

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5276985号
(P5276985)

(45) 発行日 平成25年8月28日 (2013. 8. 28)

(24) 登録日 平成25年5月24日 (2013. 5. 24)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N	1/21	(2006. 01)	C 1 2 N	1/21	Z N A
C 1 2 N	1/15	(2006. 01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	(2006. 01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	15/09	(2006. 01)	C 1 2 N	15/00	A
C 1 2 P	7/16	(2006. 01)	C 1 2 P	7/16	

請求項の数 18 (全 83 頁)

(21) 出願番号 特願2008-533648 (P2008-533648)
 (86) (22) 出願日 平成18年9月28日 (2006. 9. 28)
 (65) 公表番号 特表2009-509541 (P2009-509541A)
 (43) 公表日 平成21年3月12日 (2009. 3. 12)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/038007
 (87) 国際公開番号 W02007/041269
 (87) 国際公開日 平成19年4月12日 (2007. 4. 12)
 審査請求日 平成21年9月18日 (2009. 9. 18)
 (31) 優先権主張番号 60/721, 677
 (32) 優先日 平成17年9月29日 (2005. 9. 29)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/814, 470
 (32) 優先日 平成18年6月16日 (2006. 6. 16)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 310011310
 ビュータマックス・アドバンスド・バイオ
 フューエルズ・エルエルシー
 アメリカ合衆国デラウェア州19880.
 ウィルミントン、パウダーミルロード20
 0、イクスペリメンタルステーション ビ
 ー268/アール226
 (74) 代理人 100127926
 弁理士 結田 純次
 (74) 代理人 100140132
 弁理士 竹林 則幸
 (72) 発明者 ドナルドソン、ゲイル・ケイ
 アメリカ合衆国デラウェア州19711ニ
 ユーアーク・グレートサークルロード3

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 4炭素アルコールの発酵性産生

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

a) アセチル-CoAアセチルトランスフェラーゼ活性を有し、アセチル-CoAからアセトアセチル-CoAへの変換を触媒するポリペプチドをコードする異種DNA分子、

b) 3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ活性を有し、アセトアセチル-CoAから3-ヒドロキシブチリル-CoAへの変換を触媒するポリペプチドをコードする異種DNA分子、

c) クロトナーゼ活性を有し、3-ヒドロキシブチリル-CoAからクロトニル-CoAへの変換を触媒するポリペプチドをコードする異種DNA分子、

d) ブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ活性を有し、クロトニル-CoAからブチリル-CoAへの変換を触媒するポリペプチドをコードする異種DNA分子、

e) ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有し、ブチリル-CoAからブチルアルデヒドへの変換を触媒するポリペプチドをコードする異種DNA分子、および

f) ブタノールデヒドロゲナーゼ活性を有し、ブチルアルデヒドから1-ブタノールへの変換を触媒するポリペプチドをコードするDNA分子、

を含んでなる組み換え微生物宿主細胞であって、

前記微生物宿主細胞が1-ブタノールを生成する、上記組み換え微生物宿主細胞。

【請求項2】

細胞が、細菌、ラン藻、糸状菌、および酵母よりなる群から選択される請求項1に記載の宿主細胞。

10

20

【請求項 3】

細胞が、クロストリジウム (*Clostridium*)、ザイモモナス (*Zymomonas*)、エシェリキア (*Escherichia*)、サルモネラ (*Salmonella*)、ロドコッカス (*Rhodococcus*)、シュードモナス (*Pseudomonas*)、バチルス (*Bacillus*)、乳酸桿菌 (*Lactobacillus*)、腸球菌 (*Enterococcus*)、アルカリゲネス (*Alcaligenes*)、クレブシエラ (*Klebsiella*)、パエニバチルス (*Paenibacillus*)、アルスロバクター (*Arthrobacter*)、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*)、ブレビバクテリウム (*Brevibacterium*)、ピヒア (*Pichia*)、カンジダ (*Candida*)、ハンゼスラ (*Hansenula*)、およびサッカロミセス (*Saccharomyces*) よりなる群から選択される属のメンバーである請求項 2 に記載の宿主細胞。

10

【請求項 4】

細胞が大腸菌 (*Escherichia coli*)、アルカリゲネス・ユートロファス (*Alcaligenes eutrophus*)、バチルス・リチェニホルミス (*Bacillus licheniformis*)、パエニバチルス・マセランス (*Paenibacillus macerans*)、ロドコッカス・エリスロポリス (*Rhodococcus erythropolis*)、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、ラクトバチルス・プランタルム (*Lactobacillus plantarum*)、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、エンテロコッカス・ガリナラム (*Enterococcus gallinarum*)、エンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*)、およびサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) よりなる群から選択される請求項 3 に記載の宿主細胞。

20

【請求項 5】

アセチル CoA アセチルトランスフェラーゼが、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 129、配列番号 131、および配列番号 133 よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載の宿主細胞。

【請求項 6】

3-ヒドロキシブチリル CoA デヒドロゲナーゼが、配列番号 6、配列番号 135、配列番号 137、および配列番号 139 よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載の宿主細胞。

30

【請求項 7】

クロトナーゼが、配列番号 8、配列番号 141、配列番号 143、および配列番号 145 よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載の宿主細胞。

【請求項 8】

ブチリル CoA デヒドロゲナーゼが、配列番号 10、配列番号 147、配列番号 149、配列番号 151、および配列番号 187 よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載の宿主細胞。

40

【請求項 9】

ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼが、配列番号 12、配列番号 153、および配列番号 189 よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載の宿主細胞。

【請求項 10】

ブタノールデヒドロゲナーゼが、配列番号 14、配列番号 16、配列番号 153、配列番号 155、および配列番号 157 よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載の宿主細胞。

【請求項 11】

宿主細胞が通性嫌気性菌である請求項 1 に記載の宿主細胞。

【請求項 12】

50

ブタノールデヒドロゲナーゼ活性を有し、ブチルアルデヒドから1-ブタノールへの変換を触媒するポリペプチドをコードするDNA分子が異種である請求項1に記載の宿主細胞。

【請求項13】

i) 請求項1～12のいずれか1項に記載の組み換え微生物宿主細胞を提供し、そして
ii) 1-ブタノールが生成される条件下で、(i)の宿主細胞と発酵性炭素基質とを接触させる
ことを含んでなる1-ブタノールの生成方法。

【請求項14】

発酵性炭素基質が、単糖類、オリゴ糖類、および多糖類よりなる群から選択される請求項13に記載の方法。

【請求項15】

炭素基質が、グルコース、スクロース、およびフルクトースよりなる群から選択される請求項13に記載の方法。

【請求項16】

1-ブタノールが生成される条件が嫌気性条件である請求項13に記載の方法。

【請求項17】

1-ブタノールが生成される条件が好気的條件である請求項13に記載の方法。

【請求項18】

宿主細胞が最少培地中で炭素基質と接触する請求項13に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【0001】

本出願は、米国特許法第119条に基づく、2005年9月29日に出願された米国仮出願第60/721677号明細書、および2006年6月16日に出願された米国仮出願第60/814470号明細書からの優先権を主張する。

【技術分野】

【0002】

本発明は、工業微生物学分野およびアルコールの生成に関する。より具体的には、組み換え微生物の工業発酵を通じて1-ブタノールが生成される。

【背景技術】

【0003】

ブタノールは重要な工業化学物質であり、燃料添加剤として、プラスチック工業における原材料化学物質として、および食物および香料工業における食物等級抽出剤として有用である。毎年、100～120億ポンドのブタノールが石油化学的手段によって生成され、この汎用化学物質に対する需要は増大すると思われる。

【0004】

オキソ法、レッペ法、およびクロトンアルデヒドの水素付加などの1-ブタノールの化学合成法が知られている（非特許文献1）。これらの方法は、石油化学物質に由来する出発原料を使用し、一般に高価であり環境を損なう。植物由来原料からの1-ブタノール生成は温室効果ガス排出を最小化し、当該技術分野における進歩に相当する。

【0005】

その他の有機化学物質の生体内変換によって1-ブタノール製造する方法もまた、知られている。例えばムラモト（Muramoto）らは特許文献1で、シュードモナス（Pseudomonas）の菌株を使用して、アルデヒドからブタノールをはじめとするアルコールを生成する方法について述べている。さらにクーンレ（Kuehnle）らは特許文献2で、ロドコッカス・ルバー（Rhodococcus ruber）の様々な株による炭化水素の酸化によって、1-ブタノールおよび2-ブタノールを調製する方法について述べている。

【0006】

10

20

30

40

50

発酵によってブタノールを製造する方法もまた知られており、最も普及している方法はアセトン、1-ブタノール、およびエタノールの混合物を生成し、A B E法と称される（ブラチェク（B l a s c h e k）らに付与された特許文献3）。クロストリジウム・アセトブチリカム（C l o s t r i d i u m a c e t o b u t y l i c u m）によるアセトン-ブタノール-エタノール（A B E）発酵は、最古の既知の工業発酵の一つであり、これらの溶剤の生成を担う経路および遺伝子について報告されている（非特許文献2）。しかし実際の発酵はかなり複雑で、制御が困難であった。A B E発酵は1950年代以来継続して衰退し、現在ほとんど全てのブタノールは上述のように石油化学的経路によって生産されている。典型的なA B E発酵では、最初に酪酸、プロピオン酸、乳酸、および酢酸がC．アセトブチリカム（a c e t o b u t y l i c u m）によって生成され、培養pH 10
が下がって代謝「バタフライ」シフトを被り、次に1-ブタノール、アセトン、イソプロパノール、およびエタノールが形成される。従来のA B E発酵では、グルコースからの1-ブタノールの収率は低く、典型的に15%前後で25%を超えることは稀である。したがって従来のA B E発酵中の1-ブタノール濃度は、通常1.3%よりも低い。

【0007】

その他の全ての溶剤副産物の排除によって、A B E法からの1-ブタノール生成を最大化する試みは完全に成功しておらず、したがって方法はガソリン添加剤として有用でない顕著な量のアセトンを生じる。1-ブタノールが唯一の産物であるブタノールの発酵的生産方法は、当該技術分野における進歩に相当する。

【0008】

【特許文献1】特開昭63-017695号公報

【特許文献2】欧州特許第1149918号明細書

【特許文献3】米国特許第6,358,717号明細書

【非特許文献1】「ウルマンの工業化学百科事典（U l l m a n n ' s E n c y c l o p e d i a o f I n d u s t r i a l C h e m i s t r y）」第6版、第5巻、716～719頁、W i l e y - V C H V e r l a g G m b H a n d C o . , W e i n h e i m , G e r m a n y , 2003年

【非特許文献2】ギルバル（G i r b a l）ら、T r e n d s i n B i o t e c h n o l o g y 16:11～16頁、1998年

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

したがって単一産物としての1-ブタノール生成のための、環境的に責任を持てる、対費用効果の高い方法が必要とされている。本発明は、1-ブタノール生合成経路を発現する組み換え微生物生成宿主の発見を通じて、この必要性に対処する。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明は、改変された1-ブタノール生合成経路を有する組み換え微生物を提供する。改変された微生物を1-ブタノールの商業的生成のために使用してもよい。したがって本発明は、

- a) アセチル-CoAからアセトアセチル-CoAへ、
- b) アセトアセチル-CoAから3-ヒドロキシブチリル-CoAへ、
- c) 3-ヒドロキシブチリル-CoAからクロトニル-CoAへ、
- d) クロトニル-CoAからブチリル-CoAへ、
- e) ブチリル-CoAからブチルアルデヒドへ、および
- f) ブチルアルデヒドから1-ブタノールへ

