一部であるが、この酵素は野生型生物から成功裏に精製されており、大腸菌から発現され、部分精製されている。どちらの場合も、LuxCは他のサブユニットとは独立して活性であった。このことはLuxCを、ピメロイルCoAをピメリン酸セミアルデヒドに変換するための良好な候補物にする。

【0323】

マリノバクテリウム・アクアエオレイ (*Marinobacter aquaeolei*) VT8由来の FAcCoAR (YP_959769.1) (Willis, R. M., Wahlen, B. D., Seefeldt, L. C., and Barney, B. M. (2011). Characterization of a fatty acyl-CoA reductase from *Marinobacter aquaeolei* VT8: a bacterial enzyme catalyzing the reduction of fatty acyl-CoA to fatty alcohol. *Biochemistry* 50, 10550-10558): この脂肪アシルCoAレダクターゼ (FAcCoARと称される) は、 γ プロテオバクテリア、マリノバクテリウム・アクアエオレイVT8において最近発見された。この酵素は、アシルCoA誘導体のアルコールへの還元を触媒する、二官能性アシルCoAレダクターゼの初めての原核生物の例である。重要な点として、これはC12未満の基質で試験された唯一の酵素でありインビトロでオクタノイルCoAに活性を示す (Willis et al., 2011)。この酵素はアシルCoAからアルコールを生成するが、これを含めるための論理的根拠は、オクタノイルCoA (C8) からアラキドノイルCoA (C20) までの広い基質範囲を有する明確な証拠が存在することである。さらに、C末端はAcr1酵素に高い配列相同性を示し、そのためN末端領域はアルコール形成ドメインであり得る。それゆえ、機能性のアルデヒド生成酵素を作製することを目的として、ポリペプチドのN末端領域をコードする遺伝子の部分を除去することの影響を試験することは価値があるであろう。このアプローチに関する潜在的な問題は、酵素が不活性であり得るまたはアルデヒドがトランケートされた酵素複合体から放出されない場合があり得ることである。この酵素はアシルACP誘導体に対する活性に関しては試験しなかった。

【0324】

マリノバクテリウム・アクアエオレイVT8由来のFAR (YP_959486) (Hofvander, P., Doan, T. T. P., and Hamberg, M. (2011). A prokaryotic acyl-CoA reductase performing reduction

of fatty acyl-CoA to fatty alcohol.FEBS Letters 585,3538-3543) :この脂肪アシルCoAレダクターゼ (FARと称される) はもともと脂肪アルデヒドレダクターゼとして同定された (Wahlen,B.D.,Oswald,W.S.,Seefeldt,L.C.,and Barney,B.M. (2009) .Purification ,characterization,and potential bacterial wax production role of an NADPH-dependent fatty aldehyde reductase from *Marinobacter aquaeolei* VT8.Appl Environ Microbiol 75,2758-2764) が、その後アシルCoAレダクターゼ活性を有することが示された (Hofvander,P.,Doan,T.T.P.,and Hamberg,M. (2011) .A prokaryotic acyl-CoA reductase performing reduction of fatty acyl-CoA to fatty alcohol.FEBS Letters 585,3538-3543) 。これは上述した脂肪アシルCoAレダクターゼに非常に類似するが、アシルACP誘導体にも作用することが公知である。C16-CoAから C20-CoAまでで活性を認めたが、より短い基質に関しては試験しなかった。この酵素は513アミノ酸長であり、Acr1と同じアルデヒド生成に関連するC末端ドメインを有する。この酵素もトランケートし得る可能性があり、これは、先に述べたようにN末端領域を切断除去することを意味する。2つの別々の (および競合する) 研究グループがFARとFACoRを検討したので、FARとFACoRが完全に異なる酵素であるかどうかは明らかでない。

【0325】

ボトリオコッカス・ブラウニイ (*Botryococcus braunii*) 由来のアルデヒド生成アシルCoAレダクターゼ (AAB35106) (Wang,X.,and Kolattukudy,P.E. (1995) .Solubilization and purification of aldehyde-generating fatty acyl-CoA reductase from green alga *Botryococcus braunii*.FEBS Lett 370,15-18) :この酵素は、微細藻類、ボトリオコッカス・ブラウニイ由来のアルデヒド生成アシルCoAレダクターゼである。この酵素は野生型生物から精製されており、標識活性化脂肪酸、[1-14C]-パルミトイルCoAを用いて検定した。酵素は対応するアルデヒドを生成することが示され、NADH依存性であった。基質範囲は検討されておらず、これは対処する必要がある。さらに、タンパク質をクローン化し、大腸菌において発現させ、精製する必要がある。受託番号AAB35106は、精製酵素からの部分的な26アミノ酸のN末端配列に言及する。完全なタンパク質配列はUNIPROT、BRENDAまたはNCBIデータベースには寄託されていない。ゲノムの配列決定は進行中である (<http://www.jgi.doe.gov/>) 。N末端配列についてのプライマーを使用して遺伝子を単離する余地はあり得るが、この酵素についての全般的な情報の欠如は、代謝遺伝子操作のためのその利用を複雑にし得る。

【0326】

したがって、ピメロイルCoAのピメリン酸セミアルデヒドへの還元に関して試験すべき適切な候補物である多くのアシルCoAレダクターゼが同定されている。アシネトバクター・カルコアセティカス由来の酵素、Acr1は、短鎖の奇数のCの基質に対する活性に関しては情報がないが、同定された酵素のうちで最もよく特性づけられているので、最良の候補物であると考えられる。初期試験が陰性であった場合も、この酵素はまだピメロイルCoA還元を得る指向性進化のための良好な標的であろう。

【0327】

S.エロンガタス由来のAARおよびそのオルソログならびにLuxCも有望な候補物である。これらの酵素は比較的長鎖の脂肪アシルCoA基質に作用するが、短鎖基質に関しては試験されていない。やはり、初期試験が陰性である場合は、指向性進化が所望の基質選択性を得るための有望な経路を提供し得る。

【0328】

M.アクアエオレイVT8由来の2つの酵素も有望であり得るが、アルデヒドの酸化を防ぐために多少のタンパク質遺伝子操作を必要とする可能性がある。これらの酵素は、同定されたすべての脂肪アシルCoAレダクターゼの中で最短鎖の脂肪アシルCoAに作用することが公知であるので、適切な候補物である。B.ブラウニイ由来の酵素をコードする遺伝子はまだ同定されていない。これがこの酵素を取り上げるうえで最も難しい点であるが、他の選択肢が成功しない場合は検討し得る。類似の酵素も高等植物 (例えばエンドウ (*Pisum sativum*)) において公知であり、試験するためのさらなる選択肢を提供するが、やはりまだ

十分に特性づけられていない。

【0329】

したがって、上記の6つの酵素は、細胞画分中で組換えまたは天然のいずれかで調製され、(部分的または完全に)精製されて、インビトロで検定されたという文献報告があることから、これらを選択した。それらのヌクレオチド配列および一次アミノ酸配列は、ボトリオコッカス・ブラウニイ由来の酵素を除き、主要なタンパク質データベースBRENDAおよびUNIPROTに寄託されている。試験からの結果は、査読のある専門誌に公表されている。試験した基質はオクタノイルCoA (C8) からアラキドノイルCoA (C20) までにわたり、シネココッカス・エロンガタス由来のAARの場合はアシルACPも基質として含んだ。対応するアルデヒドが生成物として形成される。しかし、これまで、いずれの酵素もピメロイルCoAまたはいかなる他の奇数のCの基質に関しても試験されておらず、おそらくそれは、これらの基質の代謝が常に偶数のCの基質と同じパターンに従うと考えられており、現在まで、これらの基質に対して試験するに足る根拠が存在しなかったためである。それゆえ、これらの酵素がピメロイルCoAの還元を触媒する可能性は高い。ピメロイルCoAが基質ではない場合も、これらの酵素は指向性進化または標的タンパク質遺伝子操作のための良好な出発点を提供するであろう。

【0330】

ピメロイルCoAのピメリン酸セミアルデヒドへの変換のための長鎖脂肪アシルCoAレダクターゼの中の他の候補物は、以下の生物からのレダクターゼを含むが、それらに限定されるわけではない:エンドウ (*Vioque et al.*,1997.Resolution and purification of an aldehyde-generating and an alcohol-generating fatty acyl-CoA reductase from Pea leaves (*Pisum sativum* L.) ,Archives of Biochemistry and Biophysics,340 (1) ,64-72);ピブリオ・フィシェリ (*Vibrio fischeri*) (P12748) (Boylan et al.,1985.Functional identification of the fatty acid reductase components encoded in the luminescence operon of *Vibrio fischeri*,Journal of Bacteriology,163 (3) ,1186-1190);ブラシカ・オレラセア (*Brassica oleracea*) およびセイヨウナタネ (*B.napus*) (Q39342) (Kolattukudy,1971.Enzymatic synthesis of fatty alcohols in *Brassica oleracea*.Archives of Biochemistry and Biophysics,142 (2) ,701-709);クロストリジウム・ブチリカム (*Clostridium butyricum*) (Day et al.,1978.Partial purification and properties of acyl-CoA reductase from *Clostridium butyricum*,Archives of Biochemistry and Biophysics,190 (1) ,322-331);マガモ (Ishige,T.;Tani,A.;Takabe,K.;Kawasaki,K.;Sakai,Y.;Kato,N.Wax Ester Production from n-Alkanes by *Acinetobacter* sp.Strain M-1 :Ultrastructure of Cellular Inclusions and Role of Acyl Coenzyme A Reductase .Appl Environ Microbiol 2002,68,1192-1195);シロイヌナズナ (Doan,T.T.P.;Carlsson,A.S.;Hamberg,M.;Bulow,L.;Stymne,S.;Olsson,P.Functional expression of five *Arabidopsis* fatty acyl-CoA reductase genes in *Escherichia coli*.Journal of plant physiology 2009,166,787-796;Hooks,M.A.;Kellas,F.;Graham,I.A.Long-chain acyl-CoA oxidases of *Arabidopsis*.Plant J.1999,20,1-13);ヒトR.P.;Wang,Y.;Mohsen,A.-W.;He,M.;Vockley,J.;Kim,J.-J.P.Structural basis for substrate fatty acyl chain specificity: crystal structure of human very-long-chain acyl-CoA)。

【0331】

上記のEC 1.2.1.50におけるこれらのアルデヒド形成性デヒドロゲナーゼから、フォトバクテリウム・ホスホレウム (*Photobacterium phosphoreum*) 由来のNADPH特異的アシル-CoAレダクターゼであるLuxCを、ピメロイル-CoAからのピメリン酸セミアルデヒドの形成を実証するための一例として選択した。他の興味深いデヒドロゲナーゼは、EC 1.2.1.76 およびEC 1.2.1.10.に認められ、例えば、クロストリジウム・クルイベリDSM555は、ピメロイル (pimloyl) -CoAをピメリン酸セミアルデヒドに変換させるために用いる、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ (SucD、EC 1.2.1.76、アクセッション番号AAA92347.1)、ならびに他の2つのアルデヒドデヒドロゲナーゼ (アクセッション番号E DK34221.1) およびアセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ (EC 1.2.1.10、アクセッション番号

号EDK33116.1)を有する。EC 1.2.1.10におけるさらなる酵素である、PduB、プロピオンバクテリウム・フロイデンライシイ亜種シャー머니イ (*Propionibacterium freudenreichii* subssp. *Shermanii*) (アクセッション番号D7GD28) 由来のCoA依存性プロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼを選択した。

【0332】

これらの5つの選択した酵素を、標準的な手法を用いて、pET151/Topoベクター中にクローニングして、大腸菌BL21 (DE3) またはRosetta2 (DE3) で発現させた。活性は、基質としてのアセチル-CoA、ならびにヘキサノイル-CoAを用いたNADHまたはNADPHの消失について反応物を340nmでモニターすることによって確認した。クロストリジウム・クルイベリ由来のSucD酵素は不溶性画分から得られ、可溶性画分では活性を検出することができなかったため、クロストリジウム・クルイベリの破壊細胞懸濁液を以後の生物変換アッセイに用いた。

10

【0333】

ピメロイル-CoAに対する酵素の活性を、大腸菌で産生された精製 (Histrapカラム) 酵素を用いてアッセイするための生物変換を、好氣的条件下で行った。DTT (5mM)、MgSO₄ (5mM)、NADH (1.2mM)、アジポイル-CoAまたはピメロイル-coA (1mM) を含むtris緩衝液 (50mM、pH7.5) で構成される250uLの総反応容積を、96ウェルプレート中に調製した。反応は、大腸菌において調製されたタンパク質の10~15uLの可溶性画分を添加することによって開始した。各反応は3回ずつ行なった。「対照緩衝液」は、酵素調製物をTris (50mM、pH7.5) に置き換えることによって調製した。この対照は3回繰り返して調製した。「対照酵素」は、各酵素調製物についてヘキサノイル-CoAを水で置き換えた上で、上記の混合物を用いて調製した。この対照は2回繰り返して行なった。

20

【0334】

混合物 (「アッセイ」、「対照緩衝液」、「対照酵素」) はすべて平行して調製し、200rpmの振盪下で37℃または32℃で一晩インキュベートした96ウェルプレート中でインキュベートし、その後に遠心沈降させた。上清を、LC/MSによる分析のために適切なLC/MS 96ウェルプレートに添加した。

【0335】

クロストリジウム・クルイベリの酵素画分を用いて、ピメロイル-CoAのピメリン酸セミアルデヒド (semialdehyde) への還元についてアッセイするための生物変換は、以下の通りに行なった。

30

【0336】

クロストリジウム・クルイベリの培養および酵素画分の調製

C.クルイベリの2つの菌株 (DSM555およびDSM563) を、以下のものを含む改変DSM-52培地40mL中にて、エタノール (20mL/L培養物) およびスクシネート (5g/L) を加えたフラスコ内にて増殖させた: K₂HPO₄ (0.31g/L)、KH₂PO₄ (0.23g/L)、NH₄Cl (0.25g/L)、MgSO₄·7H₂O (0.20g/L)、微量元素溶液SL-10 (1mL) (10mL HCl (25%、pH7.7M) /L 溶液; 1.5g/L FeCl₂·4H₂O; 70mg/L ZnCl₂; 100mg/L MnCl₂·4H₂O; 6mg/L H₃BO₃; 190mg/L CoCl₂·6H₂O; 2mg/L CuCl₂·2H₂O; 24mg/L NiCl₂·6H₂O; 36mg/L Na₂MoO₄·2H₂O)、亜セレン酸塩-タンゲステン酸塩溶液 (1mL) (0.5g/L NaOH、3mg/L Na₂SeO₃·5H₂O; 4mg/L Na₂WO₄·2H₂O)、酵母エキス (1g/L)、レザズリン90.5g/L)、NaHCO₃ (2.5g/L)、ビタミン7種の溶液 (1mL) (100mg/LのビタミンB12; 80mg/Lのp-アミノ安息香酸 (aminobenzoic acid); 20mg/LのD(+)-ビオチン; 200mg/Lのニコチン酸; 100mg/Lのパントテン酸カルシウム; 300mg/Lの塩酸ピリドキシン; 200mg/Lのチアミン-HCl·xH₂O)、システイン-HCl·xH₂O (0.25g/L)、Na₂Sx9H₂O (0.25g/L)。培地は厳密に嫌氣的に調製した。

40

【0337】

30℃での4~5日間の増殖後に、培養物を採取して、ペレットを秤量した。ペレットは、N₂ガスを1時間通気させたY-per (登録商標) 酵母抽出試薬を用いて溶解させた。手順はすべて、嫌気性キャビネット内で行った。C.クルイベリ培養物から得られた可溶性画分を例

50

示用の反応に用いた。

【0338】

C. クルイベリ菌株由来の酵素画分を用いた生物変換反応は、嫌気性キャビネット内で以下の通りに行った：反応は、Tris緩衝液（50mM、pH7.5）、DTT（5mM）、MgSO₄（5～10mM）、NADH（1mM）、NADPH（1mM）、アジボイル補酵素Aまたはピメロイル補酵素A（0.5～1mM）を含む200μLの総容積中で行った。反応は15μLの酵素調製物（可溶性または不溶性画分）を添加することによって開始した。これらの反応を3回繰り返して行った。「対照緩衝液」は、酵素調製物をTris（50mM、pH7.5）によって置き換えることによって調製した。この対照は3回繰り返して調製した。混合物（「アッセイ」、「対照緩衝液」）はすべて平行して調製し、200rpmの振盪下で30℃（またはP. ホスホレウムの場合は22℃）で一晩インキュベートして、その後に遠心沈降させた。LC/MSによる分析のために、上清を適切なLC/MS 96ウェルプレートに添加した。

10

【0339】

アジピン酸-(C6-)およびピメリン酸-(C7-)セミ-アルデヒドの検出は、1290 Infinity LCと連結した6538 Accurate-mass Q-TOFをHTC/HTSオートサンプラー（Agilent）とともに用いて行った。Synergi-2.5u FusionRPカラム（Phenomenex, Ref: 00B-4423-B0）を分析のために用いた。C6-およびC7-セミ-アルデヒドの標準品を、0.1%（v/v）のギ酸を加えた超純水、および5%（v/v）の超純水を加えたアセトニトリルをランニングバッファーとして用いる陰性モードで検出した。セミ-アルデヒド標準品を検出するために用いた方法を、反応物を分析するために用いた。

20

【0340】

大腸菌で発現されて、好氣的条件下でアッセイした可溶性画分中で得られた酵素のうち、すべての酵素が、分光光度的な判定で、アセチル-CoAおよびヘキサノイル-CoAに対して検出可能な活性を示した。しかし、LC-MSによる判定でピメロイル-CoAからピメリン酸セミアルデヒドを生成させたのは、可溶性画分中で得られたのは酵素のごくわずかな割合であったという事実にもかかわらず、プロピオニバクテリウム・フロイデンライシイ亜種シヤーマニイ（アクセッション番号D7GD28）由来のCoA依存性プロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼのみであった。C. クルイベリ由来の酵素は酸素感受性であることが知られているため、C. クルイベリ由来の3つの酵素によって観察された活性の欠如はアッセイ条件に起因する可能性がある。このため、スクシネートを誘導物質として培地中に用いて嫌気性条件下で生成され、ネイティブ性菌株において嫌気性条件でアッセイされたC. クルイベリ細胞画分を、SucD（EC 1.2.1.76）の活性の決定に用いた。C. クルイベリの両方の菌株（DSM555およびDSM563）の酵素画分を用いて、LC-MSによる分析で、ピメロイル-CoAから検出可能な量のピメリン酸セミアルデヒドが生成された。

30

【0341】

3.1.4 カルボン酸レダクターゼ（EC 1.2.99.-）によるピメリン酸のピメリン酸セミアルデヒドへの変換

3.1.4.1 カルボン酸レダクターゼ標的の選択、クローニングおよび発現

ピメリン酸のピメリン酸セミアルデヒドへの還元のための酵素標的をカルボン酸レダクターゼファミリー（EC 1.2.99.-、例えばEC 1.2.99.6）から選択した。特に、ノカルジア属のカルボン酸レダクターゼは、芳香族基質に対して大きな基質特異性を示す単量体酵素であり、大腸菌において成功裏にクローン化され、発現された（*Nocardia* sp. Carboxylic acid reductase: Cloning, expression, and characterization of a new aldehyde oxidoreductase family: He et al. Appl. Environ. Microbiol. 2004, 70, 1874-1881）。この酵素は、それゆえ、ピメリン酸のピメリン酸セミアルデヒドへの変換を観測する初期スクリーニングのための良好な候補物であった。

40

【0342】

ノカルジア属種のカルボン酸レダクターゼ（CAR）遺伝子（GeneBank AY495697）を、大腸菌BL 21において、ノカルジアホスホパンテテイントランスフェラーゼ（PPTase）とともに発現させて、細胞溶解、および不溶性画分を除去するための遠心分離後に、無細胞抽

50

出物として用いた (Venkitasubramanian, P.; Daniels, L.; Rosazza, J. P. N. Reduction of carboxylic acids by Nocardia aldehyde oxidoreductase requires a phosphopantetheinylated enzyme. J Biol Chem 2007, 282, 478-485を参照)。

【0343】

続いて、標準的な条件 (1mM IPTG、誘導前および誘導後温度37℃) を用いて発現試験を開始し、以前に報告されたプロトコルに従ってIPTG誘導下で大腸菌において発現させ、活性アッセイのために十分なタンパク質が生産されるようにスケールアップを行った。

【0344】

3.1.4.3 活性アッセイ

活性アッセイは、陽性対照としての安息香酸ナトリウム、およびピメリン酸ナトリウムに対するCAR活性の検出に基づいた。アッセイの条件は、Applied and Environmental Microbiology 2004, 70, p1874-1881から採用した。

【0345】

各アッセイ物は、最終濃度にして50mMの基質 (100 μl)、100mM塩化マグネシウム (100 μl)、1つの原液から一緒に添加した50mM tris-塩酸、1mMエチレンジアミン四酢酸、1mMジチオトレイトール (200 μl)、10mMアデノシン三-リン酸 (100 μl)、1.5mMニコチンアミド-ジヌクレオチドリリン酸水和物 (還元型) (100 μl)、および、無細胞抽出物として投入して最終濃度4.3g/L全細胞当量とした生物触媒で構成された。反応は、2mLキュベット内でpH 7.5にて、周囲温度 (ほぼ20℃) で実施した。各アッセイ物に対して、まず塩化マグネシウム (100 μl)、50mM tris-塩酸、1mMエチレンジアミン四酢酸、1mMジチオトレイトール (200 μl)、10mMアデノシン三-リン酸 (100 μl) および1.5mMニコチンアミド-ジヌクレオチドリリン酸水和物 (還元型) (100 μl) を投入し、吸光度測定値を時間ゼロ (0s) から2分 (120s) まで30秒 (30s) 間隔で記録した。続いて生物触媒を投入して、吸光度を時間ゼロ (0s) から2分 (120s) まで30秒 (30s) 間隔で記録した。最後に基質を投入して、吸光度を時間ゼロ (0s) から3分 (180s) まで30秒 (30s) 間隔で記録した。

以下のアッセイを行った： 実験ID	基質	生物触媒	注記
KG1112-021-20-CAR-1SB	安息香酸ナトリウム	rCAR	陽性対照
KG1112-021-20-CAR-2PA	ピメリン酸	rCAR	
KG1112-021-20-CAR-3AA	アジピン酸	rCAR	
KG1112-021-20-W-1SB	安息香酸ナトリウム	水	水を用いた陰性対照
KG1112-021-37-BL21-1SB	安息香酸ナトリウム	BL21	空ベクターを有する 宿主細胞を用いた 陰性対照
KG1112-021-37-BL21-2PA	ピメリン酸	BL21	空ベクターを有する 宿主細胞を用いた 陰性対照
KG1112-021-37-BL21-3AA	アジピン酸	BL21	空ベクターを有する 宿主細胞を用いた 陰性対照

【0346】

カルボン酸レダクターゼアッセイの結果

上記のアッセイ物のそれぞれに関してNADPH消費を経時的に測定した分光光度アッセイの結果を、図13に提示している。NADPH消費のバックグラウンド速度 (基質、および空ベクターを保有する生物触媒を用いた陰性対照実験、表2) に関して補正すると、アジピン

酸およびピメリン酸の両方が、モデル基質である安息香酸塩よりも高率で還元型であることが明らかである。したがって、カルボン酸レダクターゼ酵素がNADPHを消費し、かつ安息香酸ナトリウム、アジピン酸およびピメリン酸に対する活性を有することが守備良く実証された。

【0347】

(表2)

	NADPH消費 (未補正)	NADPH消費 (バックグラウンド に関して補正)
安息香酸ナトリウム	-0.00172	-0.00091
アジピン酸	-0.00125	-0.00180
ピメリン酸	-0.00096	-0.00103

10

【0348】

このように、ノカルジア由来のCARは、ピメリン酸のピメリン酸セミアルデヒドへの還元を、安息香酸に対する活性の100%を上回って触媒した。EC 1.2.99.6からの、ピメリン酸の還元に適した他の酵素には、例えば、ストレプトミセス・グリセウス (*Streptomyces griseus*) のものが含まれる (Suzuki et al., 2007. GriC and GriD constitute a carbonylic acid reductase involved in grixazone biosynthesis in *Streptomyces griseus*. J Antibiot (Tokyo). Jun;60(6):380-7)。加えて、スフィンゴモナス種およびカプリアビダス種における非アシル化アルデヒドデヒドロゲナーゼであるThnGも、テトラリン分解時にピメリン酸セミアルデヒドをピメリン酸に変換し (図8参照)、これは可逆性でありうる。

20

【0349】

3.1.5 チオエステルヒドロラーゼ (EC 3.1.2.-)、ピメロイル-CoAリガーゼ (EC 6.2.1.-) またはCoAトランスフェラーゼ (EC 2.8.3.-) による、ピメロイル-CoAおよび/またはピメロイル-[acp]のピメリン酸への変換

CoASHまたはアシル-[アシル-キャリアータンパク質]チオエステルの加水分解または転移を触媒することができる酵素は、EC 3.2.1.-、例えばEC 3.1.2.2、EC 3.1.2.14EC 3.1.2.18; 3.1.2.19、3.1.2.20 EC 3.1.2.21などからのチオエステルヒドロラーゼ、EC 6.2.1.-、例えばEC 6.2.1.3、EC 6.2.1.5; EC 6.2.1.14、EC 6.2.1.20; EC 6.2.1.23などからの酸-チオールリガーゼ、ならびにEC 2.8.3.-、例えばEC 2.8.3.12およびEC 2.8.3.13などからのCoAトランスフェラーゼ、または (or or) CoAのピメリン酸への可逆的転移を触媒するThnHの遺伝子産物を含む (Aroa Lopez-Sanchez, Belen Floriano, Eloisa Andujar, Maria Jose Hernaez, and Eduardo Santero, 2010. Tetralin-Induced and ThnR-Regulated Aldehyde Dehydrogenase and β -Oxidation Genes in *Sphingomonas macroglutabida* Strain TFA. Appl. Environ Microbiol. 76: 110-118)。それらの3つのファミリーのうち、チオエステラーゼは、多数の特性づけられた酵素、ならびに鎖の長さ (C-3~C-26) の点および官能基 (ジカルボキシリル-CoA基質) の点から見たそれらの幅広い基質特異性のために、ピメロイル-CoAの加水分解のための最良の候補となる。

30

【0350】

3.1.5.1 酸-チオールリガーゼ (EC 6.2.1.-) およびCoAトランスフェラーゼ (EC 2.8.3.-)

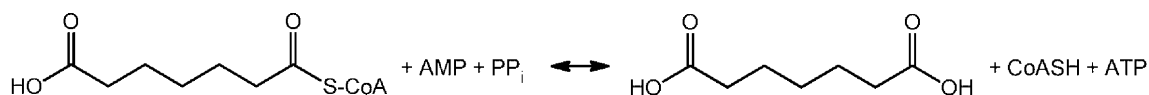
40

酸-チオールリガーゼは、付随するアデノシン三リン酸 (ATP) の加水分解を伴って炭素-硫黄結合の形成を触媒する。CoAリガーゼは、可逆性に関して厳密にまたは体系的に試験されていない。結晶構造が得られておらず、そのため活性部位の構造は不明である。それゆえ、AMP、ピロリン酸またはマグネシウムイオンが可逆的反応のために必要であるかどうかは明らかでなく、これらの補因子の組合せの存在下および不在下でインビトロアッセイを実施すべきである。言うまでもなく、最終的な目標は全細胞において可逆的反応を得ることであり、これはより困難であり得る。経路における後の反応は、当然ながら、平衡をチオ開裂の方向に引き寄せる。それにもかかわらず、ATPの加水分解およびその後のピ

50

ロリン酸の加水分解は正反応をエネルギー発生性にするので、これは逆転させるのが難しい反応であり得る。それゆえ、細胞を遺伝子操作することを試みる前に、インビトロで反応の可逆性に対する種々のATP:AMP比の影響を測定することが重要である。ATP:AMP比が決定的に重要である場合は、可逆的反応を進行させるのに十分なだけ細胞内ATP濃度を低下させるように細胞エネルギー充足率を操作することが必要であり得る。これは、次に、十分に低いATP濃度を達成するためにATPシンターゼ阻害剤または脱共役剤を使用する必要がある得るので、良好な生産性を得ることに關してさらなる困難を引き起こし得る。原則として、これらの問題はいずれも克服できないわけではないが、遺伝子操作された生物触媒の開発は複雑になり得る。アシルCoAの加水分解は、それゆえ、逆反応と比較して熱力学的に不利である酸-チオールリガーゼ触媒反応の間、ATPの生成を必要とする。

10



【0351】

しかし、これらの酵素は、可逆的であることが見出されれば、なおも有用であり、いくつかのCoAリガーゼはピメロイルCoAに作用することが公知である。

酵素	EC	供給源	反応	遺伝子	サイズ	過剰発現	精製
bioW (P22822)	6.2.1.14 6-カルボキシ ヘキサノ酸CoA リガーゼ、 AMP形成 (ピメロイル CoAシンターゼ)	リシニバチルス (バチルス・ スファエリカス)	ピメリン酸→ ピメロイルCoA	あり	28 kDa	あり、 大腸菌	あり、 均一
pauA (AJ012480)	6.2.1.14 異化 ピメロイル CoAシンターゼ	シュードモナス ・メンドシナ35	ピメリン酸→ ピメロイルCoA アジピン酸→ アジポイルCoA アゼライン酸→ アゼラオイルCoA	あり	74 kDa	あり、 大腸菌	あり、 均一
SCS _{tk}	6.2.1.5 スクシニルCoA シンテターゼ	サーモコッカス・ コダカラエンシス	スクシニルCoA→ スクシネート	あり			
??	6.2.1.n ピメロイルCoA シンテターゼ	巨大菌	ピメリン酸→ ピメロイルCoA	なし	?	なし	あり、 34倍
??	ピメロイルCoA シンターゼ	ラベンダー L.	ピメリン酸→ ピメロイルCoA	なし	?	なし	なし
??	植物可溶性 アシルCoA シンテターゼ	エンドウ L.	ピメリン酸→ ピメロイルCoA アゼライン酸→ アゼラオイルCoA	なし	53 kDa	なし	なし
??	植物 ペルオキシソーム アシルCoA シンテターゼ	エンドウ L.	ピメリン酸→ ピメロイルCoA	なし	?	なし	なし
??	6.2.1.23 ミクロソーム ジカルボン酸 CoAリガーゼ	ラット	C5-C16 ジカルボキシレート →CoAエステル	なし	?	なし	なし
??	6.2.1.23 ピメロイルCoA シンテターゼ	LP-1 株	ピメリン酸→ ピメロイルCoA	なし	?	なし	なし

20

30

40

【0352】

リシニバチルス・スファエリカス (*Lysinibacillus sphaericus*) (バチルス・スファエリカス) (*Bacillus sphaericus*) 由来のBioW (Uniprot:P22822)

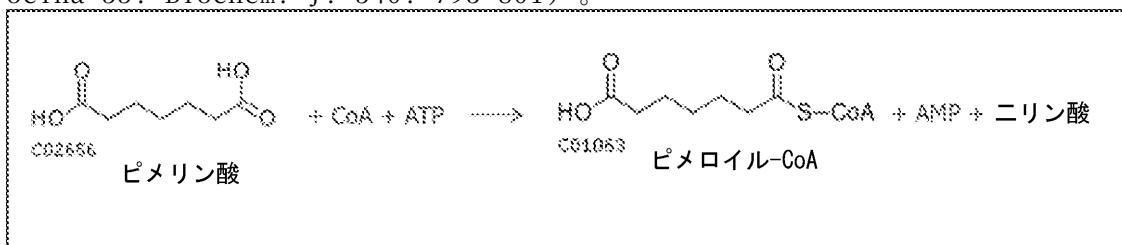
50

ピメリン酸CoAシンターゼ（6-カルボキシヘキサノ酸CoAリガーゼ）は、無細胞抽出物を用いてバチルス・スファエリカスにおいて発見された。これはビオチン生合成経路に関与する。酵素活性は、7-ケト-8-アミノペラルゴン酸シンターゼと合わせた反応およびサッカロミセス・セレピシエを使用した微生物学的アッセイによって間接的に決定された [1]。ピメリン酸CoAシンターゼ (bioW) をコードする遺伝子は、*B. スファエリカス* ゲノムからのライブラリ担持配列を有する大腸菌突然変異体の相補性試験によって7-ケト-8-アミノペラルゴン酸シンターゼ (bioF) と共に同定された [Gloeckler R, Ohsawa I, Speck D, Ledoux C, Bernard S, Zinsius M, Villeval D, Kisou T, Kamogawa K, Lemoine Y. (1990) Cloning and characterization of the *Bacillus sphaericus* genes controlling the bioconversion of pimelate into dethiobiotin. *Gene*. 87:63-70]。BioWは大腸菌において過剰発現され、均一に精製された [Ploux O, Soularue P, Marquet A, Gloeckler R, Lemoine Y. (1992) Investigation of the first step of biotin biosynthesis in *Bacillus sphaericus*. Purification and characterization of the pimeloyl-CoA synthase, and uptake of pimelate. *Biochem J*. 287:685-690]。この酵素は、ピメリン酸二ナトリウム、ATP、CoA SHおよびMgCl₂の存在下で活性であった。反応の生成物はピメロイルCoAおよびAMPであり、ADPは検出されなかった。この酵素はATP およびピメリン酸に対してのみ特異的であった。他のヌクレオチド（例えばGTP、AMP）および代替的な基質（コハク酸、グルタル酸、アジピン酸、スベリン酸）は受け入れられなかった。

【0353】

シュードモナス・メンドシナ35 (*Pseudomonas mendocina* 35) 由来のPauA (GenBank:AJ012480.1) (EC 6.2.1.14)

異化ピメロイルCoAリガーゼ、pauAは、シュードモナス・メンドシナ35におけるジカルボン酸 (C6~C10) の分解に関与する [Binieda A, Fuhrmann M, Lehner B, Rey-Berthod C, Frutiger-Hughes S, Hughes G, Shaw NM. (1999) Purification, characterization, DNA sequence and cloning of a pimeloyl-CoA synthetase from *Pseudomonas mendocina* 35. *Biochem J*. 340:793-801]。この酵素はジカルボン酸を活性化し、ジカルボン酸はその後β酸化経路によって代謝される。酵素は均一に精製され、部分的アミノ酸配列が決定された。pauAはbioWより広い基質範囲を示し、ピメリン酸 (100%相対活性)、アジピン酸 (72%) およびアゼライン酸 (18%) を受け入れた。この酵素は、ビオチン生合成経路に関与するbioWよりも1桁から2桁分活性であった。遺伝子pauAが同定され、リガーゼは大腸菌において成功裏に過剰発現された。シュードモナス・メンドシナ由来のリガーゼpauAをこのクラスからの一例として選択したが、それはその基質範囲および特異的活性が理由である（好ましい基質はピメリン酸である、Binieda et al., 1999. Purification, characterization, DNA sequence and cloning of a pimeloyl-CoA synthetase from *Pseudomonas mendocina* 35. *Biochem. J.* 340: 793-801)。



