(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5641938号
(P5641938)

(45)発行日　平成26年12月17日(2014.12.17)　(24)登録日　平成26年11月7日(2014.11.7)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19	ZNA
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15	
C12P 7/46	(2006.01)	C12P	7/46	
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A
C12N 9/02	(2006.01)	C12N	9/02	

請求項の数 15　(全 38 頁)

(21)出願番号	特願2010-533596 (P2010-533596)
(86)(22)出願日	平成20年11月14日 (2008.11.14)
(65)公表番号	特表2011-502524 (P2011-502524A)
(43)公表日	平成23年1月27日 (2011.1.27)
(86)国際出願番号	PCT/EP2008/065583
(87)国際公開番号	WO2009/065778
(87)国際公開日	平成21年5月28日 (2009.5.28)
審査請求日	平成23年6月10日 (2011.6.10)
(31)優先権主張番号	07121117.1
(32)優先日	平成19年11月20日 (2007.11.20)
(33)優先権主張国	欧州特許庁 (EP)
(31)優先権主張番号	07121120.5
(32)優先日	平成19年11月20日 (2007.11.20)
(33)優先権主張国	欧州特許庁 (EP)

(73)特許権者　503220392
ディーエスエム　アイピー　アセッツ　ビー．ブイ．
オランダ国，　６４１１　ティーイー　ヘーレン，　ヘット　オーバールーン　１
(74)代理人　100094318
弁理士　山田　行一
(74)代理人　100176773
弁理士　坂西　俊明
(74)代理人　100123995
弁理士　野田　雅一
(74)代理人　100128381
弁理士　清水　義憲
(74)代理人　100107456
弁理士　池田　成人

最終頁に続く

(54)【発明の名称】真核細胞中におけるコハク酸の生成

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

フマル酸からコハク酸への変換を触媒するＮＡＤ（Ｈ）依存フマル酸還元酵素をコードするヌクレオチド配列を含む、酵母および糸状菌からなる群から選択される、組み換え真核細胞であって、

ＮＡＤ（Ｈ）依存フマル酸還元酵素をコードするヌクレオチド配列の発現に際して、ＮＡＤ（Ｈ）依存フマル酸還元酵素が細胞質ゾル中で活性であり、

細胞がコハク酸の形成を触媒する酵素をコードするヌクレオチド配列を発現し、ヌクレオチド配列がＮＡＤ（Ｈ）依存フマル酸還元酵素をコードして、前記ＮＡＤ（Ｈ）依存フマル酸還元酵素が配列番号３、および／または配列番号６のアミノ酸配列と少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、細胞。

【請求項２】

ＮＡＤ（Ｈ）依存フマル酸還元酵素がトリパノソーマ（Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ）種に由来する、請求項１に記載の細胞。

【請求項３】

内在性ピルビン酸カルボキシラーゼをコードするヌクレオチド配列を過剰発現する、請求項１又は２に記載の細胞。

【請求項４】

異種のホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼをコードするヌクレオチド配列をさらに含み、

前記異種のホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼが配列番号１４又は配列番号１７のアミノ酸配列と少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１～３のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項５】

リンゴ酸デヒドロゲナーゼをコードするヌクレオチド配列の発現に際して、細胞質ゾル中で活性であるリンゴ酸デヒドロゲナーゼをコードするヌクレオチド配列をさらに含み、

前記リンゴ酸デヒドロゲナーゼが配列番号１９又は配列番号２１のアミノ酸配列と少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１～４のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項６】

リンゴ酸のフマル酸への変換を触媒する酵素をコードするヌクレオチド配列の発現に際して、細胞質ゾル中でリンゴ酸のフマル酸への変換を触媒する酵素をコードするヌクレオチド配列をさらに含み、

前記リンゴ酸のフマル酸への変換を触媒する酵素が配列番号２３のアミノ酸配列と少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項７】

ジカルボン酸輸送体をコードするヌクレオチド配列をさらに含み、

前記ジカルボン酸輸送体が配列番号３６のアミノ酸配列と少なくとも９０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１～６のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項８】

アルコールデヒドロゲナーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子ａｄｈ１又はａｄｈ２が機能性でない酵母である、請求項１～７のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項９】

グリセロール－３－リン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子ｇｐｄ１が機能性でない酵母である、請求項１～８のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項１０】

コハク酸デヒドロゲナーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子ｓｄｈＡ又はｓｄｈＢが機能性でないアスペルギルス・ニガー（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｎｉｇｅｒ）である、請求項１～７のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項１１】

アスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）である、請求項１～７のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項１２】

アスペルギルス・ニガー（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｎｉｇｅｒ）である、請求項１１に記載の細胞。

【請求項１３】

サッカロミセス・セレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）である、請求項１～９のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項１４】

請求項１～１３のいずれか一項に記載の真核細胞を、コハク酸が調製される適切な発酵培地中で発酵させるステップを含む、コハク酸を調製する方法。

【請求項１５】

請求項１４に記載の方法によって得られる、コハク酸を含む発酵ブロス。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【０００１】

本発明は、フマル酸還元酵素をコードするヌクレオチド配列を含む組み換え真核細胞、および組み換え真核細胞を使用したコハク酸を生成する方法に関する。

【０００２】

コハク酸は、多数の化学物質のための潜在的前駆物質である。例えばコハク酸は、１，４－ブタンジオール（ＢＤＯ）、テトラヒドロフラン、およびγ－ブチロラクトンに転換できる。コハク酸に由来する別の生成物は、コハク酸とＢＤＯの結合によって作成されるポリエステルポリマーである。

【０００３】

コハク酸は、主としてブタンの水素付加により石油化学プロセスを通じて生産される。これらのプロセスは、環境に対して有害と見なされ高価である。炭素源として再生可能な原材料を使用してもよいコハク酸の発酵生産は、コハク酸生産のための魅力的な代案のプロセスかもしれない。

【０００４】

大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）、および反芻胃細菌アクチノバシラス（Ａｃｔｉｎｏｂａｃｉｌｌｕｓ）、アネロビオスピリルム（Ａｎａｅｒｏｂｉｏｓｐｉｒｉｌｌｕｍ）、バクテロイデス（Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ）、マンヘイミア（Ｍａｎｎｈｅｉｍｉａ）、またはサクシニモナス（Ｓｕｃｃｉｎｉｍｏｎａｓ）種などのいくつかの異なる細菌が、コハク酸を産生することが知られている。これらの細菌株の代謝工学は、コハク酸収率および／または生産性を改善し、または副産物形成を低下させた。

【０００５】

国際公開第２００７／０６１５９０号パンフレットは、ピルビン酸カルボキシラーゼ酵素またはホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ酵素、およびリンゴ酸輸送体タンパク質（ＭＡＥ）で形質転換された、リンゴ酸および／またはコハク酸生産のためのピルビン酸デカルボキシラーゼ陰性酵母を開示する。

【０００６】

コハク酸の発酵生産に加えられた改善にもかかわらず、コハク酸の発酵生産のための改善された微生物に対する必要性が残る。

【０００７】

本発明の目的は、コハク酸生産のための代案の微生物である。

【０００８】

この目的は、本発明に従って、フマル酸からコハク酸への変換を触媒するＮＡＤ（Ｈ）依存フマル酸還元酵素をコードするヌクレオチド配列を含む、酵母および糸状菌からなる群から選択される組み換え真核細胞を用いて達成される。

【０００９】

意外にも本発明に係る組み換え真核細胞は、野生型真核細胞によって産生されるコハク酸の量と比較して、コハク酸生成量が増大することが分かった。好ましくは本発明に係る真核細胞は、ＮＡＤ（Ｈ）依存フマル酸還元酵素をコードするヌクレオチド配列を含まない野生型真核細胞よりも、少なくとも１．２、好ましくは少なくとも１．５、好ましくは少なくとも２倍量のコハク酸を産生する。

【００１０】

ここでの用法では、本発明に係る組み換え真核細胞は、天然では真核細胞中に生じないヌクレオチド配列またはポリペプチドを含有し、またはそれによって形質転換または遺伝子組み換えされた細胞と定義され、またはそれは内在性核酸配列の追加的コピーまたはコピー群を含有する。野生型真核細胞は、ここで組み換え細胞の親細胞と定義される。

【００１１】

フマル酸からコハク酸への変換を触媒するＮＡＤ（Ｈ）依存フマル酸還元酵素をコードするヌクレオチド配列は、異種のまたは相同的なヌクレオチド配列であってもよく、または変異、中断または欠失によってさらに遺伝子組み換えされていてもよい異種のまたは相同的なＮＡＤ（Ｈ）依存フマル酸還元酵素をコードしてもよい。組み換えＤＮＡ技術については、ＳａｍｂｒｏｏｋおよびＲｕｓｓｅｌ（２００１年）「Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ」（第３版），Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓなど、当該技術分野で良く知られている。

【００１２】
「相同的な」という用語は、特定の（組み換え）核酸またはポリペプチド分子と、特定の宿主生物または宿主細胞との間の関係を示すために使用される場合、自然界において核酸またはポリペプチド分子が同一種、好ましくは同一変種または株の宿主細胞または生物によって産生されることを意味するものと理解される。
【００１３】
「異種の」という用語は、核酸（ＤＮＡまたはＲＮＡ）またはタンパク質に関して使用される場合、それがその中に存在する生物、細胞、ゲノムまたはＤＮＡまたはＲＮＡ配列の一部として自然発生せず、または自然界で見られるのとは異なる細胞、またはゲノムまたはＤＮＡまたはＲＮＡ配列中の１つまたは複数の位置に見られる核酸またはタンパク質を指す。異種の核酸またはタンパク質は、それがその中に取り込まれた細胞に内在性でないが、別の細胞から得られ、または合成的にまたは組み換え的に生成されている。
【００１４】
本発明に係るＮＡＤ（Ｈ）依存フマル酸還元酵素が補助因子としてＮＡＤ（Ｈ）を使用するのに対して、ほとんどの真核細胞は$FADH_2$依存フマル酸還元酵素を含み、そこでは$FADH_2$が補助因子である。ＮＡＤ（Ｈ）依存フマル酸還元酵素は、ＮＡＤ（Ｈ）をNAD^+に酸化し、細胞内の酸化還元バランスに影響を与えるさらなるオプションを細胞に提供するので、ＮＡＤ（Ｈ）依存フマル酸還元酵素をコードするヌクレオチド配列を含む真核細胞は、有利であることが分かった。
【００１５】
好ましくは細胞はコハク酸の形成を触媒する酵素をコードするヌクレオチド配列を発現し、ヌクレオチド配列は好ましくはＮＡＤ（Ｈ）依存フマル酸還元酵素をコードして、配列番号１、および／または配列番号３、および／または配列番号４、および／または配列番号６のアミノ酸配列と少なくとも４０％、好ましくは少なくとも４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、９７、９８、９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。好ましくはヌクレオチド配列は、配列番号１、および／または配列番号３、および／または配列番号４、および／または配列番号６のアミノ酸配列を含むＮＡＤ（Ｈ）依存フマル酸還元酵素をコードする。
【００１６】
配列同一性は、ここで配列を比較して判定される２つ以上のアミノ酸（ポリペプチドまたはタンパク質）配列または２つ以上の核酸（ポリヌクレオチド）配列間の関係と定義される。通常、配列同一性または類似性は、比較される配列の全長にわたって比較される。当該技術分野では「同一性」はまた、場合によってはこのような配列ストリング間の整合によって判定される、アミノ酸または核酸配列間の配列関連性の度合いも意味する。
【００１７】
同一性を判定する好ましい方法は、試験される配列間に最大整合を与えるようにデザインされる。同一性および類似性を判定する方法は、公的に入手可能なコンピュータプログラムで体系化されている。２つの配列間の同一性および類似性を判定する好ましいコンピュータプログラム法としては、ＮＣＢＩおよびその他の別の情報源から公的に入手可能なＢＬＡＳＴＰおよびＢＬＡＳＴＮが挙げられる（ＢＬＡＳＴ Ｍａｎｕａｌ，Ａｌｔｓｃｈｕｌ，Ｓ．ら，ＮＣＢＩ ＮＬＭ ＮＩＨ Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ ２０８９４）。ＢＬＡＳＴＰを使用したアミノ酸配列比較のための好ましいパラメーターは、ｇａｐ ｏｐｅｎ １１．０、ｇａｐ ｅｘｔｅｎｄ １、Ｂｌｏｓｕｍ ６２ ｍａｔｒｉｘである。
【００１８】
本発明の細胞中で発現される酵素をコードするヌクレオチド配列はまた、穏やかな、または好ましくはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、配列番号１、配列番号３、配列番号４、および／または配列番号６のＮＡＤ（Ｈ）依存フマル酸還元酵素をコードするヌクレオチド配列とハイブリッド形成する、それらの能力によって定義されてもよい。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、ここで少なくとも約２５個

、好ましくは約５０個のヌクレオチド、７５個または１００個、最も好ましくは約２００個以上のヌクレオチドの核酸配列を約６５℃の温度で、好ましくは６×ＳＳＣ（塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウム）である約１Ｍの塩を含む溶液、または匹敵するイオン強度を有するあらゆるその他の溶液中でハイブリッド形成させ、６５℃で、好ましくは０．２×ＳＳＣである約０．１Ｍ以下の塩を含む溶液、または匹敵するイオン強度を有するあらゆるその他の溶液中で洗浄する条件と定義される。好ましくはハイブリダイゼーションは、一晩、すなわち少なくとも１０時間にわたり実施され、好ましくは洗浄は、洗浄溶液を少なくとも２回取り替えて少なくとも１時間実施される。これらの条件は通常、約９０％以上の配列同一性を有する配列の特異的ハイブリダイゼーションを可能にする。

【００１９】

穏やかな条件とは、ここで少なくとも５０個のヌクレオチド、好ましくは約２００個以上のヌクレオチドの核酸配列を約４５℃の温度で、好ましくは６×ＳＳＣである約１Ｍの塩を含む溶液、または匹敵するイオン強度を有するあらゆるその他の溶液中でハイブリッド形成させ、室温で、好ましくは６×ＳＳＣである約１Ｍの塩を含む溶液、または匹敵するイオン強度を有するあらゆるその他の溶液中で洗浄する条件と定義される。好ましくはハイブリダイゼーションは、一晩、すなわち少なくとも１０時間にわたり実施され、好ましくは洗浄は洗浄溶液を少なくとも２回取り替えて少なくとも１時間実施される。これらの条件は通常、約５０％までの配列同一性を有する配列の特異的ハイブリダイゼーションを可能にする。当業者はまた、同一性が５０％～９０％の間で異なる配列を具体的に同定するために、これらのハイブリダイゼーション条件を修正できる。

【００２０】

導入された酵素が、本発明の真核細胞中において活性形態で発現される可能性を増大させるために、対応するコード化ヌクレオチド配列を適応させて、選択された真核生物宿主細胞のためにそのコドン使用頻度を最適化してもよい。コドンを最適化するいくつかの方法は、当該技術分野で知られている。ヌクレオチド配列のコドン使用頻度を真核細胞のために最適化する好ましい方法は、国際公開第２００８／０００６３２号パンフレットで開示されるようなコドンペア最適化技術である。コドンペア最適化は宿主細胞中でポリペプチドを生成する方法であり、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の改善された発現、および／またはポリペプチドの改善された生成を得るために、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列が、それらのコドン使用、特に使用されるコドンペアに関して修正されている。コドンペアは、コード配列内の２つの連続三つ組（コドン）セットと定義される。

【００２１】

「遺伝子」という用語は、ここでの用法では、真核生物中の核酸ポリメラーゼであるＲＮＡポリメラーゼＩＩのための鋳型を含有する核酸配列を指す。遺伝子はｍＲＮＡに転写され、それは次にタンパク質に翻訳される。

【００２２】

「核酸」という用語は、ここでの用法では一本または二本鎖のどちらかの形態のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドポリマー、すなわちポリヌクレオチドへの言及を含み、特に制限のない限り、天然ヌクレオチド（例えばペプチド核酸）と同様に一本鎖核酸とハイブリダイズする、天然ヌクレオチドの必須の性質を有する既知の類似体を包含する。ポリヌクレオチドは、天然または異種の構造遺伝子または調節遺伝子の全長または部分配列であることができる。特に断りのない限り、この用語は特定の配列ならびにその相補的配列への言及を含む。

【００２３】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語は、ここで同義的に使用され、アミノ酸残基のポリマーを指す。この用語は、その中で１つ以上のアミノ酸残基が対応する天然アミノ酸の人工化学類似体であるアミノ酸ポリマー、ならびに天然アミノ酸ポリマーに適用される。このような天然アミノ酸類似体に必須の性質は、タンパク質に組み込んだ際に、そのタンパク質が同一であるが完全に天然アミノ酸から構成される

タンパク質に対して誘発される抗体に対して、特異的に反応性であることである。「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語はまた、グリコシル化、脂質付加、硫酸化、グルタミン酸残基のγ－カルボキシル化、ヒドロキシル化、およびＡＤＰ－リボシル化をはじめとするが、これに限定されるものではない修飾も包含する。

【００２４】

「酵素」という用語は、ここでの用法では細胞中で（生）化学反応を触媒するタンパク質と定義される。

【００２５】

通常、酵素をコードするヌクレオチド配列は、本発明に係る真核細胞中で対応するヌクレオチド配列の十分な発現を引き起こすプロモーターと作動可能に連結して、細胞にコハク酸生成能を与える。

【００２６】

ここでの用法では、「作動可能に連結する」という用語は、機能的関係にあるポリヌクレオチド要素（またはコード配列または核酸配列）の結合を指す。核酸配列は、それが別の核酸配列と機能的関係に置かれた場合に「作動可能に連結する」。例えばプロモーターまたはエンハンサーは、それがコード配列の転写に影響を与えれば、コード配列と作動可能に連結する。

【００２７】

ここでの用法では、「プロモーター」という用語は、遺伝子の転写開始部位の転写方向に対して上流に位置して、ＤＮＡ依存ＲＮＡポリメラーゼのための結合部位、転写開始部位、および当業者に知られているあらゆるその他のＤＮＡ配列の存在によって構造的に同定される、１つ以上の遺伝子の転写を制御するように機能する核酸断片を指す。「構成的」プロモーターは、ほとんどの環境および生育条件下で活性のプロモーターである。「誘導性」プロモーターは環境制御または生育制御下で活性のプロモーターである。