よりなる群から選択される、基質から産物への変換を触媒するポリペプチドをコードする少なくとも1つのDNA分子を含んでなる組み換え微生物宿主細胞を提供し、少なくとも1つのDNA分子は前記微生物宿主細胞に対して異種であり、前記微生物宿主細胞は1-ブタノールを生成する。

10

20

30

40

50

【0011】

別の実施態様では、本発明は、

- i) a) アセチル-CoAからアセトアセチル-CoAへ、
- b) アセトアセチル-CoAから3-ヒドロキシブチリル-CoAへ、
- c) 3-ヒドロキシブチリル-CoAからクロトニル-CoAへ、
- d) クロトニル-CoAからブチリル-CoAへ、
- e) ブチリル-CoAからブチルアルデヒドへ、および
- f) ブチルアルデヒドから1-ブタノールへ

よりなる群から選択される、基質から産物への変換を触媒するポリペプチドをコードして、前記微生物宿主細胞に対して異種である、少なくとも1つのDNA分子を含んでなる組

10

み換え微生物宿主細胞を提供し、そして

ii) 1-ブタノールが生成される条件下で、(i)の宿主細胞と発酵性炭素基質とを接触させる

ことを含んでなる1-ブタノールの生成方法を提供する。

【0012】

配列説明

本願明細書の一部を形成する次の詳細な説明、図、および添付の配列説明によって、本発明をより完全に理解できるであろう。

【0013】

以下の配列は、37 C. F. R. 1. 821~1. 825 (「ヌクレオチド配列および／またはアミノ酸配列開示を含む特許出願の要件—配列規則 (Requirements for Patent Applications Containing Nucleotide Sequences and/or Amino Acid Sequence Disclosures — the Sequence Rules) 」) を満たし、世界知的所有権機関 (WIPO) 標準 ST. 25 (1998年) および EPO および PCT の配列表要件 (規則 5. 2 および 49. 5 (a) の 2)、および実施細則第 208 号 および 附属書 C) に一致する。ヌクレオチドおよびアミノ酸配列データのために使用される記号および型式は、37 C. F. R. § 1. 822 で述べられる規則に従う。

20

【0014】

【表 1】

表 1

遺伝子およびタンパク質配列番号のまとめ

説明	核酸 配列番号	ペプチド 配列番号
クロストリジウム・アセトブチリカム ATCC 824 からの アセチル-CoA アセチルトランスフェラーゼ thIA	1	2
クロストリジウム・アセトブチリカム ATCC 824 からの アセチル-CoA アセチルトランスフェラーゼ thIB	3	4
大腸菌からのアセチル-CoA アセチルトランスフェラーゼ	128	129
枯草菌からのアセチル-CoA アセチルトランスフェラーゼ	130	131
サッカロミセス・セレヴィシエからのアセチル-CoA アセチルトランスフェラーゼ	132	133
クロストリジウム・アセトブチリカム ATCC 824 からの 3-ヒドロキシブチリル-CoA デヒドロゲナーゼ	5	6
枯草菌からの 3-ヒドロキシブチリル-CoA デヒドロゲナーゼ	134	135
ラルストニア・ユートロファからの 3-ヒドロキシブチリル-CoA デヒドロゲナーゼ	136	137

10

20

【0 0 1 5】

【表 2】

アルカリゲネス・ユートロファスからの 3-ヒドロキシブチリル-CoA デヒドロゲナーゼ	138	139
クロストリジウム・アセトブチリカム ATCC 824 からの クロトナーゼ	7	8
大腸菌からのクロトナーゼ	140	141
枯草菌からのクロトナーゼ	142	143
アエロモナス・キャビエからのクロトナーゼ	144	145
クロストリジウム・アセトブチリカム ATCC 824 からの推定 上のトランスエノイル CoA レダクターゼ	9	10
ミドリムシからのブチリル-CoA デヒドロゲナーゼ	146	147
ストレプトミセス・コリヌス からのブチリル-CoA デヒドロゲナーゼ	148	149
ストレプトミセス・コエリカラ ーからのブチリル-CoA デヒドロゲナーゼ	150	151
クロストリジウム・バイジェリンキー NRRL B594 からの ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ	11	12
クロストリジウム・アセトブチリカムからの ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ	152	153
クロストリジウム・アセトブチリカム ATCC 824 からの ブタノールデヒドロゲナーゼ bdhB	13	14
クロストリジウム・アセトブチリカム ATCC 824 からの ブタノールデヒドロゲナーゼ bdhA	15	16
クロストリジウム・アセトブチリカムからの ブタノールデヒドロゲナーゼ	152	153
大腸菌からのブタノールデヒドロゲナーゼ	154	155

【0016】

配列番号 17～44 は、1-ブタノール生合成経路の遺伝子を増幅するのに使用されるオリゴヌクレオチドプライマーのヌクレオチド配列である。

【0017】

配列番号 45～72 は、配列決定のために使用されるオリゴヌクレオチドプライマーのヌクレオチド配列である。

【0018】

配列番号 73～75 は、実施例 9 で述べられる形質転換ベクターを構築するために使用されるオリゴヌクレオチドプライマーのヌクレオチド配列である。

【0019】

配列番号 76 は、ここで C a T E R と称されるコドン最適化 C A C O 4 6 2 遺伝子のヌクレオチド配列である。

【0020】

配列番号 77 は、ここで E g T E R (o p t) と称されるコドン最適化 E g T E R 遺伝子のヌクレオチド配列である。

【0021】

配列番号78は、ここでald(opt)と称されるコドン最適化ald遺伝子のヌクレオチド配列である。

【0022】

配列番号79は、プラスミドpFP988のヌクレオチド配列である。

【0023】

配列番号80～127、160～185、および190～207は、ここで述べられ表4および5でより詳細に述べられる、1-ブタノール生合成経路の遺伝子のクローニング、配列決定、またはスクリーニングのために使用される、クローニング、配列決定、またはPCRスクリーニングプライマーの核酸配列である。

10

【0024】

配列番号156は、cscBKA遺伝子クラスターのヌクレオチド配列である。

【0025】

配列番号157は、スクロースヒドロラーゼ(CsCA)のアミノ酸配列である。

【0026】

配列番号158は、D-フルクトキナーゼ(CsCK)のアミノ酸配列である。

【0027】

配列番号159は、スクロースパーミアーゼ(CsCB)のアミノ酸配列である。

【0028】

配列番号186は、実施例17で述べられるコドン最適化tery遺伝子のヌクレオチド配列である。

20

【0029】

配列番号187は、コドン最適化tery遺伝子(配列番号186)によってコードされるブチルーCoAデヒドロゲナーゼ(ter)のアミノ酸配列である。

【0030】

配列番号188は、実施例17で述べられるコドン最適化aldy遺伝子のヌクレオチド配列である。

【0031】

配列番号189は、コドン最適化aldy遺伝子(配列番号188)によってコードされるブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ(ald)のアミノ酸配列である。

30

【0032】

配列番号208は、実施例14で使用されるテンプレートDNAのヌクレオチド配列である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0033】

本発明は、組み換え微生物を使用した1-ブタノール生成方法に関する。本発明は、いくつかの商業的および工業的ニーズを満たす。ブタノールは多様な用途がある重要な汎用工業化学物質であり、燃料または燃料添加剤としてのその可能性は特に顕著である。四炭素のみのアルコールでありながら、ブタノールはガソリンに類するエネルギー含量を有してあらゆる化石燃料と混合できる。ブタノールを標準内燃エンジン内で燃焼させるとCO₂のみが生じ、SO_xまたはNO_xは微量または全く生じないので、それは燃料または燃料添加剤として好まれている。さらにブタノールは、今までのところ最も好ましい燃料添加剤であるエタノールよりも腐食性が低い。

40

【0034】

生物燃料または燃料添加剤としてのその有用性に加えて、ブタノールは、新興の燃料電池産業における水素流通問題に影響を及ぼす可能性を有する。今日の燃料電池は、水素輸送および流通に関連した安全性への懸念に悩まされている。ブタノールはその水素含量を容易に改善でき、既存の給油所を通じて、燃料電池または車両のいずれかのために必要な純度で流通させることができる。

【0035】

50

最後に本発明は植物由来炭素源からブタノールを生成し、ブタノール生成のための標準石油化学法に関連する環境への悪影響を回避する。

【0036】

次の定義および略語が、特許請求の範囲および明細書の解釈のために使用される。

【0037】

「発明」または「本発明」という用語は、ここでの用法では非限定的用語であり、特定の発明のいかなる単一実施態様を指すことも意図されず、明細書および特許請求の範囲で述べられるような全ての可能な実施態様を包含する。

【0038】

「ABE」は、アセトノーブタノールーエタノール発酵法の略語である。

10

【0039】

「1-ブタノール生合成経路」という用語は、アセチル-補酵素A（アセチル-CoA）から1-ブタノールを生成するための酵素経路を意味する。

【0040】

「アセチル-CoAアセチルトランスフェラーゼ」という用語は、2個のアセチル-CoA分子からアセトアセチル-CoAおよび補酵素A（CoA）への変換を触媒する酵素を指す。より幅広い基質範囲の酵素（E. C. 2. 3. 1. 16）もまた機能できるが、好ましいアセチル-CoAアセチルトランスフェラーゼは、短鎖アシル-CoAおよびアセチル-CoAに対して基質優先傾向がある（順方向反応）アセチル-CoAアセチルトランスフェラーゼであり、E. C. 2. 3. 1. 9と分類される「酵素命名法（Enzyme Nomenclature）、Academic Press, San Diego、1992年、」。アセチル-CoAアセチルトランスフェラーゼは、例えば大腸菌（*Escherichia coli*）（ジェンバンク番号：NP_416728（配列番号129）、NC_000913（配列番号128）；NCBI（国立バイオテクノロジー情報センター（National Center for Biotechnology Information））アミノ酸配列、NCBIヌクレオチド配列）、クロストリジウム・アセトブチリカム（*Clostridium acetobutylicum*）（ジェンバンク番号：NP_349476. 1（配列番号2）、NC_003030（配列番号1）；NP_149242（配列番号4）、NC_001988（配列番号3）、枯草菌（*Bacillus subtilis*）（ジェンバンク番号：NP_390297（配列番号131）、NC_000964（配列番号130））、およびサッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）（ジェンバンク番号：NP_015297（配列番号133）、NC_001148（配列番号132））などのいくつかの供給源から入手できる。

20

30

【0041】

「3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ」という用語は、アセトアセチル-CoAから3-ヒドロキシブチリル-CoAへの変換を触媒する酵素を指す。3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼは還元ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NADH）依存性であってもよく、（S）-3-ヒドロキシブチリル-CoAまたは（R）-3-ヒドロキシブチリル-CoAに対して基質選好性があり、それぞれE. C. 1. 1. 1. 35およびE. C. 1. 1. 1. 30と分類される。さらに3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼは、還元ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸（NADPH）依存性であってもよく、（S）-3-ヒドロキシブチリル-CoAまたは（R）-3-ヒドロキシブチリル-CoAに対して基質選好性があり、それぞれE. C. 1. 1. 1. 157およびE. C. 1. 1. 1. 36と分類される。3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼは、例えばC. アセトブチリカム（*acetobutylicum*）（ジェンバンク番号：NP_349314（配列番号6）、NC_003030（配列番号5））、枯草菌（*B. subtilis*）（ジェンバンク番号：AAB09614（配列番号135）、U29084（配列番号134））、ラルストニア・ユートロファ（*Ralstonia eutropha*）（ジェンバンク番号：YP_2944

40

50

81 (配列番号137)、NC_007347 (配列番号136))、およびアルカリゲネス・ユートロファス (*Alcaligenes eutrophus*) (ジェンバンク番号: AAA21973 (配列番号139)、J04987 (配列番号138)) などのいくつかの供給源から入手できる。