【0354】

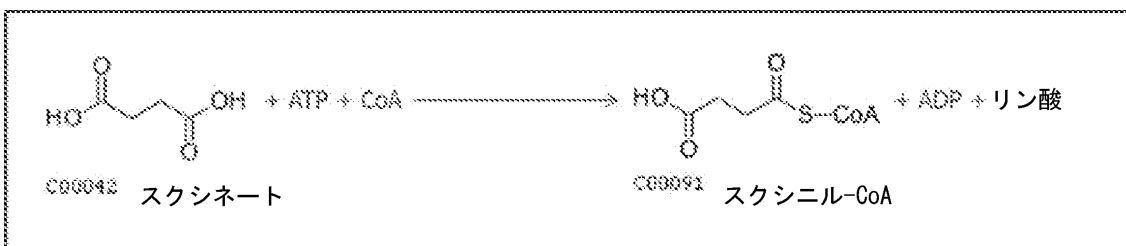
それに代わるものの1つは、同様に大腸菌で発現され、広範囲にわたる基質 (C₇~C₁₄ジカルボン酸) でのリガーゼ活性を有することが示されているロドシュードモナス・パルストリスpimAであるが、ピメリン酸は好ましい基質ではない (Harrison and Harwoo, 2005. The pimFABCDE operon from *Rhodopseudomonas palustris* mediates dicarboxylic acid degradation and participates in anaerobic benzoate degradation. *Microbiol.* 151: 727-736)。この理由から、シュードモナス・メンドシナ由来のpauA遺伝子の方がより優れた選択肢であるように思われ、例示のために選択した。

【0355】

サーモコッカス・コダカラエンシス (EC 6.2.1.5) 由来のSCS (Uniprot Q5JEN7)

高度好熱性古細菌サーモコッカス・コダカラエンシス (SCS_{TK}) 由来のスクシニル-CoA シンテターゼは、TK1880 (α-サブユニット) およびTK0943 (β-サブユニット) によってコードされるヘテロマー酵素 (α₂β₂) である。SCSは、スクシニル-CoAのスクシネートへの可逆的変換を触媒し、CoAはADP/GDPの基質レベルでのリン酸化を伴う。SCS_{TK}は比較的特異的であり、少数の酸のみに対して意味のあるレベルの活性を示す。スクシネート、イソバレレートおよび3-メチルチオプロピオネートに対するSCS_{TK}の活性レベルおよび速度論的パラメーターからは、Glu、LeuおよびMetの異化作用におけるこの酵素の関与が示唆される。しかし、ACSII_{TK}が後者2つの基質に対しても高レベルの活性を示すことを考慮すれば、SCS_{TK}の主要な生理的役割はスクシニル-CoAからのATPの生成にある可能性が最も高い。SCS_{TK}は可逆的酵素であり、それはアジペートでネイティブ性基質の活性の59%を示しており (Shikata et al., 2007. J Biol Chem, 282:26963-26970)、それ故に適した候補であるように思われる。

10



20

【0356】

巨大菌 (Bacillus megaterium) 由来のピメロイルCoAシンテターゼ

酵素を79%の回収率で約34倍に精製した [Izumi Y, Morita H, Tani Y, Ogata K. (1974) The pimeloyl-CoA synthetase responsible for the first step in biotin biosynthesis by microorganisms. Agr. Biol. Chem. 38, 2257-2262]。反応は、ピメリン酸、ATP、CoASHおよびMgCl₂を必要とした。この酵素はピメリン酸に対してのみ特異的であり、他のジカルボン酸は受け入れられなかった。興味深いことに、ATPをADPで置き換えることができ、ピロリン酸開裂が必須ではないことを示唆した。アミノ酸配列およびヌクレオチド配列は不明である。しかし、巨大菌の3つの完全なゲノムが1974年から公表されている。それゆえ、bioWホモログに関するBLAST検索を実施した。残念ながら、これはいかなる適合も示さなかった。

30

【0357】

ラベンダー (Lavandula vera L.) 由来の植物ピメロイルCoAシンターゼ

ラベンダー細胞培養物におけるピメロイルCoAシンターゼ活性が記述されている [6]。[³H]-ピメリン酸はビオチン生合成における前駆体であることが認められたが、この酵素または遺伝子について入手可能なデータはない。

【0358】

エンドウ由来の植物可溶性アシルCoAシンテターゼ

エンドウタンパク質抽出物の可溶性画分において活性が認められた [7]。酵素はATP/Mg²⁺およびCoASHを必要とした。リガーゼの分子量を、リシニパチルス・スファエリカス由来のリガーゼに対するポリクローナル抗体を使用してウェスタンブロット法によって決定した。酵素は、ピメリン酸ならびにアゼライン酸を受け入れたが、ノナン酸は受け入れなかった。GTPをATPの代わりに使用することができたが、ADPについては反応を認めなかった。可溶性ピメロイルCoAシンテターゼをコードする遺伝子は同定されなかった。

40

【0359】

エンドウ由来の植物ペルオキシソームアシルCoAシンテターゼ

この酵素はペルオキシソームタンパク質画分に位置した [Gerbling H, Axiotis S, Douce R. (1994) A new acyl-CoA synthetase, located in higher plant cytosol. J Plant Physiol. 143:561-564.]。ピメリン酸はピメロイルCoAへと活性化され、その後β酸化経路によ

50

ってアセチルCoAおよびマロニルCoAに分解された。この酵素の基質範囲は試験しなかった。この酵素は、同じ生物由来の可溶性アシルCoAシンテターゼよりも高いpH最適値を示した。

【0360】

ラット (*Rattus norvegicus*) 由来のジカルボン酸CoAリガーゼ

ジカルボン酸 (C5~C16) は、ラット肝臓からのミクロソームタンパク質画分由来のジカルボキシリルCoAシンテターゼによってそれらのCoAエステルに変換された[Vamecq J, de Hoffmann E, Van Hoof F. (1985) The microsomal dicarboxyl-CoA synthetase. *Biochem J*. 230:683-693.]. この酵素はATPを利用するが、GTPは利用しない。反応はその生成物によって阻害され、AMPはピロリン酸よりも阻害性である。酵素はC12基質に対して最も高い活性を示した。ジカルボキシリルCoAシンテターゼの一部のアッセイでは、CoA消費のプラトーの後にCoAが放出された。これは、反応が可逆的であり得ることを示唆するので、重要な所見である。しかし、タンパク質試料がCoAチオエステラーゼで汚染されていた可能性があるため、この示唆はいくぶん慎重に取り扱うべきである。この酵素は有望であり得るが、ラットゲノム配列のBLAST検索はいかなるbioWまたはpauAホモログも明らかにしなかった。遺伝子を同定するには代替的なアプローチ、例えば酵素の精製、N末端配列決定、プライマー設計およびPCR増幅が必要であろう。

10

【0361】

未同定細菌、LP-1株由来のピメロイルCoAシンテターゼ

硝酸ナトリウムおよびピメリン酸ナトリウムで増殖するように濃縮した活性汚泥由来の脱窒素菌の環境培養物において活性が認められた[Gallus C, Schinlc B. (1994) Anaerobic degradation of pimelate by newly isolated denitrifying bacteria. *Microbiology*. 140:409-416.]. この酵素はATPおよび Mg^{2+} の存在下で活性であった。反応の生成物はADPではなくAMPであった。この酵素は安息香酸を受け入れなかった。

20

【0362】

CoAトランスフェラーゼは、狭い基質特異性または、例えばコハク酸-ヒドロキシメチルグルタル酸CoAトランスフェラーゼ (EC 2.8.3.13、ピメロイルCoA、アジピルCoA (Substrate specificity of a dicarboxyl-CoA:dicarboxylic acid coenzyme A transferase from rat liver mitochondria: Deana et al. *Biochem Int*. 1992, 26, 767-773) のC-6誘導体に対して活性を示すにもかかわらず) の場合のような遺伝子/タンパク質特性づけの欠如のために、チオエステラーゼほど魅力的ではない候補物である。スクシニル-CoA:ピメロイル-CoAトランスフェラーゼは1つのみ報告されているが、その活性の原因となる遺伝子は入手されておらず、報告された生物は同定されていない (Gallus and Schink (1994) *Microbiol.* 10: 409-416 Anaerobic degradation of pimelate by newly isolated denitrifying bacteria)。このファミリーからのいくつかの酵素は依然として有用であり、以下の酵素 (enzymes) が有望な候補として同定されている。

30

【0363】

アシダミノコッカス・フェルメンタンス由来のグルタコン酸補酵素A-トランスフェラーゼ (Gct) (UniProt Q59111)

アシダミノコッカス・フェルメンタンス由来のグルタコン酸補酵素A-トランスフェラーゼ (Gct) は、アセチル-CoAおよび遊離酸からの(R)-2-ヒドロキシグルタリル-CoAの形成を触媒する酵素である。Gctは、2種類のサブユニット (GctA、35725DaおよびGctB、29168Da) で構成されるヘテロ八量体 ($\alpha_4\beta_4$) として特性づけられている。両方のサブユニット: GctAおよびGctBが大腸菌で共発現され、グルタコン酸CoA-トランスフェラーゼ (EC 2.8.3.12) として機能的であることが示されている。Gctはまた、不飽和型および飽和型の基質ならびにヒドロキシ化基質 (2-ヒドロキシグルタレート) に対しても活性があるが、C7補酵素誘導体に対しては検討されていない (Mack et al., 1994. Location of the two genes encoding glutaconate coenzyme A-transferase at the beginning of the hydroxyglutarate operon in *Acidaminococcus fermentans*). *Eur. J. Biochem*, 226:41-51)。これは、アシダミノコッカス・フェルメンタンス (*Acidaminococcus fermentans*) (

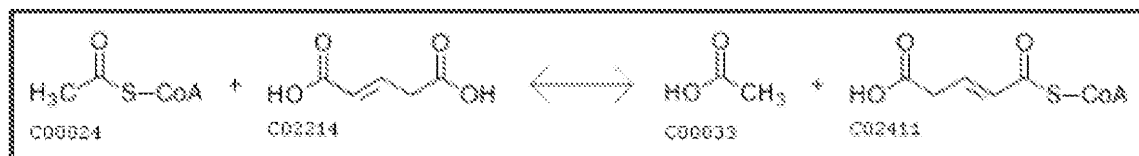
40

50

GctAB、EC 2.8.3.12) (Glutaconate CoA-transferase from *Acidaminococcus fermentans*: Buckel et al. *Eur. J. Biochem.* 1981, 118, 315-321) 由来の酵素、グルタコン酸CoAトランスフェラーゼの活性を、部位指定突然変異誘発によってCoAトランスフェラーゼからCoAエステラーゼに変更することが可能であったので (Mack M, Buckel W. (1997) Conversion of glutaconate CoA-transferase from *Acidaminococcus fermentans* into an acyl-CoA hydrolase by site-directed mutagenesis. *FEBS Lett.* 405; 209-212)、見込みのある標的であるようである。この酵素は大腸菌において成功裏に発現され、グルタコニルCoA、3-メチルグルタコニルCoA、ブチンジオイルCoA、2-ヒドロキシアジポイルCoA、オキサロクロトニルCoAおよびムコニルCoAの酵素生合成のために使用された (Parthasarathy A, Pierik A, Kahnt J, Zelder O, Buckel W. (2011) Substrate specificity of 2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase from *Clostridium symbiosum*: Toward a bio-based production of adipic acid. *Biochemistry.* 50: 3540-35500)。GctABの結晶構造も公表された (Jacob U, Mack M, Clausen T, Huber R, Buckel W, Messerschmidt A. (1997) Glutaconate CoA-transferase from *Acidaminococcus fermentans*: the crystal structure reveals homology with other CoA-transferases. *Structure.* 5: 415-426)。このトランスフェラーゼは、いくつかの水素結合を介して末端カルボン酸陰イオンをセリン残基に結合し、これにより種々の鎖の長さに調整し得る。

10

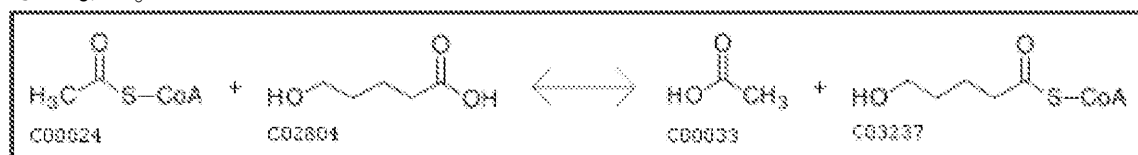
20



【0364】

ラット由来のCoAトランスフェラーゼ (コハク酸-ヒドロキシメチルグルタル酸CoAトランスフェラーゼ EC 2.8.3.13) は、スクシニルCoA、マロニルCoA、グルタリルCoAに関して認められるよりも高い親和性でアジビルCoAを基質として受け入れるので、この酵素も他の適したCoAトランスフェラーゼに含まれる (Substrate specificity of a dicarboxyl-CoA:dicarboxylic acid coenzyme A transferase from rat liver mitochondria (Deana B *Biochem Int.* 1992, 26, 767-773))。同様に、クロストリジウム・アミノワレリウム (*Clostridium aminovalericum*) 由来のアセチル-CoA:5-ヒドロキシペンタノエートCoA-トランスフェラーゼ (EC 2.8.3.14) も、C7基質に対する活性については検討されていないが、C3~C5基質に対する活性は示しており、飽和基質に対して特異的である (Eikmanns and Buckel, 1990. Properties of 5-hydroxyvalerate CoA-transferase from *Clostridium aminovalericum*. *Biol. Chem.* 371: 1077-1082)。この活性の原因となる遺伝子は記載されていない。

30



40

【0365】

酸-チオールリガーゼおよびCoAトランスフェラーゼによるピメロイル-CoAのピメリン酸への可逆的加水分解の例示

上記のリストから、以下の酵素を例として選択した。

供給源生物	遺伝子合成 参照番号	タンパク質名	UniProt アクセス コード
サーモコッカス・ コダカラエンシス <i>EC 6.2.1.5</i>	BDIGENE0041	スクシニル-CoAシンテターゼ 大サブユニット	Q5JEN7
	BDIGENE0042	アセチル-CoAシンテターゼII サブユニットβ	Q5JIA9
アシダミノコッカス ・フェルメンタンス <i>EC 2.8.3.12</i>	BDIGENE0043	グルタコン酸CoA-トランスフェラーゼ サブユニットA (GctA)	Q59111
	BDIGENE0044	グルタコン酸CoA-トランスフェラーゼ サブユニットB (GctB)	Q59112
シュードモナス ・メンドシナ <i>EC 6.2.1.14</i>	BDIGENE0045	ピメロイル-CoAシンテターゼ (pauA)	Q9ZER2

【0366】

以前に報告されたように (Binieda et al. (1999) Biochem. J. 340: 793-801; Shikat a et al. (2007). A novel ADP-forming succinyl-CoA synthetase in Thermococcus kod akaraensis structurally related to the archaeal nucleoside diphosphate-forming a cetyl-CoA synthetases. J Biol Chem. 282:26963-26970)、遺伝子が大腸菌用にコドン最適化して、BL21 (DE3) において発現させた。Hisタグ標識タンパク質を1mlのHisrapカラムで精製した。シュードモナス・メンドシナ由来の酵素は完全に不溶性であり、リフォールディングが可能であったのはごく微量に過ぎなかったため、アシダミノコッカスおよびサーモコッカス由来の酵素のみを、それらのネイティブ性基質との活性アッセイに用いた。両方の酵素の活性を、それらの天然基質である(E)-グルタコン酸およびスクシネートのCoAエステルの形成を、それぞれ520nmおよび405nmで吸光度を測定することによってモニターする比色アッセイを用いて確認した。

【0367】

アジポイル-CoAおよびピメロイル-CoAの消失、ならびにアジピン酸またはピメリン酸の形成をアッセイするための生物変換 (biotransformation) 反応は、30ulのタンパク質溶液を、反応混合物中に以下のもの (1ml当たり) を含む300ulの反応混合物に添加することにより、1mlの反応物中で行った。

タンパク質	43/44	41/42	45	43/44	41/42	45
原液のある容積を添加して得るもの :	A0	AD	AM	P0	PD	PM
20mMリン酸ナトリウム, pH 7.0	16	16	16	16	16	16
1 mM ピメロイル-CoA	-	-	-	160	160	160
1 mM アジポイル-CoA	160	160	160	-	-	-
5 mM AMP	-	-	80	-	-	80
5 mM ADP	-	80	-	-	80	-
5 mM 酢酸ナトリウム	4	-	-	4	-	-
H ₂ O	624	544	544	624	544	544
2.5 mM MgCl ₂ (最後に添加)	2	2	2	2	2	2
合計, μl	800	800	800	800	800	800

【0368】

陰性対照には、酵素溶液の代わりに30ulの溶出用緩衝液を含めた。反応混合物を、70℃

(41/42) または室温 (43/44; 45) で5時間インキュベートし、570ulの水で希釈して、LC-MSによってアッセイした。

【0369】

3種の酵素はすべて、ピメロイル-CoAをピメリン酸に加水分解することができた (図26参照)。PauAの可溶性酵素はごく微量しか生成されなかったという事実にもかかわらず、この酵素はピメロイル-CoAからピメリン酸を形成させた。このことから、EC 6.2.1.14の酸-チオールリガーゼが真に可逆的であり、ピメロイル-CoAからピメリン酸を調製するために用いることが確かめられた。さらに、CoAトランスフェラーゼも、ピメロイル-CoAからピメリン酸を生成させるために用いる。

【0370】

3.1.5.3 チオエステルヒドロラーゼ (EC 3.1.2.-).-)

3.1.5.3.1 適切な酵素の選択

チオエステラーゼは、CoAまたは[acp]チオエステルの加水分解を触媒する加水分解酵素である。



【0371】

チオエステラーゼは、すべての生物に普遍的に存在しており、CoAまたは[acp]活性化カルボン酸に対して作用し、かつ、CoAエステルヒドロラーゼ (hydrolase) についてはEC 3.1.2.2; EC 3.1.2.28; EC 3.1.2.19; EC 3.1.2.20を含むEC 3.1.2に属し、一方、[acp]チオエステルヒドロラーゼはEC 3.1.2.14およびEC 3.1.2.21に認められる。スクシニル-CoAなどのジカルボキシル-モノ-CoAエステルに対する活性について検討がなされているのは、2種のチオエステラーゼ (ACOT8およびACOT4) のみである。

酵素	EC	供給源	基質	サイズ (kDa)	精製
ACOT8 (PTE-2)	3.1.2.27	マウス	広範囲直鎖CoA、胆汁酸CoAおよび分枝鎖アシル-CoA	50	あり、hisタグ融合物、均一
ACOT5 (PTE-Ic)	3.1.2.2 パルミトイル-CoA ヒドロラーゼ	マウス	中鎖アシル-CoA	46.6	あり、hisタグ融合物、均一
ACOT3 (PTE-Ia)	3.1.2.2 パルミトイル-CoA ヒドロラーゼ	マウス	長鎖アシル-CoA	47.4	あり、hisタグ融合物、均一
ACOT4 (PTE-Ib)	3.1.2.3 スクシニル-CoA チオエステラーゼ	マウス	スクシニル-CoAおよびグルタリル-CoAのみ	36 (二量体として活性)	あり、hisタグ融合物、均一

【0372】

マウス由来のACOT8ペルオキシソームアシルCoAチオエステラーゼ8 (以前のPTE-2)

ACOT8はヒトPET1チオエステラーゼのホモログである。この酵素は大腸菌において His タグ融合タンパク質として過剰発現され、HisTrapカラムクロマトグラフィを用いて均一に精製された [Westin MA, Hunt MC, Alexson SE. (2005) The identification of a succinyl-CoA thioesterase suggests a novel pathway for succinate production in peroxisomes. J Biol Chem. 280:38125-38132]。活性は、長鎖アシルCoAに関して5~10 μM超の基質濃度で阻害されたが、BSAの添加は阻害を防止された。チオエステラーゼの基質範囲を、飽和および不飽和直鎖アシルCoA (C2~C20) を用いて試験した。最も高い活性はC10~C18の胆汁酸 (トリヒドロキシコプロスタノイルCoA、コロイルCoAおよびケノデオキシコロイルCoAならびに分枝鎖アシルCoA) に対してであった。試験した基質の大部分についてのK_m値はかなり低く、ACOT8が非常に広い基質特異性を有し、それらの大部分を受け入れ得る

ことを強く示唆した。ACOT8はCoASHにより10~15 μ MのIC₅₀で強力に阻害された。ACOT8はジカルボキシリル-モノCoA誘導体に対する活性に関しても試験され、長鎖基質を優先的に加水分解した（C鎖の長さがC3からC12に増大すると共に活性が上昇した）[Hunt MC, Solaa s K, Kase BF, Alexson SE. (2002) Characterization of an acyl-coA thioesterase that functions as a major regulator of peroxisomal lipid metabolism. J Biol Chem. 277: 1128-1138]。

【0373】

マウス由来のACOT3（以前のPTE-1a）

ACOT3は大腸菌において発現され、均一に精製された[19]。この酵素はC8からC26までのモノカルボン酸エステルに対して活性を示し、より長鎖の基質（C16）に対して最も高い活性を示した。酵素は胆汁酸エステルを受け入れなかった。遊離CoASHによる阻害は存在しなかった。ジカルボン酸エステルは試験しなかった。

【0374】

マウス由来のACOT5（以前のPTE-1c）

ACOT5は大腸菌において発現され、均一に精製された[Westin MA, Alexson SE, Hunt MC. (2004) Molecular cloning and characterization of two mouse peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) -regulated peroxisomal acyl-CoA thioesterases. J Biol Chem. 279:21841-21848]。この酵素はC6からC20までのモノカルボン酸エステルに対して活性を示し、中鎖基質（C10）に対して最も高い活性を示した。酵素は胆汁酸エステルを受け入れなかった。遊離CoASHによる阻害は存在しなかった。ジカルボン酸エステルは試験しなかった。

【0375】

マウス由来のACOT4ペルオキシソームアシルCoAチオエステラーゼ4（以前のPTE-1b）

ACOT4は大腸菌において発現され、均一に精製された[18]。この酵素は狭い基質範囲を示し、スクシニルCoAおよびグルタリルCoAを受け入れた。反応は、500 μ Mまでの濃度ではCoASHによって阻害されなかった。

【0376】

ACOT8、ACOT5およびACOT3は、したがって、ピメリン酸生合成経路に参与するジカルボキシリルCoAおよび他のアシルCoAの加水分解のための優れた候補物である。

【0377】

3.1.5.3.2 選択したチオエステラーゼに関するクローニング、発現および生物転換

マウスAcot8（野生型mRNA配列 GeneBank NM_133240; mRNAフラグメント65-1027）およびインフルエンザ菌YciA（野生型遺伝子配列GeneBank L42023フラグメント 878596-87906 0、EC 3.1.2.20）由来のチオエステラーゼを、それらのジカルボキシリルCoA基質に対する特異性のゆえに、ピメロイルCoAのピメリン酸への変換についての例として選択した（The identification of a succinyl-CoA thioesterase suggests a novel pathway for succinate production in peroxisomes: Westin J. et al. Biol. Chem 2005, 280, 38125-38132; Divergence of function in the hot dog fold enzyme superfamily - the bacterial thioesterase YciA: Zhuang et al. Biochemistry 2008, 47, 2789-2796）。どちらの遺伝子もそれらのそれぞれの宿主ゲノムから同定され、大腸菌において成功裏にクローニングされ、発現された（Characterization of an acyl-CoA thioesterase that functions as a major regulator of peroxisomal lipid metabolism: Hunt et al. J. Biol. Chem. 277, 1128-1138; Divergence of function in the hot dog fold enzyme superfamily - the bacterial thioesterase YciA: Zhuang et al. Biochemistry 2008, 47, 2789-2796）。

【0378】

両遺伝子を、対応する大腸菌発現ベクターの構築のための野生型配列として選択し、大腸菌BL21（DE3）を形質転換するために使用した。インフルエンザ菌YciAチオエステラーゼの発現は大腸菌において達成された（図14h）が、マウスAcot8チオエステラーゼの発現は達成されなかった。予想されたサイズ（17kDa）のタンパク質バンドが、IPTG誘導後に可溶性画分（レーン2から3）および不溶性画分（レーン6および7）において明瞭に検出さ

れた。陰性対照実験（レーン4および8）では対応するタンパク質を認めず、予想された17 kDaのインフルエンザ菌YciAチオエステラーゼタンパク質が集合体構築物I8から大腸菌において成功裏に発現されたことを示唆した。YciAタンパク質の可溶性発現は誘導後4時間から24時間のインキュベーションの間経時的に増大すると思われ（レーン2および3）、一方不溶性発現は同じ期間に減少すると思われた（レーン6および7）。それゆえ、24時間後の可溶性試料はインフルエンザ菌YciAチオエステラーゼの活性を観測するために最良の候補物であると思われた。

【0379】

3.1.5.3.3 ピメロイル-CoAの合成

補酵素Aナトリウム塩（150mg、195 μmol ）を、アセトン（22.5mL）と水（225 μL ）の混合物中に懸濁させた。この懸濁液を氷上で0℃まで冷却し、200mM炭酸水素ナトリウム溶液でpH 8に調整した。酸塩化物（586 μmol 、3当量）を、懸濁液に攪拌しながらゆっくりと添加し、その間、反応物のpHは、炭酸水素ナトリウム溶液のさらなる添加によって8に維持した。反応混合物を0℃でさらに1時間攪拌した。HPLC反応モニタリングによる判定で補酵素Aが消費されたところで、反応混合物を真空下で濃縮し、白色残留物を水（20mL）に再懸濁させ、5Mリン酸でpH 3に調整した上で、ジエチルエーテル（3×20mL）で抽出した。続いて、残った水層を、Phenomenexによって供給されているStrata X 33 μm ポリマー逆相1g/20mLカートリッジを用いる固相抽出（SPE）によって精製した。

【0380】

SPEカートリッジは、使用前に、メタノールで初回処理した上で、10mMリン酸ナトリウム（pH4.2）緩衝液によって平衡化した。粗アシル-CoA生成物を含む水層をカートリッジに対してローディングした。10mMリン酸ナトリウム（pH4.2）緩衝液による洗浄（3×5mL）を実施し、その後5、10および20% MeOH/緩衝液による溶出（3×5mL）を用いる段階的勾配を行った。各画分を収集し、HPLCによって分析した。生成物を含む画分のみを一緒に合わせて、真空下で濃縮した。単離された生成物を、それ以上の精製は行わずに生物変換に直接用いた。1H NMRまたはLCMSを、生成物の特性決定のために用いた。

【0381】

3.1.5.3.4 ピメロイル-CoAのピメリン酸への生物変換

生物変換を最終容積2mL中にて実施した。生物変換物は、1mM基質、200mM KClおよび50mM Hepesカリウム（pH 7.5）で構成した。陰性対照は、空ベクターを保有する細胞で構成した。生物触媒は、最終濃度がほぼ15g/L全細胞当量となるように無細胞抽出物として投入した。反応は、周囲温度（20℃）で、15mLファルコンチューブ内で攪拌しながら実施した。各生物変換物の試料採取を1時間後、4時間後および24時間後に行い、Phenomenex Luna C18 250 x 4.6mm、5ミクロンカラムによるHPLC（Agilent 1100）によって分析した。注入の前に、反応を停止させるために各試料を100℃で5分間加熱し、14000rpmで2分間遠心分離を行った上で、0.2ミクロンのシリンジフィルターを通して濾過した。濾過液を、ピメロイル-CoAの消失（Rt 12.39分）およびCoAの形成（Rt 7.98分間）に関して260nmでのHPLCによって分析したが、これらはいずれもこの波長で強く吸光するものの、ピメリン酸（pimlic acid）は260nmでのUVによっては検出されない。ピメリン酸の形成はLC-MSによって確認した。

【0382】

陰性対照では低レベルのバックグラウンド加水分解が観察され、これは空ベクターを保有する大腸菌における低レベルの内因性チオエステラーゼ活性に起因すると考えることができる。ピメロイル-CoAのピメリン酸およびアセチル-CoAへの完全な加水分解が、1時間の反応後に観察された。

【0383】

3.1.6 ω -トランスアミナーゼ（EC 2.6.1.-）によるピメリン酸セミアルデヒドの7-アミノヘプタン酸への変換およびアミノ酸アミノトランスフェラーゼ（EC 2.6.1.-）による α -ケトスベレート α -アミノスベレートへの変換

トランスアミナーゼまたはアミノトランスフェラーゼは、アミノ酸とケト酸の間の反応

を触媒する酵素である。この反応は、アミノ供与体からアミノ基を除去する段階、 α -ケト酸を残す段階、およびそれを受容体 α -ケト酸に転移してアミノ酸に変換する段階を含む。これらはアミノ酸の合成において重要な酵素であり、自然界全体に遍在する。これらの酵素の多くはピリドキサルリン酸（PLP）を補因子として含む。これらの酵素は、広範囲の基質を利用する、広範囲の細胞機能をカバーする大きくて多様性のあるファミリーに属する。

【0384】

3.1.6.1 トランスアミナーゼの選択

文献検索、BLAST検索およびタンパク質データベース検索によって同定された多数の候補物は、ピメリン酸セミアルデヒドの7-アミノヘプタン酸への変換のための適切な酵素である。

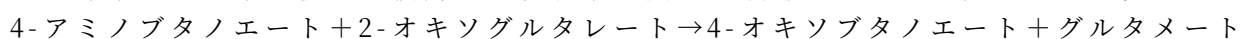
酵素名/ EC番号	アクセッション 番号	供給源	入手 可能な 遺伝子	精製された タンパク質
EC 2.6.1.19	YP_001823341.1	ストレプトミセス・グリセウス	あり	あり
LysN	Q72LL6	サーマス・ サーモフィルス	あり	あり
AADaT	Q64602	ラット	あり	あり

【0385】

EC 2.6.1.19

ストレプトミセス・グリセウス由来の4-アミノ酪酸トランスアミナーゼ

この酵素は1985年に初めて検討され、以下の反応を触媒することが認められた。



この酵素は、6-アミノヘキサノエートおよび7-アミノヘプタノエートを含む比較的広い基質範囲を有し、2-オキソグルタレートをアミノ受容体として使用して、対応するセミアルデヒドを形成する（Yonaha, K., K. Suzuki, and S. Toyama, 4-Aminobutyrate:2-oxoglutarate aminotransferase of *Streptomyces griseus*: purification and properties. *Eur J Biochem*, 1985. 146 (1): p. 101-6）。これは非常に有望であるが、これらの反応の可逆性は試験されていない。それゆえ、グルタメートは7-オキソヘプタノエートから7-アミノヘプタン酸を提供するので、これをアミノ供与体として使用して逆反応をインビトロで試験する。酵素をS. グリセウス IF0 3102 (S. グリセウス亜種グリセウス) において精製し、各々約50 kDaの2つの同一サブユニットからなる100kDaであることを認めた。補因子はピリドキサル5'-リン酸である。タンパク質はPubmedデータベースに寄託される（表1）。推定上の4-アミノトランスフェラーゼと注釈されている、これをコードする遺伝子（SGR_1829）は、IF0 3102に密接に関連する、S. グリセウス IF0 13350のゲノム配列中に存在する。明らかにではないが、このタンパク質が、記述され、検討された酵素の近接ホモログである可能性は極めて高い（Yonaha, K., K. Suzuki, and S. Toyama, 4-Aminobutyrate:2-oxoglutarate amino transferase of *Streptomyces griseus*: purification and properties. *Eur J Biochem*, 1985. 146 (1): p. 101-6）。入手可能な基質範囲データを考慮すると、このタンパク質は適切なアミノトランスフェラーゼ酵素として試験するための非常に良好な候補物である。

【0386】

EC 2.6.1.39

サーマス・サーモフィルス由来のアミノアジピン酸トランスアミナーゼ（Q72LL6）

これは、哺乳動物由来の α -アミノアジピン酸アミノトランスフェラーゼ（AAAAT）に相同性を有する酵素であり、細菌サーマス・サーモフィルスHB27におけるリジン合成に関与すると考えられる[2,3]。動力学データが、2-オキソアジペート、2-オキソイソカプロエート、 α -アミノアジペートおよびさらには芳香族アミノ酸などに基質に関して入手可能である[3]。タンパク質は大腸菌において発現され、精製されており、インビトロでは主

として、各々約44kDaのサイズのサブユニットのホモ二量体として存在することが認められた (Miyazaki,T.,et al.,alpha-Aminoadipate aminotransferase from an extremely thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus*. *Microbiology*,2004.150 (Pt 7) :p.2327-34)。広い基質特異性、その原核生物起源およびコード遺伝子が入手可能であることは、これが1に関して試験するための良好な候補物であり得ることを示唆する。これは非常によく検討された酵素であり、その結晶構造が入手可能であって (PDB ID:2ZP7)、基質特異性への機構的洞察を提供する (Ouchi,T.,et al.,Dual roles of a conserved pair,Arg 23 and Ser20,in recognition of multiple substrates in alpha-aminoadipate aminotransferase from *Thermus thermophilus*. *Biochem Biophys Res Commun*,2009.388 (1) :p.21-7;Tomita,T.,et al.,Mechanism for multiple-substrates recognition of alpha-aminoadipate aminotransferase from *Thermus thermophilus*. *Proteins*,2009.75 (2) :p.348-59)。

10

【0387】

ラット由来のアミノアジピン酸アミノトランスフェラーゼ (Q64602)

この酵素は先に述べたサーマス・サーモフィルス由来の酵素に類似する。キヌレニン/アミノアジピン酸アミノトランスフェラーゼと注釈されているが、2つの異なるタンパク質がこれらの反応を実施することを示唆するいくつかの証拠がある (Mawal,M.R.and D.R. Deshmukh,Alpha-aminoadipate and kynurenine aminotransferase activities from rat kidney.Evidence for separate identity. *J Biol Chem*,1991.266 (4) :p.2573-5)。タンパク質はラットの腎臓から精製され、ヒト胚性腎線維芽細胞において発現されており、約100kDaのサイズであることが認められた。この酵素は2-オキソアジペートを基質として受け入れることができる。初期試験は (おそらく同じ酵素に関して)、見かけ上可逆性である反応においてDL-2-アミノピメリン酸をアミノ供与体とし、2-オキソグルタレートを受容体として使用できることを示している (Deshmukh,D.R.and S.M.Mungre,Purification and properties of 2-aminoadipate:2-oxoglutarate aminotransferase from bovine kidney. *Biochem J*,1989.261 (3) :p.761-8)。同じ論文は、ピメリン酸が活性の阻害剤であり得、ピメリン酸の存在下で活性が30%低下し得ることを示した。

20

【0388】

上記の3つの酵素は、7-アミノヘプタン酸を生成する最終的なアミノ基転移に適するはずである。S.グリセウス由来の酵素は良好な候補物であり、クローニング、発現および精製の工程は特に難しくはないであろう。同じことが、広い基質範囲を有すると思われる、T.サーモフィルス由来のLysNにも当てはまる。ラット由来の酵素はより困難であろうが、活性データは、この酵素が必要な特定の基質を使用し得ることを示唆する。

30

【0389】

5-アミノ吉草酸トランスアミナーゼ (EC 2.6.1.48)

EC 2.6.1.48からのジアミノアミノトランスフェラーゼ、例えば5-アミノ吉草酸トランスアミナーゼもまた、ピメリン酸セミアルデヒドからの7-アミノヘプタン酸の調製に適した触媒である。