【００２８】

ＮＡＤ（Ｈ）依存フマル酸還元酵素などの酵素、または本発明の真核細胞に導入されるあらゆるその他の酵素をコードするヌクレオチド配列の発現を達成するために使用できるプロモーターは、発現される酵素をコードするヌクレオチド配列に天然でなくてもよく、すなわちそれが作動可能に連結するヌクレオチド配列（コード配列）に異種のプロモーターであってもよい。好ましくはプロモーターは相同的であり、すなわち宿主細胞に内在性である。

【００２９】

この文脈で適切なプロモーターとしては、構成的および誘導性双方の天然プロモーターならびに当業者に良く知られている改変プロモーターが挙げられる。真核生物宿主細胞中の適切なプロモーターは、ＧＡＬ７、ＧＡＬ１０、またはＧＡＬ１、ＣＹＣ１、ＨＩＳ３、ＡＤＨ１、ＰＧＬ、ＰＨ０５、ＧＡＰＤＨ、ＡＤＣ１、ＴＲＰ１、ＵＲＡ３、ＬＥＵ２、ＥＮＯ、ＴＰＩ、およびＡＯＸ１であってもよい。その他の適切なプロモーターとしては、ＰＤＣ、ＧＰＤ１、ＰＧＫ１、ＴＥＦ１、およびＴＤＨが挙げられる。

【００３０】

通常、酵素をコードするヌクレオチド配列は、ターミネーターを含む。本発明では、真核細胞中で機能性のあらゆるターミネーターを使用してもよい。好ましいターミネーターは、宿主細胞の天然遺伝子から得られる。適切なターミネーター配列については、当該技術分野で良く知られている。好ましくはこのようなターミネーターは、突然変異と組み合わさって本発明の宿主細胞中でナンセンス変異依存ｍＲＮＡ分解機構を防止する（例えばＳｈｉｒｌｅｙら，２００２年，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　１６１：１４６５～１４８２を参照されたい）。

【００３１】

好ましい実施態様では、ＮＡＤ（Ｈ）依存フマル酸還元酵素をコードするヌクレオチド配列が過剰発現されて、細胞によるコハク酸の十分な産生が達成されてもよい。

【００３２】

本発明の真核細胞中における、酵素をコードするヌクレオチド配列の過剰発現のために当該技術分野で利用できる様々な手段がある。例えば細胞ゲノム中に遺伝子の追加的コピーを組み込むことにより、セントロメアベクターからの遺伝子、エピソームマルチコピー発現ベクターからの遺伝子を発現することにより、または遺伝子の複数コピーを含む（エピソーム）発現ベクターを導入することにより、細胞中で酵素をコードする遺伝子のコピー数を増加させて、特に酵素をコードするヌクレオチド配列を過剰発現させてもよい。好ましくは本発明に係る酵素の過剰発現は、（強力な）構成的プロモーターを用いて達成される。

【００３３】

本発明はまた、配列番号７、配列番号８、配列番号９または配列番号１０からなる群から選択される１つ以上のヌクレオチド配列を含むヌクレオチドコンストラクトにも関する。

【００３４】

核酸コンストラクトは、例えば低コピー数プラスミドまたは高コピー数プラスミドなどのプラスミドであってもよい。本発明に係る真核細胞は、ＮＡＤ（Ｈ）依存フマル酸還元酵素をコードするヌクレオチド配列の単一コピーを含んでいてもよいが、好ましくは複数コピー、例えばヌクレオチドコンストラクトの複数コピーを含む。

【００３５】

核酸コンストラクトはエピソームに保持されてもよく、したがって常染色体複製配列などの自律複製配列を含んでいてもよい。真核細胞が真菌起源である場合、適切なエピソームの核酸コンストラクトは、例えば酵母２μまたはｐＫＤ１プラスミド（Ｇｌｅｅｒら，１９９１年，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　９：９６８～９７５）、またはＡＭＡプラスミド（Ｆｉｅｒｒｏら，１９９５年，Ｃｕｒｒ　Ｇｅｎｅｔ．２９：４８２～４８９）に基づいていてもよい。代案としては各核酸コンストラクトを１つ以上のコピーで、真核細胞ゲノム中に組み込んでもよい。細胞ゲノムへの組み込みは非相同的組換えによって無作為に起きてもよいが、好ましくは核酸コンストラクトは、当該技術分野で良く知られているように相同的組換えによって細胞ゲノム中に組み込まれてもよい。

【００３６】

ＮＡＤ（Ｈ）依存フマル酸還元酵素をコードするヌクレオチド配列は、異種のまたは相同的なヌクレオチド配列であってもよい。好ましくはＮＡＤＨ依存フマル酸還元酵素は、例えば細菌、真菌、原生動物または植物などのあらゆる適切な起源に由来してもよい異種の酵素である。好ましくは本発明に係る細胞は、好ましくは例えばトリパノソーマ・ブルセイ（Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ　ｂｒｕｃｅｉ）などのトリパノソーマ（Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ）種に由来する異種のＮＡＤ（Ｈ）依存フマル酸還元酵素を含む。

【００３７】

好ましい実施態様では、ＮＡＤ（Ｈ）依存フマル酸還元酵素をコードするヌクレオチド配列は、細胞質ゾル中で発現される。意外にも酵素の細胞質ゾル活性は、真核細胞によるコハク酸の生産性増大をもたらす。

【００３８】

ＮＡＤ（Ｈ）依存フマル酸還元酵素をコードするヌクレオチド配列がペルオキシソームまたはミトコンドリア標的シグナルを含む場合、酵素のペルオキシソームまたはミトコンドリア標的指向化を妨げるために、いくつかのアミノ酸（そしてコードするヌクレオチド配列中の対応するヌクレオチド配列）を修飾しまたは消去することが必須かもしれない。ペルオキシソーム標的シグナルの存在は、例えばＳｃｈｌｕｔｅｒら，Ｎｕｃｌｅｉｃ　ａｃｉｄ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　２００７年，３５，Ｄ８１５－Ｄ８２２によって開示される方法により判定してもよい。

【００３９】

コード化ヌクレオチド配列の発現に際して酵素が細胞質ゾルで活性であるために、好ましくはＮＡＤ（Ｈ）依存フマル酸還元酵素は、ペルオキシソームまたはミトコンドリア標的シグナルを欠く。

【００４０】
好ましくは細胞は、コハク酸の形成を触媒する酵素をコードするヌクレオチド配列を発現し、ヌクレオチド配列は好ましくはＮＡＤ（Ｈ）依存フマル酸還元酵素をコードし、好ましくはフマル酸還元酵素は、配列番号３、および／または配列番号６のアミノ酸配列と、少なくとも４０％、好ましくは少なくとも４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、９７、９８、９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。好ましくはＮＡＤ（Ｈ）依存フマル酸還元酵素をコードするヌクレオチド配列は、配列番号３、および／または配列番号６のアミノ酸配列を含む。
【００４１】
真核細胞は、好ましくはサッカロミセス（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）、アスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）、ペニシリウム（Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ）、ピチア（Ｐｉｃｈｉａ）、クリヴェロミセス（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ）、ヤロウィア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）、カンジダ（Ｃａｎｄｉｄａ）、ハンゼヌラ（Ｈａｎｓｅｎｕｌａ）、フミコラ（Ｈｕｍｉｃｏｌａ）、クモノスカビ（Ｒｈｉｚｏｐｕｓ）、トルラスポラ（Ｔｏｒｕｌａｓｐｏｒａ）、トリコスポロン（Ｔｒｉｃｈｏｓｐｏｒｏｎ）、ブレタノマイセス（Ｂｒｅｔｔａｎｏｍｙｃｅｓ）、チゴサッカロミセス（Ｚｙｇｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）、パチソレン（Ｐａｃｈｙｓｏｌｅｎ）またはヤマダザイマ（Ｙａｍａｄａｚｙｍａ）属の１つに属する酵母および糸状菌からなる群から選択される。より好ましくは真核細胞は、サッカロミセス・セレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）、サッカロミセス・ウバルム（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｕｖａｒｕｍ）、サッカロミセス・バヤヌス（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｂａｙａｎｕｓ）、アスペルギルス・ニガー（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｇｅｒ）、ペニシリウム・クリソゲヌム（Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ ｃｈｒｙｓｏｇｅｎｕｍ）、ピチア・スティピディス（Ｐｉｃｈｉａ ｓｔｉｐｉｄｉｓ）、クリヴェロミセス・マルキシアナス（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ ｍａｒｘｉａｎｕｓ）、Ｋ．ラクチス（ｌａｃｔｉｓ）、Ｋ．サーモトレランス（ｔｈｅｒｍｏｔｏｌｅｒａｎｓ）、ヤロウィア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）、カンジダ・ソノレンシス（Ｃａｎｄｉｄａ ｓｏｎｏｒｅｎｓｉｓ）、Ｃ．グラブラタ（ｇｌａｂｒａｔａ）、ハンゼヌラ・ポリモルファ（Ｈａｎｓｅｎｕｌａ ｐｏｌｙｍｏｒｐｈａ）、トルラスポラ・デルブリュッキイ（Ｔｏｒｕｌａｓｐｏｒａ ｄｅｌｂｒｕｅｃｋｉｉ）、ブレッタノミセス・ブルキレンシス（Ｂｒｅｔｔａｎｏｍｙｃｅｓ ｂｒｕｘｅｌｌｅｎｓｉｓ）、リゾプス・オリゼー（Ｒｈｉｚｏｐｕｓ ｏｒｙｚａｅ）またはチゴサッカロミセス・バイリイ（Ｚｙｇｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｂａｉｌｉｉ）である。
【００４２】
フマル酸からコハク酸への変換を触媒するＮＡＤ（Ｈ）依存フマル酸還元酵素をコードするヌクレオチド配列に加えて、本発明に係る組み換え真核細胞は、例えば相同的なヌクレオチド配列中の突然変異、欠失または中断、および／または細胞中でコハク酸に向かう流れの増大をもたらす反応を触媒する相同的なまたは異種の酵素をコードするヌクレオチド配列による形質転換などのさらなる遺伝子組み換えを含んでいてもよい。例えばｉ）ホスホエノールピルビン酸またはピルビン酸からオキサロ酢酸への変換を触媒する酵素、ｉｉ）ＯＡＡからリンゴ酸への変換を触媒するリンゴ酸デヒドロゲナーゼ、またはｉｉｉ）リンゴ酸からフマル酸への変換を触媒するフマラーゼをコードする異種のおよび／または相同的なヌクレオチド配列を導入し、遺伝子組み換えし、および／または過剰発現することが有利かもしれない。
【００４３】
真核細胞は、あらゆる適切なヌクレオチド配列によって形質転換または遺伝子組み換えされて、ホスホエノールピルビン酸（ＰＥＰ、Ｃ３）からオキサロ酢酸（ＯＡＡ、Ｃ４）へ、およびピルビン酸（Ｃ３）からＯＡＡまたはリンゴ酸（Ｃ３）へなどのＣ３からＣ４炭素分子への反応を触媒してもよい。適切な酵素は、ＰＥＰからＯＡＡへの変換を触媒するＰＥＰカルボキシキナーゼ（ＥＣ４．１．１．４９、ＥＣ４．１．１．３８）およびＰ

ＥＰカルボキシラーゼ（ＥＣ４．１．１．３１）；ピルビン酸からＯＡＡへの反応を触媒するピルビン酸カルボキシラーゼ（ＥＣ６．４．１．１．）；またはピルビン酸からリンゴ酸への反応を触媒するリンゴ酸酵素（ＥＣ１．１．１．３８）である。

【００４４】

好ましくは本発明に係る真核細胞は、ピルビン酸カルボキシラーゼ（ＰＹＣ）をコードするヌクレオチド配列の発現に際して、好ましくは細胞質ゾル中で活性のＰＹＣをコードするヌクレオチド配列を過剰発現し、例えばＰＹＣは配列番号４１に記載のアミノ酸配列を含む。好ましくは内在性のまたは相同的なピルビン酸カルボキシラーゼが過剰発現される。意外にも、内在性ピルビン酸カルボキシラーゼの過剰発現は、本発明に係る真核細胞によるコハク酸生成レベルの増大をもたらすことが分かった。

【００４５】

別の好ましい実施態様では、本発明に係る真核細胞は異種のＰＥＰカルボキシキナーゼ（ＥＣ４．１．１．４９）をコードするヌクレオチド配列をさらに含み、ホスホエノールピルビン酸からオキサロ酢酸への反応を触媒する。意外にも異種のＰＥＰカルボキシキナーゼをさらに含む本発明に係る真核細胞は、異種のＰＥＰカルボキシキナーゼを含まない真核細胞と比較して、コハク酸生成量が増大することが分かった。好ましくは細菌に由来するＰＥＰカルボキシキナーゼ、より好ましくはＰＥＰカルボキシキナーゼ活性を有する酵素は、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）、マンヘイミア（Ｍａｎｎｈｅｉｍｉａ）種、アクチノバシラス（Ａｃｔｉｎｏｂａｃｉｌｌｕｓ）種、またはアナエロビオスピリルム（Ａｎａｅｒｏｂｉｏｓｐｉｒｉｌｌｕｍ）種、より好ましくはマンヘイミア・サクシニシプロデュセンス（Ｍａｎｎｈｅｉｍｉａ ｓｕｃｃｉｎｉｃｉｐｒｏｄｕｃｅｎｓ）、アクチノバシラス・サクシノジェネス（Ａｃｔｉｎｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｃｃｉｎｏｇｅｎｅｓ）、またはアナエロビオスピリルム・サクシニシプロデュセンス（Ａｎａｅｒｏｂｉｏｓｐｉｒｉｌｌｕｍ ｓｕｃｃｉｎｉｃｉｐｒｏｄｕｃｅｎｓ）に由来する。コハク酸生成量の増大をもたらすことが分かったため、好ましくはＰＥＰカルボキシキナーゼは、ＰＥＰカルボキシキナーゼをコードするヌクレオチド配列の発現に際して細胞質ゾル中で活性である。一実施態様ではアクチノバシラス・サクシノジェネス（Ａｃｔｉｎｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｃｃｉｎｏｇｅｎｅｓ）のＰＥＰカルボキシキナーゼ（ＰＣＫａ）は修飾され、１２０～１２２位のＥＧＹがＤＡＦアミノ酸配列で置換される。好ましくは本発明に係る真核細胞は、配列番号１４または配列番号１７と、少なくとも８０、８５、９０、９５または９９％の配列同一性を有するＰＥＰカルボキシキナーゼを含み、好ましくはＰＥＰカルボキシキナーゼは、配列番号１４または配列番号１７を含む。意外にも、ＰＹＣおよびＰＥＰカルボキシキナーゼの同時（過剰）発現は、ここで述べられているようにコハク酸生成に少なくとも１．５倍の増大をもたらすことが分かった。

【００４６】

別の好ましい実施態様では、本発明に係る細胞は、ヌクレオチド配列の発現に際して細胞質ゾル中で活性である、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ（ＭＤＨ）をコードするヌクレオチド配列をさらに含む。細胞質ゾルＭＤＨは、あらゆる適切な相同的なまたは異種のリンゴ酸デヒドロゲナーゼであってもよい。ＭＤＨは、Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）ＭＤＨ３またはＳ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）ＭＤＨ１であってもよい。好ましくはＭＤＨは、細胞質ゾル中で酵素を限局化させるペルオキシソームまたはミトコンドリア標的シグナルを欠いている。代案としてはＭＤＨは、グルコースの存在下でそれが不活性化せず、細胞質ゾル中で活性であるように改変されたＳ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）ＭＤＨ２である。グルコース飢餓細胞へのグルコースの添加に際して、ＭＤＨ２の転写が抑制されてＭｄｈ２ｐが分解することが知られている。アミノ末端アミノ酸の最初の１２個を欠失させたＭｄｈ２ｐは、グルコース誘発分解の影響をより受けにくい（ＭｉｎａｒｄおよびＭｃＡｌｉｓｔｅｒ－Ｈｅｎｎ、Ｊ．Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ．１９９２年 Ａｕｇ ２５；２６７（２４）：１７４５８～６４）。好ましくは本発明に係る真核細胞は、リンゴ酸デヒドロゲナーゼをコードするヌクレオチド配列を含み、それ

は配列番号１９または配列番号２１のアミノ酸配列と、少なくとも７０％、好ましくは少なくとも７５、８０、８５、９０、９２、９４、９５、９６、９７、９８、９９％の配列同一性を有する。好ましくはリンゴ酸デヒドロゲナーゼは、配列番号１９または配列番号２１を含む。好ましくはリンゴ酸デヒドロゲナーゼの活性は、当該技術分野で既知の方法によって、コード化ヌクレオチド配列を過剰発現することで増大する。

【００４７】

好ましくは本発明に係る真核細胞は、例えばフマラーゼ（ＦＵＭ）などの異種のまたは相同的な酵素であってもよい、リンゴ酸からフマル酸への変換を触媒する酵素をコードするヌクレオチド配列をさらに含む。リンゴ酸からフマル酸への変換を触媒する異種の酵素をコードするヌクレオチド配列は、好ましくは微生物起源、好ましくは例えばサッカロミセス・セレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）などの酵母、または例えばリゾプス・オリゼー（Ｒｈｉｚｏｐｕｓ　ｏｒｙｚａｅ）などの糸状菌である、あらゆる適切な起源に由来してもよい。好ましくは本発明に係る真核細胞はフマラーゼをコードするヌクレオチド配列を含み、それは配列番号２３のアミノ酸配列と少なくとも７０％、好ましくは少なくとも７５、８０、８５、９０、９２、９４、９５、９６、９７、９８、または９９％の配列同一性を有する。好ましくはフマラーゼは配列番号２３を含む。好ましくはフマラーゼ活性を有する酵素は、フマラーゼ活性を有する酵素をコードするヌクレオチド配列の発現に際して、細胞質ゾル中で活性である。意外にもフマラーゼ活性を有する酵素をさらに含む真核細胞は、ここで述べられているようにコハク酸生成量が増大することが分かった。