【0042】

「クロトナーゼ」という用語は、3-ヒドロキシブチリル-CoAからクロトニル-CoAおよびH₂Oへの変換を触媒する酵素を指す。クロトナーゼは(S)-3-ヒドロキシブチリル-CoAまたは(R)-3-ヒドロキシブチリル-CoAに対する基質選好性を有してもよく、それぞれE.C. 4.2.1.17およびE.C. 4.2.1.55と分類される。クロトナーゼは、例えば大腸菌 (*E. coli*) (ジェンバンク番号: NP_415911 (配列番号141)、NC_000913 (配列番号140))、C. アセトブチリカム (*acetobutylicum*) (ジェンバンク番号: NP_349318 (配列番号8)、NC_003030 (配列番号7))、枯草菌 (*B. subtilis*) (ジェンバンク番号: CAB13705 (配列番号143)、Z99113 (配列番号142))、およびアエロモナス・キャビエ (*Aeromonas caviae*) (ジェンバンク番号: BAA21816 (配列番号145)、D88825 (配列番号144)) などのいくつかの供給源から入手できる。

【0043】

「ブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ」という用語は、クロトニル-CoAからブチリル-CoAへの変換を触媒する酵素を指す。ブチリル-CoAデヒドロゲナーゼは、NADH依存性またはNADPH依存性のいずれかであってもよく、それぞれE.C. 1.3.1.44およびE.C. 1.3.1.38と分類される。ブチリル-CoAデヒドロゲナーゼは、例えばC. アセトブチリカム (*acetobutylicum*) (ジェンバンク番号: NP_347102 (配列番号10)、NC_003030 (配列番号9))、ミドリムシ (*Euglena gracilis*) (ジェンバンク番号: Q5EU90 (配列番号147)、AY741582 (配列番号146))、ストレプトミセス・コリヌス (*Streptomyces collinus*) (ジェンバンク番号: AAA92890 (配列番号149)、U37135 (配列番号148))、およびストレプトミセス・コエリカラー (*Streptomyces coelicolor*) (ジェンバンク番号: CAA22721 (配列番号151)、AL939127 (配列番号150)) などのいくつかの供給源から入手できる。

【0044】

「ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ」という用語は、補助因子としてNADHまたはNADPHを使用して、ブチリル-CoAからブチルアルデヒドへの変換を触媒する酵素を指す。NADHに対する選好性があるブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼはE.C. 1.2.1.57として知られており、例えばクロストリジウム・バイジェリンキー (*Clostridium beijerinckii*) (ジェンバンク番号: AAD31841 (配列番号12)、AF157306 (配列番号11))、およびC. アセトブチリカム (*acetobutylicum*) (ジェンバンク番号: NP_149325 (配列番号153)、NC_001988 (配列番号152)) から入手できる。

【0045】

「ブタノールデヒドロゲナーゼ」という用語は、補助因子としてNADHまたはNADPHのいずれかを使用して、ブチルアルデヒドから1-ブタノールへの変換を触媒する酵素を指す。ブタノールデヒドロゲナーゼは、例えばC. アセトブチリカム (*acetobutylicum*) (ジェンバンク番号: NP_149325 (配列番号153)、NC_001988 (配列番号152) ; 注記: この酵素はアルデヒドおよびアルコールデヒドロゲナーゼ活性の双方を有する) ; NP_349891 (配列番号14)、NC_003030 (配列番号13) ; およびNP_349892 (配列番号16)、NC_003030 (配列番号15))、および大腸菌 (*E. coli*) (ジェンバンク番号: NP_417484 (配列番号155)、NC_000913 (配列番号154)) から入手できる。

【0046】

「通性嫌気性菌」という用語は、好気性および嫌気性環境の双方において生育できる微生物を指す。

【0047】

「炭素基質」または「発酵性炭素基質」という用語は、本発明の宿主生物によって代謝されることができる炭素源を指し、特に単糖類、オリゴ糖類、多糖類、および一炭素基質またはそれらの混合物よりなる群から選択される炭素源を指す。

【0048】

「遺伝子」という用語は、特定のタンパク質として発現されることができ、場合によりコード配列に先行し（5'非コード配列）および後続する（3'非コード配列）、制御配列を含む核酸断片を指す。「天然遺伝子」とは、それ自体の制御配列と共に天然に見られる遺伝子を指す。「キメラ遺伝子」とは、天然には一緒に見られない調節およびコード配列を含んでなる、天然遺伝子でないあらゆる遺伝子を指す。したがってキメラ遺伝子は、異なる供給源に由来する制御配列およびコード配列を含んでもよく、または同一供給源に由来するが天然に見られるのとは異なる様式に配列された制御配列およびコード配列を含んでなってもよい。「内在性遺伝子」とは、生物のゲノム中のその自然な位置にある天然遺伝子を指す。「外来性」または「異種遺伝子」とは、常態では宿主生物中に見られないが、遺伝子移入により宿主生物中に導入される遺伝子を指す。外来性遺伝子は、非天然生物中に挿入された天然遺伝子、またはキメラ遺伝子を含んでなることができる。「導入遺伝子」とは、形質転換手順によってゲノム中に導入された遺伝子である。

【0049】

ここでの用法では「コード配列」という用語は、特定のアミノ酸配列をコードするDNA配列を指す。「適切な制御配列」とは、コード配列上流（5'非コード配列）、その中、または下流（3'非コード配列）に位置するヌクレオチド配列を指し、それは関連したコード配列の転写、RNAプロセッシングまたは安定性、または翻訳に影響する。制御配列はプロモーター、翻訳リーダー配列、イントロン、ポリアデニル化認識配列、RNAプロセッシング部位、エフェクター結合部位、およびステムループ構造を含んでもよい。

【0050】

「プロモーター」という用語は、コード配列または機能性RNAの発現を制御できるDNA配列を指す。一般にコード配列は、プロモーター配列に対して3'に位置する。プロモーターはその全体が天然遺伝子に由来してもよく、または天然に見られる異なるプロモーターに由来する異なる要素から構成されてもよく、または合成DNAセグメントを含んでなってもよい。当業者は、異なる組織または細胞タイプにおいて、または異なる発生ステップにおいて、または異なる環境的または生理学的条件に応じて、異なるプロモーターが遺伝子の発現を指示してもよいことを理解する。ほとんどの場合にほとんどの細胞タイプで遺伝子の発現を引き起こすプロモーターは、一般に「構成的プロモーター」と称される。ほとんどの場合、制御配列の正確な境界は完全に画定されていないので、異なる長さのDNA断片が同一のプロモーター活性を有してもよいこともさらに認識される。

【0051】

「作動的に結合する」という用語は、一方の機能が他方の機能によって影響される、単一核酸断片上の核酸配列のつながりを指す。例えばプロモーターはコード配列の発現に影響できる（すなわちコード配列がプロモーターの転写調節の下にある）場合、そのコード配列と作動的に結合する。コード配列は、センスまたはアンチセンス方向で制御配列に作動的に結合できる。

【0052】

「発現」という用語は、ここでの用法では、発明の核酸断片から誘導されるセンス(mRNA)またはアンチセンスRNAの転写および安定した蓄積を指す。発現はまた、mRNAのポリペプチドへの翻訳を指してもよい。

【0053】

ここでの用法では「形質転換」とは、遺伝的に安定した遺伝形質をもたらす宿主生物へ

10

20

30

40

50

の核酸断片の転移を指す。形質転換された核酸断片を含有する宿主生物は、「遺伝子導入」または「組み換え」または「形質転換」生物と称される。

【0054】

「プラスミド」、「ベクター」、および「カセット」という用語は、細胞の中央代謝の一部ではない遺伝子を有することが多く、通常環状二本鎖DNA断片の形態である染色体外要素を指す。このような要素は、一本鎖または二本鎖DNAまたはRNAの直鎖または環状の自律的に複製される配列、ゲノム一体化配列、ファージまたはヌクレオチド配列であってもよく、それはその中で適切な3'非翻訳配列と共に、選択された遺伝子産物のためのプロモーター断片およびDNA配列を細胞中に導入することができる独自の構成に、いくつかのヌクレオチド配列が結合または組み換えされるあらゆる供給源に由来する。「形質転換カセット」とは、外来性遺伝子を含有し、外来性遺伝子に加えて特定の宿主細胞の形質転換を容易にする要素を有する特定のベクターを指す。「発現カセット」とは、外来性遺伝子を含有し、外来性遺伝子に加えて外来性宿主におけるその遺伝子の促進された発現を可能にする要素を有する、特定のベクターを指す。

10

【0055】

ここでの用法では「コドン縮重」という用語は、コードされるポリペプチドのアミノ酸配列に影響することなく、ヌクレオチド配列の変更を可能にする遺伝コードにおける性質を指す。当業者は、任意のアミノ酸を特定化するためのヌクレオチドコドンの利用において、特定の宿主細胞によって示される「コドンバイアス」を十分承知している。したがって宿主細胞中での改善された発現のために遺伝子を合成する場合、コドン使用頻度が宿主細胞の好ましいコドン使用頻度に近くなるようように、遺伝子をデザインすることが望ましい。

20

【0056】

「コドン最適化」という用語は、様々な宿主の形質転換のための遺伝子または核酸分子のコーディング領域について言及する場合、DNAによってコードされるポリペプチドを改変することなく、宿主生物体の典型的なコドン使用を反映させる、遺伝子中のコドンまたは核酸分子のコーディング領域の改変を指す。

【0057】

ここで使用される標準リコンビナントDNAおよび分子クローニング技術は当該技術分野で良く知られており、サムブルック (Sambrook), J.、フリッチュ (Fritsch), E. F.、およびマニアティス (Maniatis), T.、「分子クローニング：実験室マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY、1989年 (以下「Maniatis」)；シルハビー (Silhavy), T. J.、ベンナン (Bennan), M. L. およびエンクイスト (Enquist), L. W.、「遺伝子融合実験 (Experiments with Gene Fusions)」、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY、1984年；およびオースベル (Ausubel), F. M. ら、「分子生物学現代プロトコル (Current Protocols in Molecular Biology)」、Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscienceによる出版、1987年、で述べられている。

30

40

【0058】

1-ブタノール生合成経路

炭水化物利用微生物は、中心的代謝経路として、エムデン-マイヤーホフ-パーナス (EMP) 経路、エントナー-ドウドロフ経路、およびペントースリン酸回路を用いて、生育および維持のためのエネルギーおよび細胞前駆物質を提供する。これらの経路は共通して中間体グリセルアルデヒド-3-リン酸を有し、究極的にピルビン酸が直接に、またはEMP経路と組み合わせあって形成される。続いてピルビン酸は、ピルビン酸デヒドロゲナ

50

ーゼ複合体、ピルビン酸ーギ酸リアーゼ、およびピルビン酸ーフェレドキシンオキシドレダクターゼとの反応をはじめとする多様な手段を通じて、アセチルー補酵素A（アセチルーC o A）に転換される。アセチルーC o Aは、例えば脂肪酸、アミノ酸、および二次代謝産物を発生させる上で、重要な中間体の役割を果たす。アセチルーC o Aへの糖変換反応の組み合わせは、エネルギー（例えばアデノシンー5'ー三リン酸、A T P）および還元等価物（例えば還元ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、N A D H、および還元ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリッ酸、N A D P H）を生じる。N A D HおよびN A D P Hはそれらの酸化形態（それぞれN A D⁺およびN A D P⁺）に再生されなくてはならない。無機電子受容体（例えばO₂、N O₃⁻、およびS O₄²⁻）の存在下で還元等価物を使用してエネルギープールを増強してもよく、あるいは還元炭素副産物を形成してもよい。炭水化物の発酵に起因するエタノールおよび1ーブタノール生成は、後者の例である。