【0390】

3.1.6.2 選択したアミノトランスフェラーゼの発現

2つの遺伝子を、どちらもピメリン酸セミアルデヒドの7-アミノヘプタン酸への変換および α -ケトスベレートの α -アミノスベレートへの変換のために選択した: (1) IlvE- ω V融合物 (SEQ ID 1および2) ならびに (2) IlvE-Ad最適化 ω 融合物 (SEQ ID 3および4)。これらの遺伝子を、以前に大腸菌において高い発現レベルを示した、分枝鎖アミノトランスフェラーゼIlvEの5'末端と共に ω アミノトランスフェラーゼの融合物を組み込んだプラスミドにおいて調製した (図23および図24参照)。IlvEフラグメントの導入はアミノトランスフェラーゼ遺伝子の発現を有意に増大させることが実証された。IlvEフラグメントと分枝鎖アミノトランスフェラーゼ遺伝子を含む別の熱誘導性プラスミドも活性アッセイにおいて試験した (ING66)。

40

【0391】

50

さらなる5つの遺伝子（バチルス・ウェイヘンステファネンシス（*Bacillus weihenstephanensis*）KBAB4、緑膿菌（gi9951072）、枯草菌（gi16078032）、シュードモナス・シリングアエ（*Pseudomonas syringae*）クラスIII、ロドバクター・スフェロイデス（*Rhodobacter sphaeroides*）クラスIII）を選択した（DSM特許（Preparation of 6-aminocaproic acid from 5-formyl valeric acid:DSM - US2011-0171699 A1特許）。これらの酵素は α -ケトピメリン酸の α -アミノピメリン酸への変換においてある程度の活性を示し、ピメリン酸セミアルデヒドの7-アミノヘプタン酸への変換においても活性であり得る（SEQ ID 5～14参照）。

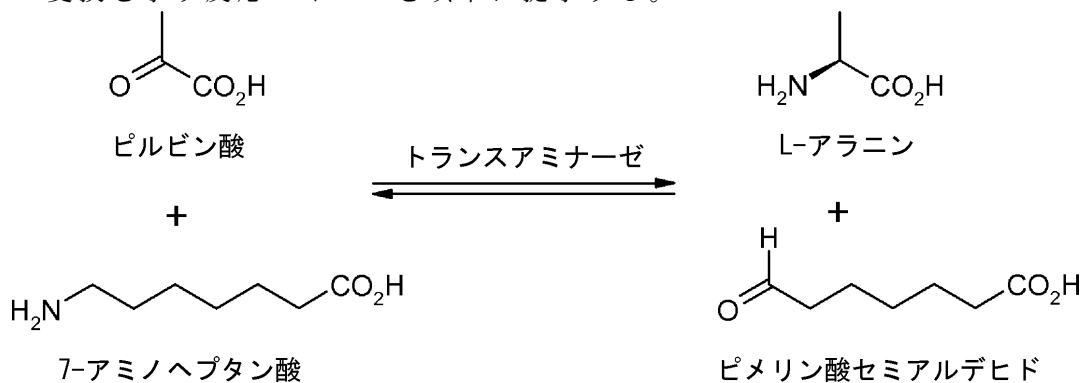
【0392】

前述同様に大腸菌BL21において発現されたIlvE- ω Vf融合物（pING2022）（図23）およびIlvE-Ad最適化 ω 融合物（pING2030）（図24）タンパク質のSDS-PAGE分析。予想されたサイズの明らかなバンドがIlvE- ω Vf融合物（pING2022）（図15、レーン5および6）ならびにIlvE-Ad最適化 ω 融合物（pING2030）（図15、レーン8および9）タンパク質の両方で認められる。陰性対照では対応するバンドは存在せず、IlvE- ω Vf融合物およびIlvE-Ad最適化 ω 融合物タンパク質の発現を確認した。

【0393】

IlvE- ω Vf融合物（pING2022）およびIlvE-Ad最適化 ω 融合物（pING2030）アミノトランスフェラーゼタンパク質の活性アッセイ

組換えVfアミノトランスフェラーゼを使用して7-アミノヘプタン酸への活性を検定した。3種の生物転換体を調製し、7-アミノヘプタン酸およびピルビン酸ナトリウムのL-アラニンへの変換に対する酵素負荷の影響を検討した。生物転換体におけるL-アラニンの検出は、7-アミノヘプタン酸に関する所望のアミノトランスフェラーゼ特異性の明確な証拠を提供する。7-アミノヘプタン酸のピメリン酸セミアルデヒドへのアミノトランスフェラーゼ変換を示す反応スキームを以下に提示する。



【0394】

3種の生物転換体（3ml容量）は、50mMピルビン酸ナトリウムおよび10mM 7-アミノヘプタン酸を含んだ。反応物を30℃の軌道インキュベータに保持し、アリコート进行分析のために生物転換体から定期的に採取した。

試料ID	ピルビン酸ナトリウム/mM	7-アミノヘプタン酸/mM	酵素負荷 v/v%
rc0212-40-1	50	10	0.33
rc0212-40-2	50	10	0.66
rc0212-40-3	50	10	1.67

【0395】

アリコート（1ml）を生物転換体から取り、95℃に5分間加熱して、可溶性タンパク質を沈殿させた。その後試料を遠心分離し、上清をHPLC分析の前に0.2ミクロンのフィルターを通してろ過した。HPLC分析は、 β -メルカプトエタノールおよびオルトフタルアルデヒドとの化学付加物形成に基づくプレカラム誘導体化法を用いた。L-アラニンおよび7-アミ

ノヘプタン酸の外部標準品を使用して、生物転換体中の7-アミノヘプタン酸およびL-アラニンの濃度を測定した。

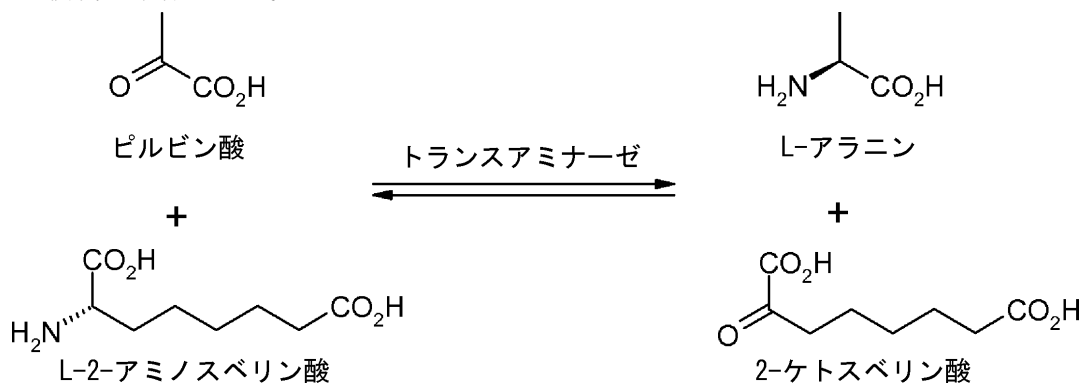
【0396】

結果（図16）は、生物転換体におけるL-アラニンの形成を明らかに示し、Vfアミノトランスフェラーゼに関するアミノトランスフェラーゼ活性および特異性についての説得力のある証拠を提供する。7-アミノヘプタン酸濃度は、予想されたアミノトランスフェラーゼ活性と一致して経時的に低下する。7-アミノヘプタン酸の割合は、やはり予想されたトランスアミナーゼ活性と一致して、酵素の濃度上昇と共に増大する。形成されるL-アラニンの量は消費された7-アミノヘプタン酸とは合致しないが、これは、大腸菌抽出物中に存在する他の非アミノトランスフェラーゼ酵素によって形成されるL-アラニンの選択的な生化学的分解によって引き起こされ得る。

10

【0397】

2-アミノスベレートに対する活性を評価するためにアミノトランスフェラーゼのさらなる検討を実施した。



20

【0398】

L-2-アミノスベリン酸の2-ケトスベリン酸へのアミノトランスフェラーゼ変換は、生物転換を調節する可能性を提供する。

【0399】

6種の生物転換を実施し、pING 2022、pING2030およびING66（Ilve分枝鎖アミノトランスフェラーゼ、E.C.2.6.1.42、既に菌株コレクションに存在する構築物）を検討した。各々の生物転換は、以下に示されているように10mMのDL-2-アミノスベリン酸、50mMピルビン酸ナトリウムおよび高負荷または低負荷の無細胞抽出物（CFE）を含んだ。注記：ING 66は全細胞として使用した。

30

ラボブックID	アミノトランスフェラーゼ	全細胞 当量 g/L
rc0212-44-5	pING2022	5
rc0212-44-6	pING2030	5
rc0212-44-7	pING2022	20
rc0212-44-8	pING2030	20
rc0212-46-1	ING66	25
rc0212-46-2	ING66	5

40

【0400】

6種の形質転換体（3ml容量）を30℃の軌道インキュベータに保持し、アリコート进行分析のために生物転換体から定期的に採取した。アリコート（1ml）を生物転換体から取り、9

50

5℃に5分間加熱して、可溶性タンパク質を沈殿させた。その後試料を遠心分離し、上清をHPLC分析の前に0.2ミクロンのフィルターを通してろ過した。HPLC分析は、Boc-システインおよびオルトフタルアルデヒドとの化学付加物形成に基づくプレカラム誘導体化法を用いた。DL-2-アミノスベリン酸およびL-アラニンの外部標準品を使用して、2-アミノスベリン酸エナンチオマーの保持時間を測定した。

【0401】

結果は、6種の生物転換体すべてにわたってL-2-アミノスベリン酸濃度の低下およびD-2-アミノスベリン酸のエナンチオ濃縮を示す。ここで試験したアミノトランスフェラーゼはL-立体選択性を示すことが公知であるので、この結果はL-エナンチオマーへのアミノトランスフェラーゼの作用と一致する。ピルビン酸塩のアミノ基転移から生じるはずである測定可能なL-アラニンはHPLCによって認められなかったが、7-アミノヘプタン酸の反応において先に認められたように、形成されたL-アラニンが生物転換体中に存在するその他の宿主タンパク質によってさらに分解された可能性がある。

10

【0402】

ING66生物転換体 (rc0212-46-1および-2) は、pING2022およびpING2030アミノトランスフェラーゼと比較して有意に高いレベルのL-2-アミノスベリン酸分解を示した。ING 66分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼは、L-2-アミノスベリン酸のより短い (C5) ホモログであるL-2-アミノグルタレート (L-グルタミン酸) に対して卓越した選択性を示すことが既に公知であり、そのためING 66に対する活性のこの優先性は予想外ではない。

20

【0403】

ピメリン酸セミアルデヒドからの7-アミノヘプタン酸の生成

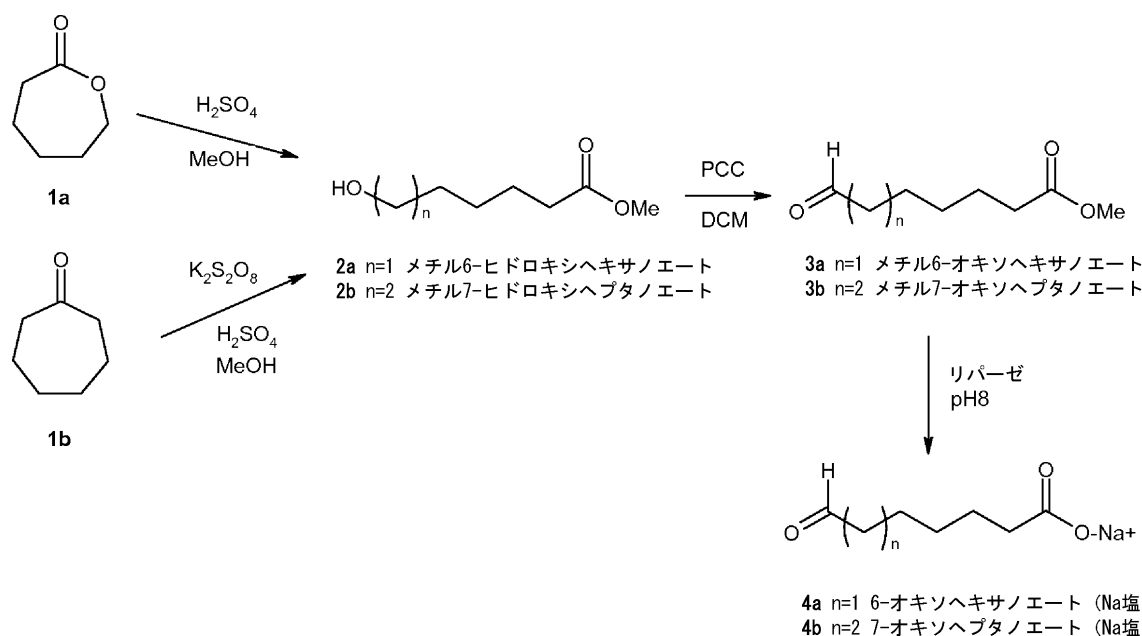
7-アミノヘプタン酸に対するビブリオ・フルビアリス (*Vibrio fluvialis*) ω -アミノトランスフェラーゼ (アクセッション番号HQ418483.1 (WT遺伝子配列: フラグメント325-1686)) 活性の観察された活性に基づき、逆方向での反応、すなわち、ピメリン酸セミアルデヒドの7-アミノヘプタン酸への変換を行った。ビブリオ・フルビアリス ω -アミノ酸トランスアミナーゼ酵素、ならびにN-ter-His-Tag精製バチルス・ウェイヘンステファネンシスの両方を評価した。バチルス・ウェイヘンステファネンシス ω -アミノ酸トランスアミナーゼ (アクセッション番号JA114119.1) を発現させて、標準的な手法を用いて精製した。反応はアジピン酸セミアルデヒドおよびピメリン酸セミアルデヒドの両方を用いて行い、生成物の形成 (6-アミノカプロン酸および7-アミノヘプタン酸) をHPLC (Agilent 1200、GraceSmart RP C18カラム) によって確認した。

30

【0404】

アジピン酸 (adipic acid) セミアルデヒドおよびピメリン酸セミアルデヒドの合成のための一般的手順

C6およびC7セミアルデヒドの合成は、公表された方法 (Synthetic communications, 21 (8&9), 1075-1081 (1991)) に基づき、以下の一般的な反応スキームに従って行った。



10

【0405】

メチル6-ヒドロキシヘキサノエートの調製 (2a)

ε-カプロラクトン1a (50g、0.425mol、1当量) をメタノール (500mL) 中に溶解させた。濃硫酸 (1mL) を投入し、溶液を加熱して一晚還流させた。2aへの完全な変換をGC-MSによって判定した。反応物をRTまで冷却させて、水 (700mL) を投入した。生成物をジエチルエーテル (3×200mL) 中に抽出し、硫酸マグネシウム上で乾燥させた上で濃縮して、透明な無色の液体 (40.7g) を得た。粗生成物を高真空下 (沸点=120℃、7mbar) で蒸留して無色の油2a (32.9g) を得て、それを次の段階に直接用いた。

20

【0406】

メチル7-ヒドロキシヘプタノエート (heptanoate) の調製 (2b)

濃硫酸 (1mL)、水 (120mL) およびメタノールを氷上で15℃に冷却した。過硫酸カリウム (365.6g、1.34mol、3当量) を、攪拌しながらゆっくりと添加した。メタノール (150mL) 中にあるシクロヘプタノン1b (50g、0.447mmol、1当量) を、45分間かけて滴下しながら添加した。反応物を一晚かけて攪拌しながら室温まで温まるようにした。2bへの完全な変換はGC-MSによって判定した。この時点で、2aに記載したワークアップ (work-up) 生成物の追跡を行った。

30

【0407】

エステルアルデヒド3a/3bを調製するためのヒドロキシエステル2a/bのPCC酸化のための一般の手順

クロロクロム酸ピリジニウム (PCC) (60g) およびシリカゲル (60g) を、1L RBフラスコに、ジクロロメタン (200mL) とともに投入した。この懸濁液を乾燥するまで濃縮して、微粉末を得た。ジクロロメタン (500mL) を、3 Å 分子ふるい (70g) とともに投入した。懸濁液を氷上で0℃に冷却した。

【0408】

各ヒドロキシエステル (2a 32.6g、2b 37g) をジクロロメタン (30mL) 中に溶解させて、30分間かけてPCC/シリカ懸濁液に滴下しながら添加した。さらに30分間攪拌した後に、エステルアルデヒド3a/bへの完全な変換をGC-MSによって観察した。粗反応混合物をセライトパッドに通して濾過した。すべての生成物が透明な暗褐色の濾過液に確実に洗い出されるように、ジエチルエーテル洗浄 (5×200mL) を行った。続いて、有色不純物を除去するために、濾過液をシリカパッドに通して濾過した。シリカパッドのさらなるジエチルエーテル洗浄 (3×100mL) を行った。一緒に合わせた濾過液を真空下で濃縮して、淡い黄緑色の液体 (3a 24.5g、3b 7.9g) を得た。粗生成物を短経路高真空蒸留 (3a 沸点=98℃、8mbar、3b沸点=106℃、7mbar) によって精製して、透明な無色の蒸留物 (3a 16.9g、3b 4.9g) を得た。生成物を¹Hおよび¹³C NMR分析によって特性決定した。

40

50

【0409】

カンジダ・アンタールクティカ (*Candida antarctica*) 由来の固定化リパーゼアクリル樹脂を用いてC6/C7酸セミアルデヒド4a/bを作製するための3a/bの加水分解のための一般的手順

各エステルアルデヒド3a/b (1g, 6.9mmol, 1当量) を、50mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 8) (20mL) 中に懸濁させた。固定化リパーゼ樹脂 (100mg) を投入し、懸濁液を50℃に加熱して45分間攪拌した。この時点の後に、GC-MSにより、エステルアルデヒド出発材料3a/bが消費されたことが示された。懸濁液をRTに冷却して、リパーゼビーズを濾過し、その結果得られた濾過液を真空下で濃縮して、リン酸緩衝液中にある粗C6/C7セミアルデヒド4a/4bを得た。生成物を¹H NMRによって特性決定した。

10

【0410】

カンジダ・アンタールクティカ由来の固定化リパーゼアクリル樹脂を用いてC6/C7酸セミアルデヒド4a/bを作製するための3a/bの加水分解のための一般的手順

各エステルアルデヒド3a/b (1g, 6.9mmol, 1当量) を50mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 8) (20mL) 中に懸濁させた。固定化リパーゼ樹脂 (100mg) を投入し、懸濁液を50℃に加熱して45分間攪拌した。この時点の後に、GC-MSにより、エステルアルデヒド出発材料3a/bが消費されたことが示された。懸濁液をRTに冷却して、リパーゼビーズを濾過し、その結果得られた濾過液を真空下で濃縮して、リン酸緩衝液中にある粗C6/C7セミアルデヒド4a/4bを得た。生成物を¹H NMRによって特性決定した。

20

【0411】

V.f. ω-アミノ酸トランスアミナーゼ生物変換の条件

ラボブック参照符号	kg1112-021-10
基質濃度	5mM (6-オキシヘキサン酸) 5mM (7-オキシヘプタン酸)
L-グルタミン酸一ナトリウム (アミノ供与体)	100mM
全細胞当量 (WCE) に基づく生物触媒のローディング (g/L) (無細胞抽出物)	15g/L全細胞当量*
pH	7
温度 (℃)	30℃
最終反応容積	5mL

30

* 全細胞当量 (WCE) という用語は、細胞溶解後の無細胞抽出物中に存在する生物触媒の量を推定するために用いられる用語である。これは、既知の重量の湿性全細胞を、規定の溶解用緩衝液容積中に再懸濁させることによって計算される。例えば、遠心沈降させた湿性全細胞ペレットの1gを10mLの溶解用緩衝液に再懸濁させる場合には、WCE濃度は100g/Lである。典型的には、本発明者らは生物触媒の懸濁液原液をこの様式で調製し、この原液を必要に応じて希釈して、各生物変換における所望の生物触媒濃度を得る。

【0412】

生物変換に用いるC6/C7セミアルデヒド基質のインサイチュー調製のためのプロトコル

40

C6およびC7セミアルデヒドの10mM原液を試験の前に調製した。これらの原液の調製には以下のプロトコルを用いた：10mMメチルエステルアルデヒドを50mMリン酸ナトリウム (pH 7) (50mL) 中に懸濁させた。カンジダ・アンタールクティカ (*Candida antarctica*) 由来の固定化リパーゼアクリル樹脂 (10mg) を投入した。懸濁液を50℃に加熱して、1時間攪拌した。TLC分析により、この時点の後での出発材料の完全な消費が示された。反応物をRTに冷却し、ビーズを濾過して、ほぼ10mMのセミアルデヒドを含む濾過液を各生物変換に直接用いた。

【0413】

V.f. ωアミノ酸トランスアミナーゼ生物変換のプロトコル

続いて、6種の生物変換を、最終容積5mL中にてそれぞれ実施した。各生物変換物は、5m

50

Mセミアルデヒド、100mM L-グルタミン酸一ナトリウム、および、無細胞抽出物として投入して最終濃度15g/L全細胞当量とした生物触媒で構成した。反応は、30℃で、15mLファルコンチューブ内で攪拌しながらpH 7にて実施した。各生物変換物を定期的に試料採取し、HPLCによって分析した。注入の前に、各試料を100℃に5分間加熱し、14000rpmで2分間遠心分離を行って、0.2ミクロンのシリンジフィルターに通して濾過した。

【0414】

実施したV.f. ω アミノ酸トランスアミナーゼ生物変換の一覧

実験ID	基質	生物触媒	注記
KG1112-021-10-86	6-オキソヘキサン酸	V.f. ω アミノ酸 トランス アミナーゼ 無細胞抽出物	
KG1112-021-10-96	6-オキソヘキサン酸	大腸菌BW25113 Δ dadAX	空ベクターを有する 宿主細胞を用いた 陰性対照
KG1012-021-80-6	6-オキソヘキサン酸	水	水を用いた 陰性対照
KG1112-021-10-87	7-オキソヘプタン酸	V.f. ω アミノ酸 トランス アミナーゼ 無細胞抽出物	
KG1112-021-10-97	7-オキソヘプタン酸	大腸菌BW25113 Δ dadAX	空ベクターを有する 宿主細胞を用いた 陰性対照
KG1012-021-80-3	7-オキソヘプタン酸	水	水を用いた 陰性対照

【0415】

V.f. ω アミノ酸トランスアミナーゼ生物変換の結果

V.f. ω -アミノ酸トランスアミナーゼが6-オキソヘキサン酸および7-オキソヘプタン酸に対する活性を有することが首尾良く実証された。対応する6-アミノヘキサン酸生成物および7-アミノヘプタン酸生成物の形成をHPLCによって測定した。生成物ピークの実体は、それらの各々の外部標準物質の保持時間と相関づけることによって判定した。

【0416】

これらの条件下で有意に多くの6-アミノヘキサン酸が生成されたことが観察され、これにより、このトランスアミナーゼが7-オキソヘプタン酸と比較して6-オキソヘキサン酸に対してより高度の活性を有するという強い証拠が得られた。

【0417】

いずれの場合にも、かなりの量の各生成物が、空ベクター細胞、すなわち標的トランスアミナーゼを発現しない大腸菌菌株を用いた陰性対照実験でも観察された。本発明者らは、これらの結果が、宿主無細胞抽出物におけるバックグラウンドトランスアミナーゼ活性に起因すると推測している。しかし、HPLCの結果は、どちらの基質に関しても、トランスアミナーゼ酵素を過剰発現する細胞を含めた実験において、対照と比較してより高レベルの生成物が形成されたことを明らかに示している。無細胞抽出物の代わりに水を用いた陰性対照実験のいずれにおいても、生成物形成は全く観察されなかった。

【0418】

B.w. ω -アミノ酸トランスアミナーゼ (N-ter-His-Tag) 生物変換の条件

基質濃度	10mM
L-グルタミン酸一ナトリウム (アミノ供与体)	100mM
生物触媒のローディング (g/L)	100uL精製N-ter-His-Tag 10uL精製N-ter-His-Tag 1uL精製N-ter-His-Tag
pH	7
温度 (°C)	30°C
最終反応容積	5mL

10

【0419】

B.w. ω-アミノ酸トランスアミナーゼ (N-ter-His-Tag) 生物変換のプロトコル

続いて、14種の生物変換を最終容積1mL中にて実施した。各生物変換物は、10mMセミアルデヒド、100mM L-グルタミン酸一ナトリウム、およびある範囲にわたる精製酵素アリコート容積 (100、10および1μL) で構成した。これは、種々のタンパク質濃度でのトランスアミナーゼ活性を評価するために行った。各生物変換はpH 7で実施し、30°C (250rpm) の振盪インキュベーター内に置いた。試料採取を定期的に行い、HPLCによって分析した。注入の前に、各試料を100°Cに5分間加熱し、14000rpmで2分間遠心分離を行って、0.2ミクロンのシリンジフィルターに通して濾過した。

【0420】

20

B.w. ω-アミノ酸トランスアミナーゼ (N-ter-His-Tag) 生物変換実験の一覧

番号	基質	生物触媒	生物触媒 の容積	注記	
1	6-オキソ-ヘキサン酸	B. w. ω -アミノ酸 トランスアミナーゼ	100 μ L	N-ter-His-Tag精製酵素 アリコート使用	
2	6-オキソ-ヘキサン酸	大腸菌(BL21 DE3)	100 μ L	空ベクターを有する宿主細胞を 用いた陰性対照。 過剰発現菌株と同じ精製工程に 供した。	10
3	6-オキソ-ヘキサン酸	水	100 μ L	細胞の代わりに水を用いた 陰性対照	
4	6-オキソ-ヘキサン酸	B. w. ω -アミノ酸 トランスアミナーゼ	10 μ L		
5	6-オキソ-ヘキサン酸	大腸菌(BL21 DE3)	10 μ L		
6	6-オキソ-ヘキサン酸	B. w. ω -アミノ酸 トランスアミナーゼ	1 μ L		
7	6-オキソ-ヘキサン酸	大腸菌(BL21 DE3)	1 μ L		
8	7-オキソ-ヘプタン酸	B. w. ω -アミノ酸 トランスアミナーゼ	100 μ L	N-ter-His-Tag精製酵素 アリコート使用	20
9	7-オキソ-ヘプタン酸	大腸菌(BL21 DE3)	100 μ L	空ベクターを有する宿主細胞を 用いた陰性対照。 過剰発現菌株と同じ精製工程に 供した。	
10	7-オキソ-ヘプタン酸	水	100 μ L	細胞の代わりに水を用いた 陰性対照	
11	7-オキソ-ヘプタン酸	B. w. ω -アミノ酸 トランスアミナーゼ	10 μ L		30
12	7-オキソ-ヘプタン酸	大腸菌(BL21 DE3)	10 μ L		
13	7-オキソ-ヘプタン酸	B. w. ω -アミノ酸 トランスアミナーゼ	1 μ L		
14	7-オキソ-ヘプタン酸	大腸菌(BL21 DE3)	1 μ L		

【0421】

B. w. ω -アミノ酸トランスアミナーゼ生物変換の結果

精製N-ter-His-Tag B. w. ω -アミノ酸トランスアミナーゼは、6-オキソヘキサン酸および7-オキソヘプタン酸に対して弱い活性を有することが実証された。HPLCの結果は、100 μ Lの精製酵素を投入した実験で所望のアミノ酸生成物が形成されたことを示している。

【0422】

各実験において測定された生成物レベルが同等であったことからみて、C6基質特異性とC7基質特異性との間には有意差は認められないように思われた。しかし、いずれの場合にも、形成された生成物のレベルは極めてわずかであった。

【0423】

関連するクロマトグラムにおける低レベルの生成物ピークの正しい同定を確実にするために、適切な外部標準物質を用いた一連の試料スパイクを実施した。それぞれの場合に、生成物ピークサイズの明らかな増加が観察された。外部標準物質のスパイク容積は、観察されたピーク振幅の増加に比例した。

【0424】

HPLC分析条件

装置：Agilent 1200；カラム：GraceSmart RP C18 150 x 4.6mm、5ミクロン；カラム温度：40℃。流速：1mL／分；検出：UV 338nm；注入容積：14uL

移動相：系統A：5mMリン酸ナトリウム pH 7；系統B：アセトニトリル

勾配：

時間 (分)	%B
0	5
4	25
6	80
8	80
8.5	5
12	5

10

【0425】

採用した各試料に関して、非キラル性HPLCプレカラム誘導体化を以下の通りに実施した：

β-メルカプトエタノール (50 μL)、o-フタルジアルデヒド (50mg)、400mMホウ酸カリウム緩衝液 pH10 (4.5mL) およびメタノール (0.5mL) を含む5mL溶液を調製した。誘導体化は、HPLCのオートサンプラー中にて以下の注入プログラムを用いて行った：2 μLの試料、6 μLの誘導体化混合物、6 μLのホウ酸カリウム緩衝液 pH10を注入器ループ内で混合し、注入前に4分間保持した。

20

【0426】

参照標準物質の濃度：

10mM 6-アミノカプロン酸

10mM 7-アミノヘキサン酸

50mM L-グルタミン酸一ナトリウム

【0427】

結論：アジピン酸セミアルデヒドおよびピメリン酸セミアルデヒドの、対応する6-アミノヘキサン酸および7-アミノヘプタン酸への変換をHPLCによって測定した。セミ-アルデヒドメチルエステルを化学的に調製し、合成の最終段階を、固定化リパーゼを用いた適切なメチルエステルの加水分解としたところ、セミアルデヒド溶液が得られ、それをそれ以上精製せずに用いた。生成物 (ω-アミノ酸) 形成が、ビブリオ・フルビアリス (*Vibrio fluvalis*) およびバチルス・ウェイヘンステファネンシスの両方に由来するωアミノトランスフェラーゼを用いて、C6セミアルデヒドおよびC7セミアルデヒドの両方に関して観察された。ビブリオ・フルビアリス酵素の方が活性が幾分か高かった。

30

【0428】

D-およびL-2-アミノスベレート (7-アミノヘプタン酸を生成するD-またはL-特異的デカルボキシラーゼの基質) の生成のためのD-およびL-特異的アミノ酸アミノトランスフェラーゼ

40

α-ケトスベレートのα-アミノスベレートへの変換を実証するために、大腸菌由来のI1 vE L-AAAT (WT遺伝子：X02413.1 (フラグメント301..1230)；WTタンパク質：1104250A) をL-選択的アミノトランスフェラーゼとして選択し、バチルス・スファエリクス (*Bacillus sphaericus*) D-AAAT (WT遺伝子：U26732.1 (フラグメント427..1278) WTタンパク質：P54693.1) をD-選択的αアミノ酸アミノトランスフェラーゼの一例として選択した。

【0429】

2-オキソ酸基質の調製のための一般的手順



20

ジエチルエステルの調製 (2)

30

トリエチルオキサリル中間体の調製 (3)

40

加水分解および生成物の単離 (4)

50

をアセトン（100mL）中に溶解させて、活性炭（4g）を投入した。懸濁液を室温で一晩攪拌し続けて、セライトパッドに通して濾過した。濾過ケーキをアセトン（5×10mL）で洗浄し、その結果得られた淡黄色の濾過液を濃縮して、淡橙色の油（20.5g）を得た。

【0433】

この生成物を水（10mL）（pH 0.2）中に再び溶解させて、10M水酸化ナトリウムでpH 4に中和した。形成された淡黄色の懸濁液を0℃に冷却した。イソプロピルアルコール（10mL）を攪拌しながら投入した。その結果得られた懸濁液を濾過してオフホワイト色の濾過ケーキ（7.4g）を得て、それを真空乾燥器に移し、一晩かけて乾燥させた。この時点の後に、生成物がオフホワイト色の固体（3.77g）として単離された。NMRを、最終生成物の特性決定のために用いた（スペクトルについては補遺セクションを参照されたい）。

10

【0434】

生物変換の条件

IlvE（L-選択的アミノトランスフェラーゼ）

ラボブック参照符号	RH0912-021-56
基質濃度	10mM
L-グルタミン酸一ナトリウム（アミノ供与体）	50mM
生物触媒のローディング（g/L）	100g/L全細胞（IlvE）
pH	7-7.4
温度（℃）	30℃
最終反応容積	10mL

20

【0435】

B.s. D-AAAT（D-選択的アミノトランスフェラーゼ）

ラボブック参照符号	KG1012-021-59（2-オキソ-スベレート） KG1012-021-93（2-オキソ-ピメレート）
基質濃度	10mM
D-アラニン（アミノ供与体）	50mM
ピリドキサルリン酸補因子	0.4mM
全細胞当量（WCE）に基づく 生物触媒のローディング（g/L）	21g/L全細胞当量
pH	7
温度（℃）	30℃
最終反応容積	5mL

30

【0436】

生物変換のプロトコル

IlvE（L-AAAT）

4種の生物変換を、最終容積5mL中にてそれぞれ実施した。各生物変換物は、10mM基質および50mM L-グルタミン酸一ナトリウムで構成した。生物触媒は、100g/Lの最終濃度が得られるように全細胞として投入した。反応は、30℃で、15mLファルコンチューブ内にて攪拌しながら実施した。各生物変換物を定期的に試料採取し、HPLCによって分析した。注入の前に、各試料を100℃に5分間加熱し、14000rpmで2分間遠心分離を行って、0.2ミクロンのシリンジフィルターに通して濾過した。

40

実験ID	基質	生物触媒	注記
RH0912-56-1	2-オキソ-ピメレート	I1vE全細胞	
RH0912-56-2	2-オキソ-スベレート	I1vE全細胞	
RH0912-56-3	2-オキソ-ピメレート	水	陰性対照
RH0912-56-4	2-オキソ-スベレート	水	陰性対照

【0437】

B. s. D-AAAT

9種の生物変換を、最終容積5mLにて実施した。各生物変換物は、10mM基質、50mM D-アラニン、および0.4mMピリドキサルリン酸で構成した。生物触媒を、21g/L全細胞当量の最終濃度が得られるように無細胞抽出物として投入した。反応は、振盪インキュベーターにおいて、30℃で、15mLファルコンチューブ内で実施した。各生物変換物を定期的に試料採取し、HPLCによって分析した。注入の前に、各試料を100℃に5分間加熱し、14000rpmで2分間遠心分離を行って、0.2ミクロンのシリンジフィルターに通して濾過した。

実験ID	基質	生物触媒	注記
KG1012-59-1	2-オキソ-グルタル酸	B. s. D-AAAT無細胞抽出物	陽性対照
KG1012-59-2	2-オキソ-グルタル酸	I17空ベクター	陰性対照
KG1012-59-3	2-オキソ-グルタル酸	水	陰性対照
KG1012-59-4	2-オキソ-スベレート (ナトリウム塩)	B. s. D-AAAT無細胞抽出物	
KG1012-59-5	2-オキソ-スベレート (ナトリウム塩)	I17空ベクター	陰性対照
KG1012-59-6	2-オキソ-スベレート (ナトリウム塩)	水	陰性対照
KG1012-93-1	2-オキソ-ピメレート (ナトリウム塩)	B. s. D-AAAT無細胞抽出物	
KG1012-93-2	2-オキソ-ピメレート (ナトリウム塩)	I17空ベクター	陰性対照
KG1012-93-3	2-オキソ-ピメレート (ナトリウム塩)	水	陰性対照

【0438】

結論

大腸菌I1vEを用いて、L-2-アミノスベリン酸およびL-2-アミノピメリン酸生成物が、それぞれ2-オキソスベレートおよび2-オキソピメレートから生成されることが首尾良く実証された。生物変換の結果は、外部標準物質のHPLC保持時間を、各生物変換において形成された、観察された生成物ピークと相関づけることによって判定した。

【0439】

対応する誘導体化生成付加物の、逆相C18カラムによる338nmでの検出が可能となるように、非キラル性誘導体化HPLC法を使用した。I1vEはエナンチオ特異性であり、ケト酸からL-アミノ酸のみを形成することが知られているため、簡便性の点からアキラル分析法を用いた。非キラル性誘導体化プロトコルの詳細は補遺セクションに概説されている。