【００４８】

別の実施態様では本発明に係る真核細胞は、好ましくはリンゴ酸輸送体タンパク質（ＭＡＥ）である、ジカルボン酸輸送体タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。ジカルボン酸輸送体タンパク質は、相同的なまたは異種のタンパク質であってもよい。好ましくはジカルボン酸輸送体タンパク質は、異種タンパク質である。ジカルボン酸輸送体タンパク質はあらゆる適切な生物に由来してもよく、好ましくはシゾサッカロミセス・ポンベ（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｐｏｍｂｅ）に由来する。好ましくはジカルボン酸輸送体タンパク質は、配列番号３６と、少なくとも８０、８５、９０、９５または９９％の配列同一性を有するリンゴ酸輸送体タンパク質（ＭＡＥ）である。好ましくはＭＡＥは、配列番号３６を含む。意外にもリンゴ酸輸送体などのジカルボン酸輸送体をさらに含む本発明に係る真核細胞は、ここで述べられているように、ジカルボン酸輸送体タンパク質を含まない真核細胞と比較して、コハク酸生成量が増大することが分かった。

【００４９】

本発明はまた、コハク酸生成を増大させるための、好ましくはリンゴ酸輸送体タンパク質であるジカルボン酸輸送体の真核細胞中における使用にも関する。好ましくはリンゴ酸輸送体は、シゾサッカロミセス・ポンベ（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｐｏｍｂｅ）に由来する。

【００５０】

好ましい実施態様では本発明に係る真核細胞は、好ましい実施態様をはじめとしてここで述べられているように、ＮＡＤ（Ｈ）依存フマル酸還元酵素、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、異種フマラーゼ、異種ＰＥＰカルボキシキナーゼ、および異種ジカルボン酸輸送体をコードするヌクレオチド配列を含み、ピルビン酸カルボキシラーゼ（ＰＹＣ）を過剰発現する酵母である。意外にもここで述べられているような酵素をコードするヌクレオチド配列を含む本発明の酵母は、ヌクレオチド配列のいずれかのみを含む酵母と比較して、コハク酸生成量が増大することが分かった。

【００５１】

別の好ましい実施態様では、本発明に係る真核細胞は、野生型細胞中におけるこれら酵素の活性と比較して、ＮＡＤ（Ｈ）をNAD^+に変換する酵素活性が低下している。

【００５２】

好ましくは本発明に係る細胞は、その中でアルコールデヒドロゲナーゼをコードする少

なくとも１つの遺伝子が機能性でない細胞である。機能性でないアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子は、アルコールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子が全て機能性である細胞と比較して、アルコールデヒドロゲナーゼ活性が低下している真核細胞について述べるために、ここで使用される。例えばＧｕｅｌｄｅｎｅｒら，２００２年，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｖｏｌ．３０，Ｎｏ．６，ｅ２３によって開示される方法によって、例えば突然変異、中断、または欠失などの当該技術分野で既知の方法により、遺伝子を機能性でなくしてもよい。好ましくは真核細胞はサッカロミセス・セレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）などの酵母細胞であり、アルコールデヒドロゲナーゼをコードする１つ以上の遺伝子ａｄｈ１および／またはａｄｈ２が不活性化している。

【００５３】

好ましくは本発明に係る細胞は、機能性でないグリセロール－３－リン酸デヒドロゲナーゼをコードする、少なくとも１つの遺伝子をさらに含む。機能性でないグリセロール－３－リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子は、野生型細胞と比較してグリセロール形成低下をもたらす、例えばグリセロール－３－リン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の突然変異、中断、または欠失によって、グリセロール－３－リン酸デヒドロゲナーゼ活性が低下している真核細胞について述べるために、ここで使用される。意外にも低下したアルコールデヒドロゲナーゼ活性および／またはグリセロール－３－リン酸デヒドロゲナーゼ活性と、ＮＡＤ（Ｈ）依存フマラーゼがある真核細胞は、アルコールデヒドロゲナーゼおよび／またはグリセロール－３－リン酸デヒドロゲナーゼをコードする１つ以上の遺伝子が不活性化されていない細胞と比較して、コハク酸生成量の増大をもたらすことが分かった。

【００５４】

本発明はまた、アルコールデヒドロゲナーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子が機能性でなく、および／またはグリセロール－３－リン酸デヒドロゲナーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子が機能性でない真核細胞を発酵させるステップを含む、コハク酸を生産する方法にも関する。

【００５５】

別の好ましい実施態様では、本発明に係る組み換え真核細胞は、機能性でないコハク酸デヒドロゲナーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子を含む。機能性でないコハク酸デヒドロゲナーゼは、野生型細胞と比較してコハク酸の形成増大をもたらす、コハク酸デヒドロゲナーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子の突然変異、中断、または欠失によって、コハク酸デヒドロゲナーゼ活性が低下している真核細胞について述べるためにここで使用される。機能性でないコハク酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含む真核細胞は、コハク酸デヒドロゲナーゼをコードするｓｄｈＡおよびｓｄｈＢなどの１つ以上の遺伝子が例えばこれらの遺伝子の欠失によって機能性でない、例えばアスペルギルス・ニガー（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｇｅｒ）、好ましくはアスペルギルス・ニガー（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ ｎｉｇｅｒ）であってもよい。

【００５６】

好ましくは本発明に係る真核細胞は、酵母、好ましくはサッカロミセス・セレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）、好ましくは配列番号９および配列番号１０から選択されるヌクレオチド配列の１つ以上を含むサッカロミセス・セレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）である。本発明に係る真核細胞はまた、好ましくはＡ．ニガー（ｎｉｇｅｒ）、好ましくは配列番号７および配列番号８から選択される１つ以上のヌクレオチド配列を含むＡ．ニガー（ｎｉｇｅｒ）である糸状菌であってもよい。

【００５７】

好ましくはここで述べられている遺伝子組み換えのいずれか１つを含む本発明に係る真核細胞は、少なくとも０．３、０．５、０．７、ｇ／Ｌのコハク酸、好ましくは少なくとも１ｇ／Ｌのコハク酸、好ましくは少なくとも１．５、好ましくは少なくとも２、または２．５、４．５、好ましくは少なくとも８、１０、１５、または２０ｇ／Ｌ、しかし通常

は２００未満または１５０ｇ／Ｌ未満のコハク酸を産生できる。
【００５８】
本発明に係る好ましい真核細胞は、当該技術分野で知られているあらゆる適切な炭素源上で生育でき、それをコハク酸に変換できてもよい。真核細胞は、植物由来資源、セルロース、ヘミセルロース、ペクチン、ラムノース、ガラクトース、フコース、マルトース、マルトデキストリン、リボース、リブロース、またはデンプン、デンプン誘導体、スクロース、乳糖、およびグリセロールを直接変換できてもよい。したがって好ましい宿主生物は、セルロースをグルコースモノマーに、そしてヘミセルロースをキシロースとアラビノースモノマーに変換するのに必要なセルラーゼ（エンドセルラーゼおよびエキソセルラーゼ）およびヘミセルラーゼ（例えばエンドおよびエキソキシラナーゼ、アラビナーゼ）、ペクチンをグルクロン酸とガラクツロン酸に変換できるペクチナーゼ、またはデンプンをグルコースモノマーに変換するアミラーゼなどの酵素を発現する。好ましくは細胞は、グルコース、果糖、ガラクトース、キシロース、アラビノース、スクロース、ラフィノース、乳糖、およびグリセロールからなる群から選択される炭素源を変換できる。
【００５９】
他の態様では本発明は、コハク酸が調製される本発明に係る真核細胞を発酵させるステップを含む、コハク酸を調製する方法に関する。
【００６０】
ほとんどの真核細胞は増殖のために無菌条件を必要とせず、バクテリオファージ感染に非感受性であるため、本発明に係る真核細胞の使用が、コハク酸製造工程において有利であることが分かった。
【００６１】
好ましくは本発明に係る方法で調製されるコハク酸は、望ましい生成物にさらに転換される。望ましい生成物は、例えばポリブチレンコハク酸（ＰＢＳ）などのポリマー、除氷剤、または界面活性剤であってもよい。
【００６２】
本発明に係る方法は、好気性および嫌気性条件下で実施してもよい。好ましくは方法は、嫌気性条件下、または微好気性または酸素制限条件下で実施される。嫌気性発酵工程はここで、酸素不在下で実施され、または実質的に酸素が消費されない、好ましくは５、２．５または１ｍｍｏｌ／Ｌ／ｈ未満であり、その中で有機分子が電子供与体と電子受容体の双方の役割を果たす、発酵工程と定義される。
【００６３】
酸素制限発酵工程は、その中で酸素消費が、気体から液体への酸素移動によって制限される工程である。酸素制限の程度は、入ってくるガスフローの量および組成、ならびに使用される発酵装置の実際の混合／質量移動特性によって定まる。好ましくは酸素制限条件下の工程において、酸素消費速度は少なくとも５．５、より好ましくは少なくとも６、なおもより好ましくは少なくとも７ｍｍｏｌ／Ｌ／ｈである。
【００６４】
本発明に係るコハク酸生成法は、１～９の間のあらゆる適切なｐＨで実施してもよい。好ましくは発酵ブロス中のｐＨは、２～７の間、好ましくは３～５の間である。本発明に係る方法を低ｐＨで実施できることは、細菌汚染を防止することから有利であることが分かった。さらにコハク酸生成中にｐＨが低下するために、ｐＨを所望のレベルに保つのにより少量の滴定液が必要かもしれない。
【００６５】
本発明に係る方法を実施してもよい適切な温度は、５～６０℃の間、好ましくは１０～５０℃の間、より好ましくは１５～３５℃の間、より好ましくは１８℃～３０℃の間である。当業者は、どの最適温度が特定の真核細胞の発酵に適するかを知っている。
【００６６】
好ましくはコハク酸は、例えば結晶化およびアンモニウム沈殿などの当該技術分野で知られている適切な方法によって、発酵ブロスから回収される。

【００６７】
好ましくは本発明に係る方法で調製されるコハク酸は、医薬品、化粧品、食品、飼料、または化学製品にさらに転換される。コハク酸は、ポリブチレンコハク酸（ＰＢＳ）などのポリマーまたはそれから誘導されるその他の適切なポリマーにさらに転換されてもよい。
【００６８】
本発明はまた、本発明に係る方法によって得られるコハク酸を含む発酵ブロスに関する。
【００６９】
本発明は、トリパノソーマ・ブルセイ（Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ　ｂｒｕｃｅｉ）からのフマル酸還元酵素が使用されてコハク酸生成を増大させ、好ましくはフマル酸還元酵素が細胞質ゾル中で活性である、コハク酸産生株としての酵母または糸状菌によるコハク酸の生成法に関する。
【００７０】
［遺伝子組み換え］
ＳａｍｂｒｏｏｋおよびＲｕｓｓｅｌ（２００１年）「Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ」（第３版），Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ、またはＦ．　Ａｕｓｕｂｅｌら編「Ｃｕｒｒｅｎｔ　ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ｂｉｏｌｏｇｙ」，Ｇｒｅｅｎ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ　ａｎｄ　Ｗｉｌｅｙ　Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ（１９８７年）で述べられているように、宿主細胞中における酵素の過剰発現、宿主細胞の遺伝子組み換え、またはハイブリダイゼーション技術などの標準遺伝子工学技術は、当該技術分野で既知の方法である。真菌宿主細胞の形質転換、遺伝子組み換えなどの方法については、例えば欧州特許出願公開第０６３５５７４Ａ号明細書、国際公開第９８／４６７７２号パンフレット、国際公開第９９／６０１０２号パンフレットおよび国際公開第００／３７６７１号パンフレット、国際公開第９０／１４４２３号パンフレット、欧州特許出願公開第０４８１００８Ａ号明細書、欧州特許出願公開第０６３５５７４Ａ号明細書、および米国特許第６，２６５，１８６号明細書から知られている。
【００７１】
以下の実施例はあくまでも例示を目的とし、本発明を限定するものではないと理解される。
【図面の簡単な説明】
【００７２】
【図１】Ａ．ニガー（ｎｉｇｅｒ）中におけるフマル酸還元酵素の発現のために使用されたｐＧＢＴＯＰ－１１ベクターのマップである。
【図２】サッカロミセス・セレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）中における発現のためのトリパノソーマ・ブルセイ（Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ　ｂｒｕｃｅｉ）からのミトコンドリアフマル酸還元酵素ｍ１（ＦＲＤｍ１）をコードするｐＧＢＳ４１４ＳＵＳ－０７のプラスミドマップである。ＣＰＯは最適化されたコドンペアを示す。
【図３】サッカロミセス・セレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）中における発現のためのトリパノソーマ・ブルセイ（Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ　ｂｒｕｃｅｉ）からのグリコソームフマル酸還元酵素（ＦＲＤｇ）をコードするｐＧＢＳ４１４ＳＵＳ－０８のプラスミドマップである。ＣＰＯは最適化されたコドンペアを示す。
【図４】ｐＤＥＬ－ＳＤＨＡのプラスミドマップである。
【図５】Ａ．ニガー（ｎｉｇｅｒ）中におけるＦＲＤｍ１過剰発現のためのプラスミドｐＧＢＴＰＡｎ１のマップである。
【図６】ｓｄｈＡの置換スキームである。

【図７】サッカロミセス・セレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）中における発現のためのトリパノソーマ・ブルセイ（Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ ｂｒｕｃｅｉ）からのミトコンドリアフマル酸還元酵素ｍ１（ＦＲＤｍ１）をコードするｐＧＢＳ４１６ＦＲＤ－１のプラスミドマップである。ＣＰＯは最適化されたコドンペアを示す。

【図８】サッカロミセス・セレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）中における発現のためのトリパノソーマ・ブルセイ（Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ ｂｒｕｃｅｉ）からのグリコソームフマル酸還元酵素（ＦＲＤｇ）をコードするｐＧＢＳ４１６ＦＲＥ－１のプラスミドマップである。ＣＰＯは最適化されたコドンペアを示す。

【図９】サッカロミセス・セレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）中における発現のためのアクチノバシラス・サクシノジェネス（Ａｃｔｉｎｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｃｃｉｎｏｇｅｎｅｓ）からのＰＥＰカルボキシキナーゼ（ＰＣＫａ）を含有するｐＧＢＳ４１４ＰＰＫ－１のプラスミドマップである。合成遺伝子コンストラクトＴＤＨ１プロモーター－ＰＣＫａ－ＴＤＨ１ターミネーターは、発現ベクターｐＲＳ４１４にクローンされた。ＣＰＯは最適化されたコドンペアを示す。

【図１０】サッカロミセス・セレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）中における発現のためのアクチノバシラス・サクシノジェネス（Ａｃｔｉｎｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｃｃｉｎｏｇｅｎｅｓ）からのＰＥＰカルボキシキナーゼ（ＰＣＫａ）、およびトリパノソーマ・ブルセイ（Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ ｂｒｕｃｅｉ）からのミトコンドリアフマル酸還元酵素ｍ１（ＦＲＤｍ１）を含有するｐＧＢＳ４１４ＰＰＫ－２のプラスミドマップである。合成遺伝子コンストラクトＴＤＨ１プロモーター－ＰＣＫａ－ＴＤＨ１ターミネーターおよびＴＤＨ３プロモーター－ＦＲＤｍ１－ＴＤＨ３ターミネーターは、発現ベクターｐＲＳ４１４にクローンされた。ＣＰＯは最適化されたコドンペアを示す。

【図１１】サッカロミセス・セレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）中における発現のためのアクチノバシラス・サクシノジェネス（Ａｃｔｉｎｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｃｃｉｎｏｇｅｎｅｓ）からのＰＥＰカルボキシキナーゼ（ＰＣＫａ）およびトリパノソーマ・ブルセイ（Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ ｂｒｕｃｅｉ）からのグリコソームフマル酸還元酵素（ＦＲＤｇ）を含有するｐＧＢＳ４１４ＰＰＫ－３のプラスミドマップである。合成遺伝子コンストラクトＴＤＨ１プロモーター－ＰＣＫａ－ＴＤＨ１ターミネーターおよびＴＤＨ３プロモーター－ＦＲＤｇ－ＴＤＨ３ターミネーターは、発現ベクターｐＲＳ４１４にクローンされた。ＣＰＯは最適化されたコドンペアを示す。

【図１２】サッカロミセス・セレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）中における発現のためのマンヘイミア・サクシニシプロデュセンス（Ｍａｎｎｈｅｉｍｉａ ｓｕｃｃｉｎｉｃｉｐｒｏｄｕｃｅｎｓ）からのＰＥＰカルボキシキナーゼ（ＰＣＫｍ）を含有するｐＧＢＳ４１４ＰＥＫ－１のプラスミドマップである。合成遺伝子コンストラクトＴＤＨ１プロモーター－ＰＣＫｍ－ＴＤＨ１ターミネーターは、発現ベクターｐＲＳ４１４にクローンされた。ＣＰＯは最適化されたコドンペアを示す。

【図１３】サッカロミセス・セレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）中における発現のためのマンヘイミア・サクシニシプロデュセンス（Ｍａｎｎｈｅｉｍｉａ ｓｕｃｃｉｎｉｃｉｐｒｏｄｕｃｅｎｓ）からのＰＥＰカルボキシキナーゼ（ＰＣＫｍ）、およびトリパノソーマ・ブルセイ（Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ ｂｒｕｃｅｉ）からのミトコンドリアフマル酸還元酵素ｍ１（ＦＲＤｍ１）を含有するｐＧＢＳ４１４ＰＥＫ－２のプラスミドマップである。合成遺伝子コンストラクトＴＤＨ１プロモーター－ＰＣＫｍ－ＴＤＨ１ターミネーターおよびＴＤＨ３プロモーター－ＦＲＤｍ１－ＴＤＨ３ターミネーターは、発現ベクターｐＲＳ４１４にクローンされた。ＣＰＯは最適化されたコドンペアを示す。

【図１４】サッカロミセス・セレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）中における発現のためのマンヘイミア・サクシニシプロデュセンス（Ｍａｎｎ

ｈｅｉｍｉａ ｓｕｃｃｉｎｉｃｉｐｒｏｄｕｃｅｎｓ）からのＰＥＰカルボキシキナーゼ（ＰＣＫｍ）、およびトリパノソーマ・ブルセイ（Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ ｂｒｕｃｅｉ）からのグリコソームフマル酸還元酵素（ＦＲＤｇ）を含有するｐＧＢＳ４１４ＰＥＫ－３のプラスミドマップである。合成遺伝子コンストラクトＴＤＨ１プロモーター－ＰＣＫｍ－ＴＤＨ１ターミネーターおよびＴＤＨ３プロモーター－ＦＲＤｇ－ＴＤＨ３ターミネーターは、発現ベクターｐＲＳ４１４にクローンされた。ＣＰＯは最適化されたコドンペアを示す。