10

【0059】

本発明は、図1に示すようにアセチルーC o Aから1ーブタノールへの完全な1ーブタノール生合成経路を提供することで、組み換え微生物によって炭水化物源から1ーブタノールが生成できるようにする。遺伝子の不在または適切な遺伝子制御の欠如のために、一般に微生物群生中に欠如しているこの生合成経路は、以下の基質から産物への変換を含んでなる。

- a) 例えばアセチルーC o Aアセチルトランスフェラーゼによって触媒されるようなアセチルーC o AからアセトアセチルーC o Aへ、
- b) 例えば3ーヒドロキシブチリルーC o Aデヒドロゲナーゼによって触媒されるようなアセトアセチルーC o Aから3ーヒドロキシブチリルーC o Aへ、
- c) 例えばクロトナーゼによって触媒されるような3ーヒドロキシブチリルーC o AからクロトニルーC o Aへ、
- d) 例えばブチリルーC o Aデヒドロゲナーゼによって触媒されるようなクロトニルーC o AからブチリルーC o Aへ、
- e) 例えばブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼによって触媒されるようなブチリルーC o Aからブチルアルデヒドへ、および
- f) 例えばブタノールデヒドロゲナーゼによって触媒されるようなブチルアルデヒドから1ーブタノールへの変換。

20

30

【0060】

経路はA T Pを必要とせずN A D⁺および／またはN A D P⁺を発生させるので、アセチルーC o Aを発生させる中央代謝経路と釣り合う。天然生物が発酵によって1ーブタノールを生成する能力は稀であり、最も顕著にはクロストリジウム・バイジェリンキー（*Clostridium beijerinckii*）およびクロストリジウム・アセトブチリカム（*Clostridium acetobutylicum*）によって例証される。クロストリジウム・アセトブチリカム（*Clostridium acetobutylicum*）の遺伝子構成および遺伝子制御については述べられている（L. ギルバル（Girbal）およびP. スーカイ（Soucaille）、*Trends in Biotechnology*、216：11～16頁、1998年）。しかしこれらの酵素活性の多くは、例えば炭化水素利用、脂肪酸酸化、およびポリヒドロキシアルカノート代謝などの代案の経路とも結びついている。したがってアセチルーC o Aから1ーブタノールへの組み換え経路を提供する上で、個々の反応ステップを満たすいくつかの選択があり、当業者は公的に入手可能な配列を利用して、関連する経路を構築できるであろう。当該技術分野で知られており、1ーブタノール生合成経路の構築において有用である、代表的ないくつかの遺伝子の一覧を下の表2に列挙する。

40

【0061】

【表 3】

表 2

1-ブタノール経路遺伝子の供給源

遺伝子	ジェンバンク引用
アセチル-CoA アセチルトランス フェラーゼ	NC_000913 大腸菌 K12、完全なゲノム gi 49175990 ref NC_000913.2 [49175990]
	NC_001988 クロストリジウム・アセトブチリカム ATCC 824 プラスミド pSOL1、完全な配列 gi 15004705 ref NC_001988.2 [15004705]
	NC_000964 枯草菌亜種サブティリス (subtilis) 168 株、 完全なゲノム gi 50812173 ref NC_000964.2 [50812173]
	NC_001148 サッカロミセス・セレヴィシエ染色体 XVI、 完全な染色体配列 gi 50593503 ref NC_001148.3 [50593503]
	CP000017 化膿連鎖球菌 (Streptococcus pyogenes) MGAS5005、完全なゲノム gi 71852596 gb CP000017.1 [71852596]
	NC_005773 インゲンマメかさ枯れ病菌 (Pseudomonas syringae pv. phaseolicola) 1448A、完全なゲノム gi 71733195 ref NC_005773.3 [71733195]
	CR931997 コリネバクテリウム・ジェイケイウム (Corynebacterium jeikeium) K411 完全なゲノム gi 68262661 emb CR931997.1 [68262661]
3-ヒドロキシブチリル- CoA デヒドロゲナーゼ	NC_003030 クロストリジウム・アセトブチリカム ATCC 824、完全なゲノム gi 15893298 ref NC_003030.1 [15893298]
	U29084 枯草菌 (mmgA)、(mmgB)、(mmgC)、および クエン酸シンターゼ III (mmgD) 遺伝子、 完全な cds、および (mmgE) 遺伝子、部分的 cds gi 881603 gb U29084.1 BSU29084[881603]

10

20

30

40

【0062】

【表 4】

	NC_007347 ラルストニア・ユートロファ JMP134 Raeut01_1、全ゲノムショットガン配列 gi 45517296 ref NZ_AADY01000001.1 [45517296]	
	J04987 A.ユートロファス (eutrophus) β -ケトチオラーゼ (phbA) およびアセトアセチル-CoA レダクターゼ (phbB) 遺伝子、完全な cds gi 141953 gb J04987.1 AFAKTLAACA[141953]	10
	NC_004129 蛍光菌 (Pseudomonas fluorescens) Pf-5、 完全なゲノム gi 70728250 ref NC_004129.6 [70728250]	
	NC_000913 大腸菌 K12、完全なゲノム gi 49175990 ref NC_000913.2 [49175990]	
	NC_004557 破傷風菌 (Clostridium tetani) E88、完全なゲノム gi 28209834 ref NC_004557.1 [28209834]	20
	NC_006350 バークホルデリア・シュードマレイ (Burkholderia pseudomallei) K96243 染色体 1、完全な配列 gi 53717639 ref NC_006350.1 [53717639]	
	NC_002947 シュードモナス・プチダ (Pseudomonas putida) KT2440、完全なゲノム gi 26986745 ref NC_002947.3 [26986745]	
クロトナーゼ	NC_000913 大腸菌 K12、完全なゲノム gi 49175990 ref NC_000913.2 [49175990]	30
	NC_003030 クロストリジウム・アセトブチリカム ATCC 824、完全なゲノム gi 15893298 ref NC_003030.1 [15893298]	
	Z99113 枯草菌完全なゲノム (セクション 21 中の 10) : 1807106~2014934 gi 32468758 emb Z99113.2 BSUB0010[32468758]	

【表 5】

	D88825 PHA シンターゼのためのアエロモナス・キャビエ phaC 遺伝子、完全な cds gi 2335048 dbj D88825.1 [2335048]	
	NC_006274 バチルス・セレウス (Bacillus cereus) ZK、 完全なゲノム gi 52140164 ref NC_006274.1 [52140164]	10
	NC_004557 破傷風菌 E88、完全なゲノム gi 28209834 ref NC_004557.1 [28209834]	
ブチリル-CoA デヒドロゲナーゼ	NC_003030 クロストリジウム・アセトブチリカム ATCC 824、完全なゲノム gi 15893298 ref NC_003030.1 [15893298]	
	AY741582 ミドリムシ trans-2-エノイル-CoA レダクターゼ mRNA、完全な cds gi 58201539 gb AY741582.1 [58201539]	20
	U37135 スレプトミセス・コリヌス クロトニル-CoA レダクターゼ (ccr) 遺伝子、完全な cds gi 1046370 gb U37135.1 SCU37135[1046370]	
	AL939127 スレプトミセス・コエリカラ A3(2) 完全なゲノム; セグメント 24/29 gi 24429552 emb AL939127.1 SCO939127[24429552]	
	AP006716 スタフィロкокカス・パラヘモリティカス (Staphylococcus haemolyticus) JCSC1435、完全なゲノム gi 68445725 dbj AP006716.1 [68445725]	30
	NC_006274 バチルス・セレウス ZK、完全なゲノム gi 52140164 ref NC_006274.1 [52140164]	
	NC_004557 破傷風菌 E88、完全なゲノム gi 28209834 ref NC_004557.1 [28209834]	

【 0 0 6 4 】

【表 6】

ブチルアルデヒド デヒドロゲナーゼ	AF157306クロストリジウム・バイジェリンキー NRRL B593株 仮説的タンパク質、補酵素Aアシル化アルデヒドデヒドロ ゲナーゼ(ald)、アセト酢酸:酪酸/酢酸補酵素Aトランス フェラーゼ(ctfA)、アセト酢酸:酪酸/酢酸補酵素Aトランス フェラーゼ(ctfB)、およびアセト酢酸デカルボキシラーゼ(adc) 遺伝子、完全なcds gi 47422980 gb AF157306.2 [47422980]	10
	NC_001988クロストリジウム・アセトブチリカム ATCC 824プラスミドpSOL1、完全な配列 gi 15004705 ref NC_001988.2 [15004705]	
	AY251646クロストリジウム・サッカロペルブチルアセトニカム (Clostridium saccharoperbutylacetonicum) solオペロン、 完全な配列 gi 31075382 gb AY251646.1 [31075382]	20
ブタノールデヒドロ ゲナーゼ	NC_001988クロストリジウム・アセトブチリカム ATCC 824プラスミドpSOL1、完全な配列 gi 15004705 ref NC_001988.2 [15004705]	
	NC_003030クロストリジウム・アセトブチリカム ATCC 824、完全なゲノム gi 15893298 ref NC_003030.1 [15893298]	
	NC_000913大腸菌K12、完全なゲノム gi 49175990 ref NC_000913.2 [49175990]	30
	NC_003198サルモネラ・エンテリカ(Salmonella enterica) 亜種エンテリカ(enterica)血清型Typhi CT18株、完全なゲノム gi 16758993 ref NC_003198.1 [16758993]	
	BX571966 バークホルデリア・シュードマレイ K96243 株、 染色体 2、完全な配列 gi 52211453 emb BX571966.1 [52211453]	
	Z99120枯草菌完全なゲノム(セクション21中の17): 3213330~3414388 gi 32468813 emb Z99120.2 BSUB0017[32468813]	40
	NC_003366クロストリジウム・ペルFRINGENS (Clostridium perfringens) 13株、完全なゲノム gi 18308982 ref NC_003366.1 [18308982]	
	NC_004431大腸菌CFT073、完全なゲノム gi 26245917 ref NC_004431.1 [26245917]	

1-ブタノール生成のための微生物宿主

1-ブタノール生成のための微生物宿主は、細菌、ラン藻、糸状菌類、および酵母から選択されてもよい。1-ブタノール生成のために使用される微生物宿主は、ブタノール毒性によって収率が制限されないように、好ましくは1-ブタノールに耐性である。1-ブタノールの高力価レベルで代謝的に活性の微生物については、当該技術分野であまり知られていない。溶剤起源クロストリジウム (*Clostridia*) からブタノール耐性突然変異体が単離されているが、その他の潜在的に有用な細菌株のブタノール耐性に関する情報はほとんどない。細菌におけるアルコール耐性の比較に関する研究のほとんどは、ブタノールがエタノールよりも毒性が高いことを示唆する(デ・カバルホ (de Cavalho) ら、*Microsc. Res. Tech.* 64: 215~22頁、2004年; およびカベリッツ (Kabelitz) ら、*FEMS Microbiol. Lett.* 220: 223~227頁、2003年)。トーマス (Thomas) ら、*J. Bacteriol.* 186: 2006~2018頁、2004年、はクロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) 中での発酵におけるブタノールの収率が、ブタノール毒性によって制限されるかもしれないことを報告する。クロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) に対するブタノールの主要効果は、膜機能の破壊である(ヘルマン (Hermann) ら、*Appl. Environ. Microbiol.* 50: 1238~1243頁、1985年)。

10

【0066】

20

1-ブタノール生成について選択される微生物宿主は好ましくは1-ブタノールに対して耐性であり、炭水化物を1-ブタノールに転換できる。適切な微生物宿主選択のための判定基準としては、以下が挙げられる。1-ブタノールに対する内因的耐性、高率のグルコース使用、遺伝子操作のための遺伝的ツールの利用可能性、および安定した染色体の改変を発生させる能力。