【0440】

これらの条件下で、HPLCによって測定されたL-2-アミノピメリン酸/2-オキソピメレートに対する酵素活性は、L-2-アミノスベリン酸/2-オキソスベレートよりもかなり低いように思われる。この驚くべき結果についてさらに調べるために、2-オキソピメレートの異

なるバッチを用いて生物変換を再度行ったが、同じ結果が得られ、このことは、C8化合物に対する活性がC7化合物に対するよりも実際に高いことを示唆する。このことは、C5アミノ-二酸であるグルタミン酸がこれらのすべての反応に共通するアミノ供与体であることを考慮すれば、特に驚くべきことである。

【0441】

全細胞の代わりに水を用いることによって、陰性対照実験を実施した。これらの実験ではいずれの基質についてもバックグラウンド活性は全く観察されなかった。

【0442】

バチルス・スファエリクスD-AAATを用いて、D-2-アミノグルタミン酸（陽性対照）ならびにD-2-アミノ-スベリン酸およびD-2-アミノ-ピメリン酸生成物が、それぞれ2-オキシグルタレート、2-オキソスベレートおよび2-オキソピメレートから生成されたことが首尾良く実証された。

10

【0443】

生物変換の結果は、外部標準物質のHPLC保持時間を、各生物変換において形成された、観察された生成物ピークと関連づけることによって判定した。

【0444】

さらに、HPLCは、酵素のエナンチオ特異性を実証するためにも用いた。各試料に対するプレカラム誘導体化プロトコルをキラル誘導体化試薬の存在下で用いたところ、対応するジアステレオマー付加物を、逆相C18カラムにより、338nmの波長で分離することができた。

20

【0445】

2種の陰性対照実験を各基質に対して実施した；I17空ベクター細胞、すなわち標的アミノトランスフェラーゼを発現しない大腸菌菌株、および水である。

【0446】

各基質に関するI17空ベクター陰性対照実験において、少量のバックグラウンド変換が観察された。本発明者らは、この結果が、宿主無細胞抽出物におけるバックグラウンドでのアミノトランスフェラーゼ活性が低レベルであることに起因すると予想している。これは、以後に大腸菌における内因性L-AAAT酵素のアミノ供与体として作用する、ある程度のL-アラニンを生産する内因性アラニンラセマーゼ活性の組み合わせである可能性が最も高い。

30

【0447】

これらの条件下で、検出可能なレベルの予想されるアミノ酸は、水陰性対照実験のいずれにおいても観察されなかった。

【0448】

HPLC分析条件：

装置：Agilent 1100；カラム：Phenomenex Kinetex 150 x 4.6mm、5 micro GraceSmart 150 x 4.6mm、5ミクロン；カラム温度：40℃ 流速：1mL／分；検出：UV 338nm；注入容積：14μL

移動相：系統A：5mMリン酸ナトリウム pH 7；系統B：アセトニトリル

勾配：

40

時間 (分)	%B
0	5
4	25
6	80
8	80
8.5	5
12	5

【0449】

50

IlvE実験に関して、非キラル性HPLCプレカラム誘導体化を以下の通りに実施した：

β -メルカプトエタノール (50 μ L)、*o*-フタルジアルデヒド (50mg)、400mMホウ酸カリウム緩衝液 pH10 (4.5mL) およびメタノール (0.5mL) を含む5mL溶液を調製した。誘導体化は、誘導体化は、HPLCのオートサンプラー中にて以下の注入プログラムを用いて行った：2 μ Lの試料、6 μ Lの誘導体化混合物、6 μ Lのホウ酸カリウム緩衝液 pH10を注入器ループ内で混合し、注入前に4分間保持した。

【0450】

D-AAAT実験に関して、キラル性HPLCプレカラム誘導体化を以下の通りに実施した：

Boc-L-システイン (128mg)、*o*-フタルジアルデヒド (50mg)、400mMホウ酸カリウム緩衝液 pH10 (4.5mL) およびメタノール (0.5mL) を含む5mL溶液を調製した。誘導体化は、HPLCのオートサンプラー中にて以下の注入プログラムを用いて行った：2 μ Lの試料、6 μ Lの誘導体化混合物、6 μ Lのホウ酸カリウム緩衝液 pH10を注入器ループ内で混合し、注入前に4分間保持した。

【0451】

参照標準物質の濃度：

10mM D-グルタミン酸；10mM DL-2-アミノスベリン酸；10mM DL-2-アミノピメリン酸；10mM L-2-アミノスベリン酸；50mM D-アラニン；50mM L-MSG

【0452】

3.1.7 α -アミノデカルボキシラーゼ (EC 4.1.1.-) による α -アミノスベリン酸の7-アミノヘプタン酸への変換 (図10参照)

適切な触媒を、 α -アミノスベリン酸の脱カルボキシル化のための候補物として α -アミノ酸デカルボキシラーゼから、特にアスパラギン酸4-デカルボキシラーゼ (EC 4.1.1.11)、グルタミン酸デカルボキシラーゼ (EC 4.1.1.15)、リジンデカルボキシラーゼ (EC 4.1.1.18)、ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ (EC 4.1.1.20) およびジアミノ酪酸デカルボキシラーゼ (EC 4.1.1.86) から選択した。

【0453】

大腸菌GadAグルタミン酸デカルボキシラーゼおよび大腸菌LysAジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼを最初にこれらの群のタンパク質から選択した。他の適切な酵素は、メタノカルドコッカス・ジャナスキイ由来のLysA (AAB99100) (EC 4.1.1.20) (Ray, S.S., et al., Cocystal structures of diaminopimelate decarboxylase: mechanism, evolution, and inhibition of an antibiotic resistance accessory factor. Structure, 2002.10 (11) : p.1499-508)、ならびに大腸菌に存在するリジンデカルボキシラーゼ: 嫌気的条件下でリジンによって誘導性であり、非常に高い活性を有するCadA (AAA23536) および構成的に発現されるがリジンに対してより低い活性を有するLdc (受託番号D87518) (Kikuchi, Y., et al., Characterization of a second lysine decarboxylase isolated from Escherichia coli. J Bacteriol, 1997.179 (14) : p.4486-9) を含む。

【0454】

選択した遺伝子に対応するDNA配列ならびにそれらの関連タンパク質配列をSEQ ID 15~18に示す。大腸菌LysAジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼの配列は、先に述べたように大腸菌コドン最適化遺伝子として選択した (Preparation of 6-aminocaproic acid from 5-formyl valeric acid: DSM - US2011-0171699 A1特許)。大腸菌 GadAグルタミン酸デカルボキシラーゼは野生型配列として選択した。先の例で述べた方法を用いて遺伝子をクローン化し、発現させた。

【0455】

先に調製した構築物 (I29:pET21-GadAおよびI30:pET21-LysA) に加えて、2つのさらなる構築物を、inABLE技術を用いてilvEフラグメント (以下の集合体I31およびI32) の導入によって調製した。関心対象のタンパク質の上流の大腸菌分枝アミノ酸アミノトランスフェラーゼ (IlvE) の15アミノ酸のN末端ペプチドの導入は、大腸菌における一部のタンパク質標的の発現上昇をもたらすことが以前に示されている。

遺伝子	アクセッション番号
I29 大腸菌GadA WT配列	M84024.1
I30 大腸菌LysA (大腸菌コドン最適化)	JA114145.1
I31 大腸菌GadA iLvE	iLvE遺伝子の最初の45塩基を GadA遺伝子と融合させた
I32 大腸菌LysA iLvE	iLvE遺伝子の最初の45塩基を LysA遺伝子と融合させた
iLvE (野生型配列)	X02413.1 (野生型配列) フラグメント301-1230

10

【0456】

発現結果を以下に要約する。

集合体	タンパク質	可溶性画分		不溶性画分	
		4時間	24時間	4時間	24時間
I29	大腸菌 GadA	++	+	+++	+++
I30	大腸菌 LysA	+	+	+	+
I31	大腸菌 GadA ilvE	+	++	+++	++
I32	大腸菌 LysA ilvE	+++	++	+	+

20

【0457】

活性アッセイのためのタンパク質抽出物の調製

誘導後24時間の試料からのあらかじめ凍結した細胞ペレットを、1.5mgのリゾチームを添加した、0.1mMトリス、1mg/mlペプスタチンAおよび200mM PMSFプロテアーゼ阻害剤からなるビーズ溶解緩衝液に再懸濁した（5のOD₆₀₀で1mLの培養物からの細胞ペレットの溶解のために161μLの混合物を使用すべきである）。酸で洗った212~300μmのガラスビーズ（溶解緩衝液1mL当たり0.4g）を各試料に添加した。全速力でボルテックスする30秒のバースト、次いで氷上で30秒のインキュベーションを合計10分間反復することによって溶解を実施した。

【0458】

1mLの試料を取り、残りの培養物を活性アッセイに使用した。1mL試料を13000rpmで2分間遠心分離し、上清を分離した。上述したようにSDS試料を調製し、SDS-PAGEゲルで分析した（図18）。溶解後、バグバスターによって溶解した、1mL試料中には存在しない大腸菌GadA ilvE (I31) タンパク質についての可溶性画分に大きなバンドが存在する（図18、レーン4）。以前に高い可溶性発現を示した、大腸菌LysA (I32) タンパク質は、ビーズ溶解ではあまり可溶性発現を示さなかった（図18、レーン5）。これは溶解方法の大きな変動性を示し得る。次に粗細胞抽出物を使用して4つの構築物I29~I32から発現されたタンパク質の活性を観測した。

30

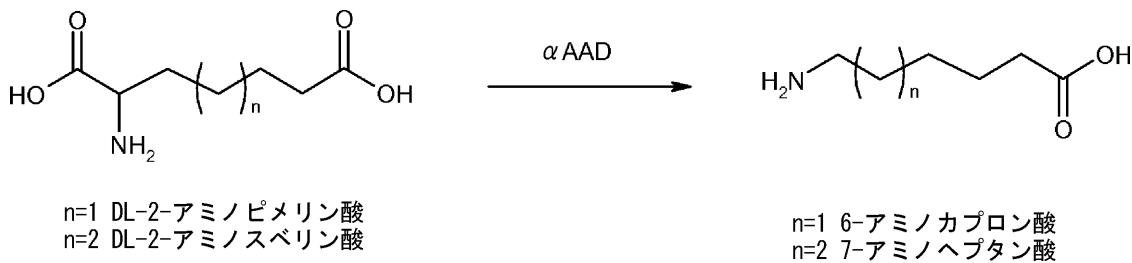
【0459】

生物変換反応のために、より大規模な培養を行い、20g/L全細胞当量を含む無細胞抽出物を調製した。空ベクターを保有する宿主細胞を対照として用いた。

40

【0460】

生物変換は、2-アミノスベレートならびに2-アミノヘプタン酸に対する活性をアッセイするために行った。各生物変換物は、10mM基質、10ug/mLピリドキサルリン酸および1mM β-メルカプトエタノールで構成し、1M水酸化ナトリウムでpH 7に調整した。生物触媒は、20g/L全細胞当量の最終濃度が得られるように無細胞抽出物として投入した。反応は、30℃で、15mLファルコンチューブ内で攪拌しながら実施した。各生物変換物を定期的に試料採取し、HPLCによって分析した。注入の前に、各試料を100℃に5分間加熱し、14000rpmで2分間遠心分離を行って、0.2ミクロンのシリンジフィルターに通して濾過した。



【0461】

反応混合物を、HPLCによって以下の通りに分析した：

装置：Agilent 1100；カラム：GraceSmart RP C18 150 x 4.6mm、5ミクロン；カラム温度：40℃。流速：1mL／分。検出：UV 338nm。注入容積：14uL。

移動相：系統A：5mMリン酸ナトリウム pH 7；系統B：アセトニトリル

勾配：

時間 (分)	%B
0	5
4	25
6	80
8	80
8.5	5
12	5

【0462】

採用した各試料に関して、非キラル性HPLCプレカラム誘導体化を以下の通りに実施した：

β -メルカプトエタノール (50 μ L)、o-フタルジアルデヒド (50mg)、400mMホウ酸カリウム緩衝液 pH10 (4.5mL) およびメタノール (0.5mL) を含む5mL溶液を調製した。誘導体化は、HPLCのオートサンプラー中にて以下の注入プログラムを用いて行った：2 μ Lの試料、6 μ Lの誘導体化混合物、6 μ Lのホウ酸カリウム緩衝液 (pH10) を注入器ループ内で混合し、注入前に4分間保持した。

【0463】

参照標準物質の濃度：

10mM 6-アミノヘキサン酸

10mM 7-アミノヘプタン酸

10mM DL-2-アミノスベリン酸

10mM DL-2-アミノピメリン酸

【0464】

すべての α -アミノ酸デカルボキシラーゼが、2-アミノピメリン酸および2-アミノスベリン酸に対する活性を有することが首尾良く実証された。対応する6-アミノヘキサン酸および7-アミノヘプタン酸生成物の形成をHPLCによって測定した。生成物ピークの実体は、それらの各々の外部標準物質の保持時間と関連づけることによって判定した。

【0465】

I29、I30およびI31菌株を評価した実験では、両方の基質に対して、より低レベルの活性が観察された。正しいピークが同定されたことを確実にするために、いくつかの試料に、対応する外部標準物質によるスパイク刺激を行った。

【0466】

いずれの基質についても、I32大腸菌LysA iLvEは最良の結果をもたらしたが、このことは他の菌株と比較してより高い活性を実証している。

【0467】

加えて、空ベクター細胞、すなわち標的デカルボキシラーゼを発現しない大腸菌菌株を

用いた陰性対照実験でも、極めて低レベルの各生成物が観察された。本発明者らは、これらの結果は、宿主無細胞抽出物におけるバックグラウンドのデカルボキシラーゼ活性に起因すると推測している。

【0468】

しかし、HPLCの結果は、どちらの基質に関しても、デカルボキシラーゼ酵素を過剰発現する細胞を含めた実験において、陰性対照と比較してより高レベルの生成物が形成されたことを明らかに示している。無細胞抽出物の代わりに水を用いた陰性対照実験のいずれにおいても、生成物形成は全く観察されなかった。

【0469】

7-アミノヘプタン酸に対応する認められたピークの濃度を図19に示す。

10

【0470】

3.1.8 α -ケトデカルボキシラーゼ (EC 4.1.1.-) による α -ケトスベリン酸のピメリン酸への変換

3.1.8.1 適切な触媒の選択

デカルボキシラーゼのファミリーの中で、 α -ケト酸デカルボキシラーゼ、特にピルビン酸デカルボキシラーゼ (EC 4.1.1.1)、ベンゾイルギ酸デカルボキシラーゼ (EC 4.1.1.7) および分枝鎖2-オキソ酸デカルボキシラーゼ (EC 4.1.1.72) は、 α -ケトスベリン酸の脱カルボキシル化のための最良の候補物として浮上した。

【0471】

これら4つの群の各々からのタンパク質をコードする遺伝子は広範囲の宿主から同定されており、それらの生成物は生化学的におよび一部の場合は構造的に特性づけられている (The crystal structure of benzoylformate decarboxylase at 1.6Å resolution - Diversity of catalytic residues in ThDP-dependent enzymes: Hasson et al. Biochemistry 1998, 37, 9918-9930; High resolution crystal structure of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*: Dobritzsch et al. J. Biol. Chem. 1998, 273, 20196-20204; Structure of the branched-chain keto acid decarboxylase (KdcA) from *Lactococcus lactis* provides insights into the structural basis for the chemoselective and enantioselective carbonylation reaction: Berthold et al. Acta Crystallographica Sec. D 2007, D63, 1217-1224)。

20

【0472】

次に、これらの群の中から以下の酵素をそれらの基質特異性に従って選択した: ラクトコッカス・ラクティス kivD 2-ケトイソ吉草酸デカルボキシラーゼ (GeneBank JA114157); ラクトコッカス・ラクティス kdcA 分枝鎖 α -ケト酸デカルボキシラーゼ (GeneBank JA114154)、サッカロミセス・セレビスエ pdc1 ピルビン酸デカルボキシラーゼ (GeneBank JA114148)、ザイモモナス・モビリス pdc (I472A) ピルビン酸デカルボキシラーゼ突然変異体 (GeneBank JA114151)、シュードモナス・プチダ md1C (A460I) ベンゾイルギ酸突然変異体 (GeneBank AY143338; フラグメント 2860-4446)。

30

【0473】

最初の4つの酵素は、以前に、標的化合物である α -ケトスベリン酸のC-7誘導体、 α -ケトピメリン酸の脱カルボキシル化においてある程度の活性を示した (Preparation of 6-aminocaproic acid from 5-formyl valeric acid: DSM - US2011-0171699 A1 特許)。

40

【0474】

シュードモナス・プチダ由来のベンゾイルギ酸デカルボキシラーゼのA460I突然変異体の特性づけは、2-ケトオクタン酸に対して低い活性を示す野生型酵素と比較して (Comparative characterisation of ThPP-dependent decarboxylases: Gocke et al. J. Mol. Cat. B: Enzymatic 2009, 61, 30-35)、2-ケトヘキササン酸に対する高い選択性を示した (Exchanging the substrate specificities of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis* and benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida*: Siegert et al. Port. Eng. Des. Sel. 2005, 18, 345-357)。

【0475】

50

3.1.9 デカルボキシラーゼ活性を有する推定アセト乳酸シンターゼによる α -ケトスベリン酸のピメリン酸セミアルデヒドへの変換

補酵素B [(7-メルカプトヘプタノイル) スレオニンリン酸]の合成のための経路は、古細菌における他の代謝経路の分析ならびに²Hおよび¹³C標識前駆体の最終生成物への組み込みの質量分析に基づき、White [White RH (1989) Biosynthesis of the 7-mercaptoheptanoic acid subunit of component B [(7-mercaptoheptanoyl) threonine phosphate] of methanogenic bacteria, *Biochemistry*, 28:860-865]によって主張された。この経路は、仮定上の2-ケト酸デカルボキシラーゼによって媒介される2-ケトスベリン酸の7-オキシヘプタン酸 (ピメリン酸セミアルデヒド) への非酸化的脱カルボキシル化段階を含む。次の段階では、7-メルカプトヘプタン酸が形成される。この生成物だけが形成される (C5およびC6等価物は形成されない) ので、これは、経路の上流の酵素の少なくとも1つがC8基質だけを受け入れ、C6およびC7基質は受け入れないことを示す。

【0476】

経路は、GC-MS を用いた2-ケトグルタレートから2-ケトスベレートへの2-ケトジカルボン酸伸長反応の確認[White RH (1989) A novel biosynthesis of medium chain length α -ketodicarboxylic acids in methanogenic archaeobacteria. *Archivers of Biochemistry and Biophysics*, 270:691-697]ならびに7-オキシヘプタン酸からの7-メルカプトヘプタン酸および補酵素Bの合成[White RH (1989) Steps in the conversion of α -ketosuberate to 7-mercaptoheptanoic acid in methanogenic bacteria, *Biochemistry*, 28:9417-9423; White RH (1994) Biosynthesis of 7-mercaptoheptanoylthreonine phosphate, *Biochemistry*, 33:7077-7081]によって検証された。経路の段階の一部に関与する酵素をコードする遺伝子 (aksA、aksD、aksEおよびaksF) は同定され、大腸菌においてクローン化され、発現されているが、2-ケトスベリン酸デカルボキシラーゼをコードする遺伝子は同定、クローン化および発現されてされていない[Howell DM, Harich K, Xu H, White RH. (1998) α -keto acid chain elongation reactions involved in the biosynthesis of coenzyme B (7-mercaptoheptanoyl threonine phosphate) in methanogenic Archaea. *Biochemistry*, 37:10108-10117; Howell DM, Graupner M, Xu H, White RH. (2000) Identification of enzymes homologous to isocitrate dehydrogenase that are involved in coenzyme B and leucine biosynthesis in methanobacteria. *J Bacteriol.* 182:5013-5016; Drevland RM, Jia Y, Palmer DR, Graham DE. (2008) Methanogen homoaconitase catalyzes both hydrolyase reactions in coenzyme B biosynthesis. *J Biol Chem.* 283:28888-28896]。2-ケトスベリン酸の7-オキシヘプタン酸への非酸化的脱カルボキシル化については不明であり、この活性はインビトロでは報告されていない。しかし、2-ケトスベリン酸は全細胞によって補酵素Bに変換された[White RH (1989)]。

【0477】

方法

WhiteとGrahamによって行われた研究は、古細菌 (Archaeobacteria) (メタノカルドコックス・ジャナスキイのような) が2-ケトスベリン酸の7-オキシヘプタン酸への非酸化的脱カルボキシル化に関与する酵素を有する可能性があることを示した。補酵素B経路に関わる他の酵素は、M. ジャナスキイ [Bult CJ, White O, Olsen GJ, Zhou L, Fleischmann RD, Sutton GG, Blake JA, FitzGerald LM, Clayton RA, Gocayne JD, Kerlavage AR, Dougherty BA, Tomb JF, Adams MD, Reich CI, Overbeek R, Kirkness EF, Weinstock KG, Merrick JM, Glodek A, Scott JL, Geoghagen NS, Venter JC. (1996) Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science*. 273:1058-1073] およびメタノバクテリウム・サーモオートトロフィカム (*Methanobacterium thermoautotrophicum*) Δ H [Smith DR, Doucette-Stamm LA, Deloughery C, Lee H, Dubois J, Aldredge T, Bashirzadeh R, Blakely D, Cook R, Gilbert K, Harrison D, Hoang L, Keagle P, Lumm W, Pothier B, Qiu D, Spadafora R, Vicaire R, Wang Y, Wierzbowski J, Gibson R, Jiwani N, Caruso A, Bush D, Reeve JN, (1997) Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* Δ H: functional analysis and comparative genomics. *J Bacteriol.* 179:7135-7155] のゲノム

の分析によって同定された。ゲノムを標的遺伝子クラスターの存在に関して分析し、既存の酵素に相同性を示すタンパク質についてBLAST検索した。我々は、2-ケトスベリン酸デカルボキシラーゼをコードする遺伝子を同定するために同様のアプローチをとった。

【0478】

結果

遺伝子クラスターの分析

細菌ゲノムは、特定の経路において役割を果たす酵素をコードする遺伝子がオペロンおよび/または遺伝子クラスターに局在する、高レベルの組織化を示し得る。補酵素B経路の他の酵素が同定されており、一部の古細菌ゲノムの配列が公表されているので、2-ケトスベリン酸デカルボキシラーゼを同定することを試みた。以下の表はこの経路に関わる遺伝子および酵素を示す。

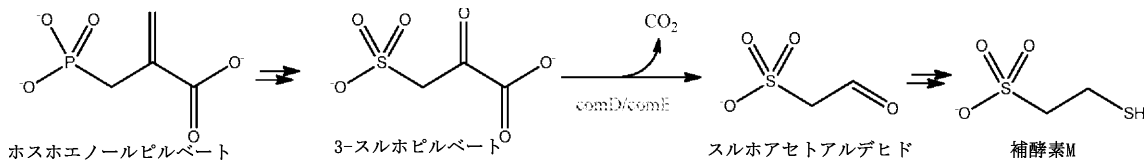
酵素	反応	遺伝子	
		メタノカルドコッカス・ジャナスキイ	メタノバクテリウム・サーモオートトロフィカム
<i>AksA</i> (R)-ホモクエン酸 シンターゼ	α -ケトグルタレートとアセチルCoAの縮合； α -ケトアジペートおよび α -ケトピメレートのアセチルCoAへの縮合；	MJ0503	MTH1630
<i>AksDAksE</i> ホモクエン酸 シンターゼ/ デヒドラターゼ および シスホモアコニット酸 ヒドラターゼ	(R)-ホモシトレートおよび類似体のシスホモアコニテートまたはそれぞれの類似体への脱水、ならびに生成物のホモイソシトレートおよびそのそれぞれの類似体への水和	MJ1003 MJ1271	MTH1113 MTH1631
<i>AksF</i> NAD依存性 スレオ-イソクエン酸 デヒドロゲナーゼ	(-) -スレオ-イソホモシトレート、 (-) -スレオ-イソ(ホモ) ₂ シトレート および(-)-スレオ-イソ(ホモ) ₃ シトレートのNAD依存性脱カルボキシル化	MJ1596	MTH0184
2-ケトスベリン酸 デカルボキシラーゼ	2-ケトスベリン酸の 脱カルボキシル化	??	??
メルカプトヘプタン 酸シンターゼ		??	??
メルカプトヘプタノ イルスレオニン シンターゼ		??	??
N-(7-メルカプト ヘプタノイル) -3-O-ホスホノ -L-スレオニン シンターゼ		??	??

M. ジャナスキイおよびM. サーモオートトロフィカム由来の補酵素B生合成遺伝子は、M. サーモオートトロフィカムにおける (R) -ホモクエン酸シンターゼ (MTH1630) およびホモクエン酸シンターゼ/デヒドラターゼラージサブユニット (MTH1631) をコードする遺伝子を除き、遺伝子クラスターに存在するとは思われなかった。上記に列挙した遺伝子のいずれかを含む仮説上のオペロンの分析は、公知のデカルボキシラーゼに相同性を有するいかなるタンパク質の存在も示さなかった。それゆえ、M. ジャナスキイにおける関連代謝経路中の類似の脱カルボキシル化に関して検索を行った。

【0479】

メタノカルドコッカス・ジャナスキイゲノムの分析

M. ジャナスキイにおける他の代謝経路の分析は、類似の脱カルボキシル化が補酵素M経路に存在することを示した[Graupner M, Xu H and White RH. (2000) Identification of the gene encoding sulfopyruvate decarboxylase, an enzyme involved in biosynthesis of coenzyme M. J Bacteriol. 182:4862-4867]。



【0480】

BRENDAデータベースにおいて見出されるcomD、comEおよびそれらのオルソログを、メタノカルドコッカス・ジャナスキイのBLAST検索のクエリとして使用した。メタノセラ属メタン生成古細菌 (*Methanocella paludicola*) 由来のcomD/comEデカルボキシラーゼ (SEQ ID 21) を使用して最良の適合を得た。

【0481】

M. ジャナスキイゲノムによってコードされる2つのオープンリーディングフレーム (MJ0277および MJ0663) だけが、E値<0.0001で comD/comEに有意の相同性を示した。これらはどちらもアセト乳酸シンターゼと注釈された (SEQ ID 22およびSEQ ID 23)。

【0482】

BRENDAデータベースに寄託されている、類似の基質を受け入れるデカルボキシラーゼ (2-ケトグルタル酸デカルボキシラーゼ、オキサロ酢酸デカルボキシラーゼ、 α -ケトイソ吉草酸デカルボキシラーゼ、アミノ基転移アミノ酸デカルボキシラーゼ、ベンゾイルギ酸デカルボキシラーゼ、2-ケトアルギニンデカルボキシラーゼ、ホスホノピルビン酸デカルボキシラーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼおよびインドール-3-ピルビン酸デカルボキシラーゼ) の配列を使用して別の検索を実施した。

クエリ (名称 および UNIPROT エントリ)	基質	供給源	ヒット (E 値<10 ⁻⁴)
Kgd Q9CC97	2-ケトグルタル酸 デカルボキシラーゼ EC 4.1.1.71	マイコバクテリウム ・ レプレ (<i>Mycobacterium leprae</i>)	ヒットなし
citM Q7X4Z5	オキサロ酢酸 デカルボキシラーゼ	ラクトコッカス ・ ラクティス	ヒットなし
kivd Q684J7	α -ケトイソ吉草酸 デカルボキシラーゼ EC 4.1.1.1	ラクトコッカス ・ ラクティス	NP_247250.1 アセト乳酸シンターゼ 触媒サブユニット E 値 :8e-29 NP_247647.1 アセト乳酸シンターゼ 大サブユニット IlvB5e-19

ARO10 Q06408	アミノ基転移 アミノ酸 デカルボキシラーゼ EC 4.1.1.-	サッカロミセス ・セレビシエ (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	NP_247250.1 アセト乳酸シンターゼ 触媒サブユニット 2e-17 NP_247647.1 アセト乳酸シンターゼ 大サブユニット IlvB9e-12 P58416.1 スルホピルビン酸 デカルボキシラーゼサブユニット β 4e-04
MdIC Q97XR3	ベンゾイルギ酸 デカルボキシラーゼ EC 4.1.1.7	スルホロブス・ ソルファタリカス	NP_247250.1 アセト乳酸シンターゼ 触媒サブユニット 3e-23 NP_247065.1 シグナル認識粒子 タンパク質 Srp54 6e-04 2V3C_C Srp54-Srp19-7s.S SrpRna の結晶構造 6e-04 3NDB_B シグナルに結合した シグナル配列の結晶構造 6e-04
arul B7V368	2-ケトアルギニン デカルボキシラーゼ	緑膿菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	NP_247250.1 アセト乳酸 シンターゼ触媒サブユニット 4e-71 NP_247647.1 アセト乳酸 シンターゼ大サブユニット 2e-38 NP_248425.1 コビリン酸a, c- ジアミドシンターゼ 4e-05
fom2 Q6D9X5	ホスホノピルビン酸 デカルボキシラーゼ	エルウィニア・ カロトボラ亜種 アトロセプチカ (<i>Erwinia carotovora</i> subsp. atroseptica) (<i>Pectobacterium atrosepticum</i>)	P58416.1 スルホピルビン酸 デカルボキシラーゼサブユニット β 3e-20 P58415.1 スルホピルビン酸 デカルボキシラーゼサブユニット α 2e-11 NP_247516.1 2-オキソグルタル酸 フェレドキシンオキシドレダクターゼ サブユニット β 2e-05 NP_247250.1 アセト乳酸 シンターゼ触媒サブユニット 6e-04

10

20

30

40

PDC6 P26263	ピルビン酸 デカルボキシラーゼ イソ酵素3 4.1.1.1	サッカロミセス ・セレビシエ	NP_247250.1 アセト乳酸 シンターゼ触媒サブユニット 6e-23 NP_247647.1 アセト乳酸 シンターゼ大サブユニット IIvB9e-14 P58416.1 スルホピルビン酸 デカルボキシラーゼサブユニット β 6e-04 NP_247310.1 仮説上のタンパク質 MJ_0337 9e-04
IpdC F2EPZ5	インドール-3- ピルビン酸 デカルボキシラーゼ	パントエア・ アナナティス (<i>Pantoea</i> <i>ananatis</i>)	NP_247250.1 アセト乳酸 シンターゼ触媒サブユニット 6e-22 NP_247647.1 アセト乳酸 シンターゼ大サブユニット 7e-12 NP_247516.1 2-オキソグルタル酸 フェレドキシンオキシドレダクターゼ サブユニット β 9e-05

10

20

【0483】

MJ0277（受託番号NP_247250）およびMJ0663（NP_247647）は、ゲノムを検索するのに使用したクエリのほとんどすべてについて良好なヒットであった。ClustalWアルゴリズムを用いたタンパク質アラインメントは、MJ0277とcomD/comEタンパク質の間に有意の相性を示した（図20）。しかし、MJ0277はラクトコッカス・ラクティス由来のLACLAアセト乳酸シンターゼに対してさらにいっそう高い相性を示した（図21）。

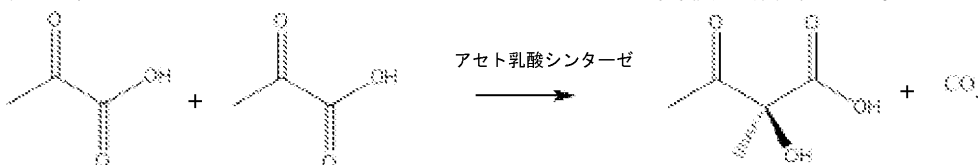
【0484】

LACLAアセト乳酸シンターゼ、メタノセラ属メタン生成古細菌由来のcomD/comEおよび仮説上のアセト乳酸シンターゼMJ0277における機能性ドメインの分析は、これらのすべてがリン酸チアミン結合部位を含む類似の構造を有することを示した（図22）。メタノカルドコッカス・ジャナスキイ由来の第2のオープンリーディングフレームMJ0663についてもほとんど同じ結果を得た。

30

【0485】

アセト乳酸シンターゼ（ALS）酵素（アセトヒドロキシ酸シンターゼとしても知られる）は、ピルベートの α -アセトラクテートへの変換を触媒する。



40

【0486】

反応の第一段階は、ピルベート（2-ケト酸である）の酵素結合中間体への脱カルボキシル化であり、前記中間体はさらに第2のピルベート分子と縮合してアセトラクテートを生じる。したがって、2-ケト酸デカルボキシラーゼおよびアセト乳酸シンターゼは互いに高い相性を示す可能性がある。

【0487】

結論

M. ジャナスキイゲノムの分析は、アセト乳酸シンターゼと注釈される2つのタンパク質（MJ0277およびMJ0663）の存在を示し、これらは、補酵素B合成に関与するこれまで同

50

定されていなかった2-ケトスベリン酸非酸化的デカルボキシラーゼである可能性がある。この第2のヴァージョンのアセト乳酸シンターゼ (MJ0663) を見たところ有すると思われるのは、メタン生成菌種のみであり、例えば、メタノカルドコッカス・フェルベンス (*Methanocaldococcus fervens*) (NC_013156.1) (座位YP_003128272) ; メタノトリリス・イグネウス (*Methanotorris igneus*) Kol 5 (NC_015562.1) (座位YP_004483786) およびメタノカルドコッカス・インフェルヌス (*Methanocaldococcus infernus*) ME (NC_014122.1) (座位YP_003615749) はすべて、MJ0663に関する陽性率が75%を上回るタンパク質を有する。メタン非生成菌種でMJ0663に対する陽性率が50%を上回るものはない。他の菌種は、MJ0277、メタノカルドコッカス・フェルベンス (座位YP_003127480) ; メタノトリスコッカス・イグネウス Kol 5 (座位YP_004484320) およびメタノカルドコッカス・インフェルヌス ME (座位YP_003615992) に対する相同性を有する第2の遺伝子を有し、この遺伝子はアセト乳酸シンターゼと注釈されている。この遺伝子は、他のメタン非生成生物におけるアセト乳酸シンターゼとの相同性を有する。

10

20

30

40

50

【0488】

それらの1つが真のアセト乳酸シンターゼである可能性は非常に高い。この酵素活性は多くの古細菌で示されており、M. ジャナスキイはアセト乳酸シンターゼ調節サブユニット、MJ0161をコードする。しかし、これらの酵素の1つが未同定の2-ケト酸デカルボキシラーゼであって、単に注釈づけが誤っている可能性もある。可能性が高い。アセト乳酸シンターゼの小サブユニットである調節性サブユニットMJ0161またはILVN (メタノカルドコッカス・ジャナスキイの座位NP_247129) が、MJ0277またはMJ0663のデカルボキシラーゼ活性に求められる可能性が高い。これは、AHAS/ILVBの二量体または可能性としては四量体のホロ酵素に対して同数で結合する、ほぼ190aaの小サブユニットである。ILVNはバリン濃度に反応して、過剰産生を防止するフィードバックとして作用する (Barak and Chipman 2012)。ILVBホロ酵素の効率はILVNの非存在下では5~15%に過ぎず、調節ユニットはそれ単独では活性を全く有しない (M. Vyazmensky, C. Sella, Z. Barak, D.M. Chipman. Isolation and Characterization of Subunits of Acetohydroxy Acid Synthase Isozyme III and Reconstitution of the Holoenzyme. *Biochemistry*, 35 (1996), pp. 10339-10346)。