【図１５】サッカロミセス・セレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）中における発現のためのリゾプス・オリゼー（Ｒｈｉｚｏｐｕｓ ｏｒｙｚａｅ）からのフマラーゼ（ＦＵＭＲ）、および最初の１２個のアミノ酸が切断されているサッカロミセス・セレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）からの細胞質リンゴ酸デヒドロゲナーゼ（Δ１２ＮＭＤＨ２）を含有するｐＧＢＳ４１５ＦＵＭ－２のプラスミドマップである。合成遺伝子コンストラクトＴＤＨ１プロモーター－ＦＵＭＲ－ＴＤＨ１ターミネーターおよびＤＨ３プロモーター－ＭＤＨ３－ＴＤＨ３ターミネーターは、発現ベクターｐＲＳ４１５にクローンされた。ＣＰＯは最適化されたコドンペアを示す。

【図１６】サッカロミセス・セレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）中における発現のためのリゾプス・オリゼー（Ｒｈｉｚｏｐｕｓ ｏｒｙｚａｅ）からのフマラーゼ（ＦＵＭＲ）、およびサッカロミセス・セレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）からのペルオキシソームリンゴ酸デヒドロゲナーゼ（ＭＤＨ３）を含有するｐＧＢＳ４１５ＦＵＭ－３のプラスミドマップである。合成遺伝子コンストラクトＴＤＨ１プロモーター－ＦＵＭＲ－ＴＤＨ１ターミネーターおよびＴＤＨ３プロモーター－ＭＤＨ３－ＴＤＨ３ターミネーターは、発現ベクターｐＲＳ４１５にクローンされた。ＣＰＯは最適化されたコドンペアを示す。

【図１７】ＳＵＣ－１０１（白丸、空ベクター対照）、ＳＵＣ－１４８（黒四角、ＰＣＫａ、ＭＤＨ３、ＦＵＭＲ、ＦＲＤｍ１の過剰発現）、ＳＵＣ－１４９（白四角、ＰＣＫａ、ＭＤＨ３、ＦＵＭＲ、ＦＲＤｇ）、ＳＵＣ－１５０（黒菱形、ＰＣＫｍ、ＭＤＨ３、ＦＵＭＲ、ＦＲＤｍ１）、ＳＵＣ－１５１（白菱形、ＰＣＫｍ、ＭＤＨ３、ＦＵＭＲ、ＦＲＤｇ）、ＳＵＣ－１５２（●、ＰＣＫａ、ＭＤＨ３、ＦＵＭＲ）、ＳＵＣ－１５４（Ｘ、ＰＣＫｍ、ＭＤＨ３、ＦＵＭＲ）、およびＳＵＣ－１６９（▲、ＰＣＫｍ、Δ１２ＮＭＤＨ２、ＦＵＭＲ、ＦＲＤｍ１）株中のコハク酸レベルである。全ての過剰発現された遺伝子は、Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）中での発現についてコドンペア最適化された。全てのデータはＳＵＣ－１４８、１４９、１５０、１５１、１５２、１５４、およびＳＵＣ－１６９の３つの独立した成長実験の平均値、およびＳＵＣ－１０１の６つの独立した成長実験の平均値を表す。

【図１８】サッカロミセス・セレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）中における発現のためのシゾサッカロミセス・ポンベ（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｐｏｍｂｅ）からのリンゴ酸パーミアーゼ（ＳｐＭＡＥ１）を含有するｐＧＢＳ４１６ＭＡＥ－１のプラスミドマップである。合成遺伝子コンストラクトＥｎｏ１プロモーター－ＭＡＥ１－Ｅｎｏ１ターミネーターは、発現ベクターｐＲＳ４１６にクローンされた。ＣＰＯは最適化されたコドンペアを示す。

【図１９】ＳＵＣ－１０１（白丸、空ベクター対照）、ＳＵＣ－１６９（▲、ＰＣＫｍ、Δ１２ＮＭＤＨ２、ＦＵＭＲ、ＦＲＤｍ１）、およびＳＵＣ－１９４（黒四角、ＰＣＫｍ、Δ１２ＮＭＤＨ２、ＦＵＭＲ、ＦＲＤｍ１、ＳｐＭＡＥ１）株中のコハク酸レベルである。全ての過剰発現された遺伝子は、Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）中での発現についてコドンペア最適化された。全てのデータはＳＵＣ－１６９およびＳＵＣ－１９４の３つの独立した成長実験の平均値、およびＳＵＣ－１０１の６つの独立した成長実験の平均値を表す。

【図２０】ＳＵＣ－１０３（白丸、ａｄｈ１／２およびｇｐｄ１欠失変異体；空ベクター対照）、ＳＵＣ－２０１（白四角、ａｄｈ１／２およびｇｐｄ１欠失変異体；ＰＣＫａ、

ＭＤＨ３、ＦＵＭＲ、ＦＲＤｇ）、およびＳＵＣ－２００（黒四角、ａｄｈ１／２、およびｇｐｄ１欠失変異体；ＰＣＫａ、ＭＤＨ３、ＦＵＭＲ、ＦＲＤｇ、ＳｐＭＡＥ１）株中のコハク酸レベルである。全ての過剰発現された遺伝子は、Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）中での発現についてコドンペア最適化された。

【図２１】サッカロミセス・セレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）中における発現のためのサッカロミセス・セレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）からのピルビン酸カルボキシラーゼを含有するｐＧＢＳ４２６ＰＹＣ－２のプラスミドマップである。ＰＹＣ２をコードするヌクレオチド配列は、ＣＥＮ．ＰＫ１１３－５Ｄ株からのゲノムＤＮＡを鋳型として使用してＰＣＲによって得られ、ＰＣＲ産物は発現ベクターｐ４２６ＧＰＤにクローンされた。

【図２２】サッカロミセス・セレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）中における発現のためのトリパノソーマ・ブルセイ（Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ　ｂｒｕｃｅｉ）からのグリコソームフマル酸還元酵素（ＦＲＤｇ）をコードするｐＧＢＳ４１４ＦＲＥ－１のプラスミドマップである。合成遺伝子コンストラクトＴＤＨ３プロモーター－ＦＲＤｇ－ＴＤＨ３ターミネーターは、発現ベクターｐＲＳ４１４にクローンされた。

【図２３】ＳＵＣ－２２６（白四角、ＰＣＫａ、ＭＤＨ３、ＦＵＭＲ、ＦＲＤｇ）、ＳＵＣ－２２７（▲、ＰＹＣ２、ＰＣＫａ、ＭＤＨ３、ＦＵＭＲ、ＦＲＤｇ）、ＳＵＣ－２２８（黒四角、ＰＹＣ２、ＭＤＨ３、ＦＵＭＲ、ＦＲＤｇ）、およびＳＵＣ－２３０（白丸、ＭＤＨ３、ＦＵＭＲ、ＦＲＤｇ）株中のコハク酸レベルである。データは３つの独立した成長実験の平均値を表す。

【００７３】

［実施例］

［実施例１］

［アスペルギルス・ニガー（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｎｉｇｅｒ）中におけるトリパノソーマ・ブルセイ（Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ　ｂｒｕｃｅｉ）からのフマル酸還元酵素のクローニング］

［１．１．発現コンストラクト］

ＳｉｇｎａｌＰ　３．０（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｃｂｓ．ｄｔｕ．ｄｋ／ｓｅｒｖｉｃｅｓ／ＳｉｇｎａｌＰ／）Ｂｅｎｄｔｓｅｎ，Ｊ．ら（２００４年）Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，３４０：７８３～７９５およびＴａｒｇｅｔＰ　１．１（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｃｂｓ．ｄｔｕ．ｄｋ／ｓｅｒｖｉｃｅｓ／ＴａｒｇｅｔＰ／）Ｅｍａｎｕｅｌｓｓｏｎ，Ｏ．ら（２００７年）Ｎａｔｕｒｅ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　２，９５３～９７１を使用して、トリパノソーマ・ブルセイ（Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ　ｂｒｕｃｅｉ）からのミトコンドリアフマル酸還元酵素ｍ１（ＦＲＤｍ１）［Ｅ．Ｃ．１．３．１．６］、ＧｅｎＢａｎｋ登録番号６０４６００３５をシグナル配列の存在について分析した。２５および２６位間の可能な切断部位（Ｄ－Ｓ）をはじめとする、タンパク質のＮ末端半分の中の推定上のミトコンドリア標的配列が同定された。

【００７４】

６８個のＮ末端残基を欠くＦＲＤｍ１組み換えタンパク質が、プロ循環型（ｐｒｏｃｙｃｌｉｃ）トリパノソーマの細胞質ゾルに再局在化することが示された（Ｃｏｕｓｔｏｕら、Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ．２００５年　Ａｐｒ　２９；２８０（１７）：１６５５９～７０）。これらの結果はミトコンドリアを標的とするために、予測されたＦＲＤｍ１のＮ末端シグナルモチーフが必要であることを示唆する。配列番号１から最初の６８個のアミノ酸を除去し（ヌクレオチド配列番号２に相当する）、新しいメチオニンアミノ酸を再導入して配列番号３をもたらした。Ａ．ニガー（ｎｉｇｅｒ）について国際公開第２００８／０００６３２号パンフレットで開示されるコドンペア法を配列番号３で実施した。得られた配列番号７を構成的ＧＰＤＡプロモーター配列番号１１の後に入れ、最後の１０個のヌクレオチド配列を最適コザック配列ＣＡＣＣＧＴＡＡＡで置換した。都合よい制限部位を追加した。配列番号７中の停止コドンＴＡＡをＴＡＡＡに改変した。得られた配列は

Ｓｌｏｎｉｎｇ（プッフハイム（Ｐｕｃｈｈｅｉｍ）、ドイツ）で合成された。断片はＳｎａＢＩ、ＳｆｉＩであり、適切な制限部位を使用してＡ．ニガー（ｎｉｇｅｒ）発現ベクターｐＧＢＴＯＰ１１にクローンした（図１）。得られたＦＲＤｍ１を含むプラスミドをｐＧＢＴＯＰＡｎ１と命名した（図５）。

【００７５】

同様に、真菌特異的予測機能があるＰＴＳ１　ｐｒｅｄｉｃｔｏｒ（1276130370171_0.jsp）を使用して、トリパノソーマ・ブルセイ（Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ　ｂｒｕｃｅｉ）からのグリコソームフマル酸還元酵素（ＦＲＤｇ）［Ｅ．Ｃ．　１．３．１．６］、ＧｅｎＢａｎｋ登録番号２３９２８４２２を糸状菌中のペルオキシソーム標的化について分析した。タンパク質配列番号４から１１４０～１１４２位（ＳＫＩ）のＣ末端アミノ酸を除去し（ヌクレオチド配列番号５に相当する）、配列番号６をもたらした。Ａ．ニガー（ｎｉｇｅｒ）について国際出願ＰＣＴ／ＥＰ２００７／０５５９４号明細書で開示されるコドンペア法を配列番号６に実施した。配列番号８中の停止コドンＴＡＡをＴＡＡＡに改変した。得られた配列番号８を構成的ＧＰＤＡプロモーター配列番号１１の後に入れ、都合よい制限部位を追加した。得られた配列はＳｌｏｎｉｎｇ（プッフハイム、ドイツ）で合成された。断片はＳｎａＢＩ、ＳｆｉＩであり、適切な制限部位を使用してＡ．ニガー（ｎｉｇｅｒ）発現ベクターｐＧＢＴＯＰ１１にクローンした（図１）。

【００７６】

［１．２．Ａ．ニガー（ｎｉｇｅｒ）の形質転換］

Ａ．ニガー（ｎｉｇｅｒ）ＷＴ－１：このＡ．ニガー（ｎｉｇｅｒ）株は、グルコアミラーゼ（ｇｌａＡ）、真菌アミラーゼ、および酸アミラーゼをコードする遺伝子の欠失があるＣＢＳ５１３．８８である。Ａ．ニガー（ｎｉｇｅｒ）ＷＴ－１は、欧州特許第０６３５５７４Ｂ１号明細書で述べられているように「マーカー遺伝子フリー」アプローチを使用して構築された。

【００７７】

次の修正を加えて、Ｔｉｌｂｕｒｎ，Ｊ．ら（１９８３年）Ｇｅｎｅ　２６，２０５～２２１およびＫｅｌｌｙ，Ｊ．およびＨｙｎｅｓ，Ｍ．（１９８５年）ＥＭＢＯＪ．，４，４７５～４７９で述べられている方法に従って、Ａ．ニガー（ｎｉｇｅｒ）ＷＴ－１株に発現コンストラクトを同時形質転換する。

－胞子は３００ｒｐｍの回転振盪機に入れた振盪フラスコ内のアスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）最少培地（１００ｍｌ）中で摂氏３０度で発芽させ、１６時間培養する。アスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）最少培地は１リットルあたり次を含有する。６ｇ　$NaNO_3$、０．５２ｇ　ＫＣｌ、１．５２ｇ　KH_2PO_4、１．１２ｍｌ　４Ｍ　ＫＯＨ、０．５２ｇ　$MgSO_4 \cdot 7H_2O$、１０ｇグルコース、１ｇカザミノ酸、２２ｍｇ　$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$、１１ｍｇ　H_3BO_3、５ｍｇ　$FeSO_4 \cdot 7H_2O$、１．７ｍｇ　$CoCl_2 \cdot 6H_2O$、１．６ｍｇ　$CuSO_4 \cdot 5H_2O$、５ｍｇ　$MnCl_2 \cdot 2H_2O$、１．５ｍｇ　$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$、５０ｍｇ　ＥＤＴＡ、２ｍｇリボフラビン、２ｍｇチアミン－ＨＣｌ、２ｍｇニコチンアミド、１ｍｇピリドキシン－ＨＣＬ、０．２ｍｇパントテン酸、４ｇビオチン、１０ｍｌペニシリン（５０００ＩＵ／ｍｌ）、ストレプトマイシン（５０００　ＵＧ／ｍｌ）溶液（ギブコ（Ｇｉｂｃｏ））。

－プロトプラスト調製のために、ヘリカーゼの代わりにＮｏｖｏｚｙｍ　２３４™（Ｎｏｖｏ　Ｉｎｄｕｓｔｒｉｅｓ）を使用する。

－プロトプラスト形成後（６０～９０分間）、ＫＣ緩衝液（０．８Ｍ　ＫＣｌ、９．５ｍＭクエン酸、ｐＨ６．２）を最終容積４５ｍｌに添加し、プロトプラスト懸濁液を水平ローター内において摂氏４度で１０分間３０００ｒｐｍで遠心分離する。プロトプラストを２０ｍｌのＫＣ緩衝液に再懸濁し、引き続いて２５ｍｌのＳＴＣ緩衝液（１．２Ｍソルビトール、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ７．５、５０ｍＭ　$CaCl_2$）を添加する。プロトプラスト懸濁液を水平ローター内において摂氏４度で１０分間３０００ｒｐｍで

遠心分離し、ＳＴＣ緩衝液中で洗浄して１０Ｅ８プロトプラスト／ｍｌの濃度でＳＴＣ緩衝液に再懸濁する。
－２００μｌのプロトプラスト懸濁液に、１０μｌのＴＥ緩衝液（１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ７．５、０．１ｍＭ　ＥＤＴＡ）に溶解させたＤＮＡ断片、および１００μｌのＰＥＧ溶液（２０％ＰＥＧ　４０００（メルク（Ｍｅｒｃｋ））、０．８Ｍソルビトール、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ７．５、５０ｍＭ　$CaCl_2$）を添加する。－室温で１０分間のＤＮＡ－プロトプラスト懸濁液のインキュベーション後、試験管の混合を繰り返しながら、１．５ｍｌのＰＥＧ溶液（６０％ＰＥＧ　４０００（メルク）、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ７．５、５０ｍＭ　$CaCl_2$）を緩慢に添加する。室温で２０分間のインキュベーション後、５ｍｌの１．２Ｍソルビトールで懸濁液を希釈し、反転して混合し室温で１０分間４０００ｒｐｍで遠心分離する。プロトプラストを１ｍｌの１．２Ｍソルビトールに穏やかに再懸濁して、リボフラビン、チアミンＨＣＬ、ニコチンアミド、ピリドキシン、パントテン酸、ビオチン、カザミノ酸、およびグルコースを含まないアスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）最少培地からなる固体選択再生培地上に播種する。アセトアミド選択の場合、培地は唯一の窒素源として１０ｍＭアセトアミド、浸透圧調節物質およびＣ源として１Ｍスクロースを含有する。代案としては１～５０μｇ／ｍｌのフレオマイシンおよび浸透圧調節物質として１Ｍスクロースを添加したＰＤＡ（ジャガイモデキストロース寒天、Ｏｘｏｉｄ）上に、プロトプラストを播種する。２％寒天を使用して再生プレートを凝固する（ａｇａｒ　Ｎｏ．１，Ｏｘｏｉｄ　Ｌ１１）。摂氏３０度で６～１０日間のインキュベーション後、２％グルコースと１．５％アガロース（インビトロジェン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ））を添加したアスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）選択培地（アセトアミド選択の場合は唯一の窒素源としてアセトアミドを含有する最少培地、またはフレオマイシン選択の場合は１～５０μｇ／ｍｌのフレオマイシンを添加したＰＤＡ）からなるプレートに形質転換体の分生子を移して、摂氏３０度で５～１０日間インキュベートする。単一形質転換体を単離してこの選択的純化ステップをもう１回繰り返してから、純化された形質転換体を保存する。

【００７８】

［１．３．Ａ．ニガー（ｎｉｇｅｒ）の振盪フラスコ生育］

各コンストラクトについて全部で１０個の形質転換体が選択され、コンストラクトに対して特異的なプライマーを使用して、ＰＣＲによってコンストラクトの存在を確認する。引き続いて１００ｇ／ｌのグルコースを含む１００ｍｌアスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）最小富化培地に胞子を接種する。毎分回転数２５０の恒温器内で、株を摂氏３４度で４日間生育させる。培養液上清をＨＰＬＣによってシュウ酸、リンゴ酸、フマル酸、およびコハク酸形成について分析し、非形質転換株と比較する。

【００７９】

［１．４．ＨＰＬＣ分析］

異種サンプル中の有機酸および糖を定量するために、ＨＰＬＣを実施する。Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　Ｒｅｚｅｘ－ＲＨＭ－Ｍｏｎｏｓａｃｃｈａｒｉｄｅカラム上の分離の原理は、逆相機序を使用した、サイズ排除、イオン排除、およびイオン交換に基づく。検出は示差屈折率および紫外線検出器によって行われる。