【0067】

1-ブタノールに対して耐性の適切な宿主株は、株の内因的耐性に基づいたスクリーニングによって同定してもよい。1-ブタノールに対する微生物の内因的耐性は、最少培地中で生育させた際に、生育速度の50%阻害 (IC50) を引き起こす1-ブタノールの濃度を判定することで測定してもよい。IC50値は、当該技術分野で既知の方法を使用して判定してもよい。例えば様々な量の1-ブタノールの存在下で対象とする微生物を生育させ、600ナノメートルにおける光学濃度を測定することで生育速度をモニターしてもよい。生育曲線の対数部分から倍加時間を計算して、生育速度の尺度として使用してもよい。生育の50%阻害を生じる1-ブタノールの濃度は、1-ブタノール濃度に対する%生育阻害のグラフから判定してもよい。好ましくは宿主株は、1-ブタノールに対して約0.5%重量/容積を超えるIC50を有するべきである。

30

【0068】

1-ブタノール生成のための微生物宿主はまた、グルコースも高率で利用する。ほとんどの微生物は炭水化物を利用できる。しかし特定の環境的微生物は炭水化物を高い効率で利用できないので、適切な宿主ではない。

40

【0069】

宿主を遺伝的に改変する能力は、あらゆる組み換え微生物の生成に必須である。遺伝子移入技術の様式は、電気穿孔、接合、形質導入または自然形質転換であってもよい。広範な宿主接合性プラスミドおよび薬剤抵抗性マーカーが利用できる。クローニングベクターは、宿主中で機能できる抗生物質抵抗性マーカーの性質に基づいて、宿主生物に合わせて調整される。

【0070】

微生物宿主はまた、炭素流動について競合する経路を不活性化するために、様々な遺伝子を削除することで操作されなくてはならない。これは、不活性化を指示するトランスポゾンまたは染色体組み込みベクターのいずれかを利用可能であることが必要である。さら

50

に内因的 1-ブタノール耐性を改善する突然変異が得られるように、生成宿主は化学的突然変異誘発を容易に受け入るべきである。

【0071】

上述の判定基準に基づいて、1-ブタノール生成のための適切な微生物宿主としては、限定されるものではないが、クロストリジウム (*Clostridium*)、ザイモモナス (*Zymomonas*)、エシェリキア (*Escherichia*)、サルモネラ (*Salmonella*)、ロドコッカス (*Rhodococcus*)、シュードモナス (*Pseudomonas*)、バチルス (*Bacillus*)、乳酸桿菌 (*Lactobacillus*)、腸球菌 (*Enterococcus*)、アルカリゲネス (*Alcaligenes*)、クレブシエラ (*Klebsiella*)、パエニバチルス (*Paenibacillus*)、アルスロバクター (*Arthrobacter*)、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*)、ブレビバクテリウム (*Brevibacterium*)、ピヒア (*Pichia*)、カンジダ (*Candida*)、ハンゼヌラ (*Hansenula*)、およびサッカロミセス (*Saccharomyces*) 属のメンバーが挙げられる。好ましい宿主としては、大腸菌 (*Escherichia coli*)、アルカリゲネス・ユートロファス (*Alcaligenes eutrophus*)、バチルス・リチェニホルミス (*Bacillus licheniformis*)、パエニバチルス・マセランス (*Paenibacillus macerans*)、ロドコッカス・エリスロポリス (*Rhodococcus erythropolis*)、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*)、ラクトバチルス・プランタルム (*Lactobacillus plantarum*)、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、エンテロコッカス・ガリナラム (*Enterococcus gallinarum*)、エンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、およびサッカロミセス・セレヴィシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) が挙げられる。

【0072】

生成宿主の構築

発酵性炭素基質から 1-ブタノールへの変換のための酵素的経路をコードする必要な遺伝子を含む組み換え生物は、当該技術分野でよく知られている技術を使用して構築してもよい。本発明では、1-ブタノール生合成経路の酵素、すなわちアセチル-CoA アセチルトランスフェラーゼ、3-ヒドロキシブチリル-CoA デヒドロゲナーゼ、クロトナーゼ、ブチリル-CoA デヒドロゲナーゼ、ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ、およびブタノールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子は、上述のように様々な供給源から単離してもよい。

【0073】

細菌ゲノムから所望の遺伝子を得る方法は、分子生物学技術分野で一般的であり、よく知られている。例えば遺伝子配列が既知であれば、制限エンドヌクレアーゼ消化によって適切なゲノムのライブラリーを作り出し、所望の遺伝子配列に相補的なプローブでスクリーニングしてもよい。ひとたび配列が単離されると、ポリメラーゼ連鎖反応などの標準プライマー誘導増幅方法 (マリス (*Mullis*)、米国特許第 4,683,202 号明細書) を使用して DNA を増幅し、適切なベクターを使用した形質転換に適した量の DNA を得てもよい。異種の宿主中での発現のためのコドン最適化ツールは、容易に入手できる。コドン最適化のためのいくつかのツールは、宿主生物の GC 含量に基づいて利用できる。いくつかの例示的な微生物宿主の GC 含量を表 3 に示す。

【0074】

【表 7】

表 3
微生物宿主の GC 含量

株	%GC
B.リチェニホルミス	46
枯草菌	42
C.アセトブチリカム	37
大腸菌	50
P.プチダ	61
A.ユートロファス	61
パエニバチルス・マセランス	51
ロドコッカス・エリスロポリス	62
ブレビバチルス (Brevibacillus)	50
パエニバチルス・ポリミキサ (Paenibacillus polymyxa)	50

【0075】

ひとたび関連する経路遺伝子を同定および単離したら、それらを当該技術分野でよく知られている手段によって適切な発現宿主に形質転換してもよい。多様な宿主細胞の形質転換に有用なベクターまたはカセットは一般的であり、ウィスコンシン州マディソンのエピセンター (EPI CENTRE (登録商標) (Madison, WI))、カリフォルニア州カールスバッドのインビトロジェン・コーポレーション (Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA))、カリフォルニア州ラホヤのストラタジーン (Stratagene (La Jolla, CA))、およびマサチューセッツ州ベヴァリーのニュー・イングランド・バイオラプス・インコーポレーテッド (New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA)) などの会社から市販される。典型的にベクターまたはカセットは、関連遺伝子の転写および翻訳を指示する配列、選択可能なマーカー、および自己複製または染色体組み込みを可能にする配列を含有する。適切なベクターは、転写開始制御を内部に有する遺伝子の 5' 領域、および転写終結を制御する DNA 断片の 3' 領域を含んでなる。どちらの制御領域も形質転換宿主細胞に相同的な遺伝子に由来してもよいが、このような制御領域はまた、生成宿主として選択された特定の種に天然でない遺伝子に由来してもよいものと理解される。

【0076】

所望の宿主細胞において関連する経路コード領域の発現を駆動するのに有用な開始制御領域またはプロモーターは多数あり、当業者にはなじみが深い。限定されるものではないが、CYC1、HIS3、GAL1、GAL10、ADH1、PGK、PHO5、GAPDH、ADC1、TRP1、URA3、LEU2、ENO、TPI、CUP1、FBA、GPD、およびGPM (サッカロミセス (Saccharomyces) 中での発現に有用)；AOX1 (ピヒア (Pichia) 中での発現に有用)；およびlac、ara、tet、trp、lP_L、lP_R、T7、tac、およびtrc (大腸菌 (Escherichia coli)、アルカリゲネス (Alcaligenes)、およびシュードモナス (Pseudomonas) 中での発現に有用)；amy、apr、nprプロモーターおよび様々なファージプロモーター (枯草菌 (Bacillus subtilis)、バチルス・リチェニホルミス (Bacillus licheniformis)、およびパエニバチルス・マセランス (Paenibacillus macerans

）中での発現に有用）；*nisA*（グラム陽性細菌での発現に有用、アイヘンバウム（*Eichenbaum*）ら、*Appl. Environ. Microbiol.* 64（8）：2763～2769頁、1998年）；および合成P11プロモーター（ラクトバチルス・プランタルム（*Lactobacillus plantarum*）中での発現に有用、ラッド（*Rud*）ら、*Microbiology*, 152：1011～1019頁、2006年）をはじめとする、これらの遺伝的要素を駆動できるあらゆるプロモーターが事実上、本発明に適する。

【0077】

終結制御領域は、好ましい宿主に天然である様々な遺伝子に由来してもよい。場合により終結部位は不必要であってもよいが、含まれれば最も好ましい。

10

【0078】

特定のベクターは広範な宿主細菌中で複製することができ、接合によって転移できる。*pRK404*、および3つの関連ベクター*pRK437*、*pRK442*、および*pRK442*（H）の完全な注釈付き配列が入手できる。これらの誘導体は、グラム陰性細菌中の遺伝的操作のための有益なツールであることが証明されている（スコット（*Scott*）ら、*Plasmid* 50（1）：74～79頁、2003年）。広宿主範囲Inc P4プラスミドRSF1010のいくつかのプラスミド誘導体もまた、グラム陰性細菌中で機能できるプロモーターと共に入手できる。プラスミド*pAYC36*および*pAYC37*は、複数クローニング部位と共に活性プロモーターを有し、グラム陰性細菌中での異種遺伝子の発現を可能にする。

20

【0079】

染色体の遺伝子置換ツールもまた、広く入手できる。例えば広宿主範囲レプリコン*pWV101*の熱感受性変異型が改変されてプラスミド*pVE6002*が構築されており、これは一連のグラム陽性細菌中に遺伝子置換を作り出すのに使用できる（モーガン（*Maguin*）ら、*J. Bacteriol.* 174（17）：5633～5638頁、1992年）。さらに生体外トランスポゾームを利用して、エピセンター（EPICENTRE）（登録商標）などの商業的供給源からの多様なゲノム中にランダム突然変異を作り出せる。

【0080】

様々な好ましい微生物宿主中での1-ブタノール生合成経路の発現については、下でより詳細に述べる。

30

【0081】

大腸菌（*E. coli*）中の1-ブタノール生合成経路の発現

大腸菌（*E. coli*）の形質転換に有用なベクターまたはカセットは一般的であり、上に列挙した会社から市販される。例えば実施例11で述べられるように、1-ブタノール生合成経路の遺伝子を様々なクロストリジウム（*Clostridium*）株から単離して、改変*pUC19*ベクター中にクローニングし、大腸菌（*E. coli*）NM522に形質転換してもよい。いくつかのその他の大腸菌（*E. coli*）株中での1-ブタノール生合成経路の発現については、実施例13で述べられる。

【0082】

ロドコッカス・エリスロポリス（*Rhodococcus erythropolis*）中での1-ブタノール生合成経路の発現

40

*pRhBR17*および*pDA71*をはじめとするがこれに限定されるものではない、一連の大腸菌（*E. coli*）-ロドコッカス（*Rhodococcus*）シャトルベクターが、*R. エリスロポリス*（*erythropolis*）中での発現のために利用できる（コスチカ（*Kostichka*）ら、*Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62：61～68頁、2003年）。さらに*R. エリスロポリス*（*erythropolis*）中での異種の遺伝子発現のために、一連のプロモーターが利用できる（例えばナカシマ（*Nakashima*）ら、*Appl. Envir. Microbiol.* 70：5557～5568頁、2004年；およびタオ（*Tao*）ら、*Appl. Mi*