【0489】

あるいは、2-ケトスベリン酸が、補酵素M経路における3-スルホピルビン酸の脱カルボキシル化の原因となる酵素によって脱カルボキシル化される可能性もある。したがって、comD/comEデカルボキシラーゼも標的酵素として考慮すべきである。

【0490】

アセト乳酸シンターゼMJ0277 (NP_247250) およびMJ0663 (NP_247647) と注釈されているタンパク質を、2-ケトアジピン酸、2-ケトピメリン酸および2-ケトスベリン酸の非酸化的脱カルボキシル化のための主要な候補として同定した。アセト乳酸シンターゼは、2-ケト酸の脱カルボキシル化を触媒することが報告されている (Atsumi, S. et al., 2009. A cetolactate synthase from *Bacillus subtilis* serves as a 2-ketoisovalerate decarboxylase for isobutanol synthesis in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(19): 6306-6311)。加えて、3-スルホピルビン酸デカルボキシラーゼ comD/comE (P58415/P58416)、Kgd (Q9CC97)、citM (Q7X4Z5)、kivd (Q684J7)、AR010 (Q06408)、MdlC (Q97XR3)、aruI (B7V368)、fom2 (Q6D9X5)、PDC6 (P26263) および IpdC (F2EPZ5) は、2-ケトスベリン酸のピメリン酸セミアルデヒドへの変換についての優れた候補物である (SEQ ID 24~40)。

【0491】

3.1.10 α -ケト酸の鎖伸長による α -ケトピメリン酸の α -ケトスベリン酸への変換 (図10参照)

3.1.10.1 酵素遺伝子標的の選択

α -ケトピメリン酸の α -ケトスベリン酸への変換は、以前にメタン生成古細菌、例えばメタノカルドコッカス・ジャナスキイ、メタノコッカス・バンニエリ (*Methanocaldococcus*

us vannielii)、メタノカルドコッカス・マリパルデイス (Methanocaldococcus maripaludis)、メタノバクテリウム・サーモオートトロフィカム、メタノサルシナ・サーモフィラ等における補酵素Bの生合成の一部であると報告された (White, Arch. Biochem. Biophys. 270:691-697 (1989))。ロイシンおよびリジン生合成に参与する酵素に相同な、 α -ケトグルタル酸からスベリン酸への複数回の鎖伸長に参与する酵素をコードする遺伝子がメタノカルドコッカス・ジャナスキイから同定され、それらの対応するタンパク質が特性づけられた (α -keto acid chain elongation reactions involved in the biosynthesis of coenzyme B (7-mercaptoheptanoyl threonine phosphate) in Howell et al., Biochemistry 37:10108-10117 (1998) ; Drevland et al., J. Bacteriol. 189:4391-4400 (2007) ; Howell et al., J. Bacteriol. 182:5013-5016 (2000) ; Drevland et al., J. Biol. Chem. 283:28888-28896 (2008) ; and Jeyakanthan et al., Biochemistry 49:2687-2696 (2010))。

10

【0492】

オルソロガス遺伝子もメタノバクテリウム・サーモオートトロフィカムから同定されたが、それらの生成物はまだ特性づけられていない。少なくとも2つの同質遺伝子が、以前にメタノカルドコッカス・ジャナスキイにおいて報告されたように、必要とされる活性 (AskA、AksD/EおよびAksF) の各々についてこの古細菌で報告された (Smith et al. 1997, 179, 7135-7155)。以下の表は、先に言及した文献およびそれらの可能性のある推定上の機能に基づき、十分に特性づけられたメタノカルドコッカス・ジャナスキイタンパク質と共に対応するメタノバクテリウム・サーモオートトロフィカムタンパク質のオルソロジーを提示する。

20

酵素活性	M. ジャナスキイ タンパク質	M. ジャナスキイ タンパク質の機能	オルソログスM. サーモオート トロフィカムタンパク質
AksA: 2-イソプロピルリンゴ酸 シンターゼ/ホモクエン酸 シンターゼ	MJ0503	トランスホモアコニテート を形成する α -ケトグルタレートと アセチルCoAの縮合; α -ケトスベレート合成 における機能	MTH1630
	MJ1195	ロイシン生合成における アセチルCoAおよび 2-オキソイソバレレート からの2-イソプロピルマレート の形成	MTH1481
AksD: 3-イソプロピルリンゴ酸 デヒドラターゼ/ ホモアコニターゼ (大サブユニット)	MJ1003	MJ1271と結合した場合に シス-ホモ _n アコニテート (n=1~4)を形成; α -ケトスベリン酸の 生成に関与する	MTH1631
	MJ0499	ロイシン生合成に 関与する	MTH1386
AksE: 3-イソプロピルリンゴ酸 デヒドラターゼまたは イソメラーゼ/ ホモアコニターゼ (小サブユニット)	MJ1271	MJ1003と結合した場合に シス-ホモ _n アコニテート (n=1~4)を形成; α -ケトスベリン酸の 生成に関与する	MTH0829 : ホモアコニターゼの 特徴である YLTRコンセンサス配列 を含む
	MJ1277	ロイシン生合成に 関与する	MTH1387 : イソプロピルリンゴ酸 イソメラーゼの 特徴である YLVMコンセンサス 配列を含む

10

20

30

40

AksF: 3-イソプロピルリンゴ酸 デヒドロゲナーゼ/ ホモイソクエン酸 デヒドロゲナーゼ	MJ1596	α -ケトスベリン酸の 生成に関与する	MTH1388
	MJ0720	ロイシン生合成に 関与する	MTH0184

10

【0493】

メタノバクテリウム・サーモオートトロフィカムにおける鎖伸長タンパク質のオルソログの同定は、メタノカルドコッカス・ジャナスキイとメタノバクテリウム・サーモオートトロフィカムゲノムの間の比較ゲノミクスデータ、対応するタンパク質の配列分析および活性アッセイから文献で報告された。選択的なメタノバクテリウム・サーモオートトロフィカム遺伝子産物およびそれらの対応するメタノカルドコッカス・ジャナスキイオルソログの、 α -ケトピメリン酸の合成のための潜在的な適用が報告された（国際公開公報第2010-104391 A2号）。それゆえ、8つのメタノバクテリウム・サーモオートトロフィカムタンパク質、すなわちAksA 2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ/ホモクエン酸シンターゼMTH1630（GeneBank AE000666.1、フラグメント1494539-1495714）およびMTH1481（GeneBank AE000666.1、フラグメント1337346-1338863）、AksD 3-イソプロピルリンゴ酸デヒドラターゼ/ホモアコニターゼ（ラージサブユニット）MTH1386（GeneBank AE000666.1、フラグメント1253910-1255169）、およびMTH1631（GeneBank AE000666.1、フラグメント1495715-1497001）、AksE 3-イソプロピルリンゴ酸デヒドラターゼまたはイソメラーゼ/ホモアコニターゼ（スモールサブユニット）MTH 0829（GeneBank AE000666.1、フラグメント 752586-753098）、およびMTH1387（GeneBank AE000666.1、フラグメント1255181-1255669）、ならびにAksF 3-イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ/ホモイソクエン酸デヒドロゲナーゼMTH0184（GeneBank AE000666.1、フラグメント130396-131391）、およびMTH 1388フラグメント（GeneBank AE000666.1、1255666-1256655）を、ピメリン酸とスベリン酸の間の鎖伸長反応の例示のために選択した。

20

30

【0494】

野生型遺伝子を、開始コドンGTGまたはTTGがATGに変化した遺伝子AksA（1）-MTH1630、AksD（2）-MTH1631およびAksF（2）-MTH1388を除き、対応する大腸菌発現ベクターの構築のために選択した。

【0495】

3.1.10.2 遺伝子標的を含む発現ベクターのクローニング

次に、メタノバクテリウム・サーモオートトロフィカム由来の選択した遺伝子標的を、3.1.1.2章で詳述したように、inABLE技術を用いてIPTG誘導性pET21-aバックボーンにクローニングし、I9（pET21-a中のM.サーモオートトロフィカムAksA（1）-MTH1630遺伝子）、I10（pET21-a中のM.サーモオートトロフィカムAksA（2）-MTH1481遺伝子）、I11（pET21-a中のM.サーモオートトロフィカムAksD（1）-MTH1386遺伝子）、I12（pET21-a中のM.サーモオートトロフィカムAksD（2）-MTH1631遺伝子）、I13（pET21-a中のM.サーモオートトロフィカムAksE（1）-MTH0829遺伝子）、I14（pET21-a中のM.サーモオートトロフィカムAksE（2）-MTH1387遺伝子）、I15（pET21-a中のM.サーモオートトロフィカムAksF（1）-MTH0184遺伝子）、およびI16（pET21-a中のM.サーモオートトロフィカムAksF（2）-MTH1388遺伝子）を作製した。

40

【0496】

簡単に述べると、選択した遺伝子およびベクターバックボーン中の潜在的なEarI部位を、EarI消化/連結サイクルを含むパート/リンカー融合物調製への干渉を防ぐために分断し

50

た。AksD (1) -MTH1386、AksD (2) -MTH1631およびAksE (2) -MTH1387ではEarI部位を認めなかった。AksA (1) -MTH1630、AksA (2) -MTH1481、AksE (1) -MTH0829およびAksF (2) -MTH1388遺伝子の各々において1つのEarI部位を認め、AksF (1) -MTH0184遺伝子では2つのEarI部位を認め、ベクターバックボーンpET21-aでは3つのEarI部位を検出した。制限部位にサイレント突然変異を導入することによってEarI部位を分断した。制限部位の最後のグアニジン塩基をチミンに突然変異させることによってベクター中の3つのEarI部位を分断した。

【0497】

次に、EarIを含まない配列をパート設計ソフトウェアにおける入力配列として使用し、3.1.1.2章で論じたように、EarI部位によって隣接された対応するランケートパートを設計した。合成したメタノバクテリウム・サーモオートトロフィカムAksA (1) -MTH1630 (TP48)、AksA (2) -MTH1481 (TP49)、AksD (1) -MTH1386 (TP50)、AksD (2) -MTH1631 (TP51)、AksE (1) -MTH0829 (TP52)、AksE (2) -MTH1387 (TP53)、AksF (1) -MTH0184 (TP54) およびAksF (2) -MTH1388 (TP55) ランケートパートをDNA2.0 pJ201ベクターに挿入した。クロラムフェニコール耐性遺伝子を含むフラグメントを導入してpET21-aランケートパートベクターを完全合成し、ベクターTP31を作製した。

【0498】

inABLEオリゴヌクレオチドのリン酸化およびその後のアニーリングを、3.1.1.2章で述べたように実施した。簡単に述べると、オリゴをT4キナーゼと共に37℃で30分間インキュベートし、次いで酵素を65℃で20分間不活性化した。

【0499】

次に、パートリンカー融合物を、先に3.1.1.2章で述べたように、ランケートパートの5'末端をその対応するパートオリゴのアニールしたフラグメントと連結し、ランケートパートの3'末端をリンカーオリゴのアニールしたフラグメントと連結することによって調製した。選択した遺伝子（メタノバクテリウム・サーモオートトロフィカムAksA (1) -MTH1630、AksA (2) -MTH1481、AksD (1) -MTH1386、AksD (2) -MTH1631、AksE (1) -MTH0829、AksE (2) -MTH1387、AksF (1) -MTH0184および AksF (2) -MTH1388）に対応するパートリンカー融合物を、それらのそれぞれのアニールしたパートオリゴ（POA48、POA49、POA50、POA51、POA52、POA53、POA54またはPOA55）、それらのランケートパート（TP48、TP49、TP50、TP51、TP52、TP53、TP54またはTP55）ならびにベクターバックボーンからのアニールしたリンカーオリゴの連結によって調製した。ベクターバックボーンに対応するパートリンカー融合物を、そのアニールしたパートオリゴ、そのランケートパート、およびどちらかの遺伝子からのアニールしたリンカーオリゴの連結によって調製した。陰性対照遺伝子を含まない集合体も、ベクターバックボーンのアニールしたパートオリゴ、そのランケートパート、およびそのアニールしたリンカーオリゴの連結によって調製し、ベクターバックボーンの自己集合体を生じさせた。

【0500】

ランケートパートに対して10倍および20倍モル過剰のリンカーおよびパートオリゴを、各々のEarI消化/連結サイクルの間のランケートパートとオリゴヌクレオチドの間の連結を促進するために遺伝子およびベクター反応において使用した。50 μ LのEarI消化/連結反応物をサーモサイクラー（Eppendorf Mastercycler Gradient）でインキュベートし、温度を37℃と16℃の間で交互に変化させた。サイクルの完了後、試料を0.7%アガロースゲルに負荷し、パート/リンカー融合物の調製に関して予想されたサイズのフラグメントを認めた。次に正しいサイズのバンドをゲルから切り出し、QIAGEN QIAquick Gel Extraction Kitを使用してDNAをゲル抽出した。DNA濃度は、30 μ lの総容量で13.6ng/ μ lから24.8 μ g/ μ lの範囲であった（DNA濃度範囲4.9nM～53.9nM）。陰性対照遺伝子不含構築物の作製のためにパート/リンカー融合物（pET21-aパート/pET21-aリンカー）の自己集合も実施した。

【0501】

遺伝子パート/リンカー融合物とそれらのそれぞれのベクターパート/リンカー融合物と

の組合せを、次に、3.1.1.2章で述べたように2パート集合体を介して実施した。簡単に述べると、遺伝子パートリンカーとベクターパートリンカーを室温で30分間インキュベートした後、2 μ lの集合体反応物および10 μ lのコンピテント細胞を使用して高効率の化学的コンピテントNEB10 β 大腸菌細胞の形質転換を実施した。形質転換した細胞をLB-Amp-寒天に塗布し、37℃で一晩インキュベートした。各集合体について約1000クローンを得た。2つのランダムなクローンを各集合体から選択し、QIAGEN QIAprep Miniprep Kitを使用して対応するベクターを単離した。

【0502】

3.1.1.2章で述べたように、ベクターの構築を確認するために制限を実施した。簡単に述べると、I9から得たクローンをBglIIおよびXmnIを用いて分析して、メタノバクテリウム・サーモオートトロフィカムAksA (1) -MTH1630遺伝子のpET21-aへの挿入に関して陽性のクローンを同定し、I10集合体から得たクローンをPstIおよびXmaI/XbaIを用いて分析して、AksA (2) -MTH1481遺伝子のpET21-aへの挿入を同定し、I11集合体から得たクローンをHincIIおよびAlwNIを用いて分析して、AksD (1) -MTH1386遺伝子の挿入を同定し、I12集合体から得たクローンをNcoIおよびBglIIを用いて分析して、AksD (2) -MTH1631の挿入を同定し、I13集合体から得たクローンをMluIおよびXmnIを用いて分析して、AksE (1) -MTH0829のpET21-aへの挿入を同定し、I14集合体から得たクローンをPsiIおよびXmaI/AlwNIを用いて分析して、AksE (2) -MTH1387遺伝子の¹⁰大腸菌発現ベクターへの挿入を同定し、I15集合体から得たクローンをAlwNIおよびHincIIを用いて分析して、AksF (1) -MTH0184遺伝子の²⁰大腸菌発現ベクターへの挿入を同定し、I16集合体から得たクローンをBsaIおよびHindIII/AlwNIを用いて分析して、AksF (2) -MTH1388の挿入を同定した。制限産物をアガロースゲルで泳動させて、各集合体から試験したクローンに関して予想されたバンドパターンを認め、メタノバクテリウム・サーモオートトロフィカム鎖伸長遺伝子を保有する大腸菌pET21-a発現ベクターの構築を確認した。加えて、ベクターバックボーンの3'末端と遺伝子の5'末端の間ならびに遺伝子の3'末端とベクターバックボーンの5'末端の間のパート接合部を配列決定し、構築を確認した。

【0503】

3.1.10.3 大腸菌における外因性チオエステラーゼ遺伝子の発現

大腸菌における外因性メタノバクテリウム・サーモオートトロフィカムAksA (1) -MTH1630、AksA (2) -MTH1481、AksD (1) -MTH1386、AksD (2) -MTH1631、AksE (1) -MTH0829、AksE (2) -MTH1387、AksF (1) -MTH0184およびAksF (2) -MTH1388鎖伸長遺伝子の発現を3.1.1.3章で述べたように実施した。簡単に述べると、エレクトロコンピテントBL21 (DE3) 細胞を10ng DNAで形質転換し、形質転換試料をLB-Amp-寒天に塗布した。37℃で一晩インキュベートした後、形質転換体を得た。単一クローンを各集合体から採取し、5mlのLB-Amp培地に出発培養物として接種した。37℃および250rpmで一晩インキュベートした後、培養物のOD₆₀₀を測定し、2mLの培養物 (約 8×10^7) を使用して100mLのLB-Ampに接種し、これを500mLのバッフル付き振とうフラスコにおいて37℃および250rpmでインキュベートした。

【0504】

1mM IPTG (最終濃度) の添加によってタンパク質発現を誘導し、培養物を37℃および250rpmでインキュベートした。1mLの試料を誘導の前、誘導後4時間および24時間のインキュベーション後に採取し、OD₆₀₀を測定して細胞増殖を判定した。誘導後24時間のインキュベーション後、残存培養物を50mLファルコンチューブに移し、5000rpmで10分間の遠心分離によって採取して、細胞ペレットをさらなる分析のために使用するまたは-20℃で保存した。

【0505】

SDS-PAGE分析のために、試料を13000rpmで2分間遠心分離し、上清を取り出して、リゾチーム (15 mg/mL) およびベンゾナーゼ (3.4U/ μ L) を添加したBugbusterタンパク質抽出試薬を用いて細胞を溶解した。次に溶解反応物を13000rpmで2分間遠心分離し、可溶性画分を新しいチューブに移して、不溶性画分を水に再懸濁した。20 μ lの各画分を80 μ lの

10

20

30

40

50

SDS試料緩衝液（SDS負荷緩衝液、9%DTTおよび水）と混合し、ヒートブロックにおいて95℃で5分間加熱して、次に10μlの各SDS試料調製物をSDS-PAGE 4~20%トリシンゲルに負荷し、可溶性および不溶性画分のタンパク質含量を分析した。

【0506】

AksE (2) -MTH1387タンパク質だけが可溶性形態で、すなわちIPTG誘導後に可溶性画分において18kDバンドとして成功裏に発現された。AksA (1) -MTH1630、AksD (2) -MTH1631、AksF (1) -MTH0184およびAksF (2) -MTH1388タンパク質は不溶性形態で発現され、すなわち、それぞれ44、36および46kDバンドが不溶性部分で検出された。AksA (2) -MTH1481、AksD (1) -MTH1386およびAksE (2) -MTH1387タンパク質については発現が検出されなかった。それゆえ、文献におけるメタノカルドコッカス・ジャナスキイオルソログの発現成功の報告に基づき、AksA (1) -MTH1630、AksD (2) -MTH1631、AksF (1) -MTH0184、AksF (2) -MTH1388、AksA (2) -MTH1481、AksD (1) -MTH1386およびAksE (2) -MTH1387について発現最適化を実施した。特に、M. ジャナスキイオルソログの発現に関する文献データは、特に誘導物質濃度および誘導温度に関して種々の条件のセットを明らかにした。IPTG濃度は0.1から1mMの間で異なり（初期条件1mM）、誘導の温度は16℃と37℃の間で異なった（初期条件37℃）。3.1.1.3章で述べたのと同じ発現プロトコルおよびSDS-PAGE試料調製物を溶解度最適化実験のために使用した。

【0507】

AksA (1) -MTH1630タンパク質発現のレベルは、IPTG濃度を10倍低下させた後改善されたが、タンパク質は不溶性のままであった；温度の最適化は発現または溶解度に影響を及ぼさなかった。AksD (2) -MTH1631およびAksF (2) -MTH1388については、両タンパク質は誘導後に不溶性画分においてのみ可視であったので、IPTG濃度を10倍低下させることによる溶解度の有意の改善は認められなかった。AksD (2) -MTH1631およびAksF (2) -MTH1388については、両タンパク質は誘導後に不溶性画分においてのみ可視であったので、誘導温度を16℃に低下させることによる溶解度の有意の改善は認められなかった。しかし、AksF (1) -MTH0184の溶解度は、誘導温度を30℃に低下させることによって改善された。それゆえ、AksA (1) -MTH1630 (I9)、AksD (2) -MTH1631 (I12) およびAksF (2) -MTH1388 (I16) は種々の宿主において、例えばサッカロミセス・セレビシエのような真核生物系またはバチルス・ステアロサーモフィルス (*Bacillus stearothermophilus*) のような好熱菌において発現され得る。

【0508】

メタノバクテリウム・サーモオートトロフィカムAksA (1) -MTH1630、AksA (2) -MTH1481、AksD (2) -MTH1631およびAksE (1) -MTH0829遺伝子産物は、pET21-a/IPTG発現系を使用して大腸菌において可溶性形態では発現されなかったもので、サッカロミセス・セレビシエ発現系を使用してこれらの遺伝子を発現のためにクローン化した。構成的プロモーターADH1p、転写ターミネーターCYC1t、およびYEplac195プラスミドに由来する高コピー数ベクターバックボーンを含む、酵母ベクターバックボーンのパート/リンカー融合物の調製においてEarIの代わりにSapI制限酵素を使用したことを除き、上述したinABLE技術を用いて発現ベクターを構築した。各々のパート/リンカー集合体を用いてTOP10エレクトロコンピテント大腸菌細胞を形質転換し、QIAGEN Hi-Speed Plasmid Purification Midi Kit (120μl中67.4~173.0nM) を用いて大きなDNAストックを調製した。アガロースゲル電気泳動後、SapIの使用にもかかわらず、酵母ベクターパート/ADH1プロモーターリンカーの調製物について予想されたサイズのフラグメントを認めた。次に正しいバンドをゲルから切り出し、QIAGEN QIAquick Gel Extraction Kit (30μl中14.1~138.1nM) を用いてDNAをゲル抽出した。

【0509】

次に、4パート集合体反応物、すなわちADH1プロモーター、メタノバクテリウム・サーモオートトロフィカム遺伝子AksA (1) -MTH1630、AksA (2) -MTH1481、AksD (2) -MTH1631およびAksE (1) -MTH0829の各々、CYC1ターミネーターおよび酵母ベクターバックボーンを37℃でインキュベートして最終構築物を調製した。次に、10μlの高効率の化学的にコ

ンピテントなNEB10β大腸菌細胞を2μlの集合体反応物で形質転換し、LB-Kan-寒天に塗布して、37℃で一晩インキュベートした。4パート集合体について200～250クローンを得た。次に5つのランダムなクローンをプレートから採取し、QIAGEN QIAprep Miniprep Kitを用いて対応するベクターを単離した。

【0510】

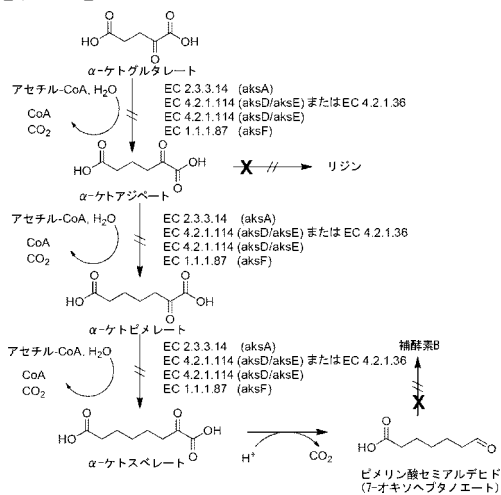
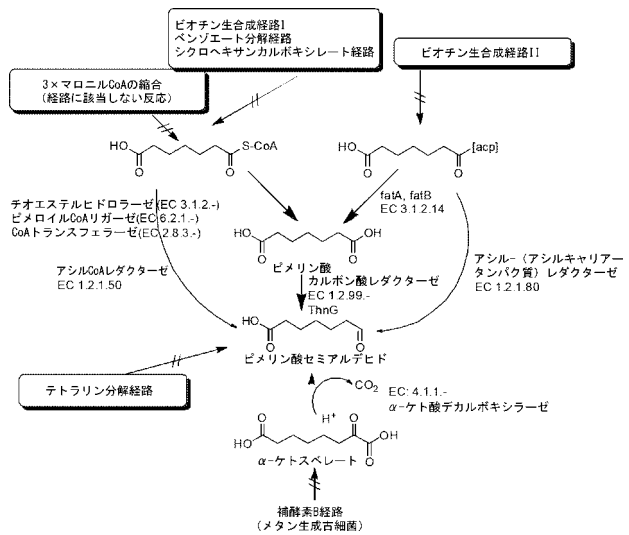
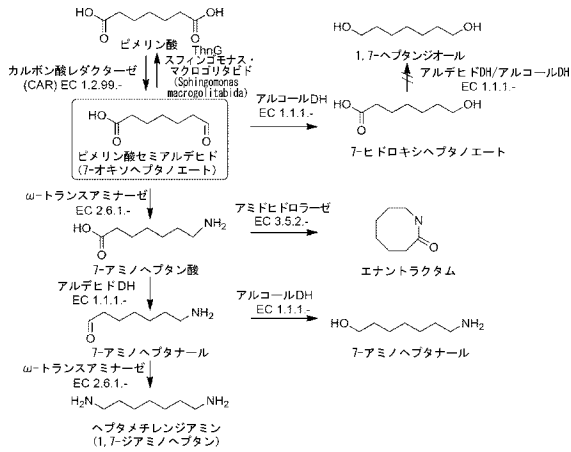
制限分析を用いて単離した構築物を分析した。PmeI/SapIを使用した予備分析を実施し、トランケートベクター夾雑物を同定した。クローンはトランケートベクター夾雑物を含まず、そこで4つのパート/リンカー融合物の挿入を確認するために制限酵素XhoI/NdeI、BsaIおよびMluIを使用してそれらを分析した。両方のクローンについて予想されたバンドパターンを認め、ADH1プロモーター、関心対象の遺伝子、CYC1ターミネーターおよび酵母ベクターバックボーンを保有するS.セレビスエ発現ベクターの構築を確認した。最後に、4パートの間の接合部を配列決定し、正しい構築を確認した。

【0511】

S.セレビスエI24～I27発現ベクターでの形質転換を本明細書で述べたように実施することができ、SDS-PAGEを用いた細胞溶解後に構成的プロモーターADH1pからの発現を観測することができる。I24構築物は、酵母ベクターバックボーンに挿入されたADH1プロモーター、メタノバクテリウム・サーモオートトロフィカムAksA(1)-MTH1630遺伝子およびCYC1ターミネーターを含む。I25構築物は、ADH1プロモーター、メタノバクテリウム・サーモオートトロフィカムAksA(2)-MTH1481遺伝子およびCYC1ターミネーターを含む。I26構築物は、ADH1プロモーター、メタノバクテリウム・サーモオートトロフィカムAksD(2)-MTH1631遺伝子およびCYC1ターミネーターを含む。I27構築物は、ADH1プロモーター、メタノバクテリウム・サーモオートトロフィカムAksE(1)-MTH0829遺伝子およびCYC1ターミネーターを含む。

【0512】

本出願全体を通して引用される特許、特許出願、公表文献、製品説明およびプロトコルは、すべての目的に関してそれらの全体が参照により本明細書に組み入れられる。

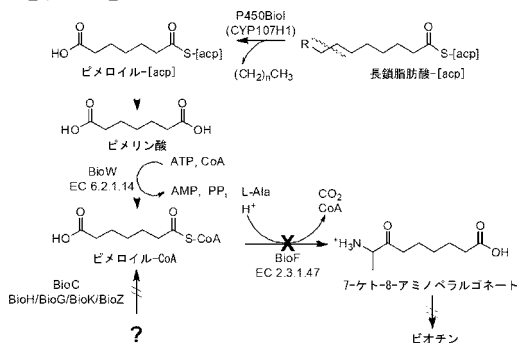
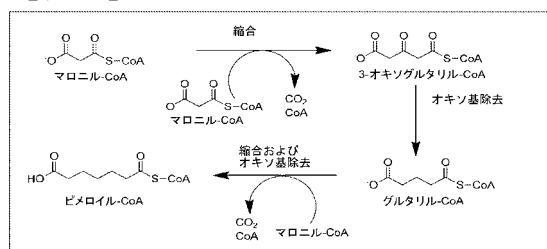


变化：

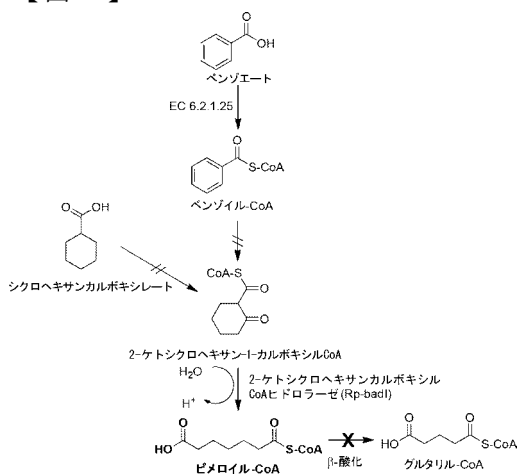
4.1.3-から2.3.3.14に（ホモシトレートシンターゼ）

AksD/AksEは、4.2.1.114 (R)-ホモシトレートリアーゼのみ、または4.2.1.114+4.2.1.36 (ホモイソシトレートヒドロリアーゼ) でありうる。

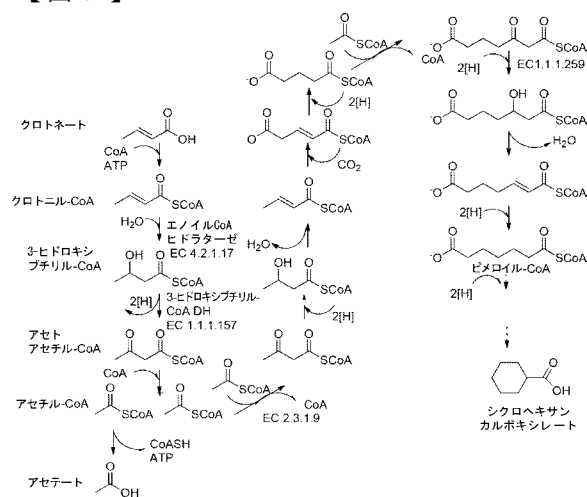
AksF ホモイソシトレートデヒドロゲナーゼ1.1.1.87



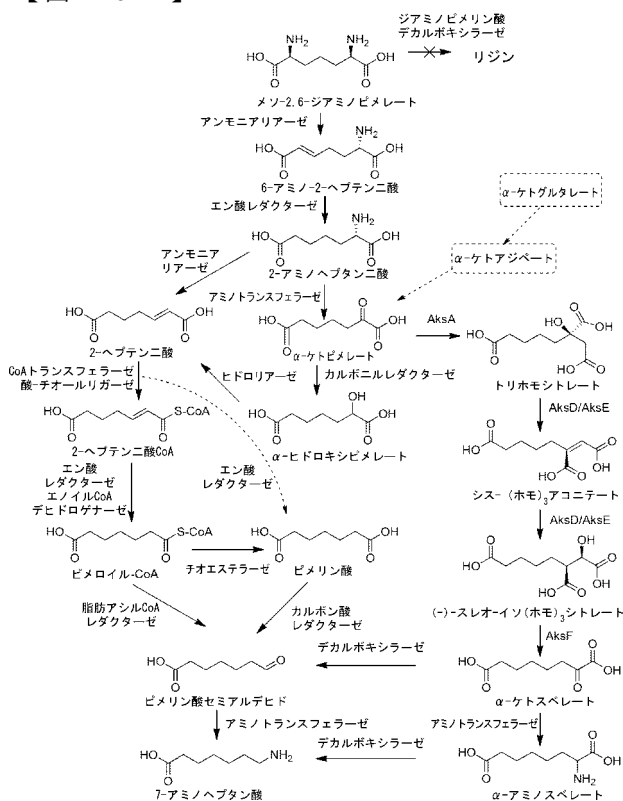
【图 7】



【图 8】



【図 10 A】



【図 16】

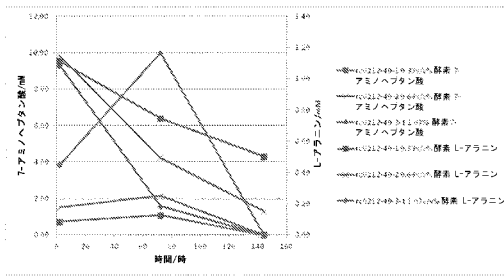


図16：7-アミノヘプタン酸基質およびL-アラニン生成物の測定濃度によるビルビン酸ナトリウムおよび7-アミノヘプタン酸の生体内変換の結果

【図 17】

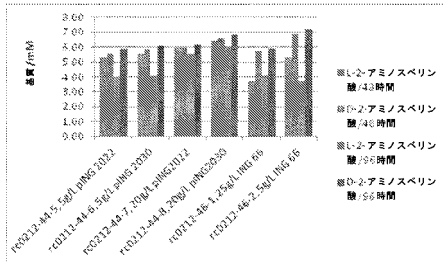


図17：48時間後および96時間後の8種の生体内変換体におけるL-およびD-2-アミノスベリン酸エナンチオマー濃度からのHPLC結果の概要

【図 18】

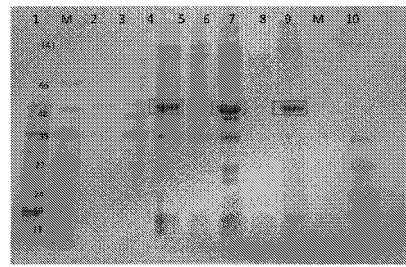


図18：大腸菌GadA (129)、大腸菌LysA (130)、大腸菌 GadA ilvE (131) および大腸菌LysA ilvE (132) タンパク質の発現物のビーズ溶解からの可溶性および不溶性画分に関するSDS-PAGE分析

(予想タンパク質サイズ：それぞれ52kDa、46kDa、52kDaおよび46kDa)

レーンM、マーカー：レーン1、陰性対照の誘導後24時間の可溶性試料；レーン2、集合体129 24時間の可溶性試料；レーン3、集合体130 4時間の可溶性試料；レーン4、集合体131 24時間の可溶性試料；レーン5、集合体131 誘導後24時間の可溶性試料；レーン6、集合体129 誘導後24時間の不溶性試料；レーン7、集合体130 誘導後24時間の不溶性試料；レーン8、集合体131 誘導後24時間の不溶性試料；レーン9、集合体132 誘導後24時間の不溶性試料；レーン10、24時間の陰性対照不溶性試料 (117)

【図 19】

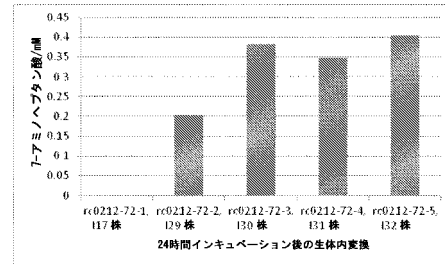


図19、2-アミノスベレートの脱カルボキシル化からの7-アミノヘプタン酸の形成

I17 (陰性対照)；I29 (pET21/GadA)；I30 (pET21/LysA)；I31 (pET21/ilvE-GadA)；I32 (pET21/ilvE-LysA)。GadA：大腸菌グルタミン酸デカルボキシラーゼ；LysA：大腸菌ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ；ilvE-GadA：大腸菌ilvE分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ (N末端ペプチド：15残基) と大腸菌グルタミン酸デカルボキシラーゼの間の融合物；ilvE-LysA：大腸菌ilvE分枝鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ (N末端ペプチド：15残基) と大腸菌ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼの間の融合物