【００８０】

［実施例２Ａ］

［サッカロミセス・セレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）中におけるトリパノソーマ・ブルセイ（Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ　ｂｒｕｃｅｉ）からのフマル酸還元酵素のクローニング］

［２Ａ．１．発現コンストラクト］

第１．１節で述べられているように、トリパノソーマ・ブルセイ（Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ　ｂｒｕｃｅｉ）からのミトコンドリアフマル酸還元酵素ｍ１（ＦＲＤｍ１）［Ｅ．Ｃ．１．３．１．６］、ＧｅｎＢａｎｋ登録番号６０４６００３５をシグナル配列の存在について分析し、Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）中での発現のためにコドン

最適化した。得られた配列番号９を構成的ＴＤＨ３プロモーター配列番号１２の後、ＴＤＨ３ターミネーター配列番号１３の前に入れ、都合よい制限部位を付加した。配列番号９中の停止コドンＴＧＡをＴＡＡＧに改変した。得られた配列はＳｌｏｎｉｎｇ（プッフハイム、ドイツ）で合成された。Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）発現ベクターｐＲＳ４１４のＢａｍＨＩ／ＮｏｔＩ制限後に、発現コンストラクトｐＧＢＳ４１４ＳＵＳ－０７を作り出し（Ｓｉｒｋｏｓｋｉ　Ｒ．Ｓ．およびＨｉｅｔｅｒ　Ｐ，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，１９８９年，１２２（１）：１９～２７）、引き続いてこのベクター中に、フマル酸還元酵素合成遺伝子コンストラクトからなるＢａｍＨＩ／ＮｏｔＩ制限酵素断片をライゲートした（図２）。ライゲーション混合物を大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ＤＨ１０Ｂ（インビトロジェン）の形質転換のために使用し、酵母発現コンストラクトｐＧＢＳ４１４ＳＵＳ－０７をもたらした（図２）。

【００８１】

同様に、第１．１節で述べられているように、トリパノソーマ・ブルセイ（Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ　ｂｒｕｃｅｉ）からのグリコソームフマル酸還元酵素（ＦＲＤｇ）［Ｅ．Ｃ．１．３．１．６］、ＧｅｎＢａｎｋ登録番号２３９２８４２２をペルオキシソーム標的化について分析し、Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）中での発現のためにコドン最適化した。得られた配列番号１０を構成的ＴＤＨ３プロモーター配列番号１２の後、ＴＤＨ３ターミネーター配列番号１３の前に入れ、都合よい制限部位を付加した。配列番号１０中の停止コドンＴＧＡをＴＡＡＧに改変した。得られた配列はＳｌｏｎｉｎｇ（プッフハイム、ドイツ）で合成された。Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）発現ベクターｐＲＳ４１４のＢａｍＨＩ／ＮｏｔＩ制限後に発現コンストラクトｐＧＢＳ４１４ＳＵＳ－０８を作り出し（Ｓｉｒｋｏｓｋｉ　Ｒ．Ｓ．およびＨｉｅｔｅｒ　Ｐ，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，１９８９年，１２２（１）：１９～２７）、引き続いてこのベクター中に、フマル酸還元酵素合成遺伝子コンストラクトからなるＢａｍＨＩ／ＮｏｔＩ制限酵素断片をライゲートした（図３）。ライゲーション混合物を大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ＤＨ１０Ｂ（インビトロジェン）の形質転換のために使用し、酵母発現コンストラクトｐＧＢＳ４１４ＳＵＳ－０８をもたらした（図３）。

【００８２】

コンストラクトｐＧＢＳ４１４ＳＵＳ－０７およびｐＧＢＳ４１４ＳＵＳ－０８を独立して、Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）ＣＥＮ．ＰＫ１１３－６Ｂ（ＭＡＴＡ　ｕｒａ３－５２　ｌｅｕ２－１１２　ｔｒｐ１－２８９）、ＲＷＢ０６６（ＭＡＴＡ　ｕｒａ３－５２　ｌｅｕ２－１１２　ｔｒｐ１－２８９　ａｄｈ１：：ｌｏｘ　ａｄｈ２：：Ｋａｎｌｏｘ）、およびＲＷＢ０６４（ＭＡＴＡ　ｕｒａ３－５２　ｌｅｕ２－１１２　ｔｒｐ１－２８９　ａｄｈ１：：ｌｏｘ　ａｄｈ２：：ｌｏｘ　ｇｐｄ１：：Ｋａｎｌｏｘ）株に形質転換する。適切なアミノ酸を添加した酵母窒素ベース（ＹＮＢ）ｗ／ｏ　ＡＡ（ディフコ（Ｄｉｆｃｏ））＋２％グルコース上に、形質転換混合物を播種する。適切なアミノ酸を添加したグルコースを含むＶｅｒｄｕｙｎ培地に形質転換体を接種し（Ｖｅｒｄｕｙｎら、１９９２年、Ｙｅａｓｔ．Ｊｕｌ；８（７）：５０１～１７）、振盪フラスコ内で好気性、嫌気性、および酸素制限条件下で生育させる。嫌気性培養用培地には、エタノールに溶解した０．０１ｇ／ｌエルゴステロールおよび０．４２ｇ／ｌ　Ｔｗｅｅｎ８０を添加する（ＡｎｄｒｅａｓｅｎおよびＳｔｉｅｒ，１９５３年，Ｊ．ｃｅｌｌ．Ｐｈｙｓｉｏｌ，４１，２３～３６；ＡｎｄｒｅａｓｅｎおよびＳｔｉｅｒ，１９５４年，Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｐｈｙｓｉｏｌ，４３：２７１～２８１）。全ての酵母培養は２５０～２８０ｒｐｍの振盪恒温器内で３０℃で生育させる。異なる培養時間後に培養物のアリコートを取り出して遠心分離し、第１．４節で述べられているようにＨＰＬＣによって、シュウ酸、リンゴ酸、フマル酸、およびコハク酸の形成について培地を分析する。

【００８３】

［実施例２Ｂ］

［サッカロミセス・セレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）中におけるトリパノソーマ・ブルセイ（Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ　ｂｒｕｃｅｉ）から

のフマル酸還元酵素のクローニング］
［２Ｂ．１．発現コンストラクト］
実施例２Ａ．１．で開示されるのと同じ方法で、トリパノソーマ・ブルセイ（Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ　ｂｒｕｃｅｉ）からのミトコンドリアフマル酸還元酵素（ＦＲＤｍ、配列番号９）をＳ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）発現ベクターｐＲＳ４１６にライゲートした（Ｓｉｒｋｏｓｋｉ　Ｒ．Ｓ．およびＨｉｅｔｅｒ　Ｐ，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，１９８９，１２２（１）：１９～２７）。ライゲーション混合物を大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ＴＯＰ１０細胞（インビトロジェン）の形質転換のために使用して、酵母発現コンストラクトおよびｐＧＢＳ４１６ＦＲＤ－１をもたらした（図７）。
【００８４】
同様に、トリパノソーマ・ブルセイ（Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ　ｂｒｕｃｅｉ）からのグリコソームフマル酸還元酵素（ＦＲＤｇ、配列番号１０）をＳ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）発現ベクターｐＲＳ４１６にライゲートした。ライゲーション混合物を大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ＴＯＰ１０細胞（インビトロジェン）の形質転換のために使用して、酵母発現コンストラクトｐＧＢＳ４１６ＦＲＥ－１をもたらした（図８）。
【００８５】
［２Ｂ．２．形質転換およびマイクロタイタープレート（ＭＴＰ）成長実験］
コンストラクトｐＧＢＳ４１６ＦＲＤ－１およびｐＧＢＳ４１６ＦＲＥ－１を独立してＳ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）ＣＥＮ．ＰＫ１１３－５Ｄ（ＭＡＴＡ　ｕｒａ３－５２）株に形質転換した。陰性対照として、空ベクターｐＲＳ４１６をＣＥＮ．ＰＫ１１３－５Ｄ株に形質転換した。形質転換混合物を酵母窒素ベース（ＹＮＢ）ｗ／ｏ　ＡＡ（Ｄｉｆｃｏ）＋２％グルコース上に播種した。９６ディープウェルＭＴＰ内の２％グルコースを含む２５０μｌのＶｅｒｄｕｙｎ培地に、次の個数の形質転換体を二回接種して、Ｉｎｆｏｒｓマイクロプレート振盪恒温器内で、摂氏３０度、５５０ｒｐｍ、湿度８０％で前培養した。１２個のｐＧＢＳ４１６ＦＲＤ－１（ＦＲＤｍ１）、１２個のｐＧＢＳ４１６ＦＲＥ－１（ＦＲＤｇ）、および２４個のｐＲＳ４１６空ベクター対照形質転換体。３日後に、ＭＴＰプレートウェル内に存在する前培養物の２５μｌをグルコースおよび$CaCO_3$を含有するＶｅｒｄｕｙｎ培地を含有する新しい９６ディープウェルＭＴＰに移した（最終濃度：総容積２５０μｌ中にグルコース１０％、ＣａＣＯ３　１％ｗ／ｖ）。Ｉｎｆｏｒｓマイクロプレート振盪恒温器内における３０℃、５５０ｒｐｍ、湿度８０％での生育の３および７日後に、ＭＴＰを２０００ｒｐｍで２分間遠心分離して、Ｍｕｌｔｉｍｅｋ　９６（ベックマン（Ｂｅｃｋｍａｎ））を使用して２００μｌの上清を収集した。実施例１．４で述べられているようにＨＰＬＣによって、上清をコハク酸の存在について分析した。結果を表１に示す。
【００８６】
【表１】

表1. 培養3および7日後のコハク酸生成レベルに対する、S.セレヴィシエ（cerevisiae）中のT.ブルセイ（brucei）からのミトコンドリア（FRDm1）およびグリコソームフマル酸還元酵素（FRDg）の導入効果

以下のプラスミドを含んでなるS.セレヴィシエ（cerevisiae）	3日後のコハク酸（mg/l）	7日後のコハク酸（mg/l）
空ベクターpRS416	138±18（n=48）	203±48（n=48）
pGBS416FRD-1（FRDm1）	340±65（n=24）	399±72（n=24）
pGBS416FRE-1（FRDg）	489±30（n=24）	516±57（n=24）

【００８７】
表１の結果は、Ｔ．ブルセイ（ｂｒｕｃｅｉ）からのミトコンドリアフマル酸還元酵素（ＦＲＤｍ１）の導入および過剰発現が、コハク酸生成レベルの増大をもたらしたことを示す（３日間の培養後に２．４７倍、ｐ＝６．９６Ｅ－１４、スチューデントｔ検定、７日間の培養後に１．９７倍、ｐ＝８．６３Ｅ－１４、スチューデントｔ検定）。
【００８８】
同様に、Ｔ．ブルセイ（ｂｒｕｃｅｉ）からのグリコソームフマル酸還元酵素（ＦＲＤｇ）の導入および過剰発現は、コハク酸生成レベルの増大をもたらした（３日間の培養後に３．５５倍、ｐ＝５．０８Ｅ－３２、スチューデントｔ検定、７日間の培養後に２．５５倍の増大、ｐ＝８．６３Ｅ－２５、スチューデントｔ検定）。
【００８９】
［実施例２Ｃ］
［サッカロミセス・セレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）中における、アクチノバシラス・サクシノジェネス（Ａｃｔｉｎｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｃｃｉｎｏｇｅｎｅｓ）またはマンヘイミア・サクシニシプロデュセンス（Ｍａｎｎｈｅｉｍｉａ ｓｕｃｃｉｎｉｃｉｐｒｏｄｕｃｅｎｓ）からのＰＥＰカルボキシキナーゼ、およびサッカロミセス・セレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）からのリンゴ酸デヒドロゲナーゼ、およびリゾプス・オリゼー（Ｒｈｉｚｏｐｕｓ ｏｒｙｚａｅ）からのフマラーゼ、およびトリパノソーマ・ブルセイ（Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ ｂｒｕｃｅｉ）からのフマル酸還元酵素の発現］
［２Ｃ．１．遺伝子配列］
［ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ］
ＳｉｇｎａｌＰ ３．０（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｃｂｓ．ｄｔｕ．ｄｋ／ｓｅｒｖｉｃｅｓ／ＳｉｇｎａｌＰ／）Ｂｅｎｄｔｓｅｎ，Ｊ．ら（２００４年）Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，３４０：７８３～７９５、およびＴａｒｇｅｔＰ １．１（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｃｂｓ．ｄｔｕ．ｄｋ／ｓｅｒｖｉｃｅｓ／ＴａｒｇｅｔＰ／）Ｅｍａｎｕｅｌｓｓｏｎ，Ｏ．ら（２００７年）Ｎａｔｕｒｅ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ２、９５３～９７１を使用して、アクチノバシラス・サクシノジェネス（Ａｃｔｉｎｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｃｃｉｎｏｇｅｎｅｓ）からのホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ［Ｅ．Ｃ．４．１．１．４９］、ＧｅｎＢａｎｋ登録番号１５２９７７９０７をシグナル配列の存在について分析した。Ｓｃｈｌｕｔｅｒら（２００７年）ＮＡＲ，３５，Ｄ８１５－Ｄ８２２によって述べられている分析からは、１１５～１２３位の推定上のＰＴＳ２シグナル配列が明らかにされた。１２０～１２２位のアミノ酸ＥＧＹをＤＡＦで置換することにより、Ａ．サクシノジェネス（ｓｕｃｃｉｎｏｇｅｎｅｓ）配列をマンヘイミア・サクシニシプロデュセンス（Ｍａｎｎｈｅｉｍｉａ ｓｕｃｃｉｎｉｃｉｐｒｏｄｕｃｅｎｓ）タンパク質配列と似るように修正し、アミノ酸配列番号１４（ヌクレオチド配列番号１５）をもたらした。Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）について国際公開第２００８／０００６３２号パンフレットで開示されるように、配列番号１４にコドンペア法を実施した。得られたヌクレオチド配列番号１６中の停止コドンＴＡＡをＴＡＡＧに改変した。停止コドンＴＡＡＧを含有するこの配列番号１６を構成的ＴＤＨ１プロモーター配列番号２５の後、およびＴＤＨ１ターミネーター配列番号２６の前に入れて、都合よい制限部位を付加した。得られた配列番号２９はＳｌｏｎｉｎｇ（プッフハイム、ドイツ）で合成された。
【００９０】
同様にＳｃｈｌｕｔｅｒら（２００７年）ＮＡＲ，３５，Ｄ８１５－Ｄ８２２によって述べられるようにして、マンヘイミア・サクシニシプロデュセンス（Ｍａｎｎｈｅｉｍｉａ ｓｕｃｃｉｎｉｃｉｐｒｏｄｕｃｅｎｓ）からのホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ［Ｅ．Ｃ．４．１．１．４９］、ＧｅｎＢａｎｋ登録番号５２４２６３４８をシグナル配列の存在について分析した。配列番号１７で示される配列には修正が必要でなかった。Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）について国際公開第２００８／０００６３２号パンフレットで開示されるように、配列番号１７にコドンペア法を実施した。

得られた配列番号１８中の停止コドンＴＡＡをＴＡＡＧに改変した。停止コドンＴＡＡＧを含有する配列番号１８を構成的ＴＤＨ１プロモーター配列番号２５の後、およびＴＤＨ１ターミネーター配列番号２６の前に入れた。都合よい制限部位を付加した。得られた合成コンストラクト（配列番号３０）はＳｌｏｎｉｎｇ（プッフハイム、ドイツ）で合成された。

【００９１】

［リンゴ酸デヒドロゲナーゼ］

細胞質リンゴ酸デヒドロゲナーゼ（Ｍｄｈ２ｐ）［Ｅ．Ｃ．１．１．１．３７］、ＧｅｎＢａｎｋ登録番号１７１９１５は、炭素異化産物抑制によって調節される。グルコース欠乏細胞にグルコースを添加すると、ＭＤＨ２の転写が抑制されてＭｄｈ２ｐは分解する。アミノ末端の１２個アミノ酸を欠失させたＭｄｈ２ｐは、グルコース誘発分解の影響をより受けにくい（ＭｉｎａｒｄおよびＭｃＡｌｉｓｔｅｒ－Ｈｅｎｎ、Ｊ．Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ．１９９２年 Ａｕｇ ２５；２６７（２４）：１７４５８～６４）。Ｍｄｈ２のグルコース誘発分解を避けるために、最初の１２個のアミノ酸をコードするヌクレオチドを除去し、Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）中でのＭｄｈ２の過剰発現のために、新しいメチオニンアミノ酸を導入した（配列番号１９）。Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）について国際公開第２００８／０００６３２号パンフレットで開示されるように、配列番号１９にコドンペア法を実施した。得られた配列番号２０中の停止コドンＴＡＡをＴＡＡＧに改変した。Δ１２ＮＭＤＨ２をコードする、修飾停止コドンＴＡＡＧを含有する配列番号２０を構成的ＴＤＨ３プロモーター配列番号１２の後、およびＴＤＨ３ターミネーター配列番号１３の前に入れ、都合よい制限部位を付加した。得られた合成コンストラクト（配列番号３１）はＳｌｏｎｉｎｇ（プッフハイム、ドイツ）で合成された。

【００９２】

真菌特異的予測機能があるＰＴＳ１ ｐｒｅｄｉｃｔｏｒ（ｈｔｔｐ：／／ｍｅｎｄｅｌ．ｉｍｐ．ａｃ．ａｔ／ｍｅｎｄｅｌｊｓｐ／ｓａｔ／ｐｔｓ１／ＰＴＳ１ｐｒｅｄｉｃｔｏｒ．ｊｓｐ）を使用して、ペルオキシソームリンゴ酸デヒドロゲナーゼ（Ｍｄｈ３ｐ）［Ｅ．Ｃ．１．１．１．３７］、ＧｅｎＢａｎｋ登録番号１４３１０９５を糸状菌中のペルオキシソーム標的化について分析した。３４１～３４３位のＣ末端アミノ酸（ＳＫＬ）をタンパク質ＭＤＨ３から除去し、配列番号２１をもたらした。Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）について国際公開第２００８／０００６３２号パンフレットで開示されるように、配列番号２１にコドンペア法を実施した。得られた配列番号２２中の停止コドンＴＧＡをＴＡＡＧに改変した。停止コドンとしてＴＡＡＧを含有する配列番号２２を構成的ＴＤＨ３プロモーター配列番号２７の後（開始コドンの６００ｂｐ上流）、およびＴＤＨ３ターミネーター配列番号２８の前（停止コドンの３００ｂｐ下流）で合成し、都合よい制限部位を付加した。得られた配列番号３２はＳｌｏｎｉｎｇ（プッフハイム、ドイツ）で合成された。