50

c r o b i o l . B i o t e c h n o l . 2 0 0 5 年、D O I 1 0 . 1 0 0 7 / s 0 0 2 5 3 - 0 0 5 - 0 0 6 4 を参照されたい)。タオ (T a o) ら (前出) およびブランズ (B r a n s) ら、A p p l . E n v i r . M i c r o b i o l . 6 6 : 2 0 2 9 ~ 2 0 3 6、2 0 0 0 年、で述べられる方法を使用して、R . エリスロポリス (e r y t h r o p o l i s) 中の染色体遺伝子の標的を定めた遺伝子破壊を作り出してもよい。

【0083】

上述のように1-ブタノール生成に必要な異種の遺伝子は、最初にpDA71またはpRhBR71中でクローニングして、大腸菌 (E . c o l i) に形質転換してもよい。次にコスチカ (K o s t i c h k a) ら (前出) が述べるように、ベクターを電気穿孔によってR . エリスロポリス (e r y t h r o p o l i s) に形質転換してもよい。組換え体はグルコースを含有する合成培地中で生育させてもよく、当該技術分野で既知の方法を使用した1-ブタノール生成がそれに続く。

10

【0084】

枯草菌 (B a c i l l u s s u b t i l i s) 中での1-ブタノール生合成経路の発現

枯草菌 (B . s u b t i l i s) 中での遺伝子発現および突然変異作成の方法もまた、当該技術分野でよく知られている。例えば実施例12で述べられるように、1-ブタノール生合成経路の遺伝子を様々なクロストリジウム (C l o s t r i d i u m) 株から単離し、改変pUC19ベクター中にクローニングして枯草菌 (B a c i l l u s s u b t i l i s) BE1010に形質転換してもよい。さらに実施例14で述べられるように、1-生合成経路の6つの遺伝子を発現のために2つのオペロンに分割できる。経路の最初の3つの遺伝子 (t h l、h b d、およびc r t) を枯草菌 (B a c i l l u s s u b t i l i s) BE1010の染色体に組み込む (ペイン (P a y n e) およびジャクソン (J a c k s o n)、J . B a c t e r i o l . 1 7 3 : 2 2 7 8 ~ 2 2 8 2 頁、1 9 9 1 年)。最後の3つの遺伝子 (E g T E R、a l d、およびb d h B) は発現プラスミド中にクローニングされて、組み込まれた1-ブタノール遺伝子を保有するバチルス (B a c i l l u s) 株に形質転換される。

20

【0085】

バチルス・リチェニホルミス (B a c i l l u s l i c h e n i f o r m i s) における1-ブタノール生合成経路の発現

プロトプラスト形質転換または電気穿孔のどちらかによって、B . リチェニホルミス (l i c h e n i f o r m i s) を形質転換するのに、枯草菌 (B . s u b t i l i s) 中で複製されるプラスミドおよびシャトルベクターのほとんどが使用できる。例えば1-ブタノール生成に必要な遺伝子をプラスミドpBE20またはpBE60誘導体中でクローニングしてもよい (ナガラジャン (N a g a r a j a n) ら、G e n e 1 1 4 : 1 2 1 ~ 1 2 6 頁、1 9 9 2 年)。B . リチェニホルミス (l i c h e n i f o r m i s) を形質転換する方法は当該技術分野で知られている (例えばフレミング (F l e m i n g) ら、A p p l . E n v i r o n . M i c r o b i o l .、6 1 (11) : 3 7 7 5 ~ 3 7 8 0 頁、1 9 9 5 年、を参照されたい)。枯草菌 (B . s u b t i l i s) 中での発現のために構築されたプラスミドは、B . リチェニホルミス (l i c h e n i f o r m i s) に形質転換されて、1-ブタノールを生成する組み換え微生物宿主を生じる。

30

40

【0086】

パエニバチルス・マセランス (P a e n i b a c i l l u s m a c e r a n s) 中での1-ブタノール生合成経路の発現

上述のように枯草菌 (B . s u b t i l i s) 中での発現のためにプラスミドを構築し、プロトプラスト形質転換によってパエニバチルス・マセランス (P a e n i b a c i l l u s m a c e r a n s) に形質転換し、1-ブタノールを生成する組み換え微生物宿主を生成してもよい。

【0087】

アルカリゲネス・ユートロファス (A l c a l i g e n e s e u t r o p h u s) (ラルストニア・ユートロファス (R a l s t o n i a e u t r o p h u s)) 中での1-

50

ブタノール生合成経路の発現

ラルストニア・ユートロファス (*Ralstonia eutrophus*) 中での遺伝子発現および突然変異発生の方法は、当該技術分野で知られている（例えばタガビ (Taghavi) ら、Appl. Environ. Microbiol.、60 (10) : 3585~3591頁、1994年、を参照されたい)。1-ブタノール生合成経路のための遺伝子を上述の広宿主範囲ベクターのいずれかの中でクローニングし、電気穿孔して1-ブタノールを生成する組換え体を発現させてもよい。ラルストニア (*Ralstonia*) 中のポリヒドロキシブチレート経路については詳細に記述され、ラルストニア・ユートロファス (*Ralstonia eutrophus*) ゲノムを改変する多様な遺伝子工学技術が知られており、1-ブタノール生合成経路を操作するためにこれらのツールが応用できる。

10

【0088】

シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) 中での1-ブタノール生合成経路の発現

シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) 中での遺伝子発現のための方法は、当該技術分野で知られている（例えば参照によって本明細書に援用するベン-バサット (Ben-Bassat) らに付与された米国特許第6,586,229号明細書を参照されたい）。例えばブタノール経路遺伝子をpPCU18中に挿入してもよく、このライゲーションしたDNAをエレクトロコンピテントなシュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) DOT-T1C5aAR1細胞中に電気穿孔して、1-ブタノールを生じる組換え体を発現させてもよい。

20

【0089】

サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 中での1-ブタノール生合成経路の発現

サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 中での遺伝子発現のための方法は、当該技術分野で知られている（例えばクリスティン・ガスリー (Christine Guthrie) およびジェラルドR. フィンク (Gerald R. Fink) 編、「酵素学における方法 (Methods in Enzymology)」、第194巻、「酵母の遺伝学と分子および細胞生物学ガイド (Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology)」 (パートA)、Elsevier Academic Press、San Diego, CA) 2004年、を参照されたい)。酵母中での遺伝子発現は、典型的にプロモーターとそれに続く対象とする遺伝子、および転写ターミネーターを必要とする。1-ブタノール生合成経路をコードする遺伝子のための発現カセットを構築する上で、構成的プロモーターFBA、GPD、およびGPM、および誘導性プロモーターGAL1、GAL10、およびCUP1をはじめとするが、これに限定されるものではない、いくつかの酵母プロモーターを使用できる。適切な転写ターミネーターとしては、限定されるものではないが、FBAt、GPDt、GPMt、ERG10t、およびGAL1tが挙げられる。1-ブタノール生合成経路の適切なプロモーター、転写ターミネーター、および遺伝子は、実施例17で述べられるように酵母2ミクロン (2μ) プラスミド中にクローニングしてもよい。

30

40

【0090】

ラクトバチルス・プランタルム (*Lactobacillus plantarum*) 中での1-ブタノール生合成経路の発現

乳酸桿菌 (*Lactobacillus*) 属は乳酸杆菌科に属し、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) および連鎖球菌 (*Streptococcus*) の形質転換で使用される多くのプラスミドおよびベクターは、乳酸桿菌 (*Lactobacillus*) のために使用してもよい。適切なベクターの非限定的例としては、pAMβ1およびその誘導体 (ルノー (Renault) ら、Gene 183:175~182頁、1996年、およびオサリバン (O'Sullivan) ら、Gene 137:227~2

50

31、1993年) ; pMBB1およびpHW800、pMBB1誘導体(ワイコフ(Wyckoff)ら、Appl. Environ. Microbiol. 62:1481~1486頁、1996年) ; pMG1、接合性プラスミド(タニモト(Tanimoto)ら、J. Bacteriol. 184:5800~5804頁、2002年) ; pNZ9520(クレールベゼム(Kleerebezem)ら、Appl. Environ. Microbiol. 63:4581~4584頁、1997年) ; pAM401(フジモト(Fujimoto)ら、Appl. Environ. Microbiol. 67:1262~1267頁、2001年) ; およびpAT392(アーサー(Arthur)ら、Antimicrob. Agents Chemother. 38:1899~1903頁、1994年) が挙げられる。ラクトバチルス・プランタルム(*Lactobacillus plantarum*) からのいくつかのプラスミドもまた報告されている(例えばバンクラネンブルクR(van Kranenburg R)、ゴーリックN(Golic N)、ボンジャースR(Bongers R)、レールRJ(Leer RJ)、デボスWM(de Vos WM)、シーゼンRJ(Siezen RJ)、クレールベゼムM(Kleerebezem M)、Appl. Environ. Microbiol. ; 71(3):1223~1230頁、2005年3月)。例えばラクトバチルス・プランタルム(*Lactobacillus plantarum*) 中での1-ブタノール生合成経路の発現については、実施例18で述べられる。

10

【0091】

エンテロコッカス・フェシウム(*Enterococcus faecium*)、エンテロコッカス・ガリナラム(*Enterococcus gallinarum*)、およびエンテロコッカス・フェカーリス(*Enterococcus faecalis*) 中における1-ブタノール生合成経路の発現

20

腸球菌(*Enterococcus*) 属は乳酸菌科(*Lactobacillales*) に属し、乳酸桿菌(*Lactobacillus*)、枯草菌(*Bacillus subtilis*)、および連鎖球菌(*Streptococcus*) の形質転換において使用される多くのプラスミドおよびベクターが、腸球菌(*Enterococcus*) のために使用できる。適切なベクターの非限定的例としては、pAM β 1およびその誘導体(ルノー(Renault)ら、Gene 183:175~182頁、1996年、およびオサリバン(O'Sullivan)ら、Gene 137:227~231、1993年) ; pMBB1およびpHW800、pMBB1誘導体(ワイコフ(Wyckoff)ら、Appl. Environ. Microbiol. 62:1481~1486頁、1996年) ; pMG1、接合性プラスミド(タニモト(Tanimoto)ら、J. Bacteriol. 184:5800~5804頁、2002年) ; pNZ9520(クレールベゼム(Kleerebezem)ら、Appl. Environ. Microbiol. 63:4581~4584頁、1997年) ; pAM401(フジモト(Fujimoto)ら、Appl. Environ. Microbiol. 67:1262~1267頁、2001年) ; およびpAT392(アーサー(Arthur)ら、Antimicrob. Agents Chemother. 38:1899~1903頁、1994年) が挙げられる。ラクトコッカス(*Lactococcus*) からのnisA遺伝子を使用したE. フェカーリス(*faecalis*) のための発現ベクターもまた使用してもよい(アイヘンバウム(Eichenbaum)ら、Appl. Environ. Microbiol. 64:2763~2769頁、1998年。さらにE. フェシウム(*faecium*) 染色体中での遺伝子置換のためのベクターを使用してもよい(ナラパレディ(Nallapareddy)ら、Appl. Environ. Microbiol. 72:334~345頁、2006年)。例えばエンテロコッカス・フェカーリス(*Enterococcus faecalis*) 中での1-ブタノール生合成経路の発現については、実施例19で述べられる。