【図 20】

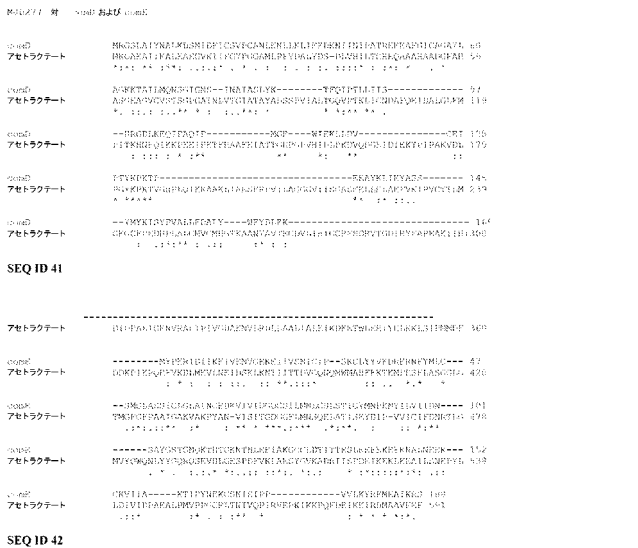


図20：MJ0277タンパク質とcomD/comEタンパク質との間の有意な相関性を示す。ClustalWアルゴリズムを使用したタンパク質アラインメント

【図 21】



図21：ラクトコッカス・ラクティス由来のLAOLAアセト乳酸シンターゼに対するMJ0277の相関性

【図 25-4】

```
1 atgaacgcac gaactgacgc canglccccc ctggggagac cggacctggg ccggtgcgac
61 caggcccaact acatgcacgg ctacacagcg ttgcagagac acggcgctga cggcgctgctg
121 aacacgcctcg ccggcgagcg cgcctatatac taagacacgg ccggcaaacg ctacctcgag
181 cggcgggggcg gcatgtggcg caacacacac cggcctggggc gcgaggaaat ggctcgcaac
241 gttggcgagc agaccccgct gctggcctat tcaaatctct ttctggcaat ggccaacccg
301 cggcgcatcg aactctcgcg caagctcgcg ccggcgaccc cggcgacccg ccacacagtg
361 ttctctaccca ccggcggttc caccgcgcgg gacacgggga tgcgcctcat gcaactaatc
421 cagaaclgtg ccggcgaayg ccgcaagaaag ccagtlcata ccgggatcaa cgtctaccaa
481 ggctcgacat tcttcggcat gtgcctgggc ggcaagagcg ccagccggcc ggccgaagtc
541 gaattctctg acgagcgcat ccacacaccc gctgtctctt attactaccg ccgcccgtaa
601 gggctggggc aagccgaggt cctcgatggc ctggctggac agttcgaaag caagatctct
661 gaactggggc ccgacccggg gggggcgctt atctcgagc cgtgtgttgg ctggcgcgcg
721 gtgcctgttc ccgcccggcg ctacacacgg ccgagtlggg agtltgtgaa gggltatgaa
781 gtgcctgttc ccccgagcga agtggcgacc tonttgggc gactgggcca ctctctcgcc
841 agccagcgcg cgttcggcgt acagccggac ataatctcta ccgccaaggg cctcaactcc
901 ggctaccagc cgttcggcgc gtgcatcttc tcccgggcca tctgggaggt gatcccgag
961 ccggacacgg gccctcgctt cagcctatgt ttaactact ccggccaccc gctggcctgc
1021 ggcgcgggcg tgaagaacat ccgacatcat gagcgcgagg cctgtctgc ccacgcctgc
1081 gagctggccc gtaacttcga ggagcccgct caaagcctcc gcgacctgcc catcgtcgcc
1141 gagctggccc ggtatcgctt cagcgctgtg tgcagatttg tcgcgcacaa ggcgagaaag
1201 cggcggtttc cggaaagcct gaacatcgcg gactgggttc accgcggggc gcgagaagcg
1261 ggcctcgctg ttctctcgat cgtccacccc aactctatgt caccgcgctt gactctcaac
1321 cggcaacagg tgcatacgtt ggttcggggc ctggcgcgga gcataaggga aacctgtggg
1381 gatctgttcc ggcgcgttca ccggttaa
```

SEQ ID 7: 緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) (g1951072) 遺伝子配列

```
1 MNARLHATSP LGDADLVRAI QAHYMHGYW FECHRVNGSL HIRAGDGAYI YDTAGNRYLD
61 AVGGKACZHI GLGKEEHART VAEQTRLLAY SNFFCDMANP RAIELCFELA ELAPGLDHW
121 FLITGGSTAV DTAIRLMHYI QNGRCFRANK HYITRIMAHI GSTFGLMSLG KSAIDRAFEB
181 DFLDEIRHHL ACTPIYRADE GLGEAEPLDG LVDEFEPKIL ELAATRVGAP ISEFVFSGOG
241 VIVFPRGYHR RMHELCPQED VLVIEDSVTV SFGRGLHFFFA QSAVFGVQPD IILIAKGLTS
301 GYQPLGACIF SRRIEVIWAE PDKGRCFSHG FTVSGHPVAC AAALKNIIRII EREGLARAD
361 EVGRVFEBRL QSLRDLPIVG DVRGMRPMAC VEFVADKASK ALFFESLNIIG SMVHLRAQKR
421 GLVSRVIVHL NVMSPDLILT REGVQTVVRV LRESISTETVE DLVRAGHR
```

SEQ ID 8: 緑膿菌 (g1951072) タンパク質配列 (予想サイズ521130a)

【図 25-6】

```
1 atgagtgcga acaccccgca aacccctoga tggcaggccc tgagcagcga gcaacacctg
61 gacacgttca cgcactacaa caaactgaaa gagaaagccc cgcgcataat ccccgctggc
121 gagggcgctt ctctgcggga aatcgcgaga aatcgcgaga cgcgcataat gtcaggctgt
181 gggctggcgg ccaacgggtta tgagcgcgaa gaactggccc accgcggcg gctggaaatg
241 cggcgagctgc cgtactacaa cctgtctctc gagaccgccc accgcggcg gctggaaatg
301 gccaaagcca tcttcgaacat cgttctcgag ggcctgaac atgtgttctt ccccggttcc
361 ggcctgaag gcaactgaca gatcctcgcc atggctctgt attactgggc gctgaaagcg
421 cagcgagaca agaaaacccc cactcagctg ctaaatggct accaggttc cactctcgct
481 ggttcacagc tggatggcat ttactggctc caagcaacgg ccgactggcc gatcccgggg
541 gttggcgaca tccacagccc ttactggctc ggcgaagggc g-gaacatgag gcgggaacag
601 ctgggaatct gggcgcgcca gcaactggag agcgtggggc gttgattgat cgttcgagat
661 ctgggaatct gcaatgcgca ggaatctctt tggcgctggc aactctgttc cggcgctgat
721 tccgactggc cgaagatcca ggaatctctt gggcgctggc aactctgttc cggcgctgat
781 gaggtgattt ctgacttgag ggttgcacgt gactgttctg gtagcgaatt ctatggcctc
841 agcgcgacca tcaagacact cgcgaagagg ctacacttcg ttactctacc gatggcgac
901 ctgactctgc ggaatgaaat cgttcgggtg ctcaactgag gtcgcatatt caatacagcg
961 ttactactat ccggcgaccc cgttcgggtg cggcttgccc tgaagaaat ccgtactctg
1021 ccgcaagaaa agatcgtcga agcgctcagc tggaaaagcg caactatatt gcaaaagcgt
1081 tgcctcgagt tgacgatcca tggcgctggc gggaagcttc gggcttgagg gctgctggg
1141 gcaatcgagc gttgagagca caagacccc cgcgagcgct ataccgcaca gcgcgcgga
1201 acgactctgc gaacctctcg ctngacaaat ggcgcgacca tggcgcgctg ggcgcgatac
1261 acgactctgc cgcgcgacat ggtgatagct ttctgcaaaa tcatgagagt ggtagagag
1321 ggcgcgacgt gctcgatctt gacgctggcg gttgtgagag gctga
```

SEQ ID 11: シュードモナス・シリシゲ (*Pseudomonas syringae*) クラスIII遺伝子配列

```
1 MSANHPQTLB HQALSSBHHI APFDYKQCLK EKGFRILTRA EGVILNDSEG NKILGMSGL
61 HCVATIGYGR ELADAASKQM RELPIYVNLFF QTAHPFVLEL AKRAISDIAPE QNHVVFPTGS
121 GSBGNDTHLR HVRHYZWALRG CPHKNTIIRF VHGYNHGYVA GASLGQHTTM HQQCLFIFPG
181 VYHPIQQPYNP GSGGQKTPNR PGTUAAQGLR NKFLHGVNPH VSAFTAPFTQ GAGGVTVFPD
241 SYWPIKINIL SHYDILLAAH BVICGGRKRS ENFGSDYFGL KHMSTIAYG LITSQVHWGG
301 LTVRDEIVAV LNEGGDEHMG FFIYSHFVAA AVALEHIRIL REEKIVRYVR SETAFYLQKR
361 LRELSDHPLV GEVROGVLLS AIELYKDEFT RERYDKGAG MICKTFCFON GLIMRAYGUT
421 MITAFPLVTS EAQTRDELXV ARRCILITITA VLSG
```

SEQ ID 12: シュードモナス・シリシゲクラスIIIタンパク質配列 (予想サイズ500420a)

【図 25-5】

```
1 atgaaggttt tagtcaatgy ccggcgatit gggcgagtg aagcatcaat cgaattggaa
61 gatcgcggtt atcgctctgg tgacggcctc tctgaagtg ttaggggtgtt caaaggagta
121 ttgtctgggt taactgagca tgcagagctg ttcttcagaa gctgctgtga aactggaaat
181 tcaactgcat tcaatataga agactcrag tgggacatga aaaagcttgt aactggaaat
241 cgggttagtg agggagcggt atacactcag caacacagag gctgtggccc gcgaaaaaac
301 cagtatgaag ccggcctcga gccgaagctt actgcctata cgtttacggt gaaaaaaabg
361 gaggcagaga aggcatacgg agtggcggtc attacagatg aggatctctg ctgctgaag
421 tctaatatca aaagtctgaa ttactctgat aatctaatga caaagcaaa ggcctaatga
481 gcgcgagcat ttgaagccat ttactctagg gacggcggtt ttacggaggg tacactctct
541 aacgttlatg ccgtlatcaa cggcacagtg ggaacacat ccggtaatcg gctcatcttc
601 aatgtaatta cagcgatgaa tatcttagga ctgattgaga agaatgggat caaactggat
661 gagaactctg tcaatgaaga agagttagaa caggcggaag agatcttcat ttgcgaaag
721 aaggacgaaa ttactctggt cgtgagctc gaggagcat cgaatcggaag ccggaaaaac
781 ggacgggtga ccaaacagct tcaagctgtt tttcaagaa gcatcaaca gctgctgagc
841 atttataaa
```

SEQ ID 9: 枯草菌 (*Bacillus subtilis*) (g16078032) 遺伝子配列

```
1 MYVIVNGRLI GKSEASDLE DRYGVQDGI YEVIRVYKV LPGLREHABR FFRSAEELGI
61 SLPPSIEDLE NDLQKLVGEN AVSEGVVIG TIRGVAPRKH QYKAGLEPQT TAVTITVKKF
121 EQSGAYGVAA ITQDLARHLR GIKSLNLLY IYMTKGRATE AGAFBAILLR DGVVTEGTS
181 NYVAVNGTVR RTHFAHRLIL NGICPMMLLG LIKXNGIKLO EIVFSEELK QASEIFISST
241 TABIIIPVVL DQSGIGSGKF GYTKLQAA PQESIQQAAS IS
```

SEQ ID 10: 枯草菌 (g16078032) タンパク質配列 (予想サイズ311820a)

【図 25-7】

```
1 atgcccgggtt cggcgggctt gcccgggaaL gaacccaatL ggggacgaga gggcgaggctg
61 ggcacagcgc ggaatgagcL gaacgaatgct cggcgagcga tgggctccgct gatcgggatg
121 caactctctt tgcctgaca ggaatggcg agctcgcgga agctcgctgt agctgctgt
181 actatctccc aggcatacta tctccatacc gaacgacccc qggcgctgat ccaacgcctc
241 cgggttatgt ggtgcgcga ggtgggtatc gggcgctgag agatctgtga ggcactggcg
301 catcagcgga ggtgctgccc ctatcgctcg ccctggatga tggcgaagag ccccgcgagg
361 cggcgggcgg agaagaatgc cactgtgagc cggcgcgatc tcaactggat cttctctacc
421 accgcggggt cgaacgcggt ggaacagcgg ctgcgctctc cgaacttcta caaacagctg
481 ctggcgcgcg ccacagaaga gccacacatc cctcgctacg agcactatca cgcctcgagc
541 ggccttacgc ccgcctgcac ccggcgacac ggaactagg cgaacttcta catcgcgag
601 gacgggatct cgttctcttc gagcccaaat cggcgacag ccggcaacgg cagcgaggaag
661 ggcctctctg acgatctgtt gaggaaatcc gaggacgga tgcagagctt cggcccgagc
721 acgatctcgg cctctctgag caaccacatc ctgccttccc qggcgctat latctcggc
781 ggcagctatc atgngcgctt caaggcgatc tgggagagc acgacatctt ctatattctg
841 gacggatggg tgaaggcctt cggcgcttgc ggcagatgct tgcctctgga gaagtgcttc
901 ggaatgcttc cgaacatctt cactctccac aaaggctgta cctccggcta tctccgcttc
961 ggcgccttg cgaacccgga ggcgctgctg ggcggatctt cggcgagaa tgcgaaguga
1021 agctcgctta caaaagctta taactacagc aatcagcggt tgccttgagg ccggcgcttc
1081 gccaatatcy agctgatgga gcgagaggtc atcgctgac agcgcgcgga gatggcgpac
1141 tatcttgccc cggcgctgct tctgcgcgc cgtctgcgg gcttgcgga aaacggctgc
1201 gtcggcctcg tgggttgctt gaaatgctg ctgcgaccca ccggcgcgga ccggaagctc
1261 gaggaacagg cctcaacctt gaagtatgac gaggcgctat tgcagctagg gctgatgctg
1321 cggcgctggy gcatctctg cgtgatctcg ccgcgcttca tcatctgag ccgagagatc
1381 gacggagatg tgcgatctat cggcgagccc atccagcag tggcgcgcg ccaagctctg
1441 accggaag aaacggcgcg cgtctga
```

SEQ ID 13: ロドバクター・スフェロイデス (*Rhodobacter sphaeroides*) クラスIII遺伝子配列

```
1 MetPGCGGLP GNEPKCRSG RSAMetIRND ATNAAGAVGA AMetREHILL PAQREMetAKL
61 KRSAQFVLTH ASGIYVHSD GRKLIDPAG MetKCAQVY GRKEIVDAME tAHQAMetVL
121 PYASNYMNM ATSPAARLAS KIATLTTCOL NRIFFTCCOS TAVDSALRES SFYNHVLGRD
181 QKRIILVRYD EYHGSTALCA ACTGRTGNHF NFIDAQDRIS FLSSPNFERHA GNRGQAFRL
241 ELVGFPEERI ESLGPDITAA FLAPETLASE GVLIIPAGYH ARFKAICERH GILVLSDEVF
301 PQVRUCGEMF ASERVGVVF DIITFAKCV SCVYFLUCLA ISEA/LAKIS GEMAKUSHTV
361 NGVTVSNQPV ACAALANIS LMetSRBGV DQAREMetAD YPARALALRL DLPVAVCPRS
421 VGLVGCQZCL DQPRALGCA EDAFELRID BRCFELGLIV RPLGCLVIS PPLIISRAQI
481 DEmuWAlMe LQAITEVSA AHGATANEK AV
```

SEQ ID 14: ロドバクター・スフェロイデスクラスIIIタンパク質配列 (予想サイズ549730a)

【図 25-8】

```
1 atggagacaga agctgtttaa ggaattccgc ttagaactac tggattccgc ttlttgccga
61 aagcgcatctt ctactatgac ggaattccgc tggacgaaat ggcggatgat
121 gtccgcatttc agattattca tgaatgaata tatcttgatc gcaacgcctc ttagaacctc
181 gccactttct gccagacatc ggaagacgaa aactgtccaa aattgatgga ttltgcgaca
241 aataaaadct ggaatgacaa ggaagaaatc cggcaactcc cagctataga cctgcgcttc
301 gaaatattgg ttgcgactc gtgtgtatgc ttgcgagcga aaatgtgtca gtcgtttgac
361 acaacaacca tctgtctctc cgaagcctgt atgttcgcgc ggaatgggat gaaatggcgt
421 ttgcgcgaac gttatgaac tcaacacaaa ccaacgcgaa aacaaacact cgtgtgcgct
481 ccggtacaaa tctgcttgcg caaatatgcn cgcacttggg atgtggagct gcttgagact
541 cctatcgccc ccggtgaatt gttattggaa ccgaacgcga tgattgaagc ctgtgaagaa
601 aacacatccg gctatgccc gaatttcggg gtaacatcaa ccgtaacta tgaattccca
661 caacngctg agcttngct gataaatttc cagcngcga ccgttataga cactgaaatg
721 cactngcga cgcgacggg ggcgttctgc gaaactgttc cgcngcga tatgtatgct
781 gacttcgccc tgcgtctgc gaaatgcgtc agtgcctcgc gccataaat cgtgtctgct
841 ccgctggctc ggcgtctgct tatctggcgt gaagaaagac cgtgcgcga ggaactggc
901 tcaaatgttg aatccctggg tggtaaatct ggtacttttc ccaataact ctccngcgc
961 ggcggtcagg taattgcaca gtaactgaat ttccctgcgc tgcgtctga aggtataac
1021 aaagtacaga accgcttcta ccagcttgcg gttatctgc cgtatgaat cgcacaaatg
1081 gggcgatag agtcaactc taccgctgc cggcagcga gcaatccgc gttttgcttc
1141 aaactgaag atggaagaa tccgctatc acatccgctc accctctga agctctgcg
1201 cgcggtgct ggcggttcc ggcctatct ctcggcgctc agjccacga cactgtgctg
1261 atcgccatta tctgcgctc cgcgttcgaa atcgacttc ctgaactgt gctggagac
1321 tacaagact cctgaasta tctcagact caccgaaac tgcagggtat tgcacagag
1381 aacagctta aacacactc a
```

SEQ ID 15: 大腸菌GadAグルタミン酸デカルボキシラーゼ野生型遺伝子配列
(GeneBank NC_000913; フラグメント3654203-3665603)

```
1 MDGKLLTIFR ZEALLSRFGA KAISTIAESX PFPLEHFFDD VAFQINDEL YLDGNARJNL
61 ATFCQTNDEE NVHKLMDSI NKKMIDKEEY PQSAAILRC VMVADLHA PAPFNGQAVG
121 THTIGSEAC MLGGAMKVR WRKMEAAKH PTEKPNLVCG PVQICNHEFA RYNDVELREI
181 PMRPGQLMD EKRMIAEDD HTIGVVFPG VTVTGNYEFP FLHDALDKF QADTGIDIM
241 HIDAASGGL APPVADPVM DFALFVKSI ASCHKEGLA PLGGGVNHR DSEALFQELV
201 FNVYDLGGCI GTFAIKFSRP AGVIAQVYE FLKLRGEGC KVNQASVGA AZLADEAKL
361 GPYBFICTGR PDZGIPAVCF KLDGDEDFY TLYLSERLR LPMQVVFAT LGGEATDIVV
421 NRMICRRGFE MEFALLESY YKSLKYSLD MFKLQIAGQ USPKHT
```

SEQ ID 16: 大腸菌GadAグルタミン酸デカルボキシラーゼタンパク質配列 (予想サイズ52685Da)

【図 25-9】

```
1 atggcaactc cctgttttcc tactgatact gatctgactc cggaaacact gctggctctg
61 ccggttgaaat tgggtgtccc ggtatgggac taacgagact agattatgc tgcgcagatc
121 gcagactgga agaatgttga tgtatggctt cttgcacaga aggcgccttc caacatccat
181 atctgcgccc tgaatgggtga gcaggcgctt aaagttaact cgtctctctt ggcgtgagat
241 gacggcgccc tggagccggc ctataacca cagaccatcc ctgacgactc tctatttact
301 gcgagatga tgaacagccg cacttgagaa cggcttcttc aacgcgaat cccgttaaat
361 ttgtgtcttg tgaatgactc gaaacagctc ggcgaagat ccccaatgca tctgtctctg
421 ccgctgtgta acccaggttt cgcngcngc cactctcaga aaatcaaac tgggtgtgag
481 aactccaaag atggaatttg gtatacgtat ctgcgctgct cactgaagct aatccagcgt
541 caccactctg agctggctgg cactcaatg cacatttgct cccgggtaga ctacgcccac
601 cggagcaag tctgcgctgc tatgttaact caggtaatg agttcgacca agatctgcag
661 gaaactagcg cgtgtgcggt cctgtctgta cttatacag agggcgagga ggcggttgac
721 actggaact actacgctt cgtgaacgct gctgtgagc aaactgcag tcaactggcg
781 caccgctga aactggagat cagcgcggc cgtctctgc tagcaaatc cgggttactg
841 actaccagag taactctctg taacagatg ggcctccgct actattgact ggtatgacga
901 ggccttaacg aactgatgc cccgctatg tatggtctt ataatcaat cctcgcgtgc
961 ggcgcgcag cgcgtctctt ggaacagcg ccgacggttg aaagcgtgtt ggcgtgtcgc
1021 cgtgtgaat ccaqcaact tttaactca cagcaagcga quaatgaga cagcgttcgc
1081 cgcgcgaag tgaagcngc gacttatct gctgtcagat atacngcgc ctacggtgct
1141 agcatgaga gcaactacaa cctcgcgcg ctgcctgcg agtccctgt cgtatacgcg
1201 caagccgccc tgaactgctc tcttgaacg atcgaggaac tgcgctact ggaagctgcg
1261 taa
```

SEQ ID 17: 大腸菌LysAジアミノペリリン酸デカルボキシラーゼ大腸菌コドン最適化遺伝子配列
(GeneBank JA114145)

```
1 MHSLSFSTST DTAARKLRL PARGGCFVW YDAQITRRQ AAAGQFNVF PAQKACSNTH
61 LPLMRGGYV NVDSVSLGI EPALAGNVP QTHPDIVTI ADVIGATLE RVSLGLFVW
121 AGSVMLDELQ GQVSPGHRV LRVNPGGNG HSQRNTGGE NKGHGVTD LPAALVIGR
181 RHGLQNVIM HIGSVVYAH LEQVCGMVK QVIFGQDLQ ATSAAGGLV PQQGGEAVP
241 TERYVGLHA ARGLTAPHV HFKLEISG RELVQSVLT IQVRSVKM GSAFVLEA
301 GFHDLNRPV HGVNHSAL AADRLEHA FTETVYVAG QLSSEVFTQ QSGAVETRA
361 LPEVKAGDVL VMDTGAYG ASGNSINRP LLEFVLDTG KRLIFRRQT ISELLALEL
```

SEQ ID 18: 大腸菌LysAジアミノペリリン酸デカルボキシラーゼタンパク質配列
(予想サイズ46170Da)

>comD5ulfopyruvate decarboxylase subunit alpha OS=Methanocaldococcus
jannaschii
MKIGLALYALKSGSIHICSVPCANLKLKLEDDKWIINIPATREEDAGLCAGAYLACKATAIMONSIG
NSIKRILASVYKTFQCTLLIISHFGDLKQIPAQIPHGRIERLLOVEIPFYKPKTPEEAYKLKIASVYWI
SYPVALFDALYETDLK

SEQ ID 19: スルホビルビン酸デカルボキシラーゼ (EC. 4.1.1.79) のcomDサブユニット

【図 25-10】

>comE5ulfopyruvate decarboxylase subunit beta OS=Methanocaldococcus
jannaschii
KVPKRIIDIKKIVNVGEKEIIVSNTIGPKELVYVDRENNFPHLSMGLASSIGLGLALNCEKVPVINDGGG
IUNNLGSLTGYMHPNYIVIDINSAYSGTGQKHTGTGKNTMLEIAKSGDITTTESLEEFERFFKALNE
EXKIVLIKTIPTNKKSNIEIPVVLKVRFEAIRS

SEQ ID 20: スルホビルビン酸デカルボキシラーゼ (EC. 4.1.1.79) のcomEサブユニット

>comD/comE Methanocella paludicola
KANVCGGVIDIMKSSGIDTVLTPDKIKHLAMVSPNKSISLTREENGICIAAGLSMAGSRPALIQSTGIGN
SLNVLSLKNATVEIPLFLASHRGVYEAIAVQAATPAGKCLPAILEASDIQHIDIGAMGELDLIKNAITASFNSL
FVILLSPRLKEISTEENNEDEPTEKRFDEMECHVVPATWRFMIMGITPSLSKRYVNSIGPSELIAA
HVVVVVFWVSLDVSALGQGLAMLSHVEYVLDGPKSLRNVNVAEVAKSHKATLTCFVNAGVSGVOK
TVSSMDELAKAFQISNKAASPGBELLEAKRGKGRFINAILEXNADVPNIDLPVEIKERFMAVTR

SEQ ID 21: メタノセラ・ハラディオ由美OcomD/comEデカルボキシラーゼ

>MJ0277 (gi|15668440|ref NP_247050.1: acetolactate synthase catalytic
subunit [Methanocaldococcus jannaschii DSM 2661])
MKGAETIKALEBGVKIIFGFGGMPLFPYDALYDSDVHLTPHEQAAHNLGPARASGAGVGVSTSGPGA
TNLVFGIATVADSGPVIALTGVPFPLIGNDAFQIDALGLMFIKHNFGIHFPEEIEFTFAAEFIATTPG
GPHDLPHVTCGSDIEKFIYPAKVLGKFKVGVGGLQVYPAKLTASERPVLAQGVITGASSELLR
LAEPVKIPCTTLMRGCGFEDHPLALGMVGMHGTAAANYATTCGVLAIGCFRSDRTVTDIKVFAFEARIHI
DIDFAETGKNVPADCFIVGAKNVLDLALALALEIKKETHLERVELKLSIRMDFDKTKGQRFKDLK
FVNIRIDAKIKNTITTTVGGQGMMAHFFPKMPSPIAGSGITGMGFPFAATGAKVAKPVANVTATGDSG
LANSQELATISEYDIPVVICIPNRLGMVYQWNLVYQGPQSEVHLGSPDFVLAESYGVKADILSPDEIK
KLFEALISNBPYLLDIVDFEAALPMVPGGLTNVQPIRVEEPIKKGPFDEIKIRDMAAVKSF

SEQ ID 22

>MJ06C3 (gi|15668444|ref NP_247647.1: acetolactate synthase large subunit
11b [Methanocaldococcus jannaschii DSM 2661])
KGGNIFLEAKVFLERNVRFISFPGQILPLENIEGGSIKNMVRDEPGAGFADGAYARTINIVIGVCLATG
PAKNTTTPAFVAKNSVLAIGQGVNIGVYVGVPMHVFVDFVAVTVAATVVAATVVAATVVAATVVAAT
QNLIPVLYFEANDINTTITVIGDSFENKIKLIVKXPLPLGGGIFGGLSYKELIKSLERINPIA
TTFPARGVIMKELHCIGVQVRGDLKLSLEADKININGSLSYNTVYESVREKLSKTHENTQKPKSKELKPF
LNSDVKNSSMYKNSNPKPGSDVSNKIYETIKNIPEDAIIVTDAGKHTVFTCLLKTGVIPRNTISSHSGFMG
PGLPASIGVPGTIGFIDNRVLLSGGGFLMVBELVAVLAVNHLKIMVVKNSLAEFCIKVDPANXIADA
FEINDCIENVLEIGSIGKYLKNSKPLVVPEDESELPKPI

SEQ ID 23

【図 25-11】

>NP_247250.1 acetolactate synthase catalytic subunit [Methanocaldococcus
jannaschii DSM 2661]
MFGAATIKALAFGVKTIIFGPGGAMLPYDALYDSDVHLTPHEQAAHAAAGPARASGAGVGVSTSGPGA
TNLVFGIATVADSGPVIALTGVPFPLIGNDAFQIDALGLMFIKHNFGIHFPEEIEFTFAAEFIATTPG
GPHDLPHVTCGSDIEKFIYPAKVLGKFKVGVGGLQVYPAKLTASERPVLAQGVITGASSELLR
LAEPVKIPCTTLMRGCGFEDHPLALGMVGMHGTAAANYATTCGVLAIGCFRSDRTVTDIKVFAFEARIHI
DIDFAETGKNVPADCFIVGAKNVLDLALALALEIKKETHLERVELKLSIRMDFDKTKGQRFKPKVILM
EVLNIDSLKNTITTTVGGQGMMAHFFPKMPSPIAGSGITGMGFPFAATGAKVAKPVANVTATGDSG
LANSQELATISEYDIPVVICIPNRLGMVYQWNLVYQGPQSEVHLGSPDFVLAESYGVKADILSPDEIK
KLFEALISNBPYLLDIVDFEAALPMVPGGLTNVQPIRVEEPIKKGPFDEIKIRDMAAVKSF
39SEQ ID 24

>NP_247647.1 acetolactate synthase large subunit 11b [Methanocaldococcus
jannaschii DSM 2661]
MGGNIFLEAKVFPKKNVTFISYFGQILPLENIEGGSIKNMVRDEPGAGFADGAYARTINIVIGVCLATG
PGKNTTTPAFVAKNSVLAIGQGVNIGVYVGVPMHVFVDFVAVTVAATVVAATVVAATVVAATVVAAT
QNLIPVLYFEANDINTTITVIGDSFENKIKLIVKXPLPLGGGIFGGLSYKELIKSLERINPIA
TTFPARGVIMKELHCIGVQVRGDLKLSLEADKININGSLSYNTVYESVREKLSKTHENTQKPKSKELKPF
LNSDVKNSSMYKNSNPKPGSDVSNKIYETIKNIPEDAIIVTDAGKHTVFTCLLKTGVIPRNTISSHSGFMG
PGLPASIGVPGTIGFIDNRVLLSGGGFLMVBELVAVLAVNHLKIMVVKNSLAEFCIKVDPANXIADA
FEINDCIENVLEIGSIGKYLKNSKPLVVPEDESELPKPI

SEQ ID 25

>gi|17432994|gb|P58416.1|CGMS_METJA PeName: Full Sulfopyruvate
decarboxylase subunit beta
NVPRIDTIFEIVNVGEKEIIVSNIGIFSEFLVYVDRENNFPLGSMGLASSIGLGLALNCEKVPVINDGGG
IUNNLGSLTGYMHPNYIVIDINSAYSGTGQKHTGTGKNTMLEIAKSGDITTTESLEEFERFFKALNE
EXKIVLIKTIPTNKKSNIEIPVVLKVRFEAIRS
SEQ ID 26
>gi|15668277|ref|NP_247065.1| signal recognition particle protein Srp54
[Methanocaldococcus jannaschii DSM 2661]
NLKDGQENLKAALKKAAAFVKKVYVDPALALQAVNVKLVKSKYKIPALSEKTEKGLKKEHII
EIVYSEVPLGEEAKKLEIPKQKIVILLVGTQSGKTTAAKLAIVKRGKLPALAAATVFAAEVQLKVL
AEKIVYPIYDGTCTKSPVDFIVGKHEKFKADVLIIDTAGRKKEKGLLEEMQKIEITPDEITLVIDGTIGQ
QAGIQARAPKAVTGSTIVTVLGSNAGGGAISAVARTAPKPTIGTGIDIRPDPKPKTSRLIAGSLR
SLLEARDNVOKTEESIDAMKNTFLNLMTGLEALIKGQSNKRLLSHICGCGAMRLESHLTAALIKYRV
ITSHREBERENFIKASRIKRIARGSGITZNVRSVRYVETITRAIDKLRKANLRIGGLGQHQHAKFE
E
SEQ ID 27

【図 25 - 1 2】

```
>gi 15669612|ref|NP_249435.1| cobyrynic acid a,c-diamide synthase
[Methanocaldococcus jannaschii DSM 2661]
MKMKRVVIRGIGSEVGKQTVITSTGKMKALSKKYNQYKQYVGDYIDTVHTIANTGNESHRLDSFPMNKQKHVLFQ
KHSDKRLSVIGOVNGLYEGISAIDPQISTASAKALSLPILLVNAKSLTSAIAIINGPNSPUNVILKQVIFN
FVDSNHEPKLKDANSYVLPDIBICIPINRECFKVSGRHLGLVPTPENLKEIESKIVLAGEBELYEKLYLDCQVINE
IADSEFEEDVDVFLMEVNEHYKKAIVAKNAFFVZWNFNEALAKENKAFIEFFSFLDSEVFDACILYIGGGTSE
LFFEDLSRNKHEMESIEFSEGYVSGDGGGLMTYTKSDNFVFWGLNLCASAVKTHVCGLSYKABELEDCLTGRK
GLKPFSGHSPHYSLVMINEERFAPKYEISGRGGIINNLDGIFNGKLAGLYLHHAVANFVASSMNHPE
SEQ ID 28

>gi 17432993|sp|P58415.1| OMD_METJA RecName: Full=Sulfoxypyrivate
decarboxylase subunit alpha
MRGSLAIYNALKDSNIIPTCSVPANLKNLKLIESDKNIIINISATPEEEAFSGICAGAYLAGKKTALIKNSGIG
NSINAIASLYHTFVPTLLTISHRGLKFEQIPAQIPMGKEIKLDDVCEIPTYNKNTPEEAYKLYKASSVNNKI
SVPTALLFDALHWEYDLKX
SEQ ID 29
```

```
>gi 15668717|ref|NP_247116.1| 2 oxoglutarate ferredoxin:oxidoreductase
subunit beta [Methanocaldococcus jannaschii DSM 2661]
MHALKYNKQDRLPHIFCSGGNGVINGFLAAEELNHPEDVIAVSGIGCSSRVPQYLYCDSLHTWGRSTAF
ATGCKIARPKWVFTVDKIDIAAGIKNRHIKQDNRNINFTVICIDNINYNKQVSTIYCKKATATVQGI
ENTHDLCKALADGATVVAHMTAHPICLQVSTSKKIGKMGAFATFVVSQCPPTVYGRNISRZPMNLFKRENS
IHLNKAUNSEBELNFIYVQELFDIEKIEVFEELHKLIEKLKE
SEQ ID 30
```

```
>gi 15668512|ref|NP_247310.1| hypothetical protein MJ_0337
[Methanocaldococcus jannaschii DSM 2661]
MHALNEYDAQIVEQAKHFLDSULFSRKIFQKKRIEDVEVNLVQVFDENAFKKGSELTVEIKKTTTSFTV
FCNLNLYTKAPFFVEFSGNADNKAQIFESLAKVVARAENQYSICALSKNNTAVGASASNGADITTPKIANDIID
AKTIEGNSAKCALVAPVDAICFRKIGTQGSAYDETDKDFIEIIFTNLITKSAVLYPIDIALQMWAVEA
DQFTEKATQVBFITTAISPMVNFKNIGIKQVGLG
SEQ ID 31
```

```
>gi 15668717|ref|NP_247116.1| 2 oxoglutarate ferredoxin:oxidoreductase
subunit beta [Methanocaldococcus jannaschii DSM 2661]
MHAFAIKYNKQDRLPHIFCSGGNGATVMMKQFIKATFANIKPPQVTAUSGIGCSSRVPQYLYCDSLHTWGRSTAF
ATGCKIARPKWVFTVDKIDIAAGIKNRHIKQDNRNINFTVICIDNINYNKQVSTIYCKKATATVQGI
ENTHDLCKALADGATVVAHMTAHPICLQVSTSKKIGKMGAFATFVVSQCPPTVYGRNISRZPMNLFKRENS
IHLNKAUNSEBELNFIYVQELFDIEKIEVFEELHKLIEKLKE
SEQ ID 32
```