【００９３】

［フマラーゼ］

ＳｉｇｎａｌＰ ３．０（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｃｂｓ．ｄｔｕ．ｄｋ／ｓｅｒｖｉｃｅｓ／ＳｉｇｎａｌＰ／）Ｂｅｎｄｔｓｅｎ，Ｊ．ら（２００４年）Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，３４０：７８３～７９５、およびＴａｒｇｅｔＰ １．１（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｃｂｓ．ｄｔｕ．ｄｋ／ｓｅｒｖｉｃｅｓ／ＴａｒｇｅｔＰ／）Ｅｍａｎｕｅｌｓｓｏｎ，Ｏ．ら（２００７年）Ｎａｔｕｒｅ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ２、９５３～９７１を使用して、リゾプス・オリゼー（Ｒｈｉｚｏｐｕｓ ｏｒｙｚａｅ）からのフマラーゼ［Ｅ．Ｃ．４．２．１．２］（ＦｕｍＲ）、ＧｅｎＢａｎｋ登録番号４６９１０３をシグナル配列の存在について分析した。タンパク質の最初の２３個のアミノ酸中の推定上のミトコンドリア標的配列を同定した。Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）中のミトコンドリア標的化の可能性を回避するために、ＦｕｍＲから最初の２３個のアミノ酸を除去し、メチオニンアミノ酸を再導入して配列番号２３をもたらした。Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒ

ｅｖｉｓｉａｅ）について国際公開第２００８／０００６３２号パンフレットで開示されるように、配列番号２３にコドンペア法を実施して、配列番号２４をもたらした。配列番号２４中の停止コドンＴＡＡをＴＡＡＧに改変した。停止コドンとしてＴＡＡＧを含有する配列番号２４を構成的ＴＤＨ１プロモーター配列番号２５の後、およびＴＤＨ１ターミネーター配列番号２６の前で合成し、都合よい制限部位を付加した。得られた合成コンストラクト配列番号３３はＳｌｏｎｉｎｇ（プッフハイム、ドイツ）で合成された。

【００９４】

［フマル酸還元酵素］

Ｔ．ブルセイ（ｂｒｕｃｅｉ）からのミトコンドリアフマル酸還元酵素（ＦＲＤｍ１）およびグリコソームフマル酸還元酵素（ＦＲＤｇ）の遺伝子配列を２Ａ．１で述べられるようにして合成した。

【００９５】

［２Ｃ．２．発現コンストラクトの構築］

Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）発現ベクターｐＲＳ４１４のＢａｍＨＩ／ＮｏｔＩ制限後に、発現コンストラクトｐＧＢＳ４１４ＰＰＫ－１（図９）、ｐＧＢＳ４１４ＰＰＫ－２（図１０）、およびｐＧＢＳ４１４ＰＰＫ－３（図１１）を作り出し（Ｓｉｒｋｏｓｋｉ　Ｒ．Ｓ．およびＨｉｅｔｅｒ　Ｐ，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，１９８９年，１２２（１）：１９～２７）、引き続いてこのベクター中に、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ（アクチノバシラス・サクシノジェネス（Ａｃｔｉｎｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｕｃｃｉｎｏｇｅｎｅｓ）起源）合成遺伝子コンストラクト（配列番号２９）からなるＢａｍＨＩ／ＮｏｔＩ制限酵素断片をライゲートした。ライゲーション混合物を大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ＴＯＰ１０（インビトロジェン）の形質転換のために使用して、酵母発現コンストラクトｐＧＢＳ４１４ＰＰＫ－１をもたらした。引き続いてｐＧＢＫ４１４ＰＰＫ－１をＡｓｃＩおよびＮｏｔＩで制限した。ｐＧＢＳ４１４ＰＰＫ－２を作り出すために、Ｔ．ブルセイ（ｂｒｕｃｅｉ）合成遺伝子コンストラクト（配列番号３４）からのミトコンドリアフマル酸還元酵素（ＦＲＤｍ１）からなるＡｓｃＩ／ＮｏｔＩ制限酵素断片を制限ｐＧＢＳ４１４ＰＰＫ－１ベクターにライゲートした。ライゲーション混合物を大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ＴＯＰ１０（インビトロジェン）の形質転換のために使用して、酵母発現コンストラクトｐＧＢＳ４１４ＰＰＫ－２をもたらした（図１０）。ｐＧＢＳ４１４ＰＰＫ－３を作り出すために、Ｔ．ブルセイ（ｂｒｕｃｅｉ）（ＦＲＤｇ）合成遺伝子コンストラクト（配列番号３５）からのグリコソームフマル酸還元酵素からなるＡｓｃＩ／ＮｏｔＩ制限酵素断片を制限ｐＧＢＳ４１４ＰＰＫ－１ベクターにライゲートした。ライゲーション混合物を大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ＴＯＰ１０（インビトロジェン）の形質転換のために使用して、酵母発現コンストラクトｐＧＢＳ４１４ＰＰＫ－３をもたらした（図１１）。

【００９６】

Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）発現ベクターｐＲＳ４１４のＢａｍＨＩ／ＮｏｔＩ制限後に、発現コンストラクトｐＧＢＳ４１４ＰＥＫ－１（図１２）、ｐＧＢＳ４１４ＰＥＫ－２（図１３）、およびｐＧＢＳ４１４ＰＥＫ－３（図１４）を作り出し（Ｓｉｒｋｏｓｋｉ　Ｒ．Ｓ．およびＨｉｅｔｅｒ　Ｐ，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，１９８９年，１２２（１）：１９～２７）、引き続いてこのベクター中に、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ（マンヘイミア・サクシニシプロデュセンス（Ｍａｎｎｈｅｉｍｉａ　ｓｕｃｃｉｎｉｃｉｐｒｏｄｕｃｅｎｓ）起源）合成遺伝子コンストラクト（配列番号３０）からなるＢａｍＨＩ／ＮｏｔＩ制限酵素断片をライゲートした。ライゲーション混合物を大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ＴＯＰ１０（インビトロジェン）の形質転換のために使用して、酵母発現コンストラクトｐＧＢＳ４１４ＰＥＫ－１をもたらした。引き続いて、ｐＧＢＫ４１４ＰＥＫ－１をＡｓｃＩおよびＮｏｔＩで制限した。ｐＧＢＳ４１４ＰＥＫ－２を作り出すために、Ｔ．ブルセイ（ｂｒｕｃｅｉ）合成遺伝子コンストラクト（配列番号３４）からのミトコンドリアフマル酸還元酵素（ＦＲＤｍ１）からなるＡｓｃＩ／ＮｏｔＩ制限酵素断片を制限ｐＧＢＳ４１４ＰＥＫ－１ベクターにライゲートした。ライゲー

ション混合物を大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ＴＯＰ１０（インビトロジェン）の形質転換のために使用して、酵母発現コンストラクトｐＧＢＳ４１４ＰＥＫ－２をもたらした（図１３）。ｐＧＢＳ４１４ＰＥＫ－３を作り出すために、Ｔ．ブルセイ（ｂｒｕｃｅｉ）合成遺伝子コンストラクト（配列番号３５）からのグリコソームフマル酸還元酵素（ＦＲＤｇ）からなるＡｓｃＩ／ＮｏｔＩ制限酵素断片を制限ｐＧＢＳ４１４ＰＥＫ－１ベクターにライゲートした。ライゲーション混合物を大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ＴＯＰ１０（インビトロジェン）の形質転換のために使用して、酵母発現コンストラクトｐＧＢＳ４１４ＰＥＫ－３をもたらした（図１４）。

【００９７】

Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）発現ベクターｐＲＳ４１５のＢａｍＨＩ／ＮｏｔＩ制限後に、発現コンストラクトｐＧＢＳ４１５ＦＵＭ－２（図１５）およびｐＧＢＳ４１５ＦＵＭ－３（図１６）を作り出し（Ｓｉｒｋｏｓｋｉ　Ｒ．Ｓ．およびＨｉｅｔｅｒ　Ｐ，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，１９８９年，１２２（１）：１９～２７）、引き続いてこのベクター中に、フマラーゼ（リゾプス・オリゼー（Ｒｈｉｚｏｐｕｓ　ｏｒｙｚａｅ）起源）合成遺伝子コンストラクト（配列番号３３）からなるＢａｍＨＩ／ＮｏｔＩ制限酵素断片をライゲートした。ライゲーション混合物を大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ＴＯＰ１０（インビトロジェン）の形質転換のために使用して、酵母発現コンストラクトｐＧＢＳ４１５ＦＵＭ－１をもたらした。引き続いてｐＧＢＫ４１５ＦＵＭ－１をＡｓｃＩおよびＮｏｔＩで制限した。ｐＧＢＳ４１５ＦＵＭ－２を作り出すために、制限ｐＧＢＳ４１５ＦＵＭ－１ベクターに、Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）（Δ１２ＮＭＤＨ２）合成遺伝子コンストラクト（配列番号３１）からのリンゴ酸デヒドロゲナーゼからなるＡｓｃＩ／ＮｏｔＩ制限酵素断片細胞質をライゲートした。ライゲーション混合物を大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ＴＯＰ１０（インビトロジェン）の形質転換のために使用して、酵母発現コンストラクトｐＧＢＳ４１５ＦＵＭ－２をもたらした（図１５）。ｐＧＢＳ４１５ＦＵＭ－３を作り出すために、制限ｐＧＢＳ４１５ＦＵＭ－１ベクターに、Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）合成遺伝子コンストラクト（配列番号３２）からのペルオキシソームリンゴ酸デヒドロゲナーゼ（ＭＤＨ３）からなるＡｓｃＩ／ＮｏｔＩ制限酵素断片をライゲートした。ライゲーション混合物を大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ＴＯＰ１０（インビトロジェン）の形質転換のために使用して、酵母発現コンストラクトｐＧＢＳ４１５ＦＵＭ－３をもたらした（図１６）。

【００９８】

［２Ｃ．３．Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）株］

プラスミドｐＧＢＳ４１４ＰＰＫ－１、ｐＧＢＳ４１４ＰＰＫ－２、ｐＧＢＳ４１４ＰＰＫ－３、ｐＧＢＳ４１４ＰＥＫ－１、ｐＧＢＳ４１４ＰＥＫ－２、ｐＧＢＳ４１４ＰＥＫ－３、ｐＧＢＳ４１５ＦＵＭ－２、ｐＧＢＳ４１５－ＦＵＭ－３の異なる組み合わせをＳ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）ＣＥＮ．ＰＫ１１３－６Ｂ株（ＭＡＴＡ　ｕｒａ３－５２　ｌｅｕ２－１１２　ｔｒｐ１－２８９）に形質転換して、表２に示す酵母株をもたらした。言及されるプラスミドに加えてｐＲＳ４１６（空ベクター）を形質転換し、原栄養酵母株を作り出した。発現ベクターを電気穿孔によって酵母に形質転換した。形質転換混合物を酵母窒素ベース（ＹＮＢ）ｗ／ｏ　ＡＡ（Ｄｉｆｃｏ）＋２％グルコースに播種した。

【００９９】

【表２】

表2:実施例2Cのために構築された酵母株

名称	バックグラウンド	プラスミド	遺伝子
SUC-148	CEN.PK113-6B	pGBS414PPK-2 pGBS415FUM-3 pRS416(空ベクター)	PCKa、FRDm1 FUMR、MDH3
SUC-149	CEN.PK113-6B	pGBS414PPK-3 pGBS415FUM-3 pRS416(空ベクター)	PCKa、FRDg FUMR、MDH3
SUC-150	CEN.PK113-6B	pGBS414PEK-2 pGBS415FUM-3 pRS416(空ベクター)	PCKm、FRDm1 FUMR、MDH3
SUC-151	CEN.PK113-6B	pGBS414PEK-3 pGBS415FUM-3 pRS416(空ベクター)	PCKm、FRDg FUMR、MDH3
SUC-152	CEN.PK113-6B	pGBS414PPK-1 pGBS415FUM-3 pRS416(空ベクター)	PCKa FUMR、MDH3
SUC-154	CEN.PK113-6B	pGBS414PEK-1 pGBS415FUM-3 pRS416(空ベクター)	PCKm FUMR、MDH3
SUC-169	CEN.PK113-6B	pGBS414PEK-2 pGBS415FUM-2 pRS416(空ベクター)	PCKm、FRDm1 FUMR、Δ12NMDH2
SUC-101	CEN.PK113-6B	pRS414(空ベクター) pRS415(空ベクター) pRS415(空ベクター)	

【０１００】

［２Ｃ．４．成長実験およびコハク酸生成］

２％ガラクトース（ｗ／ｖ）を含むＶｅｒｄｕｙｎ培地（Ｖｅｒｄｕｙｎら，１９９２年，Ｙｅａｓｔ．Ｊｕｌ；８（７）：５０１～１７）からなる２０ｍｌの前培養液に形質転換体を接種して、好気性条件下で３０℃、２５０ｒｐｍの振盪恒温器内において、１００ｍｌ振盪フラスコ内で生育させた。７２時間後に培養物を４７５０ｒｐｍで５分間遠心分離した。１ｍｌの上清を使用して、第１．４節で述べられているようにＨＰＬＣによってコハク酸レベルを測定した。残りの上清をデカントし、ペレット（細胞）を１ｍｌの生産培地に再懸濁した。生産培地は１０％ガラクトース（ｗ／ｖ）および１％ＣａＣＯ３（ｗ／ｖ）を添加したＶｅｒｄｕｙｎ培地からなった。再懸濁した細胞を１００ｍｌ振盪フラスコ内の５０ｍｌの生産培地に接種し、３０℃、１００ｒｐｍの振盪恒温器内で生育させた。様々な時点で培養物から１ｍｌのサンプルを採取し、第１．４節で述べられているようにＨＰＬＣによってコハク酸レベルを測定した（図１７）。

【０１０１】
空ベクターで形質転換した株（対照株）は、最高０．３ｇ／Ｌのコハク酸を産生した。Ｍ．サクシニシプロデュセンス（ｓｕｃｃｉｎｉｃｉｐｒｏｄｕｃｅｎｓ）からのＰＥＰカルボキシキナーゼ（ＰＣＫｍ）、Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）からのペルオキシソームリンゴ酸デヒドロゲナーゼ（ＭＤＨ３）、およびＲ．オリゼー（ｏｒｙｚａｅ）からのフマラーゼ（ＦＵＭＲ）の過剰発現は、０．９ｇ／Ｌコハク酸の生成をもたらした。Ａ．サクシノジェネス（ｓｕｃｃｉｎｏｇｅｎｅｓ）からのＰＥＰカルボキシキナーゼ（ＰＣＫａ）と、ＭＤＨ３およびＦＵＭＲの過剰発現は、１．０ｇ／Ｌへのわずかな増大をコハク酸生成にもたらした。

【０１０２】
これらの結果は、記述されるようなＳ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）中においてコハク酸生成が約３倍増大したことを示す。

【０１０３】
Ｔ．ブルセイ（ｂｒｕｃｅｉ）からのミトコンドリアフマル酸還元酵素（ＦＲＤｍ１）の追加的な過剰発現は、コハク酸生成レベルをさらに増大させる。ＰＣＫａ、ＭＤＨ３、ＦＵＭＲ、ＦＲＤｍ１の過剰発現は、２．６ｇ／Ｌのコハク酸の生成をもたらし、ＰＣＫｍ、ＭＤＨ３、ＦＵＭＲ、およびＦＲＤｍ１の過剰発現は、２．７ｇ／Ｌのコハク酸の生成をもたらした。ＰＣＫｍ、ＦＵＭＲ、およびＦＲＤｍ１と組み合わさったΔ１２ＮＭＤＨ２の過剰発現は、２．７ｇ／Ｌのコハク酸の生成をもたらし、トランケート型ＭＤＨ２またはＭＤＨ３のどちらかを使用して、同様のレベルのコハク酸が生成することが示された。Ｔ．ブルセイ（ｂｒｕｃｅｉ）からのグリコソームフマル酸還元酵素（ＦＲＤｇ）の追加的過剰発現は、さらにより高いコハク酸生成レベルの増大をもたらした。ＰＣＫａ、ＭＤＨ３、ＦＵＭＲ、およびＦＲＤｇの過剰発現が３．９ｇ／Ｌのコハク酸の生成をもたらしたのに対し、ＰＣＫｍ、ＭＤＨ３、ＦＵＭＲ、およびＦＲＤｇの過剰発現は、わずかにより低い３．６ｇ／Ｌのコハク酸の生成をもたらした。

【０１０４】
結果は、ＰＣＫａ／ｍ、ＭＤＨ３、およびＦＵＭＲの遺伝子組み換えを含むＳ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）へのここで開示されるようなＮＡＤ（Ｈ）依存フマル酸還元酵素の添加が、コハク酸生成レベルを顕著に増大させたことを示す。

【０１０５】
ＦＲＤｇの過剰発現は、Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）中におけるＦＲＤｍ１の過剰発現と比較して、Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）中のコハク酸生成レベルにより好ましい効果を有した。

【０１０６】
［実施例２Ｄ］
［コハク酸産生Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）細胞中のコハク酸生成に対するジカルボン酸輸送体の過剰発現の効果］
［２Ｄ．１．遺伝子配列］
Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）について国際公開第２００８／０００６３２号パンフレットで開示されるように、シゾサッカロミセス・ポンベ（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｐｏｍｂｅ）（配列番号３６）からのリンゴ酸パーミアーゼ、ＧｅｎＢａｎｋ登録番号１１９３６８８３１にコドンペア法を実施して、配列番号３７をもたらした。配列番号３７中の停止コドンＴＡＡをＴＡＡＧに改変した。停止コドンとしてＴＡＡＧを含有する配列番号３７を構成的ＥＮＯ１プロモーター配列番号３８の後、およびＥＮＯ１ターミネーター配列番号３９の前に入れ、都合よい制限部位を付加した。ＥＮＯ１プロモーター中においてより良いコザック配列を得るために、５９６（－５）位のＴをＡに変更した。得られた配列番号４０はＳｌｏｎｉｎｇ（プッフハイム、ドイツ）で合成された。