30

40

【0092】

発酵培地

50

本発明における発酵培地は、適切な炭素基質を含有しなくてはならない。適切な基質としては、限定されるものではないが、グルコースおよびフルクトースなどの単糖類、乳糖またはスクロースなどのオリゴ糖類、デンプンまたはセルロースなどの多糖類、またはそれらの混合物、および乳清透過液、コーンステープリーカー、甜菜モラセス、および大麦の麦芽などの再生可能原材料からの未精製混合物が挙げられる。さらに炭素基質は、重要な生化学的中間体への代謝転換が実証されている二酸化炭素、またはメタノールなどの一炭素基質であってもよい。メチロトロフ生物体はまた、一または二炭素基質に加えて、代謝活性のためにメチルアミン、グルコサミン、および多様なアミノ酸などのいくつかのその他の炭素含有化合物を利用することが知られている。例えばメチロトロフ酵母菌は、メチルアミンからの炭素を利用してトレハロースまたはグリセロールを形成することが知られている（マレル, J. コリン (Murrell, J. Collin)、ケリー, ドン P. (Kelly, Don P.) 編、第7回国際シンポジウム、ベリオン (Bellion) ら、「C1化合物上における微生物の生育 (Microb. Growth C1 Compd.)」、415～32頁、1993年、Interceptによる出版、Andover, UK)。同様に様々なカンジダ (Candida) 種がアラニンまたはオレイン酸を代謝する（サルター (Sulter) ら、Arch. Microbiol. 153: 485～489頁、1990年）。したがって本発明で用いられる炭素源は多種多様な炭素含有基質を包含してもよく、生物体の選択によってのみ制限されることが考察される。

10

【0093】

20

前述の全ての炭素基質およびそれらの混合物は、本発明で適切であることが考察されるが、好ましい炭素基質はグルコース、フルクトース、およびスクロースである。

【0094】

適切な炭素源に加えて、発酵培地は、適切な無機物、塩、補助因子、緩衝液、および培養物の生育と1-ブタノール生成に必要な酵素的経路の促進に適した、当業者に既知のその他の構成成分を含有しなくてはならない。

【0095】

培養条件

典型的に細胞は、約25℃～約40℃の範囲の温度で適切な培地中で生育させる。本発明における適切な増殖培地は、ルリア・ベルターニ (LB) ブロス、サブローデキストロース (SD) ブロスまたは酵母培地 (YM) ブロスなどの一般的で商業的に調製された培地である。その他の合成 (defined) または合成 (synthetic) 増殖培地もまた使用してもよく、特定の微生物生育に適した培地は、微生物学または発酵科学当業者に知られている。例えば環式アデノシン2':3'-リン酸などの、異化産物抑制を直接または間接的に調節することが知られている作用物質の使用もまた、発酵培地中に組み込んでよい。

30

【0096】

発酵に適したpH範囲はpH5.0～pH9.0の間であり、pH6.0～pH8.0が初期条件として好ましい。

【0097】

40

発酵は好気性または嫌気性条件下で実施してもよく、嫌気性または微好気条件が好ましい。

【0098】

発酵培地中に生成する1-ブタノールの量は、例えば高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) またはガスクロマトグラフィー (GC) などの当該技術分野で知られているいくつかの方法を使用して判定できる。

【0099】

工業的バッチおよび連続発酵

本方法はバッチ発酵法を用いる。古典的なバッチ発酵は閉鎖システムであり、そこでは培養液の組成が発酵の最初に設定され、発酵プロセス中に人為的变化を受けない。したが

50

って発酵プロセス開始時に培養液に所望の生物体または生物体群を接種して、システムには何も添加せずに発酵を生じさせる。しかし典型的には「バッチ」発酵は、炭素源の添加に関してバッチであり、pHおよび酸素濃度などの因子の調節が試みられることが多い。バッチシステムでは、システムの代謝産物およびバイオマス組成は、発酵を停止させる時点まで常に変化する。バッチ培養内で細胞は、静的な遅滞期から高い対数増殖期へ、そして最後に成長率が減退または停止する静止期へ調節される。処置を施さない場合、静止期にある細胞はやがて死滅する。一般に対数期にある細胞が、最終生成物または中間体の生成の大部分を担う。

【0100】

標準バッチシステムのバリエーションが、流加バッチシステムである。流加バッチ発酵プロセスも本発明において適切であり、発酵の進行と共に基質がステップ的に添加されること以外は、典型的なバッチシステムを含んでなる。流加バッチシステムは、異化代謝産物抑制が細胞の代謝を阻害する傾向があって、培地中に限定量の基質を有することが望ましい場合に有用である。流加バッチシステム中の実際の基質濃度の測定は困難であるので、pH、溶存酸素、およびCO₂などの排ガス分圧などの測定可能因子の変化に基づいて推定される。バッチおよび流加バッチ発酵は当該技術分野で一般的で周知であり、実例は参照によってここに援用するトマスD. ブロック (Thomas D. Brock)、バイオテクノロジー：工業微生物学テキスト (Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology)、第2版、Sinauer Associates, Inc.、Sunderland, MA. 1989年、またはデシュパンデ、ムカンドV (Deshpande, Mukund V.)、Appl. Biochem. Biotechnol.、36: 227頁、1992年、にある。

【0101】

本発明はバッチ様式で実施されるが、方法は連続発酵法に適応できることが考察される。連続発酵は開放系であり、合成発酵培地がバイオリアクターに連続的に添加されて、同時に処理のために当量の熟成培地が除去される。連続発酵は、一般に細胞が主として対数生育期にある一定の高密度に培養物を維持する。

【0102】

連続発酵は、細胞生育または最終産物濃度に影響する1つの要因またはいくつかの要因を調節できるようにする。例えば一方法は炭素源または窒素などの制限的栄養物質のレベルを定率に維持して、その他の全パラメーターを加減できるようにする。その他のシステムでは、培地濁度によって測定される細胞濃度を一定に保ちながら、生育に影響するいくつかの要素を連続的に改変できる。連続システムは定常状態生育条件を維持することを目指すので、培地が抜き取られることによる細胞損失は、発酵中の細胞生育速度に対して均衡を保たなくてはならない。連続発酵法のために栄養素および成長因子を調節する方法、ならびに生成物形成速度を最大化する技術については工業微生物学の技術分野でよく知られており、多様な方法が前出のブロック (Brock) で詳述されている。

【0103】

バッチ、流加または連続法のいずれを使用して本発明を実施してもよく、あらゆる既知の発酵様式が適切であることが考察される。さらにホールセル触媒として基質上に細胞を固定化し、1-ブタノール生成のための発酵条件に置いてよいことが考察される。

【0104】

発酵培地からの1-ブタノール単離法

生物生産された1-ブタノールは、当該技術分野で知られている方法を使用して、発酵培地から単離してもよい。例えば遠心分離、濾過、デカンテーションなどによって、固形物を発酵培地から除去してもよい。次に蒸留、液体-液体抽出、または膜ベースの分離などの方法を使用して、上述のように固形物を除去するように処理された発酵培地から1-ブタノールを単離してもよい。1-ブタノールは水と低沸点の共沸混合物を形成するので、蒸留は、混合物がその共沸性組成物になるまで分離するためにのみ使用できる。蒸留を

別の分離方法と組み合わせて使用して、共沸混合物周辺での分離を得てもよい。1-ブタノールを単離し精製するために蒸留と組み合わせて使用してもよい方法としては、限定されるものではないが、デカンテーション、液体-液体抽出、吸着、および膜ベースの技術が挙げられる。さらに1-ブタノールは、共留剤を使用した共沸蒸留を使用して単離してもよい（例えばドハーティ（Doherty）およびマロン（Malone）、「蒸留システムの概念設計（Conceptual Design of Distillation Systems）」、McGraw Hill、New York、2001年、を参照されたい）。

【0105】

1-ブタノール-水混合物は不均一共沸混合物を形成するので、デカンテーションと組み合わせた蒸留を使用して、1-ブタノールを単離し精製してもよい。この方法では、1-ブタノール含有発酵ブ罗斯を共沸組成物近くまで蒸留する。次に共沸性混合物を濃縮し、デカンテーションによって1-ブタノールを発酵培地から分離する。デカントされた水相を還流として第1の蒸留カラムに戻してもよい。第2の蒸留カラム中での蒸留によって、1-ブタノールに富む有機相をさらに精製してもよい。

10

【0106】

1-ブタノールはまた、蒸留と組み合わせた液体-液体抽出を使用して発酵培地から単離してもよい。この方法では、適切な溶剤での液体-液体抽出を使用して、1-ブタノールが発酵ブ罗斯から抽出される。次に1-ブタノール含有有機相を蒸留して、1-ブタノールを溶剤から分離する。

20

【0107】

発酵培地から1-ブタノールを単離するために、吸着と組み合わせた蒸留もまた使用してよい。この方法では、1-ブタノール含有発酵ブ罗斯を共沸組成物近くに蒸留し、次に分子ふるいなどの吸着材の使用によって残留水を除去する（アデン（Aden）ら、「トウモロコシまぐさのための並流希釈酸前加水分解および酵素的加水分解を使用したリグノセルロース生物由来資源からのエタノール加工設計および経済学（Lignocellulosic Biomass to Ethanol Process Design and Economics Utilizing Co-Current Dilute Acid Prehydrolysis and Enzymatic Hydrolysis for Corn Stover）」、NREL報告/TP-510-32438、国立再生可能エネルギー研究所（National Renewable Energy Laboratory）、2002年6月）。

30

【0108】

さらに浸透気化法と組み合わせた蒸留を使用して、発酵培地から1-ブタノールを単離、精製してもよい。この方法では、1-ブタノール含有発酵ブ罗斯を共沸性組成物近くまで蒸留し、次に親水性膜を通じた浸透気化法によって水を除去する（グオ（Guo）ら、J. Membr. Sci. 245、199～210頁、2004年）。

【実施例】

【0109】

続く実施例で本発明をさらに定義する。これらの実施例は、本発明の好ましい実施態様を示しながら、あくまで例示のために提供されるものとする。上の考察およびこれらの実施例から、当業者は本発明の必須の特徴を見極められ、その趣旨と範囲を逸脱することなく、様々な用途および条件に適合するように本発明の様々な変更および修正ができる。

40

【0110】

一般法

実施例で使用される標準リコンビナントDNAおよび分子クローニング技術は当該技術分野で良く知られており、サンプブルック（Sambrook）、J.、フリッチュ（Fritsch）、E. F.、およびマニアティス（Maniatis）、T.、「分子クローニング：実験室マニュアル（Molecular Cloning: A Laboratory Manual）」、Cold Spring Harbor Laborat

50

ory Press、Cold Spring Harbor、1989年、(マニアティス (Maniatis)) ; および T. J. シルハビー (Silhavy)、M. L. ベンナン (Bennan)、および L. W. エンクイスト (Enquist)、「遺伝子融合実験 (Experiments with Gene Fusions)」、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor, N. Y.、1984年; および オースベル (Ausubel)、F. M. ら、「分子生物学現代プロトコル (Current Protocols in Molecular Biology)」、Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience による出版、1987年、で述べられている。

10

【0111】

細菌培養の維持および生育に適した材料および方法は、当該技術分野で良く知られている。以下の実施例で使用するのに適した技術については、次で述べられる。フィリップ・デアハルト (Phillipp Gerhardt)、R. G. E. マレー (R. G. E. Murray)、ラルフ N. コスティロウ (Ralph N. Costilow)、ユーージーン W. ネスター (Eugene W. Nester)、ウィリス A. ウッド (Willis A. Wood)、ノエル R. クリーグ (Noel R. Krieg)、および G. ブリッグス・フィリップス (G. Briggs Phillips) 編、「一般微生物学方法マニュアル (Manual of Methods for General Bacteriology)」、米国微生物学会、Washington, D. C.、1994年、または トーマス D. ブロック (Thomas D. Brock)、「バイオテクノロジー：工業微生物学テキストブック (Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology)」、第2版、Sinauer Associates, Inc. : Sunderland, MA、1989年。細菌細胞の生育および維持のために使用される全ての試薬および材料は、特に断りのない限り ウィスコンシン州ミルウォーキーのアルドリッチ・ケミカルズ (Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI))、メリーランド州スパークスの BD ダイアグノスティックス・システムズ (BD Diagnostics Systems (Sparks, MD))、メリーランド州ロックビルの ライフ・テクノロジーズ (Life Technologies (Rockville, MD))、または ミズーリ州セントルイスの シグマ・ケミカル (Sigma Chemical Company (St. Louis, MO)) から得た。