【図 25 - 1 4】

```
>MtiCBenzoylformate decarboxylase 4.1.1.7 Sulfotobussolifataricus
MKVGNALFKMSBELGRCVFGNGGTETLEFLNHPKEDFNLYLALHDGIVSGASGYYTATKPFQIVNEHSGEGLT
NMGKPTVSAIGRIPIVVMQGOYVNLIDPPIYDGPDKIKQGVNKAATFIRSKDAIKTFIRAKKRLTPPIG
PVLISLPDPTDMEVSEVGEVQVPIKYPYSGCTCTSAIEFFLVKWSASASIAVAGYVSIFSAHESVPLAEKLN
APITFEPLSIFPILDSHILFKGPKLSRYKAGGVYKSELELDLVVIQGNLHYVVPFVDIPLINIVEVTSLEKES
PRKNVTIYCNPKDFLIKLYNMLYKGLNRIIKRENPDLEQGGITFVFERMKGYLDKYTIFABEIPTYRDLIKI
TELNPSLSYITRSGLLHVALSALVGSINSANVLAIGDGSFNYPGALMSAYKSTRVLYVINNEGYSASLSH
GVKDALPFSITSPVYVALANGFEAKESPDIKDKLNLWLPEDDPELLEIPLARR
SEQ ID 36
```

```
>varu1 Pseudomonas aeruginosa 2-ketobarginine decarboxylase
NGRRALRREFRLRNSFNTRILNMFKTLTAGVALVELLANYGVDTVFSGIVGVTLELDPGSGQIRHVLTRH
EQGAGHAGDGYARVSGKPGVCFVIGSGVTVTAIGQVAAQVFLVVISVNHSAIGKQWGLHETQDORANI
APITAFSALALOPEQLPILLAKAVVDSSEPRFVHISIFLDVLAAPVNDHFAVAPRGRGVCTEALRAAAE
RFAARRRPMIAGGGAAGADALAAHRIARHPTSVALKGGLPPHAPRAGAAICVAPRGMIAHADVLAAG
TEBNDTFNREBELPLGELIRVCTDPKRNENFPEVALRGQGRQTEALARLFOKRRADAPALAPVARLASAI
KAAHATLGAHVALDIAAALAPATYITUMTILAYICVAYASAKHAPQWLBUTVGLCYGLSGLAGKALAP
QRGVLVNGGGLPTAGELATASELDSPVLVLLMHDLQIRDMGLGITEVGVLPNPFDPALLGRATGCA
VRPQGLNELERDLFAGSGFGVGLIELRHACAR
SEQ ID 37
```

```
>fam3phosphoenolpyruvate decarboxylaseErwinia carotovora subsp. atroseptica
(Pectobacterium atrosepticum)
NIDPNKLIEFLAQGVREFFSGVPSLLKAFCLATGSGNNGGLAHRIASNEGCAVGMALGHYLSPTPLPVVYHQNSG
LGNATPHLSLACDPVGIPTLLIGWRGEVDSGRQGHDEPQHVMGGRVTLFQNLVLEVHIVLDSNRHPPHD
TQATIGRANDEHREVAIVVRNTESSPVAPKATPEAMMRFAIVAGLAVTGSTPIVSTTGNNREIYEIPE
QRCGCHQHVELIVCGWGLASQIALGLDCAQVQRPVVCLEDDGALLMHGGLTNTACASNLIHIVINNGANDVCG
QPTVASHLPLAFIAASGYGKTYABETEARLQALQALQAGSSQFIEVQCRVGRHEDLGRPATSPAEINDAFQ
PLATTFAAS
SEQ ID 38
```

```
>PDC 4.1.1.1 Pyruvate decarboxylase isozyme 3 Saccharomyces cerevisiae
NSEITLGRYLPRLKQVQVHTIFGLPGLNLSLLEKITEVDGLBWGNANELKAAVAAQYARIKGLSVLVITPG
VGLLSALRGAGSIAKRVGVHIVGVVSFAQKQLLRLHIGRDEIVFRRHSARLKTTSATIDATAPAEIS
KLIRPTTIRQVGLCPANLVGLVGVGLLEKPTGLLSAPMSSEAEKEVITVTELTIGMKNQVPLSACASH
NWKETQRLDLPDPAFVPLWGLGSQDHPRYGQVYVTLKQVQKQVSEALLILVGLALLSDFWNTGSPXS
VKTNNVFEHSDYVKNVATPLAGVQMPALCNLVIPDNVKGYSVPTETPRANKGVIASTPLKQWENHMLS
KFLPESGLVISETOSAFQINQTEPKLAYISQVLMGSIQFTGATLGAFAABEIDPNKRVILPIGGGSLQIT
VCELSIMRGLGFLPLVLMNDGYIEKLHSGHABEINIQTNHLLALPAPGAKZENMKIATSGENDALTTS
EQKNSVIRLIELKLVFQDAPESLIRQAOLTAATNAQO
SEQ ID 39
```

【図 25 - 1 5】

```
>IpdC Imidazole-3-pyruvate decarboxylase Pantoea agglomerans
NSDFTVQNYLALQDGGVNHLEGGVQDYNLSELDVIAHSDIGWGCANELNNAVAAQYARCTGMALL
TTFGVGLSGLSINGLAGFAEYLVIIIHVGAPSGAMQGGQCVHHTLGLGDPGHITMAKEYSAAATALTAQATA
EIERVILTLGQHPFVGLMLPVVAQRTSAFGCPMPTTASDEVRIFAQARERLLAPKRVSLADFLAQNI
GQCPALLALRTGRATFLNGLHGVLEDSQGGPVGTASGSGSDVQKQIEEVEVIGAGVREPTITTAGTQQQ
PQGRALITIQHISASVAGQTFATISMAFATLQALVPTFERLGAQWGAACAPRAARVDPDAALIQAPVQAMQCP
QGRILHAGQCAHGAHSLFVAGLGLVQLPWSIATLPLAFGQGTARFGQVILISGDSAGLCTQSLGSH
LPDQCHFLITLNNRQUTTEALIDSAQPTINDIAGQWHTALFQANSLECCQGHKISBTVQALHAGLTQGRSL
STFVVMQKEDLPPLLRKVSACLRQIG
SEQ ID 40
```

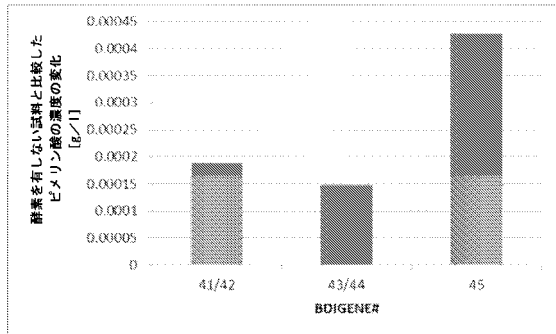
【図 25 - 1 3】

```
>kgd 3 ketoglutarate decarboxylase 4.1.1.71 Mycobacterium leprae
HMCSSPFGQENHLYSEHYKRPKPDQPSVLPSHHEFLVINYPESTAEPLTIDPTSDKQPSATPCAMFAAADPV
ASRAKFAITPTVANGTAAGSAAAPAKTTTTTPIEGDELQVLRGAAYVYHNSASLDVPTATSVAVFAHMLIDN
RTVINQGLKRNPGGKISFTHLLGVAVQAVKTFNINRHYAEIKGKIAUTFAHTHLGLADLQGLKGRSLVVA
GIERCEBLRFAQVTAEDIVRRARDGLTAEFFAGVTISLTNPGTITVHIOVEPLMTGQGLIGVAGNEYPAIF
QASAEKRIAEGLIGLITLSTTQHKIICALSGDQFQNTHEMVLSHSDVHDEIFRSLIPYLPVRKNTLNDSIV
QANRVHMLIARTNRRGLKADITDFLRLENTFRSEHPLDOLLHGLTINOLLRFVFNVGFGGHNRYELRGLGLL
RANCRHIOVEYVETLDEPQDHLQVETIKVSTVABQAVILSKLIAAEFTETHTKYVQGAEPHLEGEV
IPNDALIDQCANHOLEEVIQHEWRGRMLANIVKNEYQIETTECHLMPFLASGGVYTHLGAOLYLGQ
IQUHDIQVSLIANTSHLAEVVPVLEQVRAKQULLNKVUNQNOQEAQSVYHMLHGAARACQVQVATZNLALL
PQYRVGGPIHIVNQITGPTTAFEYSRSEYCTLVAKRMIGAPIHHNGDDPEACVWAKLAVOPRQPFEDWID
KLCYPRRSHNEGDSNTHPTMYQVVDTKGARKSYTEALIGRGLISLKSABDAIRDVGQGLERVHFEVDLETH
GQPFESVSESQMIFAGLSTAVDKALLAIGCAFLAVPEGTVVPRVGFVLEKRRHAYESKIDWAFAPALLAGS
LVABGKVLRLSGQDTRKGTFSQRHSLIDRHTGEFTPLQLLANNPLGSPFGKFLVYNSPLEYAAVGFYGVY
TGKPDVYVMEANFGDFVMAQSIDEFTNSGARHAGLSTVLLPLPHGHEGQSPDHSGRISAFGLDAREGNT
YAPSTISHTHLRRHALLQIRKLVIVTFKSMRKAASVDIKNTIEKRVLYEETPYEOSTDQSGYTVVL
LCCGLVYELAARKKINARDVAVPIEQALAPRRLRQETLORCEAKSTFVQPEFANQANRPGSELPELL
PFIQGTETPSIRAMASPSGSSVHAYEQQRLDTAFG
SEQ ID 33
```

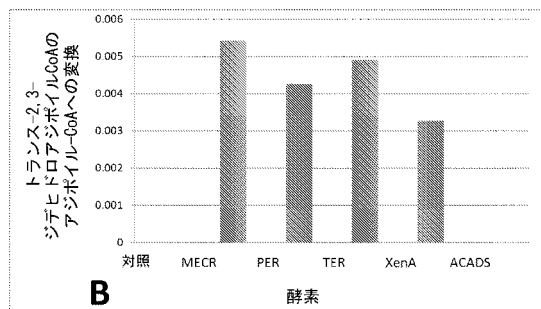
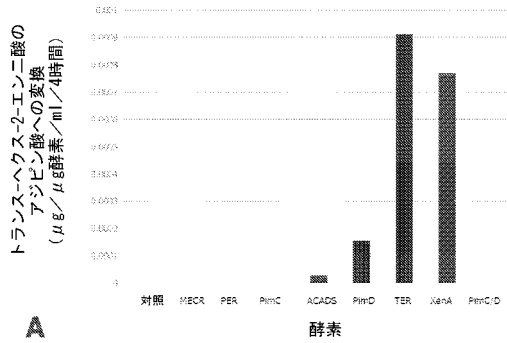
```
>kgd Lactococcus lactis Q68107
RTVYDYLQWLAELGLLEFCVQPDYVQLPLVQISHEKPKVGRANELNASYMAQGYARTKKAAPLTVQVQ
ELSAVGLAGSTAEHLTVVGVYQSPVQVQELPVPYHHTLADQYKRYHMYHBLVTAANTLLAENALVELHWL
SALLKEKKEVYINLWVAAAKAEFPLSLPXFENSTHNTSQELINKQSSKMAKKEVTVTOBBIISGLELTV
TQPSKTHVETPITLHFKKSSVDEALPSFLGIYHNTLSEPHLEFPVSEADPILNGLVLSSTGAFHSLEHNKK
ISLNDIEGKTFNERINQDFEELSLSLLDLSIEYKGYIDKKGEFVFNALLSQDRMQAVENLTQSNETIVA
EQGTFFGASSIFLKSQHFICQPLHSGIQTFFAALGQCIADKESRHLLPISGGSQQLTVQELGLAREKINPI
CFIITNNGDTVEREIGHPNQSINQWNNYSKLPESFGATEDPVVSKIVATENEFVSNKEAQAPNRMHIELI
LASEGAVLEKMGALFAEQNKS
SEQ ID 34
```

```
>ARO10Transaminated amino acid decarboxylaseEC=4.1.1.-Saccharomyces
cerevisiae
KAPVITKFPVNGEPRHVSNGACIPFGYETFKRLSISDTSFVGVPDGLSLLELYLSPSVESAGLMAVGTGN
ELAAAYAAQVSTSNKISGCLITTYGVGLSALNLAGSPAEINNVLMVAVASLIDRSKSHFERNLHVLVQL
HESNPKGPHHVVHMDIKVACQAVYSELTEPACIQVNIHDTYKYSAGYVFPADFDMSVTCNTVNFV
ISQCGLVYVPSHQLSGLINKITWNIYSKCTPALGQVLTGVVGNPLHKICTGTGNPSTVMKGVDSHNP
TYMGVYNGKGLKQVYEFELCDVILHGVQVLINEINNGHYFTTYFPHAKIIEFFNPIRLVDTGSGNEQPKIN
FAPILNELYKRIQVSKLSCYDSNVTVTHETNRLEDPNGQSIIQVGLKTNPIFLNPGDVVVEGSGPFS
VRSPAPPSGLKVISQGFPLSIGMALPAALGVGTAGQDHSHAHINGVNEEDKYPPLIPFGDGAACQICQLSTI
LCHNPLLEVIIRNNHGTIERALHGPITRSYNDVMHUKWTLFEAFQDFEGYINSLTQCPSLALKEELKNSR
HSGCLLEVLGLCEPTEFLKGVSAALAKNSR
SEQ ID 35
```

【図 2 6】



【図 27】



【配列表】

2015500663000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成26年10月6日(2014.10.6)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ピメロイル-CoA (PCoA) またはピメロイル [acp] (PACP) を、PCoAまたはPACPのピメリン酸 (PA) へのチオエステル加水分解を触媒する酵素と接触させる段階を含み、ここでPAが生成される、化合物を変換する方法であって、

酵素が、チオエステラーゼ、酸-チオールリガーゼ、またはCoAトランスフェラーゼであり、

チオエステラーゼが、

tesBまたはacot13の遺伝子産物、および

EC 3.1.2.14におけるチオエステラーゼ

のうちの1つまたは複数であり、

酸-チオールリガーゼが、EC 6.2.1.14 (BioWなど) またはEC 6.2.1.20からのアシル-[acp]-シンテターゼであり、かつ、

CoAトランスフェラーゼが、

EC 2.8.3.14におけるCoAトランスフェラーゼ、および

thnHの遺伝子産物

のうちの1つまたは複数である、前記方法。

【請求項 2】

PCoAまたはPACPが、

(a) 図10Aまたは図10Bに示される経路、

(b) ビオチン生合成経路I（図6参照）、

(c) ビオチン生合成経路II（図5参照）、

(d) ベンゾエートもしくはシクロヘキサニカルボキシレート分解経路（図7参照）、

(e) シクロヘキサニカルボキシレート経路（図9参照）、および

(f) 3つのマロニル-CoA分子の縮合（図4参照）

のうちの1つまたは複数の工程を含む過程によって生成され、

ここでPCoAまたはPACPが生成される、

請求項1記載の方法。

【請求項 3】

PAを、PAのピメリン酸セミアルデヒド（PAS）へのカルボン酸還元を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでPASが生成される、請求項1または2記載の方法。

【請求項 4】

PAのPASへのカルボン酸還元を触媒する酵素が、

NAD依存性非アシル化アルデヒドデヒドロゲナーゼ、

スフィンゴモナス（Shingomonas）属のthnGの遺伝子産物、および

カプリアビダス（Cupriavidus）属種の遺伝子産物

のうちの1つまたは複数である、請求項3記載の方法。

【請求項 5】

PCoAまたはPACPを、PCoAまたはPACPのPASへの還元を触媒する酵素と接触させる段階を含み、ここでPASが生成される、化合物を変換する方法であって、PCoAまたはPACPのPASへの還元を触媒する酵素が、EC 1.2.1.3、EC 1.2.1.20、EC 1.2.1.22、EC 1.2.1.57、またはEC 1.2.1.76における脂肪-アシル-[acp]レダクターゼまたはアルデヒドデヒドロゲナーゼである、前記方法。

【請求項 6】

PCoAまたはPACPが、

(a) 図10Aまたは図10Bに示される経路、

(b) ビオチン生合成経路I（図6参照）、

(c) ビオチン生合成経路II（図5参照）、

(d) ベンゾエートもしくはシクロヘキサニカルボキシレート分解経路（図7参照）、

(e) シクロヘキサニカルボキシレート経路（図9参照）、および

(f) 3つのマロニル-CoA分子の縮合（図4参照）

のうちの1つまたは複数の工程を含む過程によって生成され、

ここでPCoAまたはPACPが生成される、

請求項5記載の方法。

【請求項 7】

α -ケトスベレート（AKS）を、AKSのPASへの α -ケト酸脱カルボキシル化を触媒する酵素と接触させる段階を含み、ここでPASが生成される、化合物を変換する方法であって、該酵素がアセト乳酸シンターゼである、前記方法。

【請求項 8】

AKSが、

(a) 図10に示される経路、または

(b) メタン生成古細菌の補酵素B経路（図3参照）

のうちの1つまたは複数の工程を含む過程によって生成される、

請求項7記載の方法。

【請求項 9】

AKSを、 α -アミノスベレート（AAS）を生成するためのAKSへのアミノ基の転移を触媒す

る酵素と接触させる段階を含み、ここでAASが生成される、化合物を変換する方法であって、該酵素がEC 2.6.1.21におけるアミノトランスフェラーゼである、前記方法。

【請求項10】

AKSが、

(a) 図10に示される経路、または

(b) メタン生成古細菌の補酵素B経路（図3参照）

のうちの1つまたは複数の工程を含む過程によって生成される、

請求項9記載の方法。

【請求項11】

AASを、AASの7-アミノヘプタン酸（7 AHA）への α -アミノ酸脱カルボキシル化を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで7 AHAが生成される、請求項9または10記載の方法。

【請求項12】

AASの7-アミノヘプタン酸（7 AHA）への α -アミノ酸脱カルボキシル化を触媒する酵素が、

α -ケトデカルボキシラーゼもしくはアセト乳酸シンターゼ、または

EC 4.1.1.-における酵素

のうちの1つまたは複数である、請求項11記載の方法。

【請求項13】

7 AHAを、7 AHAのエナントラクタム（ENTL）へのアミド加水分解を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでENTLが生成される、請求項11または12記載の方法。

【請求項14】

7 AHAを、7 AHAの7-アミノヘプタナール（7 AHT）へのアルデヒド脱水素化を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで7 AHTが生成される、請求項11または12記載の方法。

【請求項15】

7 AHTを、1,7-ジアミノヘプタン（1,7 DAH）を生成するための7 AHTへのアミノ基の転移を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで1,7 DAHが生成される、請求項14記載の方法。

【請求項16】

7 AHTを、1,7-ジアミノヘプタン（1,7 DAH）を生成するための7 AHTへのアミノ基の転移を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで1,7 DAHが生成される、化合物を変換する方法であって、1,7-ジアミノヘプタン（1,7 DAH）を生成するための7 AHTへのアミノ基の転移を触媒する酵素が、

EC 2.6.1.21におけるアミノ酸アミノトランスフェラーゼ、

脱アミノ基デヒドロゲナーゼ、および

EC 2.6.1.11、EC 2.6.1.13、EC 2.6.1.48、またはEC 2.6.1.62における ω -トランスアミナーゼ

のうちの1つまたは複数である、前記方法。

【請求項17】

図10に示す経路の1つまたは複数の工程によって生成される7 AHAのアルデヒド脱水素化によって7 AHTが生成される、請求項16記載の方法。

【請求項18】

前記酵素、あるいは1つまたは複数の酵素が、（i）単離されている、（ii）細胞溶解物もしくは部分精製された細胞溶解物中に存在する、または（iii）それもしくはそれらを組換え発現する宿主細胞中に存在する、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

前記酵素、あるいは1つまたは複数の酵素が、（i）単離されている、（ii）細胞溶解物、部分精製された細胞溶解物、複数の細胞溶解物、もしくは複数の部分精製された細胞溶解物中に存在する、または（iii）それもしくはそれらを組換え発現する1つまたは複数の

宿主細胞株中に存在する、請求項5または6に記載の方法。

【請求項20】

前記酵素、あるいは1つまたは複数の酵素が、(i)単離されている、(ii)細胞溶解物もしくは部分精製された細胞溶解物中に存在する、または(iii)それもしくはそれらを組換え発現する宿主細胞中に存在する、請求項7または8に記載の方法。

【請求項21】

前記酵素、あるいは1つまたは複数の酵素が、(i)単離されている、(ii)細胞溶解物もしくは部分精製された細胞溶解物中に存在する、または(iii)それもしくはそれらを組換え発現する宿主細胞中に存在する、請求項9～15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項22】

前記酵素、あるいは1つまたは複数の酵素が、(i)単離されている、(ii)細胞溶解物もしくは部分精製された細胞溶解物中に存在する、または(iii)それもしくはそれらを組換え発現する宿主細胞中に存在する、請求項16または17に記載の方法。

【請求項23】

(a) (i) チオエステラーゼ、酸-チオールリガーゼ、もしくはCoAトランスフェラーゼ、および(ii) NAD依存性非アシル化アルデヒドデヒドロゲナーゼ、

(b) (i) 脂肪-アシル-[acp]レダクターゼ、および(ii) 反応生成物がPCoAまたはPACPである反応を触媒する酵素、

(c) (i) アセト乳酸シンターゼ、および(ii) 反応生成物がAKSである反応を触媒する酵素、

(d) (i) アミノトランスフェラーゼ、および(ii) アセト乳酸シンターゼ、または

(e) (i) 脱アミノ基デヒドロゲナーゼ、および(ii) 反応生成物が7 AHTである反応を触媒する酵素

をコードする1つまたは複数の外因性核酸を含む単離された細胞。

【請求項24】

原核細胞または真核細胞である、請求項23記載の細胞。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0116

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0116】

[本発明1001]

2,6ジアミノピメレート (2,6 DAP) および α -アミノピメレート (AAP) から選択される化合物を、2,6 DAPの6-アミノ-2-ヘプテン二酸 (6A2HA) への還元的脱アミノ化またはAAPの2-ヘプテン二酸 (2 HDA) への還元的脱アミノ化を触媒する酵素と接触させる段階を含む、化合物を変換する方法であって、ここで6A2HAまたは2 HDAが生成される、方法。

[本発明1002]

化合物が2,6 DAPである、本発明1001の方法。

[本発明1003]

6A2HAを、6A2HAのAAPへのエノエート還元を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでAAPが生成される、本発明1002の方法。

[本発明1004]

AAPを、AAPの2 HDAへの還元的脱アミノ化を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで2 HDAが生成される、本発明1003の方法。

[本発明1005]

2 HDAを、2 HDAのピメリン酸 (PA) へのエノエート還元を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでPAが生成される、本発明1004の方法。

[本発明1006]

PAを、PAのピメリン酸セミアルデヒド (PAS) へのカルボン酸還元を触媒する酵素と接

触させる段階をさらに含み、ここでPASが生成される、本発明1005の方法。

[本発明1007]

PASを、PASの7-アミノヘプタン酸（7 AHA）へのセミアルデヒドアミノ化を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで7 AHAが生成される、本発明1006の方法。

[本発明1008]

7 AHAを、7 AHAのエナントラクタム（ENTL）へのアミド加水分解を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでENTLが生成される、本発明1007の方法。

[本発明1009]

7 AHAを、7 AHAの7-アミノヘプタナール（7 AHT）へのアルデヒド脱水素化を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでAHTが生成される、本発明1007の方法。

[本発明1010]

7 AHTを、1,7-ジアミノヘプタン（1,7 DAH）を生成するための7 AHTへのアミノ基の転移を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで1,7 DAHが生成される、本発明1009の方法。

[本発明1011]

2 HDAを、2-ヘプテン二酸-補酵素A（2 HDA-CoA）を生成するための2 HDAへの補酵素A（CoA）の転移を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで2 HDA-CoAが生成される、本発明1004の方法。

[本発明1012]

2 HDA-CoAを、2 HDA-CoAのピメロイルCoA（PCoA）へのエノエート還元を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでPCoAが生成される、本発明1011の方法。

[本発明1013]

PCoAを、PCoAのPAへのチオエステル加水分解を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでPAが生成される、本発明1012の方法。

[本発明1014]

PAを、PAのPASへのカルボン酸還元を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでPASが生成される、本発明1013の方法。

[本発明1015]

PASを、PASの7 AHAへのセミアルデヒドアミノ化を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで7 AHAが生成される、本発明1014の方法。

[本発明1016]

7 AHAを、7 AHAのENTLへのアミド加水分解を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでENTLが生成される、本発明1015の方法。

[本発明1017]

7 AHAを、7 AHAの7 AHTへのアルデヒド脱水素化を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで7 AHTが生成される、本発明1015の方法。

[本発明1018]

7 AHTを、1,7 DAHを生成するための7 AHTへのアミノ基の転移を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで1,7 DAHが生成される、本発明1017の方法。

[本発明1019]

AAPを、 α -ケトピメレート（AKP）を生成するためのAAPへのアミノ基の転移を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでAKPが生成される、本発明1004の方法。

[本発明1020]

AKPを、AKPの α -ヒドロキシピメレート（AHP）へのケトン還元を触媒する1つまたは複数の酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでAHPが生成される、本発明1019の方法。

[本発明1021]

AHPを、 α -ヒドロキシピメレート（AHP-CoA）を生成するためのAHPへのCoAの転移を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでAHP-CoAが生成される、本発明1020の方法。

[本発明1022]

AHP-CoAを、AHP-CoAの2 HDA-CoAへの脱水を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで2 HDA-CoAが生成される、本発明1021の方法。

[本発明1023]

2 HDA-CoAを、2 HDA-CoAのPCoAへのエノエート還元を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでPCoAが生成される、本発明1022の方法。

[本発明1024]

PCoAを、PCoAのPAへのチオエステル加水分解を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでPAが生成される、本発明1023の方法。

[本発明1025]

PAを、PAのPASへのカルボン酸還元を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでPASが生成される、本発明1024の方法。

[本発明1026]

PASを、PASの7 AHAへのセミアルデヒドアミノ化を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで7 AHAが生成される、本発明1025の方法。

[本発明1027]

7 AHAを、7 AHAのENTLへのアミド加水分解を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでENTLが生成される、本発明1026の方法。

[本発明1028]

7 AHAを、7 AHAの7 AHTへのアルデヒド脱水素化を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで7 AHTが生成される、本発明1026の方法。

[本発明1029]

7 AHTを、1,7 DAHを生成するための7 AHTへのアミノ基の転移を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで1,7 DAHが生成される、本発明1028の方法。

[本発明1030]

AHPを、AHPの2 HDAへの脱水を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで2 HDAが生成される、本発明1020の方法。

[本発明1031]

2 HDAを、2 HDAのピメリン酸 (PA) へのエノエート還元を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでPAが生成される、本発明1030の方法。

[本発明1032]

PAを、PAのPASへのカルボン酸還元を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでPASが生成される、本発明1031の方法。

[本発明1033]

PASを、PASの7 AHAへのセミアルデヒドアミノ化を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで7 AHAが生成される、本発明1032の方法。

[本発明1034]

7 AHAを、7 AHAのENTLへのアミド加水分解を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでENTLが生成される、本発明1033の方法。

[本発明1035]

7 AHAを、7 AHAの7 AHTへのアルデヒド脱水素化を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで7 AHTが生成される、本発明1033の方法。

[本発明1036]

7 AHTを、1,7 DAHを生成するための7 AHTへのアミノ基の転移を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで1,7 DAHが生成される、本発明1035の方法。

[本発明1037]

2 HDAを、2 HDA-CoAを生成するための2 HDAへのCoAの転移を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで2 HDA-CoAが生成される、本発明1030の方法。

[本発明1038]

2 HDA-CoAを、2 HDA-CoAのPCoAへのエノエート還元を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでPCoAが生成される、本発明1037の方法。

[本発明1039]

PCoAを、PCoAのPAへのチオエステル加水分解を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでPAが生成される、本発明1038の方法。

[本発明1040]

PAを、PAのPASへのカルボン酸還元を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでPASが生成される、本発明1039の方法。

[本発明1041]

PASを、PASの7 AHAへのセミアルデヒドアミノ化を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで7 AHAが生成される、本発明1040の方法。

[本発明1042]

7 AHAを、7 AHAのENTLへのアミド加水分解を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでENTLが生成される、本発明1041の方法。

[本発明1043]

7 AHAを、7 AHAの7 AHTへのアルデヒド脱水素化を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで7 AHTが生成される、本発明1041の方法。

[本発明1044]

7 AHTを、1,7 DAHを生成するための7 AHTへのアミノ基の転移を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで1,7 DAHが生成される、本発明1043の方法。

[本発明1045]

AKPを、AKPの α -ケトスベレート (AKS) への α -ケト酸鎖伸長を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでAKSが生成される、本発明1019の方法。

[本発明1046]

AKSを、 α -アミノスベレート (AAS) を生成するためのAKSへのアミノ基の転移を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでAASが生成される、本発明1045の方法。

[本発明1047]

AASを、AASの7 AHAへの α -アミノ酸脱カルボキシル化を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで7 AHAが生成される、本発明1046の方法。

[本発明1048]

7 AHAを、7 AHAのENTLへのアミド加水分解を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでENTLが生成される、本発明1047の方法。

[本発明1049]

7 AHAを、7 AHAの7 AHTへのアルデヒド脱水素化を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで7 AHTが生成される、本発明1047の方法。

[本発明1050]

7 AHTを、1,7 DAHを生成するための7 AHTへのアミノ基の転移を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで1,7 DAHが生成される、本発明1049の方法。

[本発明1051]

AKSを、AKSのPASへの α -ケト酸脱カルボキシル化を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでPASが生成される、本発明1045の方法。

[本発明1052]

PASを、PASの7 AHAへのセミアルデヒドアミノ化を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで7 AHAが生成される、本発明1051の方法。

[本発明1053]

7 AHAを、7 AHAのENTLへのアミド加水分解を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでENTLが生成される、本発明1052の方法。

[本発明1054]

7 AHAを、7 AHAの7 AHTへのアルデヒド脱水素化を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで7 AHTが生成される、本発明1052の方法。

[本発明1055]

7 AHTを、1,7 DAHを生成するための7 AHTへのアミノ基の転移を触媒する酵素と接触さ

せる段階をさらに含み、ここで1,7 DAHが生成される、本発明1054の方法。

[本発明1056]

PCoAを、PCoAのPASへの還元を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでPASが生成される、本発明1023の方法。

[本発明1057]

PASを、PASの7 AHAへのセミアルデヒドアミノ化を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで7 AHAが生成される、本発明1056の方法。

[本発明1058]

7 AHAを、7 AHAのENTLへのアミド加水分解を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでENTLが生成される、本発明1057の方法。

[本発明1059]

7 AHAを、7 AHAの7 AHTへのアルデヒド脱水素化を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで7 AHTが生成される、本発明1057の方法。

[本発明1060]

7 AHTを、1,7 DAHを生成するための7 AHTへのアミノ基の転移を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで1,7 DAHが生成される、本発明1059の方法。

[本発明1061]

PCoAを、PCoAのPASへの還元を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでPASが生成される、本発明1038の方法。

[本発明1062]

PASを、PASの7 AHAへのセミアルデヒドアミノ化を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで7 AHAが生成される、本発明1061の方法。

[本発明1063]

7 AHAを、7 AHAのENTLへのアミド加水分解を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでENTLが生成される、本発明1062の方法。

[本発明1064]

7 AHAを、7 AHAの7 AHTへのアルデヒド脱水素化を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで7 AHTが生成される、本発明1062の方法。

[本発明1065]

7 AHTを、1,7 DAHを生成するための7 AHTへのアミノ基の転移を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで1,7 DAHが生成される、本発明1064の方法。

[本発明1066]

6A2HAおよび2 HDAから選択される化合物を、6A2HAのAAPへのエノエート還元または2 HDAのPAへのエノエート還元を触媒する酵素と接触させる段階を含み、ここでAAPまたはPAが生成される、化合物を変換する方法。

[本発明1067]

PCoAおよびピメロイル- [acp] (PACP) から選択される化合物を、PCoAまたはPACPのPAへのチオエステラ-ゼ加水分解を触媒する酵素と接触させる段階を含み、ここでPAが生成される、化合物を変換する方法。

[本発明1068]

PAを、PAのPASへのカルボン酸還元を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでPASが生成される、本発明1067の方法。

[本発明1069]

PASを、PASの7 AHAへのセミアルデヒドアミノ化を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで7 AHAが生成される、本発明1068の方法。

[本発明1070]

7 AHAを、7 AHAのENTLへのアミド加水分解を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここでENTLが生成される、本発明1069の方法。

[本発明1071]

7 AHAを、7 AHAの7 AHTへのアルデヒド脱水素化を触媒する酵素と接触させる段階をさ

らに含み、ここで7 AHTが生成される、本発明1069の方法。

[本発明1072]

7 AHTを、1,7 DAHを生成するための7 AHTへのアミノ基の転移を触媒する酵素と接触させる段階をさらに含み、ここで1,7 DAHが生成される、本発明1071の方法。

[本発明1073]

AKPを、AKPのAHPへのケトン還元を触媒する1つまたは複数の酵素と接触させる段階を含み、ここでAHPが生成される、化合物を変換する方法。

[本発明1074]

AKPが α -ケトアジペートまたは α -ケトグルタレートの鎖伸長によって生成される、本発明1073の方法。

[本発明1075]

AHPをPAまたはPCoAに変換する段階をさらに含む、本発明1073の方法。

[本発明1076]

α -ケト酸鎖の伸長によってAKPをAKSに変換する段階を含む、化合物を変換する方法。

[本発明1077]

AKPが α -ケトアジペートまたは α -ケトグルタレートの鎖伸長によって生成される、本発明1076の方法。

[本発明1078]

PASを、PASの7 AHAへのセミアルデヒドアミノ化を触媒する酵素と接触させる段階を含み、ここで7 AHAが生成される、化合物を変換する方法。

[本発明1079]

PASが、2,6 DAP、AKG、PCoAまたはPACPからの変換によって得られる、本発明1078の方法。

[本発明1080]

PCoAおよびPACPから選択される化合物を、該化合物のPASへの還元を触媒する酵素と接触させる段階を含み、ここでPASが生成される、化合物を変換する方法。

[本発明1081]

PASを、PASの7-ヒドロキシヘプタン酸（7 HHA）へのアルコール脱水素化を触媒する酵素と接触させる段階を含み、ここで7 HHAが生成される、化合物を変換する方法。

[本発明1082]

前記酵素、または前記1つまたは複数の酵素が、精製された酵素である、本発明1001～1081のいずれかの方法。

[本発明1083]

前記酵素、または前記1つまたは複数の酵素が、細胞溶解物または部分精製された細胞溶解物中に存在する、本発明1001～1081のいずれかの方法。

[本発明1084]

前記酵素、または前記1つまたは複数の酵素が、該酵素を組換え発現する細胞中に存在する、本発明1001～1081のいずれかの方法。

[本発明1085]

酵素がアンモニアリアーゼを含む、本発明1001または1002の方法。

[本発明1086]

アンモニアリアーゼが、EC 4.3.1におけるアンモニアリアーゼである、本発明1085の方法。

[本発明1087]

EC 4.3.1におけるアンモニアリアーゼが、EC 4.3.1.1、EC 4.3.1.2、EC 4.3.1.3、EC 4.3.1.9、EC 4.3.1.12、EC 4.3.1.13、EC 4.3.1.23、またはEC 4.3.1.24を含む、本発明1086の方法。

[本発明1088]

酵素がエン酸レダクターゼを含む、本発明1003、1005、1012、1023、1031、1038、および1066のいずれかの方法。

[本発明1089]

エン酸レダクターゼがEC 1.3.1におけるエン酸レダクターゼを含む、本発明1088の方法。

[本発明1090]

エン酸レダクターゼが以下のものである、本発明1088の方法：

(a) EC 1.3.1におけるものであって、EC 1.3.1.8；EC 1.3.1.9；EC 1.3.1.10、EC 1.3.1.31；EC 1.3.1.38；EC 1.3.1.39；EC 1.3.1.44；もしくはEC 1.3.1.62におけるピメロイル-CoAデヒドロゲナーゼ、例えばPimC／PimDもしくはThnJ／ThnKなどを含む；または

(b) EC 1.3、例えばEC 1.3.8.1；EC 1.3.99.3；EC 1.3.99.B10；もしくはシントロファス・アシディトロフィカス (*Syntrophus aciditrophicus*) 2,3-ジデヒドロピメリル-CoAレダクターゼおよびそれらのホモログにおけるものである。

[本発明1091]

酵素がカルボン酸レダクターゼまたはNAD依存性非アシル化アルデヒドデヒドロゲナーゼを含む、本発明1006、1014、1025、1032、1040、および1068のいずれかの方法。

[本発明1092]

カルボン酸レダクターゼが、EC 1.2.99におけるカルボン酸レダクターゼ、またはNAD依存性非アシル化アルデヒドデヒドロゲナーゼ、例えばスフィンゴモナス (*Shingomonas*) 属種もしくはカプリアビダス (*Cupriavidus*) 属種におけるThnGなどを含む、本発明1091の方法。

[本発明1093]

EC 1.2.99におけるカルボン酸レダクターゼがEC 1.2.99.6を含み、NAD依存性非アシル化アルデヒドデヒドロゲナーゼがスフィンゴモナスにおけるThnGである、本発明1092の方法。

[本発明1094]

酵素が ω -トランスアミナーゼを含む、本発明1007、1015、1026、1033、1052、1057、1062、1069および1078のいずれかの方法。

[本発明1095]

ω トランスアミナーゼがEC 2.6.1におけるトランスアミナーゼを含む、本発明1094の方法。

[本発明1096]

EC 2.6.1における ω -トランスアミナーゼが、EC 2.6.1.18；EC 2.6.1.19；EC 2.6.1.11；EC 2.6.1.13；EC 2.6.1.39；EC 2.6.1.48；EC 2.6.1.62を含む、本発明1095の方法。

[本発明1097]

酵素がチオエステラーゼ、酸-チオールリガーゼまたはCoAトランスフェラーゼを含む、本発明1013、1024、1039、1056、1061、および1067のいずれかの方法。

[本発明1098]

チオエステラーゼがEC 3.1.2におけるチオエステラーゼを含む、本発明1097の方法。

[本発明1099]

EC 3.1.2におけるチオエステラーゼが以下のものを含む、本発明1098の方法：

EC 3.1.2.18；EC 3.1.2.19；もしくはEC 3.1.2.20由来のCoA-チオエステルに対して作用するチオエステラーゼ；

YciA、tesBもしくはAcot13の遺伝子産物；または

EC 3.1.2.14およびEC 3.1.2.21由来の[acp]-チオエステルに対して作用するチオエステラーゼ。

[本発明1100]

酸-チオールリガーゼがEC 6.2.1における酸-チオールリガーゼを含む、本発明1097の方法。

[本発明1101]

EC 6.2.1における酸-チオールリガーゼが、EC 6.2.1.3；EC 6.2.1.5；EC 6.2.1.14；またはEC 6.2.1.23由来のCoAエステルに対して作用するCoAシンテターゼ、ならびにEC 6.2.