【０１０７】
［２Ｄ．２．発現コンストラクトの構築］

Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）発現ベクターｐＲＳ４１６のＢａｍＨＩ／ＮｏｔＩ制限後に、発現コンストラクトｐＧＢＳ４１６ＭＡＥ－１（図１８）を作り出し（Ｓｉｒｋｏｓｋｉ Ｒ．Ｓ．およびＨｉｅｔｅｒ Ｐ，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，１９８９年，１２２（１）：１９～２７）、引き続いてこのベクター中に、シゾサッカロミセス・ポンベ（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｐｏｍｂｅ）リンゴ酸輸送体合成遺伝子コンストラクト（配列番号４０）からなるＢａｍＨＩ／ＮｏｔＩ制限酵素断片をライゲートした。ライゲーション混合物を大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ＴＯＰ１０（インビトロジェン）の形質転換のために使用して、酵母発現コンストラクトｐＧＢＳ４１６ＭＡＥ－１をもたらした。

【０１０８】

［２Ｄ．３．Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）株］

プラスミドｐＧＢＳ４１４ＰＥＫ－２、ｐＧＢＳ４１５ＦＵＭ－２、およびｐＧＢＳ４１６ＭＡＥ－１（２Ｃ．２．で述べられている）をＳ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）ＣＥＮ．ＰＫ１１３－６Ｂ株（ＭＡＴＡ ｕｒａ３－５２ ｌｅｕ２－１１２ ｔｒｐ１－２８９）に形質転換して、ＰＣＫｍ、Δ１２ＮＭＤＨ２、ＦＵＭＲ、ＦＲＤｍ１、およびＳｐＭＡＥ１を過剰発現するＳＵＣ－１９４株を作り出した。全ての遺伝子をＳ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）中での発現についてコドンペア最適化した。

【０１０９】

発現ベクターを電気穿孔によって酵母に形質転換した。形質転換混合物を酵母窒素ベース（ＹＮＢ）ｗ／ｏ ＡＡ（Ｄｉｆｃｏ）＋２％グルコース上に播種した。ＳＵＣ－１０１株は表２に示される。

【０１１０】

【表３】

表3:実施例2Dのために構築された酵母株

名称	バックグラウンド	プラスミド	遺伝子
SUC-132	CEN.PK113-6B	pGBS414PEK-2 pGBS415FUM-2 pRS416(空ベクター)	PCKm、FRDm1 FUMR、Δ12NMDH2
SUC-194	CEN.PK113-6B	pGBS414PEK-2 pGBS415FUM-2 pRS416MAE-1	PCKm、FRDm1 FUMR、Δ12NMDH2 SpMAE1

【０１１１】

［２Ｄ．４．野生型ＣＥＮ．ＰＫ株の成長実験およびコハク酸生成］

以下の修正を加えて、実施例２Ｃ．４で述べられるようにして、成長パラメーターおよびサンプル分析を実施した。炭素源として２％グルコース（ｗ／ｖ）を使用して前培養を実施した。生産培地中で炭素源として１０％グルコース（ｗ／ｖ）を使用した。

【０１１２】

空ベクターで形質転換された株（対照株）は最高０．３ｇ／Ｌのコハク酸を産生した。ＰＣＫｍ、Δ１２ＮＭＤＨ２、ＦＵＭＲ、およびＦＲＤｍ１を過剰発現するＳＵＣ－１９４株中におけるＳｐＭＡＥ１の追加的過剰発現がコハク酸生成レベルの４．６ｇ／Ｌへの増大をもたらしたのに対し、ＰＣＫｍ、Δ１２ＮＭＤＨ２、ＦＵＭＲ、およびＦＲＤｍ１を過剰発現するＳＵＣ－１３２株は、２．７ｇ／Ｌのコハク酸の生成をもたらした。

【０１１３】

結果は、ここで述べられているような遺伝子組み換えを含むＳ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）へのリンゴ酸輸送体の挿入が、コハク酸生成を少なくとも１．５倍、さらに増大させることを示す。

【０１１４】

［実施例２Ｅ］

［遺伝子アルコールデヒドロゲナーゼ１および２（ａｄｈ１、ａｄｈ２）および遺伝子グリセロール－３－リン酸デヒドロゲナーゼ１（ｇｐｄ１）の欠失があるＳ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）中における、コハク酸生成レベルに対するジカルボン酸輸送体の効果］

【０１１５】

［２Ｅ．１．遺伝子配列］

２Ｄ．１で述べられている。

【０１１６】

［２Ｅ．２．発現コンストラクトの構築］

２Ｄ．２で述べられている。

【０１１７】

［２Ｅ．３．Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）株］

プラスミドｐＧＢＳ４１４ＰＰＫ－３、ｐＧＢＳ４１５ＦＵＭ－３、およびｐＧＢＳ４１６ＭＡＥ－１（２Ｃ．２で述べられている）をＳ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）ＲＷＢ０６４株（ＭＡＴＡ　ｕｒａ３－５２　ｌｅｕ２－１１２　ｔｒｐ１－２８９　ａｄｈ１：：ｌｏｘ　ａｄｈ２：：ｌｏｘ　ｇｐｄ１：：Ｋａｎｌｏｘ）に形質転換して、ＰＣＫａ、ＭＤＨ３、ＦＵＭＲ、ＦＲＤｇ、およびＳｐＭＡＥ１を過剰発現するＳＵＣ－２０１株を作り出した。全ての遺伝子をＳ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）中での発現についてコドンペア最適化した。

【０１１８】

【表４】

表4:実施例2Eのために構築された酵母株

名称	バックグラウンド	プラスミド	遺伝子
SUC-200	CEN.PK113-6B adh1::loxadh2::lox gpd1::Kanlox	pGBS414PPK-3 pGBS415FUM-3 pGBS416MAE-1	PCKa、FRDg FUMR、MDH3 SpMAE1
SUC-201	CEN.PK113-6B adh1::loxadh2::lox gpd1::Kanlox	pGBS414PPK-3 pGBS415FUM-3 pRS416(空ベクター)	PCKa、FRDg FUMR、MDH3
SUC-103	CEN.PK113-6B adh1::loxadh2::lox gpd1::Kanlox	pRS414(空ベクター) pRS415(空ベクター) pRS415(空ベクター)	

【０１１９】

［２Ｅ．４．遺伝子アルコールデヒドロゲナーゼ１および２（ａｄｈ１、ａｄｈ２）および遺伝子グリセロール－３－リン酸デヒドロゲナーゼ１（ｇｐｄ１）が欠失したＣＥＮ．ＰＫ株の成長実験およびコハク酸生成］

以下の修正を加えて、実施例２Ｃ．４で述べられるようにして、成長パラメーターおよ

びサンプル分析を実施した。炭素源として２％ガラクトース（ｗ／ｖ）を使用して前培養を実施した。ｔ＝０、３、および７日目に、生産培地に５％ガラクトース（ｗ／ｖ）を添加した。

【０１２０】

空ベクターで形質転換されたＳＵＣ－１０３株（対照株）は、生産培地中で１０日間の成長後に０．９ｇ／Ｌのコハク酸を産生した（図２０）。ＲＷＢ０６４株中のＰＣＫａ、ＭＤＨ３、ＦＵＭＲ、およびＦＲＤｇの過剰発現は、コハク酸生成レベルの２．５ｇ／Ｌへの増大をもたらした（ＳＵＣ－２０１株、図２０）。ＰＣＫａ、ＭＤＨ３、ＦＵＭＲ、およびＦＲＤｇに加えて、ＲＷＢ０６４株におけるＳｐＭＡＥ１の追加的過剰発現は、コハク酸生成レベルに１１．９ｇ／Ｌへのさらなる増大をもたらした（ＳＵＣ－２００株、図２０）。

【０１２１】

結果は、アルコールデヒドロゲナーゼおよびグリセロール－３－リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の欠失があるＳ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）中におけるリンゴ酸輸送体の過剰発現が、コハク酸生成レベルに顕著な増大をもたらしたことを示す。さらに遺伝子ａｄｈ１、ａｄｈ２、およびｇｐｄ１（ＳＵＣ－１０３）の欠失が、野性型株（ＳＵＣ－１０１、表２）と比較して、コハク酸生成レベルの増大をもたらすことが示された。

【０１２２】

［実施例２Ｆ］

［サッカロミセス・セレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）中における、アクチノバシラス・サクシノジェネス（Ａｃｔｉｎｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｕｃｃｉｎｏｇｅｎｅｓ）からのホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ、サッカロミセス・セレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）からのピルビン酸カルボキシラーゼ、サッカロミセス・セレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）からのリンゴ酸デヒドロゲナーゼ、リゾプス・オリゼー（Ｒｈｉｚｏｐｕｓ　ｏｒｙｚａｅ）からのフマラーゼ、トリパノソーマ・ブルセイ（Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ　ｂｒｕｃｅｉ）からのフマル酸還元酵素のクローニング］

［２Ｆ．１．遺伝子配列］

Ａ．サクシノジェネス（ｓｕｃｃｉｎｏｇｅｎｅｓ）からのＰＥＰカルボキシキナーゼ、Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）からのリンゴ酸デヒドロゲナーゼ、Ｒ．オリゼー（ｏｒｙｚａｅ）からのフマラーゼ、およびＴ．ブルセイ（ｂｒｕｃｅｉ）からのフマル酸還元酵素の遺伝子配列については、２Ｆ．１で述べられている。サッカロミセス・セレヴィシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）からの細胞質ピルビン酸カルボキシラーゼ（Ｐｙｃ２ｐ）［Ｅ．Ｃ．６．４．１．１．］、ＧｅｎＢａｎｋ登録番号１０４１７３４、配列番号４１は、ヌクレオチド配列番号４２によってコードされる。プライマーＰ１（配列番号４３）およびＰ２（配列番号４４）、および製造業者の使用説明書に従ってＰｈｕｓｉｏｎ　ＤＮＡポリメラーゼ（Ｆｉｎｎｚｙｍｅｓ、フィンランド）を使用して、Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）ＣＥＮ．ＰＫ１１３－５Ｄ株（ＭＡＴＡ　ｕｒａ３－５２）からのゲノムＤＮＡを鋳型として使用して、ＰＹＣ２コード配列（配列番号４２）を増幅した。さらなるクローニングの目的で、都合よい制限部位をプライマーに含めた。

【０１２３】

［２Ｆ．２．発現コンストラクトの構築］

Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）発現ベクターｐ４２６ＧＰＤのＳｐｅＩ／ＸｈｏＩ制限後に、発現コンストラクトｐＧＢＳ４２６ＰＹＣ－２（図２１）を作り出し（Ｍｕｍｂｅｒｇら，Ｇｅｎｅ．１９９５年　Ａｐｒ　１４；１５６（１）：１１９～２２）、引き続いてこのベクター中に、増幅されたＰＹＣ２ヌクレオチド配列（配列番号４２）からなるＳｐｅＩ／ＸｈｏＩ制限酵素断片をライゲートした。ライゲーション混合物を大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ＴＯＰ１０（インビトロジェン）の形質転換のために使用して、酵母発現コンストラクトｐＧＢＳ４２６ＰＹＣ－２をもたらした（図２１）。発現ベク

ターｐＧＢＳ４１４ＰＰＫ－３およびｐＧＢＳ４１５ＦＵＭ－３の構築については、２Ｃ．２で述べられている。Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）発現ベクターｐＲＳ４１４のＢａｍＨＩ／ＮｏｔＩ制限後に発現コンストラクトｐＧＢＳ４１４ＦＲＥ－１を作り出し（Ｓｉｒｋｏｓｋｉ　Ｒ．Ｓ．およびＨｉｅｔｅｒ　Ｐ，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，１９８９年，１２２（１）：１９～２７）、引き続いてこのベクター中に、グリコソームフマル酸還元酵素（トリパノソーマ・ブルセイ（Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ　ｂｒｕｃｅｉ）起源）合成遺伝子コンストラクト（配列番号３５）からなるＢａｍＨＩ／ＮｏｔＩ制限酵素断片をライゲートした。ライゲーション混合物を大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ＴＯＰ１０（インビトロジェン）の形質転換のために使用して、酵母発現コンストラクトｐＧＢＳ４１４ＦＲＥ－１をもたらした（図２２）。

【０１２４】

［２Ｆ．３．Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）株］

表５に示すように、ｐＧＢＳ４１４ＦＲＥ－１、ｐＧＢＳ４１４ＰＰＫ－３、ｐＧＢＳ４１５ＦＵＭ－１、ｐＧＢＳ４２６ＰＹＣ－２、およびｐ４２６ＧＰＤの異なるプラスミドの組み合わせをＣＥＮ．ＰＫ１１３－６Ｂ株（ＭＡＴＡ　ｕｒａ３－５２　ｌｅｕ２－１１２　ｔｒｐ１－２８９）に形質転換して、ＳＵＣ－２２６、ＳＵＣ－２２７、ＳＵＣ－２２８、およびＳＵＣ－２３０株を得た。

【０１２５】

【表５】

表5:実施例2Fのために構築された酵母株

名称	バックグラウンド	プラスミド	遺伝子
SUC-226	CEN.PK113-6B	pGBS414PPK-3 pGBS415FUM-3 p426GPD(空ベクター)	PCKa、FRDg FUMR、MDH3
SUC-227	CEN.PK113-6B	pGBS414PPK-3 pGBS415FUM-3 pGBS426PYC-2	PCKa、FRDg FUMR、MDH3 PYC2
SUC-228	CEN.PK113-6B	pGBS414FRE-1 pGBS415FUM-3 pGBS426PYC-2	FRDg FUMR、MDH3 PYC2
SUC-230	CEN.PK113-6B	pGBS414FRE-1 pGBS415FUM-3 p426GPD(空ベクター)	FRDg FUMR、MDH3

【０１２６】

［２Ｆ．４．成長実験およびコハク酸生成］

以下の修正を加えて、実施例２Ｃ．４で述べられるようにして、成長パラメーターおよびサンプル分析を実施した。炭素源として２％グルコース（ｗ／ｖ）を使用して前培養を実施した。生産培地中で炭素源として１０％グルコース（ｗ／ｖ）を使用した。

【０１２７】

図２３で示されるようにＭＤＨ３、ＦＵＭＲ、およびＦＲＤｇを過剰発現するＳＵＣ－２３０株は、最高３．０ｇ／Ｌのコハク酸を産生した。ＰＣＫａの追加的な過剰発現は、最高３．４ｇ／Ｌ（株ＳＵＣ－２２６）までコハク酸生成を増大し、ＰＹＣ２の追加的過剰発現は、３．７ｇ／Ｌ（株ＳＵＣ－２２８）までコハク酸生成を増大した。意外にもＰ

ＣＫａおよびＰＹＣ２（ＳＵＣ－２２７）双方の過剰発現は、ＰＣＫおよびＰＹＣ単独の効果と比較して、最高５．０ｇ／Ｌまでコハク酸生成レベルの１．５倍の増大をもたらした。これらの結果は、Ｓ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）中のコハク酸生成レベルに対する、Ａ．サクシノジェネス（ｓｕｃｃｉｎｏｇｅｎｅｓ）からのＰＥＰカルボキシキナーゼ（ＰＣＫａ）およびＳ．セレヴィシエ（ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）からのピルビン酸カルボキシラーゼ（ＰＹＣ２）双方の過剰発現の組み合わせの相乗効果を示す。

【０１２８】

［実施例３］

［アスペルギルス・ニガー（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｎｉｇｅｒ）中のコハク酸デヒドロゲナーゼコード化遺伝子の不活性化］

［３．１．同定］

アスペルギルス・ニガー（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｎｉｇｅｒ）ＣＢＳ５１３．８８株のゲノムＤＮＡを配列決定し分析した。コハク酸デヒドロゲナーゼタンパク質の相同体と表記された翻訳タンパク質がある２つの遺伝子が同定され、それぞれｓｄｈＡおよびｓｄｈＢと命名された。ｓｄｈＡ（Ａｎ１６ｇ０７１５０）およびｓｄｈＢ（Ａｎ０２ｇ１２７７０）遺伝子座の配列は、ｇｅｎｂａｎｋでそれぞれ登録番号１４５２５３００４および１４５２３４０７１により入手できる。既知の原理に従ってｓｄｈＡおよびｓｄｈＢの遺伝子置換ベクターをデザインし、通例のクローニング手順に従って構築した（図６参照）。ベクターは、所定のゲノムの遺伝子座における相同的組換えのために、およそ１０００ｂｐのｓｄｈ　ＯＲＦ隣接領域を含む。さらにそれらは直列反復配列間に、ｇｐｄＡプロモーターによって駆動されるＡ．ニデュランス（ｎｉｄｕｌａｎｓ）双方向性ａｍｄＳ選択マーカーを含有する。これらの欠失ベクターの一般的デザインについては、欧州特許第６３５５７４Ｂ号明細書および国際公開第９８／４６７７２号パンフレットで既に述べられている。

【０１２９】

［３．２．アスペルギルス・ニガー（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｎｉｇｅｒ）中におけるｓｄｈＡ遺伝子の不活性化］

Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　ｏｆ　Ｆｉｌａｍｅｎｔｏｕｓ　ｆｕｎｇｉ：Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　ａｎｄ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ．（１９９２）Ｒｅｅｄ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ（ＵＳＡ）；第６章：Ｔｒａｎｓｆｏｒｍａｔｉｏｎ　ｐ．１１３～１５６で述べられるようにして、欠失ベクターｐＤＥＬ－ＳＤＨＡの線状ＤＮＡ（図４）を単離して、アスペルギルス・ニガー（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｎｉｇｅｒ）ＣＢＳ５１３．８８を形質転換するのに使用した。この線状ＤＮＡはｓｄｈＡ遺伝子座でゲノムに組み込むことができ、したがって図６に示すようにｓｄｈＡ遺伝子がａｍｄＳ遺伝子によって置換される。欧州特許第６３５５７４Ｂ号明細書で述べられている標準操作手順に従って、アセトアミド培地上で形質転換体を選択し、コロニーを純化した。胞子をフルオロアセトアミド培地上に播種して、ａｍｄＳマーカーを欠失した株を選択した。成長するコロニーをＰＣＲによってｓｄｈＡ遺伝子座における組み込みについて診断し、候補株をサザン分析によってｓｄｈＡ遺伝子の欠失について試験した。ｓｄｈＡ遺伝子の欠失は、遺伝子座全体をカバーし、適切なプローブとハイブリダイズするＤＮＡ断片の約２．２ｋｂのサイズ減少により検出可能であった（４．６ｋｂの野生型断片に対し２．４ｋｂの成功裡のＳＤＨＡ欠失）。およそ９６個の最初の形質転換体のプールから、およそ９つの株がゲノムｓｄｈＡ遺伝子の除去を示した。