1.14 (BioWなど) およびEC 6.2.1.20におけるアシル-[acp]-シンテターゼを含む、本発明1100の方法。

[本発明1102]

CoAトランスフェラーゼがEC 2.8.3におけるCoAトランスフェラーゼを含む、本発明1097の方法。

[本発明1103]

EC 2.8.3におけるCoAトランスフェラーゼが、EC 2.8.3.12；EC 2.8.3.13またはEC 2.8.3.14またはThnHの遺伝子産物を含む、本発明1102の方法。

[本発明1104]

酵素がアミノ酸アミノトランスフェラーゼまたは脱アミノ基デヒドロゲナーゼを含む、本発明1010、1018、1019、1029、1036、1044、1046、1050、1060、1065および1072のいずれかの方法。

[本発明1105]

アミノ酸アミノトランスフェラーゼがEC 2.6.1におけるアミノトランスフェラーゼを含む、本発明1104の方法。

[本発明1106]

EC 2.6.1におけるアミノ酸アミノトランスフェラーゼが、EC 2.6.1.21；EC 2.6.1.39；EC 2.6.1.42；またはEC 2.6.1.67を含む、本発明1105の方法。

[本発明1107]

1つまたは複数の酵素がカルボニルレダクターゼを含む、本発明1020または1073の方法。

[本発明1108]

カルボニルレダクターゼが、EC.1.1.1.184、EC 1.1.1.79、EC 1.1.1.B3；EC 1.1.1.B4；またはEC 1.1.99.2.もしくはEC 1.1.99.6由来の2-ヒドロキシグルタリルデヒドロゲナーゼ (dehydrogenase) / α ケトグルタル酸 (ketoglutarate) レダクターゼを含む、本発明1107の方法。

[本発明1109]

酵素が α -ケト酸デカルボキシラーゼまたはアセト乳酸シンターゼを含む、本発明1047または1051の方法。

[本発明1110]

酵素が、脂肪-アシル-CoAレダクターゼまたは脂肪-アシル-[acp]レダクターゼまたはアルデヒドデヒドロゲナーゼを含む、本発明1056、1061または1080の方法。

[本発明1111]

脂肪-アシル-CoAレダクターゼ、脂肪-アシル-[acp]レダクターゼまたはアルデヒドデヒドロゲナーゼが、EC 1.2.1におけるレダクターゼである、本発明1110の方法。

[本発明1112]

EC 1.2.1における脂肪-アシル-CoAレダクターゼ脂肪-アシル-[acp]レダクターゼまたはアルデヒドデヒドロゲナーゼが、EC 1.2.1.3；EC 1.2.1.4；EC 1.2.1.20；EC 1.2.1.22；EC 1.2.1.50；EC 1.2.1.57；EC 1.2.1.63；またはEC 1.2.1.76を含む、本発明1111の方法。

[本発明1113]

酵素がアルデヒドデヒドロゲナーゼ、カルボン酸レダクターゼまたは非アシル化アルデヒドデヒドロゲナーゼを含む、本発明1009、1015、1028、1035、1043、1049、1055、1059、1064および1071のいずれかの方法。

[本発明1114]

アルデヒドデヒドロゲナーゼがEC 1.2.1を含み、カルボン酸レダクターゼまたは非アシル化アルデヒドデヒドロゲナーゼが、EC 1.2.99におけるカルボン酸レダクターゼ、またはThnGなどの非アシル化アルデヒドデヒドロゲナーゼを含む、本発明1113の方法。

[本発明1115]

EC 1.2.1におけるアルデヒドデヒドロゲナーゼがEC 1.2.1.3、EC 1.2.1.4またはEC 1.2

.1.63を含み、カルボン酸レダクターゼがEC 1.2.99.6を含み、かつ、非アシル化アルデヒドデヒドロゲナーゼがスフィンゴモナス属種またはカブリアビダス属種由来のThnGを含む、本発明1114の方法。

[本発明1116]

酵素がCoAトランスフェラーゼまたは酸-チオールリガーゼを含む、本発明1011、1021および1037のいずれかの方法。

[本発明1117]

CoAトランスフェラーゼがEC 2.8.3におけるCoAトランスフェラーゼを含み、酸チオールリガーゼがEC 6.2.1を含む、本発明1116の方法。

[本発明1118]

EC 2.8.3におけるCoAトランスフェラーゼが、EC 2.8.3.12；EC 2.8.3.13もしくはEC 2.8.3.14またはThnHの遺伝子産物を含み、EC 6.2.1における酸-チオールリガーゼがEC 6.2.1.3；EC 6.2.1.5；EC 6.2.1.14；およびEC 6.2.1.23を含む、本発明1117の方法。

[本発明1119]

酵素が、EC 3.5.2、例えば3.5.2.11などにおけるアミドヒドロラーゼである、本発明1008、1016、1027、1034、1042、1048、1053、1058、1063および1070のいずれかの方法。

[本発明1120]

酵素がヒドロリアーゼを含む、本発明1022または1030の方法。

[本発明1121]

ヒドロリアーゼがEC 4.2.1におけるヒドロリアーゼを含む、本発明1120の方法。

[本発明1122]

EC 4.2.1におけるヒドロリアーゼが、EC 4.2.1.2；EC 4.2.1.59；4.2.1.61；4.1.2.17または4.1.2.18を含む、本発明1121の方法。

[本発明1123]

α -ケト酸鎖伸長が、AksA、AksD、AksEおよびAksFを含む酵素のセットのうち1つまたは複数によって触媒される、本発明1045、1074、1076および1077のいずれかの方法。

[本発明1124]

AksAがEC 2.3.3におけるAksA酵素を含む、本発明1123の方法。

[本発明1125]

EC 2.3.3におけるAksA酵素が、EC 2.3.3.13または2.3.3.14を含む、本発明1124の方法。

[本発明1126]

AksDおよびAks Eがいずれも、EC 4.2.1.114におけるAksD/E酵素を含む、本発明1123の方法。

[本発明1127]

AksDがEC 4.2.1.114における酵素を含み、Aks EがEC 4.2.1.36における酵素を含む、本発明1123の方法。

[本発明1128]

AksFがEC 1.1.1におけるAksF酵素を含む、本発明1123の方法。

[本発明1129]

EC 1.1.1.におけるAksF酵素がEC 1.1.1.87を含む、本発明1128の方法。

[本発明1130]

α -ケト酸鎖伸長酵素の1つまたは複数がメタン生成細菌に由来する、本発明1045、1074、1076および1077のいずれかの方法。

[本発明1131]

酵素がアルコールデヒドロゲナーゼまたはアルデヒドレダクターゼを含む、本発明1081の方法。

[本発明1132]

アルコールデヒドロゲナーゼがEC 1.1.1.1、EC 1.1.1.2またはEC 1.1.1.21を含む、本発明1131の方法。

[本発明1133]

アルコールデヒドロゲナーゼが、*ザイモモナス・モビリス* (*Zymomonas mobilis*) 由来の *adhA*、*ザイモモナス・モビリス* 由来の *adhB*、*クロストリジウム・アセトブチリカム* (*Clostridium acetobutylicum*) 由来の *ブタノールデヒドロゲナーゼ*、*サッカロミセス* (*Saccharomyces*) *ADHIV*、および *S.セレビシエ* (*S.cerevisiae*) 由来の *ADH6* から選択される、本発明1131の方法。

[本発明1134]

PCoA または *PACP* が *アセチル-CoA* または *ベンゾイル-CoA* から誘導される、本発明1067または1080の方法。

[本発明1135]

アセチル-CoA が、セルロース系原材料、糖類、グリセロール、または脂肪酸を含む再生可能な原材料から誘導される、本発明1134の方法。

[本発明1136]

アセチル-CoA が *SynGas*、*メタン* または *メタノール* から誘導される、本発明1134の方法。

[本発明1137]

ベンゾイル-CoA が多環式芳香族炭化水素から誘導される、本発明1134の方法。

[本発明1138]

2,6 DAP が、*ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ* を欠くりジン産生生物によって生産される、本発明1001、1002 および 1079 のいずれかの方法。

[本発明1139]

2,6 DAP が再生可能な原材料から誘導される、本発明1001、1002、1079 および 1138 のいずれかの方法。

[本発明1140]

再生可能な原材料が糖類を含む、本発明1139の方法。

[本発明1141]

生体誘導 (bioderived) *ナイロン-7*、*ナイロン-7,x* または *ナイロン-x,7*。

[本発明1142]

PAS または *AAS* から誘導される 7 AHA を重合させる段階を含む工程によって生産される *ナイロン-7*。

[本発明1143]

PA および 1,7 DHA を重合させる段階を含む工程によって生産される *ナイロン-7,7* であって、*PA* が *PCoA*、*PACP*、または 2 HDA から誘導され、1,7 DHA が 7 AHA から誘導される、*ナイロン-7,7*。

[本発明1144]

(i) 本発明1002～1007；

(ii) 本発明1002～1004 および 1011～1015；

(iii) 本発明1002～1004 および 1019～1026；

(iv) 本発明1002～1004、1019～1020 および 1030～1033；

(v) 本発明1002～1004、1019～1020、1030 および 1037～1041；

(vi) 本発明1002～1004、1019 および 1045～1047；

(vii) 本発明1002～1004、1019、1045 および 1051～1052；

(viii) 本発明1002～1004、1019～1023 および 1056～1057；

(ix) 本発明1002～1004、1019～1020、1030、1037～1038 および 1061～1062；

(x) 本発明1067～1069；

(xi) 本発明1073～1075；

(xii) 本発明1076～1077；

(xiii) 本発明1078～1079；または

(xiv) 本発明1080、

の方法段階を含む方法によって作製される 7 AHA を重合させる工程によって生産される *ナイロン-7*。

[本発明1145]

1,7 DHAが以下の方法段階：

- (a) 本発明1002～1007および1009～1010；
- (b) 本発明1002～1004、1011～1015および1017～1018；
- (c) 本発明1002～1004、1019～1026および1028～1029；
- (d) 本発明1002～1004、1019～1020、1030～1033および1035～1036；
- (e) 本発明1002～1004、1019～1020、1037～1041および1043～1044；
- (f) 本発明1002～1004、1019、1045～1047および1049～1050；
- (g) 本発明1002～1004、1019、1045、1051～1052および1054～1055；
- (h) 本発明1002～1004、1019～1023および1056～1060；
- (i) 本発明1002～1004、1019～1020、1037～1038および1061～1065；
- (j) 本発明1067～1069および1071～1072；
- (k) 本発明1073～1075；
- (l) 本発明1076～1077；
- (m) 本発明1078～1079；または
- (n) 本発明1080、

を含む方法によって作製され、かつ

PAが以下の方法段階：

- (o) 本発明1002～1005；
- (p) 本発明1002～1004および1011～1013；
- (q) 本発明1002～1004および1019～1024；
- (r) 本発明1002～1004、1019～1020および1030～1031；
- (s) 本発明1002～1004、1019～1020、1030および1037～1039；
- (t) 本発明1067；または
- (u) 本発明1073～1075、

を含む方法によって作製される、1,7 DHAおよびPAを重合させる段階を含む工程によって生産されるナイロン7,7。

[本発明1146]

宿主細胞の実質的に純粋な培養物であって、そのうちの実質的な数が、7 AHA；PA；1,7 DAH；ENTL；および7 HHAから選択される1つまたは複数のポリマー単量体の生合成に関与する1つまたは複数の酵素をコードする1つまたは複数の外因性核酸を含み、酵素が、アンモニアリアーゼ、エン酸レダクターゼ、カルボン酸レダクターゼ、 ω -トランスアミナーゼ、チオエステラーゼ、酸-チオールリガーゼまたはCoAシンテターゼ（synthtase）、CoAトランスフェラーゼ、アシル-[acp]チオエステラーゼ、アシル-[acp]シンテターゼ、アミノ酸アミノトランスフェラーゼ、脱アミノ基デヒドロゲナーゼ、カルボニルレダクターゼ、 α -ケト酸デカルボキシラーゼ、アセト乳酸シンターゼ、 α -アミノ酸デカルボキシラーゼ、脂肪-アシル-CoAレダクターゼ、アシル-[acp]-レダクターゼ、アルデヒドデヒドロゲナーゼ、アルデヒドオキシダーゼ、アミドヒドロラーゼ、ヒドロリアーゼ、および α -ケト酸鎖伸長を触媒する酵素からなる群より選択される、宿主細胞の実質的に純粋な培養物。

[本発明1147]

細胞が原核細胞である、本発明1146の培養物。

[本発明1148]

原核細胞が、大腸菌（*Escherichia coli*）種などの大腸菌属（*Escherichia*）；クロストリジウム・ルジュングダーリイ（*Clostridium ljungdahlii*）、クロストリジウム・オートエタノゲナム（*Clostridium autoethanogenum*）またはクロストリジウム・クルイベリ（*Clostridium kluyveri*）種などのクロストリジウム属（*Clostridia*）；コリネバクテリウム・グルタミカム（*Corynebacterium glutamicum*）種などのコリネバクテリウム属（*Corynebacteria*）；カプリアビダス・ネカトル（*Cupriavidus necator*）またはカプリアビダス・メタリデュランス（*Cupriavidus metallidurans*）種などのカプリアビダス属

(Cupriavidus) ; シュードモナス・フルオレセンス (Pseudomonas fluorescens) 、 シュードモナス・プチダ (Pseudomonas putida) またはシュードモナス・オレオボランス (Pseudomonas oleovorans) 種などのシュードモナス属 (Pseudomonas) ; デルフチア・アシドボランス (Delftia acidovorans) 種などのデルフチア属 (Delftia) ; 枯草菌 (Bacillus subtilis) 種などのバシラス属 (Bacillus) ; デルブリュッキ菌 (Lactobacillus delbrueckii) などのラクトバシラス属 (Lactobacillus) ; ならびに、ラクトコッカス・ラクティス (Lactococcus lactis) 種などのラクトコッカス属 (Lactococcus) からなる群より選択される、本発明1147の培養物。

[本発明1149]

細胞が真核細胞である、本発明1146の培養物。

[本発明1150]

真核細胞が、以下のものからなる群より選択される、本発明1149の培養物：クロコウジカビ (Aspergillus niger) 種などのアスペルギルス属 (Aspergillus) ; サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) 種などのサッカロミセス属 (Saccharomyces) ; C.トロピカリス (C. tropicalis) 、 C.アルビカンス (C. albicans) 、 C.クロアカエ (C. cloacae) 、 C.グイリエルモンディイ (C. guilliermondii) 、 C.インターメディア (C. intermedia) 、 C.マルトサ (C. maltosa) 、 C.パラブシロシス (C. parapsilosis) またはC.ゼイレノイデス (C. zeylenoides) 種などのカンジダ属 (Candida) ; ピキア・パストリス (Pichia pastoris) 種などのピキア属 (Pichia) ; ヤロウイア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) 種などのヤロウイア属 (Yarrowia) ; イサタケンキア・オリエンタリス (Issathenkia orientalis) 種などのイサタケンキア属 (Issatchenkia) ; デバリオミセス・ハンセニイ (Debaryomyces hansenii) 種などのデバリオミセス属 (Debaryomyces) ; アークスラ・アデニニボランス (Arxula adeninivorans) 種などのアークスラ属 (Arxula) ; クルイベロミセス・ラクティス (Kluyveromyces lactis) 種などのクルイベロミセス属 (Kluyveromyces) ; エクソフィアラ属 (Exophiala) ; ケカビ属 (Mucor) ; トリコデルマ属 (Trichoderma) ; クラドスポリウム属 (Cladosporium) ; ファネロケータ属 (Phanerochaete) ; クラドフィアロフォラ属 (Cladophialophora) ; ペシロミセス属 (Paecilomyces) ; スケドスポリウム属 (Scedosporium) ; およびオフィオストマ属 (Ophiostoma) 。

[本発明1151]

アンモニアリアーゼがEC 4.3.1におけるアンモニアリアーゼを含む、本発明1146の培養物。

[本発明1152]

EC 4.3.1におけるアンモニアリアーゼが、EC 4.3.1.1 ; EC 4.3.1.2 ; EC 4.3.1.3 ; EC 4.3.1.9 ; EC 4.3.1.12 ; EC 4.3.1.13 ; EC 4.3.1.14 ; EC 4.3.1.23またはEC 4.3.1.24を含む、本発明1151の培養物。

[本発明1153]

エン酸レダクターゼがEC 1.3.1におけるエン酸レダクターゼを含む、本発明1146の培養物。

[本発明1154]

エン酸レダクターゼが以下のものである、本発明1153の培養物：

(a) EC 1.3.1におけるものであり、EC 1.3.1.8 ; EC 1.3.1.9 ; EC 1.3.1.10、EC 1.3.1.31 ; EC 1.3.1.38 ; EC 1.3.1.39 ; EC 1.3.1.44 ; もしくはEC 1.3.1.62におけるピメロイル-CoAデヒドロゲナーゼ、例えばPimC / PimDもしくはThnJ / ThnKなどを含む；または

(b) EC 1.3、例えばEC 1.3.8.1 ; EC 1.3.99.3 ; EC 1.3.99.B10におけるもの、もしくはシントロファス・アシディトロフィカス (Syntrophus aciditrophicus) 2,3-ジデヒドロピメリル-CoAレダクターゼおよびそれらのホモログ。

[本発明1155]

カルボン酸レダクターゼが、EC 1.2.99におけるカルボン酸レダクターゼ、または非アシル化アルデヒドデヒドロゲナーゼを含む、本発明1146の培養物。

[本発明1156]

EC 1.2.99におけるカルボン酸レダクターゼがEC 1.2.99.6を含み、非アシル化アルデヒドデヒドロゲナーゼが、スフィンゴモナスにおけるスフィンゴモナス (*Spingomonas*) およびカプリアビダス属種に由来するThnG、またはそれらのホモログを含む、本発明1155の培養物。

[本発明1157]

ω -トランスアミナーゼがEC 2.6.1におけるトランスアミナーゼを含む、本発明1156の培養物。

[本発明1158]

EC 2.6.1における ω -トランスアミナーゼが、EC 2.6.1.18；EC 2.6.1.19；EC 2.6.1.1；EC 2.6.1.13；EC 2.6.1.39；EC 2.6.1.48；EC 2.6.1.48；またはEC 2.6.1.62を含む、本発明1157の培養物。

[本発明1159]

チオエステラーゼがEC 3.1.2におけるチオエステラーゼを含む、本発明1146の培養物。

[本発明1160]

EC 3.1.2におけるチオエステラーゼが、EC 3.1.2.18；EC 3.1.2.19；もしくはEC 3.1.2.20由来のCoA-チオエステルに対して作用するチオエステラーゼ；YciA、tesBもしくはAco t13の遺伝子産物；またはEC 3.1.2.14およびEC 3.1.2.21由来の[acp]-チオエステルに対して作用するチオエステラーゼを含む、本発明1159の培養物。

[本発明1161]

酸-チオールリガーゼがEC 6.2.1における酸-チオールリガーゼを含む、本発明1146の培養物。

[本発明1162]

EC 6.2.1における酸-チオールリガーゼが、EC 6.2.1.3；EC 6.2.1.14；またはEC 6.2.1.23由来のCoAエステルに対して作用するCoAシンテターゼ、ならびにEC 6.2.1.14 (BioWなど) およびEC 6.2.1.20におけるアシル-[acp]-シンテターゼを含む、本発明1161の培養物。

[本発明1163]

CoAトランスフェラーゼが、EC 2.8.3におけるCoAトランスフェラーゼまたはThnHの遺伝子産物およびそれらのホモログを含む、本発明1146の培養物。

[本発明1164]

EC 2.8.3におけるCoAトランスフェラーゼが、EC 2.8.3.12；EC 2.8.3.13；EC 2.8.3.14；またはThnHの遺伝子産物を含む、本発明1163の培養物。

[本発明1165]

アミノ酸アミノトランスフェラーゼがEC 2.6.1におけるアミノトランスフェラーゼを含む、本発明1146の培養物。

[本発明1166]

EC 2.6.1におけるアミノ酸アミノトランスフェラーゼが、EC 2.6.1.21；EC 2.6.1.39；EC 2.6.1.42；またはEC 2.6.1.67を含む、本発明1165の培養物。

[本発明1167]

カルボニルレダクターゼが、EC 1.1.1.184；EC 1.1.1.79；EC 1.1.1.B3；EC 1.1.1.B4、またはEC 1.1.99.2.もしくはEC 1.1.99.6由来の2-ヒドロキシグルタルルデヒドロゲナーゼ／ α ケトグルタル酸 (ketoglutarate) レダクターゼを含む、本発明1146の培養物。

[本発明1168]

脂肪-アシル-CoAレダクターゼ、脂肪-アシル-[acp]レダクターゼまたはアルデヒドデヒドロゲナーゼが、EC 1.2.1におけるレダクターゼを含む、本発明1146の培養物。

[本発明1169]

EC 1.2.1における脂肪-アシル-CoAレダクターゼ、脂肪-アシル-[acp]レダクターゼまたはアルデヒドデヒドロゲナーゼが、EC 1.2.1.3；EC 1.2.1.4；EC 1.2.1.20；EC 1.2.1.22；EC 1.2.1.50；EC 1.2.1.57；EC 1.2.1.63；またはEC 1.2.1.76.を含む、本発明1168の

培養物。

[本発明1170]

アルデヒドデヒドロゲナーゼが、EC 1.2.1におけるアルデヒドデヒドロゲナーゼを含む、本発明1146の培養物。

[本発明1171]

EC 1.2.1におけるアルデヒドデヒドロゲナーゼがEC 1.2.1.3；EC 1.2.1.4またはEC 1.2.1.63を含む、本発明1170の培養物。

[本発明1172]

ヒドロリアーゼが、EC 4.2.1におけるヒドロリアーゼを含む、本発明1146の培養物。

[本発明1173]

EC 4.2.1におけるヒドロリアーゼが、EC 4.2.1.2；EC 4.2.1.59；EC 4.2.1.61；EC 4.1.2.17またはE.C. 4.1.2.18を含む、本発明1172の培養物。

[本発明1174]

α -ケト酸鎖伸長を触媒する酵素が、AksA、AksD、AksEおよびAksF酵素を含む酵素のセットから選択される1つまたは複数の酵素を含む、本発明1146の培養物。

[本発明1175]

AksAがEC 2.3.3におけるAksA酵素を含む、本発明1174の培養物。

[本発明1176]

EC 2.3.3におけるAksA酵素が、EC 2.3.3.13またはE.C. 2.3.3.14を含む、本発明1175の培養物。

[本発明1177]

AksDおよびAks Eがいずれも、EC 4.2.1.114におけるAksD/E酵素を含む、本発明1174の培養物。

[本発明1178]

EC 4.2.1におけるAksD酵素がEC 4.2.1.36を含む、本発明1177の培養物。

[本発明1179]

AksFがEC 1.1.1におけるAksF酵素を含む、本発明1174の培養物。

[本発明1180]

EC 1.1.1.におけるAksF酵素がEC 1.1.1.87を含む、本発明1179の培養物。

[本発明1181]

アルコールデヒドロゲナーゼがEC 1.1.1.1またはEC 1.1.1.2またはEC 1.1.1.21を含む、本発明1146の培養物。

[本発明1182]

アルコールデヒドロゲナーゼが、ザイモモナス・モビリス由来のadhA、ザイモモナス・モビリス由来のadhB、クロストリジウム・アセトブチリカム由来のブタノールデヒドロゲナーゼ、サッカロミセスADHIV、およびS.セレビシエ由来のADH6から選択される、本発明1146の培養物。

[本発明1183]

7 AHA；PA；1,7 DAH；ENTL；および7 HHAから選択される1つまたは複数のポリマー単体の生合成に関与する1つまたは複数の外因性核酸をコードする1つまたは複数の外因性核酸を含む単離された細胞であって、酵素が、アンモニアリアーゼ、エン酸レダクターゼ、カルボン酸レダクターゼ、 ω -トランスアミナーゼ、チオエステラーゼ、酸-チオールリガーゼまたはCoAシンテターゼ（synthtase）、CoAトランスフェラーゼ、アシル-[acp]チオエステラーゼ、アシル-[acp]シンテターゼ、アミノ酸アミノトランスフェラーゼ、脱アミノ基デヒドロゲナーゼ、カルボニルレダクターゼ、 α -ケト酸デカルボキシラーゼ、アセト乳酸シンターゼ、 α -アミノ酸デカルボキシラーゼ、脂肪-アシル-CoAレダクターゼ、アシル-[acp]-レダクターゼ、アルデヒドデヒドロゲナーゼ、アルデヒドオキシダーゼ、アミドヒドロラーゼ、ヒドロリアーゼおよび α -ケト酸鎖伸長を触媒する酵素からなる群より選択される、単離された細胞。

他の目的および利点は、本明細書に記載する以下の詳細な説明の検討から当業者には明

らかになるであろう。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2012/071472

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12P7/44 C12P7/42 C12P13/00 C12P17/10 C08L77/02
C12P13/02

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)
C12P C08L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

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

EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/104390 A2 (DSM IP ASSETS BV [NL]; RAEMAKERS-FRANKEN PETRONELLA CATHARINA [NL]; SC) 16 September 2010 (2010-09-16) the whole document -----	146-183
X	WO 2011/031146 A2 (DSM IP ASSETS BV [NL]; RAEDEMAKERS-FRANKEN PETRONELLA CATHARINA [NL];) 17 March 2011 (2011-03-17) the whole document -----	146-183
X	WO 2010/068944 A2 (CELEXION LLC [US]; BAYNES BRIAN M [US]; GEREMIA JOHN MICHAEL [US]) 17 June 2010 (2010-06-17) cited in the application the whole document ----- -/--	146-183

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

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 September 2013

Date of mailing of the international search report

17/12/2013

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Siatou, Evangelia

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/071472

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	W0 2012/031910 A2 (DSM IP ASSETS BV [NL]; TREFZER AXEL CHRISTOPH [NL]; TURK STEFANUS CORN) 15 March 2012 (2012-03-15) the whole document	146,183
A	----- NIGEL P. BOTTING ET AL: "Substrate Specificity of the 3-Methylaspartate Lyase Reaction: Observation of Differential Relative Reaction Rates for Substrate-Product Pairs", BIOCHEMISTRY, vol. 27, no. 8, 1988, pages 2953-2955, XP002713248, DOI: 10.1021/bi00408a042 cited in the application the whole document	1-65, 82-140, 146-183
A	----- Y. KATO ET AL: "Cloning nucleotide sequencing and expression of the 3-methylaspartate ammonia lyase gene from Citrobacter amalonaticus strain YG-1002", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 50, no. 4, 1988, pages 468-474, XP002713249, DOI: 10.1007/s002530051322 cited in the application the whole document	1-65, 82-140, 146-183
A	----- US 3 719 561 A (TANAKA K ET AL) 6 March 1973 (1973-03-06) the whole document	1-65, 82-140, 146-183

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2012/071472**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

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

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

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

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

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

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-65(completely); 82-140, 146-183(partially)

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/ US2012/ 071472

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-65(completely); 82-140, 146-183(partially)

Method of bioconverting a compound selected from 2,6 diaminopimelate and alpha-amino-pimelate to di-or trifunctional C7 alkanes.

2. claims: 66(completely); 82-140, 146-183(partially)

Method of bioconverting a compound selected from 6-amino-2-heptenoic acid and 2-heptene dioic acid to di-or trifunctional C7 alkanes.

3. claims: 67-72, 80(completely); 82-140, 146-183(partially)

Method of bioconverting a compound selected from pimeloyl-CoA and pimeloyl [acp] to di-or trifunctional C7 alkanes.

4. claims: 73-77(completely); 82-140, 146-183(partially)

Method of bioconverting a compound selected from alpha-keto pimelate to di-or trifunctional C7 alkane.

5. claims: 78, 79, 81(completely); 82-140, 146-183(partially)

Method of bioconverting a compound selected from pimelic acid semialdehyde to di-or trifunctional C7 alkane.

6. claims: 141-145

nylon-7, nylon-x,7, nylon-7,x.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2012/071472

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010104390 A2	16-09-2010	AU 2010221862 A1	06-10-2011
		AU 2010221863 A1	06-10-2011
		CN 102348805 A	08-02-2012
		CN 102892893 A	23-01-2013
		EA 201101311 A1	30-04-2012
		EA 201101312 A1	30-03-2012
		EP 2406384 A2	18-01-2012
		EP 2406385 A2	18-01-2012
		JP 2012520069 A	06-09-2012
		JP 2012520070 A	06-09-2012
		TW 201037078 A	16-10-2010
		US 2012028320 A1	02-02-2012
		US 2012156737 A1	21-06-2012
		WO 2010104390 A2	16-09-2010
		WO 2010104391 A2	16-09-2010
WO 2011031146 A2	17-03-2011	AU 2010293142 A1	05-04-2012
		CN 102575270 A	11-07-2012
		EA 201200454 A1	30-01-2013
		JP 2013504320 A	07-02-2013
		US 2012231512 A1	13-09-2012
		WO 2011031146 A2	17-03-2011
WO 2010068944 A2	17-06-2010	AU 2009324422 A1	07-07-2011
		CA 2747241 A1	17-06-2010
		CN 102317464 A	11-01-2012
		EP 2366026 A2	21-09-2011
		JP 2012511910 A	31-05-2012
		KR 20110104952 A	23-09-2011
		RU 2011128711 A	20-01-2013
		US 2010151536 A1	17-06-2010
		US 2011171696 A1	14-07-2011
		US 2012164702 A1	28-06-2012
		US 2012258504 A1	11-10-2012
		WO 2010068944 A2	17-06-2010
WO 2012031910 A2	15-03-2012	TW 201217536 A	01-05-2012
		WO 2012031910 A2	15-03-2012
US 3719561 A	06-03-1973	NONE	

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 1
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A
C 1 2 P	13/02	(2006.01)	C 1 2 P	13/02	

(31)優先権主張番号 PCT/US2012/044984
 (32)優先日 平成24年6月29日(2012.6.29)
 (33)優先権主張国 米国(US)

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

(74)代理人 100142929
 弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699
 弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
 弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845
 弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100114340
 弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889
 弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072
 弁理士 川本 和弥

(72)発明者 パールマン ポール エス.
 アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 ソーントン ティンバー レーン 2 4

(72)発明者 チェン チャンリン
 英国 クリーブランド州 イングルビー バーウィック クラドック グローブ 4

(72)発明者 ボーテス アドリアナ
 英国 クリーブランド州 ローズデール イースト デールサイド ロード レッド ハウス ファーム

(72)発明者 コンラディエ アレックス ヴァン エック
 英国 クリーブランド州 イーグルスクリフ アバードベイ ドライブ 4

(72)発明者 ヘルツォーク ベンジャミン ディー.
 アメリカ合衆国 カンザス州 ウィチタ イースト サマーフィールド ストリート 1 4 8 0 1

Fターム(参考) 4B024 AA03 BA07 BA08 BA10 BA80 CA02 DA06 EA04
 4B064 AC24 AD09 AE01 CA02 CA19 CA21 CB01 CB11 DA16 DA20
 4B065 AA01Y AA26X AA91Y AB01 AC14 BA02 CA12 CA16 CA27 CA28
 CA29 CA31 CA54 CA60