【０１３０】

ｓｄｈＡ遺伝子が不活性化された代表的な株としてｄＳＤＨＡ株を選択した。ｄＳＤＨＡのコハク酸生成は実施例４で述べられるようにして、マイクロタイタープレート内で判定した。

【０１３１】

［実施例４］

［アスペルギルス・ニガー（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｎｉｇｅｒ）ｄＳＤＨＡ中におけ

るトリパノソーマ・ブルセイ（Ｔｒｙｐａｎｏｓｏｍａ　ｂｒｕｃｅｉ）からのＦＲＤｍのクローニング］

実施例１．１で述べられるようにして、トランケート型ミトコンドリアフマル酸還元酵素ｍ１（ＦＲＤｍ１、配列番号７）を含む発現コンストラクトｐＧＢＴＯＰＡｎ１（図５）で、実施例３．２のＡ．ニガー（ｎｉｇｅｒ）ｄＳＤＨＡ株を形質転換した。大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ＤＮＡをＮｏｔＩ消化によって除去した。Ｑｐｉｘを使用してＡ．ニガー（ｎｉｇｅｒ）形質転換体を拾い、アスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）選択培地を含有するＭＴＰ上に移した。摂氏３０度で７日間の培養後、手動でまたはコロニーピッカーを使用して、ＰＤＡを含有するマイクロタイタープレート（ＭＴＰ）に生物体を移した。摂氏３０度で７日間の培養後、生物体は胞子形成した。Ｍｕｌｔｉｍｅｋ　９６（ベックマン）を使用して、１０％グルコースを含有する１００μｌの最小富化アスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）培地にこれらの胞子を再懸濁した。引き続いて１０％グルコースおよび１％ＣａＣＯ３を含有する１７０μｌの最小富化アスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）培地を入れた２枚のＭＴＰに３０μｌの胞子懸濁液を接種した。同様にＡ．ニガー（ｎｉｇｅｒ）ｄＳＤＨＡおよびＣＢＳ５１３．８８株をＭＴＰに接種した。これらのＭＴＰを摂氏３４度、湿度８０％で５日間培養した。５日後、Ｍｕｌｔｉｍｅｋ　９６（ベックマン）を使用して１６０μｌを収集し、実施例１．４で述べられるようにしてＨＰＬＣによってコハク酸を測定した。結果を表６に示す。

【０１３２】

【表６】

表6：A.ニガー（niger）中におけるコハク酸生成レベルに対する、コハク酸デヒドロゲナーゼ（SDHA）欠失およびT.ブルセイ（brucei）からのミトコンドリアフマル酸還元酵素（FRDm1）挿入の効果

A.ニガー（niger）株	コハク酸mg/l
CBS513.88	38
dSDHA	50
dSDHA, + gGBTOPAn1 (FRDm1)	583

【０１３３】

表６は、Ｔ．ブルセイ（ｂｒｕｃｅｉ）からのミトコンドリアフマル酸還元酵素を含むＡ．ニガー（ｎｉｇｅｒ）によるコハク酸生成の増大を明らかに示す。

【図１】

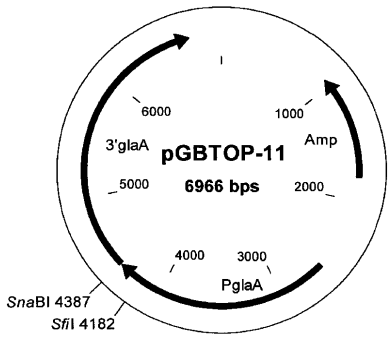


Figure 1

【図２】

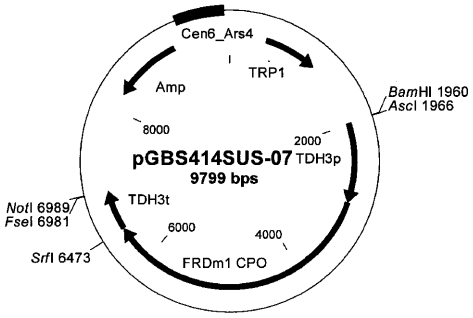


Figure 2

【図３】

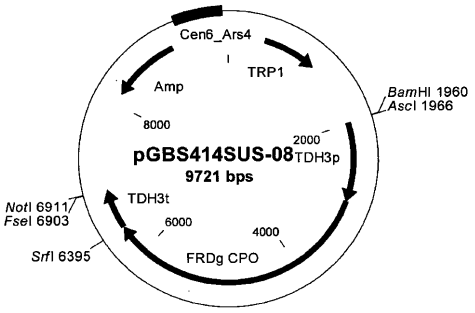


Figure 3

【図４】

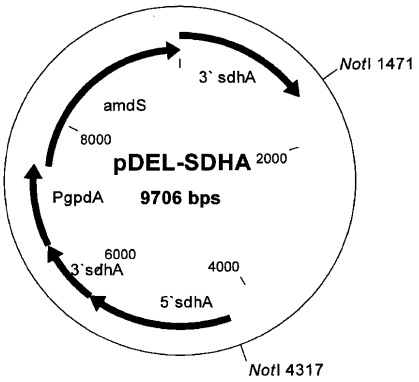


Figure 4

【図５】

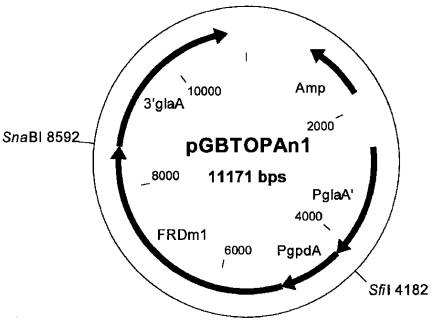


Figure 5

【図６】

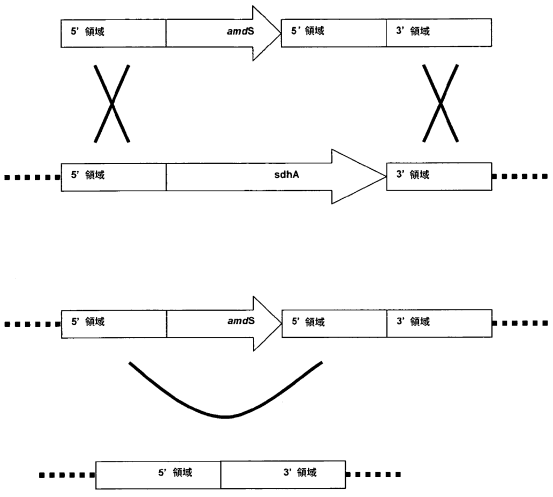


図 6

【図７】

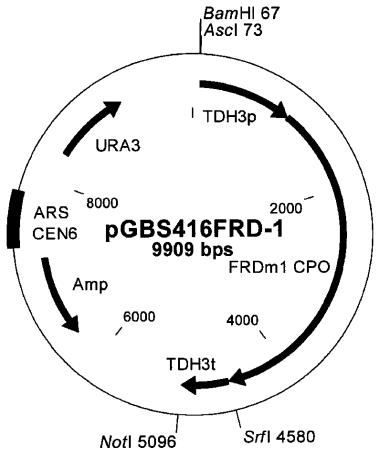


Figure 7

【図８】

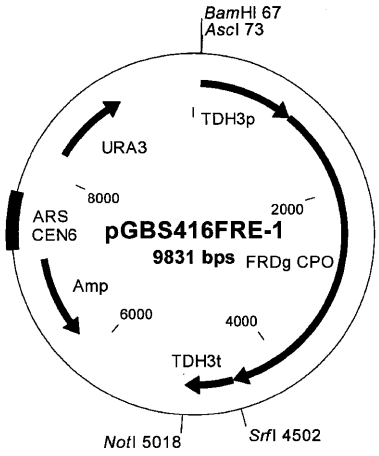


Figure 8

【図９】

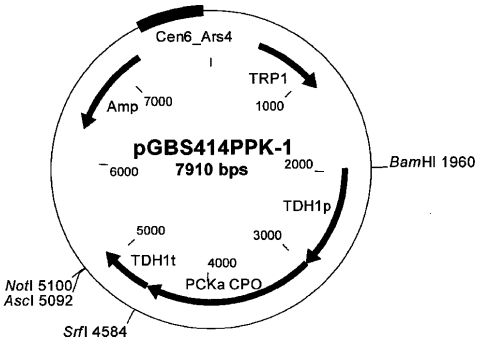


Figure 9

【図１０】

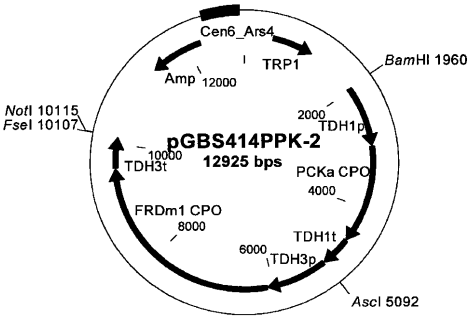


Figure 10

【図１１】

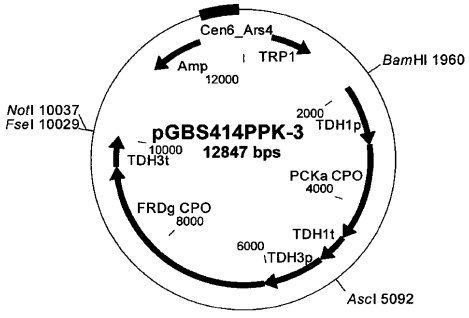


Figure 11

【図１２】

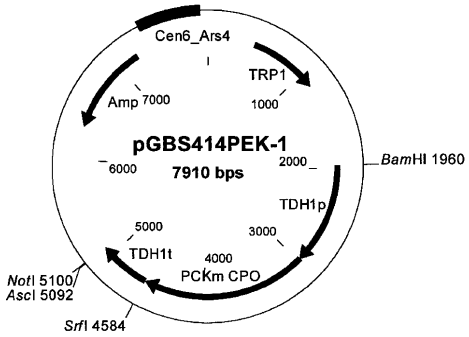


Figure 12

【図１３】

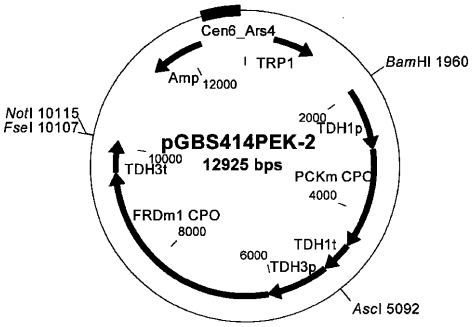


Figure 13

【図１４】

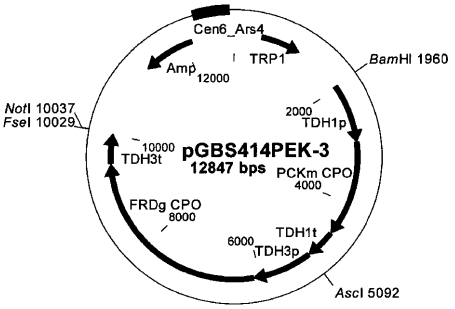


Figure 14

【図１５】

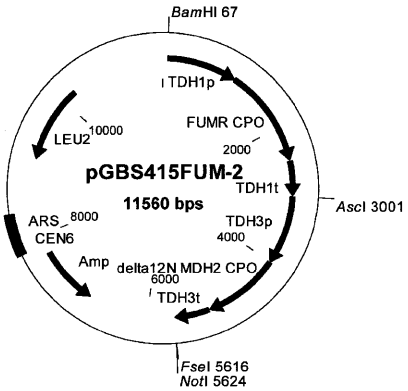


Figure 15

【図１６】

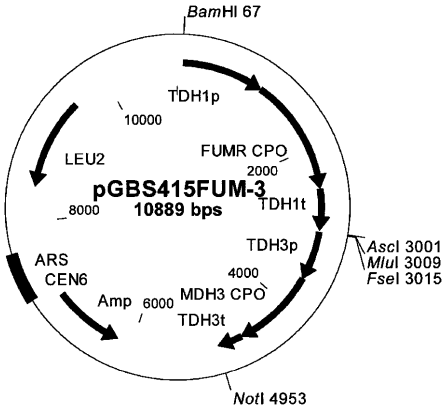


Figure 16

【図１７】

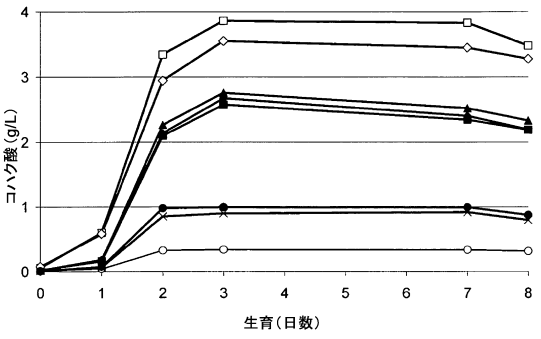


図 17

【図１８】

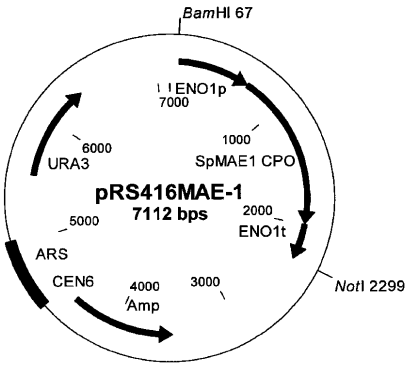


Figure 18

【図１９】

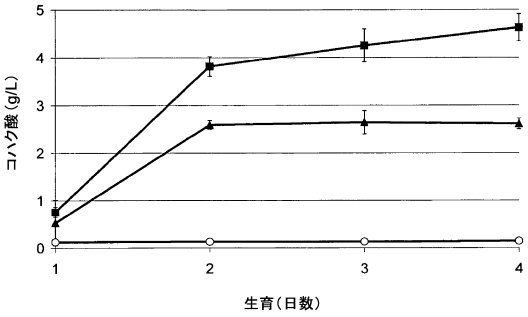


図 19

【図２０】

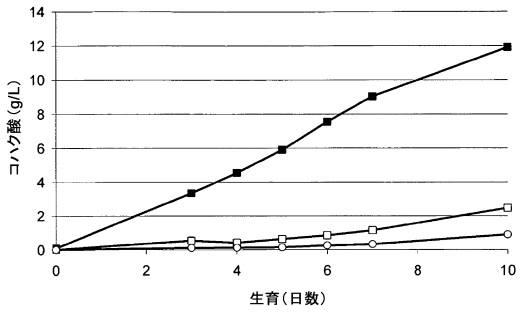


図 20

【図２１】

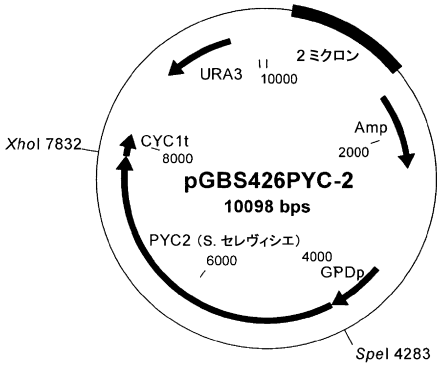


図 21

【図２２】

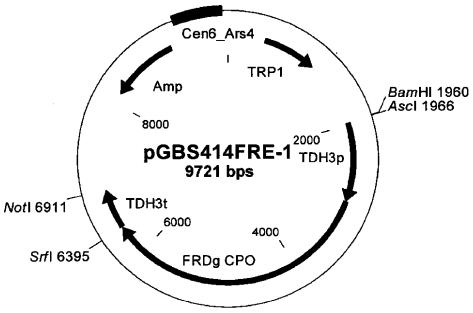


Figure 22

【図２３】

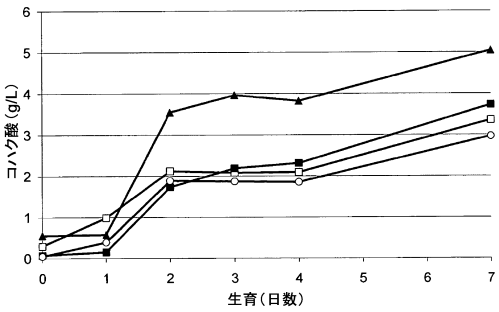


図 23

【配列表】

0005641938000001.app

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 07121113.0
(32)優先日 平成19年11月20日(2007.11.20)
(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)
(31)優先権主張番号 08156961.8
(32)優先日 平成20年5月27日(2008.5.27)
(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)
(31)優先権主張番号 08156960.0
(32)優先日 平成20年5月27日(2008.5.27)
(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)
(31)優先権主張番号 08156959.2
(32)優先日 平成20年5月27日(2008.5.27)
(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)

前置審査

(74)代理人 100162352
弁理士 酒巻 順一郎
(74)代理人 100139000
弁理士 城戸 博兒
(74)代理人 100152191
弁理士 池田 正人
(72)発明者 ヴェルワール, ルネ
オランダ国, エヌエル‐２６３１ エヌエル ヌートドルプ, マルスディープ ７
(72)発明者 ウー, リャン
オランダ国, エヌエル‐２６２５ ブイケー デルフト, スウェーリンクシュトラート ３６
(72)発明者 ダムヴェルド, ロベルトゥス, アントニウス
オランダ国, エヌエル‐２６５１ エヌケー ベルケル エン ロデンリジス, スラフテルホフ １７
(72)発明者 サグト, コルネリス, マリア, ヤコブス
オランダ国, エヌエル‐３５４３ エイチブイ ユトレヒト, カール ミロッケルホフ １９

審査官 鳥居 敬司

(56)参考文献 国際公開第２００８／１３３１６１（WO，Ａ１）
国際公開第２００７／００６２５９（WO，Ａ１）
国際公開第２００５／０２１７７０（WO，Ａ１）
J.Biol.Chem.，２００２年，Vol.277，No.41，p.38001-38012
J.Biol.Chem.，２００５年，Vol.280，No.17，p.16559-16570

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １５／００－１５／９０
Ｃ１２Ｐ ７／００－７／６６
Ｃ１２Ｎ ９／００－９／９９
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＵｎｉＰｒｏｔ／ＧｅｎｅＳｅｑ
ＷＰＩＤＳ／ＷＰＩＸ（ＳＴＮ）