20

30

【0112】

以下の実施例においてクローニングのために使用されるオリゴヌクレオチドプライマーを表4に示す。クローニングされた遺伝子の配列決定またはスクリーニングのために使用されるプライマーを表5に示す。全てのオリゴヌクレオチドプライマーは、テキサス州ウッドランドのシグマ・ジェノシス (Sigma-Genosys (Woodlands, TX)) によって合成された。

【0113】

【表 8】

表 4
オリゴヌクレオチドクローニングプライマー

遺伝子	プライマー 名称	配列	配列 番号	説明
crt	N3	CACCATGGAACTAAACAAT GTCATCCTTG	17	crt フォワード
crt	N4	CCTCCTATCTATTTTTGAA GCCTTC	18	crt リバース
hbd	N5	CACCATGAAAAAGGTATGT GTTATAGGT	19	hbd フォワード
hbd	N6	CATTTGATAATGGGGATTC TTGT	20	hbd リバース
thlA	N7	CACCATGAAAGAAGTTGTA ATAGCTAGTGC	21	thlA フォワード
thlA	N8	CTAGCACTTTTCTAGCAAT ATTGCTG	22	thlA リバース
bdhA	N9	CACCATGCTAAGTTTTGAT TATTCAATAC	23	bdhA フォワード

10

20

【 0 1 1 4 】

【表 9】

bdhA	N10	TTAATAAGATTTTTTAAATA TCTCA	24	bdhA リバース
bdhB	N11	CACCATGGTTGATTTTCGAA TATTCAATACC	25	bdhB フォワード
bdhB	N12	TTACACAGATTTTTTTGAATA TTTGT	26	bdhB リバース
thlB	N15	CACCATGAGAGATGTAGTA ATAGTAAGTGCTG	27	thlB フォワード
thlB	N16	CCGCAATTGTATCCATATT GAACC	28	thlB リバース
CAC0462	N17	CACCATGATAGTAAAAGCA AAGTTTG	29	CAC0462 フォワード
CAC0462	N21	GCTTAAAGCTTAAAACCGC TTCTGGCG	30	CAC0462 リバース
ald	N27F1	CACCATGAATAAAGACACA CTAATACC	31	ald フォワード
ald	N28R1	GCCAGACCATCTTTGAAAA TGCGC	32	ald リバース
thlA	N44	CATGCATGCAAAGGAGGTT AGTAGAATGAAAGAAG	33	thlA フォワード
thlA	N45	GTCCTGCAGGGCGCGCCC AATACTTTCTAGCACTTTTC	34	thlA リバース
hbd	N42	CATGTCGACAAAGGAGGT CTGTTTAATGAAAAAGGTA TG	35	hbd フォワード
hbd	N43	GTCGCATGCCTTGTAACCT TATTTTGAA	36	hbd リバース
CAC0462	N68	CATAGATCTGGATCCAAAG GAGGGTGAGGAAATGATA GTAAAAG	37	CAC0462 フォワード
CAC0462	N69	CATGTCGACGTGCAGCCTT TTTAAGGTTCT	38	CAC0462 リバース
crt	N38	CATGAATTCACGCGTAAAG GAGGTATTAGTCATGGAAC	39	crt フォワード
crt	N39	GTCGGATCCCTTACCTCCT ATCTATTTTTG	40	crt リバース
ald	N58	CATGCCCCGGGGGTACCA AAGGAGGAATAGTTCATGA ATAAA	41	ald フォワード

10

20

30

40

【表 10】

ald	N59	CATGGTTAACAAGAAGTTA GCCGGCAAGTACA	42	ald リバース
bdhB	N64	CATGGTTAACAAAGGAGG GGTTAAAATGGTTGATTTT GAAT	43	bdhB フォワード
bdhB	N65	CATGGCATGCGTTTAAAC GTAGGTTTACACAGATTTT	44	bdhB リバース
-	BenF	ACTTCTTTTCGCCTGTTTC AC	73	-
-	BenMAR	CATGAAGCTTGGCGCGCC GGGACGCGTTTTTGAAAAT AATGAAAAC	74	-
-	BenBPR	CATGAAGCTTGTTTAACT CGGTGACCTTGAAAATAAT GAAAACCTATATTGTTTG AAAATAATGAAAACCTATA TTG	75	-
EgTER (opt)	N85	CATAGATCTGGATCCAAAG GAGGGTGAGGAAATGGCG ATGTTTACG	80	Egter フォワード
EgTER (opt)	N86	GTCGACTTACTGCTGGGC GG	81	Egter リバース
Ptrc-ald (opt)	T-Ptrc (BspEI)	TTCCGTA CTTCGGACGA CTGCACGGTGACCAATG CTTCTG	87	Ptrc フォワード
Ptrc-ald (opt)	B-aldopt (ScaI)	CGGATCTTAAGTACTTTAA CCCGCCAGCACAGCGG CGCTGG	88	ald リバース
ald	AF BamHI	CATTGGATCCATGAATAAA GACACACTAATACCTACAA C	93	ald フォワード
ald	AR Aat2	CATGACGTCACTAGTGTTA ACAAGAAGTTAGCCGGCA AG	94	ald リバース
EgTER	フォワード 1(E)	CATGTTAACAAAGGAGGA AAGATCTATGGCGATGTTT ACGACCACCGCAA	95	EgTER SOE フォワード

【表 1 1】

EgTER	ボトム リバース I (E)	CCCCTCCTTTGGCGCGCC TTACTGCTGGGCGGCGCT CGGCAGA	96	EgTER SOE リバース
bdh	トップ フォワード 2(B)	GCCCAGCAGTAAGGCGCG CCAAAGGAGGGGTAAAAAT GGTTGATTTCGAAT	97	bdh SOE フォワード
bdh	リバース 2(B)	GTCGACGTCATACTAGTTT ACACAGATTTTTTGAATATT TGT	98	bdh SOE リバース
-	Pamy/ lacO F	CATTGTACAGAATTCGAGC TCTCGAGGCCCGCACAT ACGAAAAGAC	99	Pamy フォワード
-	Pamy/ lacO R	CATTGTACAGTTTAAACAT AGGTCACCCTCATTTTCGT AGGAATTGTTATCC	100	Pamy リバース
-	Spac F	CATCTCGAGTAATTCTACA CAGCCCAGTCC	101	Pspac フォワード
-	Spac R	CATGTTTAAACGGTGACCC AAGCTGGGGATCCGCGG	102	Pspac リバース
thl	トップ TF	CATTGGTCACCATTCCCG GGCATGCAAAGGAGGTTA GTAGAATG	103	thl SOE フォワード
thl	Bot TR	CCTTTACGCGACCGGTAC TAGTCAAGTCGACAGGGC GCGCCCAATACTTTC	104	thl SOE リバース
crt	トップ CF	CGCGCCCTGTCTGACTTGA CTAGTACCGGTCGCGTAA AGGAGGTATTAGTCATGG AAC	105	crt SOE フォワード
crt	Bot CR	CATCGTTTAACTTGGATC CAGATCCCTTACCTCCTAT	106	crt SOE リバース
ERG10-E RG10t	OT731	AAAGCTGGAGCTCCACCG CGGTGGCGGCCGCTCTAG AAGTTTTCAAAGCAGAGTT TCGTTTGAATATTTTACCA	164	ERG10- ERG10t フォワード
ERG10-E RG10t	OT732	TTCAATATGCATGCCTCAG AACGTTTACATTGTATCGA CTGCCAGAACCC	165	ERG10- ERG10t リバース

【表 1 2】

GAL1-GA L10	OT733	GCAGTCGATACAATGTAAA CGTTCTGAGGCATGCATAT TGAATTTTCAAAAATTCTTA CTTTTTTTTTTGATGGACG CA	166	GAL1-GAL10 フォワード
GAL1-GA L10	OT734	ACCTGCACCTATAACACAT ACCTTTTCCATGGTAGTTT TTTCTCCTTGACGTTAAAG TATAGAGGTATATTA	167	GAL1-GAL10 リバース
hbd	OT735	AAAAACTACCATGGAAAAG GTATGTGTTATAGGTGCAG GTACTATGGGTTTCAGGAAT TGC	168	hbd フォワード
hbd	OT736	GTAAAAAAAAGAAGGCCG TATAGGCCTTATTTTGAAT AATCGTAGAAACCTTTTCC TGATTTTCTTCCAAG	169	hbd リバース
GAL1t	OT737	ACGATTATTCAAAATAAGG CCTATACGGCCTTCTTTTT TTTACTTTGTTCAAGACAA CTTCTCATTTTTTTCTACTC ATAA	170	GAL1t フォワード
GAL1t	OT738	GAATTGGGTACCGGGCCC CCCCTCGAGGTGCACCGA TGCCTCATAAACTTCGGTA GTTATATTACTCTGAGAT	171	GAL1t リバース
thIA	OT797	AAAGTAAGAATTTTTGAAA ATTCAATATGCATGCAAGA AGTTGTAATAGCTAGTGCA GTAAGAAC	172	thIA フォワード
thIA	OT798	GAAAAAGATCATGAGAAAA TCGCAGAACGTAAGGCGC GCCTCAGCACTTTTCTAGC AATATTGCTGTTCCCTTG	173	thIA リバース
CUP1	OT806	CTCGAAAATAGGGCGCGC CCCCATTACCGACATTTGG GCGC	174	CUP1 フォワード
CUP1	OT807	ACTGCACTAGCTATTACAA CTTCTTGATGCGTGATGA TTGATTGATTGATTGTA	175	CUP1 リバース

【表 1 3】

GPD プロモーター	OT808	TCGGTAATGGGGGCGCGC CCTATTTTCGAGGACCTTG TCACCTTGA	176	GPD プロモーター フォワード
GPD プロモーター	OT809	TTTCGAATAAACACACATA AACAAACACCCCATGGAA AAGGTATGTGTTATAGGTG CAGG	177	GPD プロモーター リバース
FBA1 プロモーター	OT799	TACCGGGCCCCCCTCGA GGTCGACGGCGCGCCACT GGTAGAGAGCGACTTTGT ATGCCCCA	178	FBA1 プロモーター フォワード
FBA1 プロモーター	OT761	CTTGGCCTTCACTAGCATG CTGAATATGTATTACTTGG TTATGGTTATATATGACAA AAG	179	FBA1 プロモーター リバース
GPM1 プロモーター	OT803	CCCTCACTAAAGGGAACA AAAGCTGGAGCTCGATAT CGGCGCGCCACATGCAG TGATGCACGCGCGA	180	GPM1 プロモーター フォワード
GPM1 プロモーター	OT804	AAGGATGACATTGTTTAGT TCCATGGTTGTAATATGTG TGTTTGTTTGG	181	GPM1 プロモーター リバース
crt	OT785	CACACATATTACAACCATG GAACATAACAATGTCATCC TTGAAAAGGAAGG	182	Crt フォワード
crt	OT786	ATCATTCATTGGCCATTCA GGCCTTATCTATTTTGGAA GCCTTCAATTTTCTTTTCT CTATG	183	Crt リバース
GPM1t ターミネーター	OT787	CAAAAATAGATAAGGCCTG AATGGCCAATGAATGATTT GATGATTTCTTTTCCCTC CATTTTTC	184	GPM1t ターミネーター フォワード
GPM1t ターミネーター	OT805	GAATTGGGTACCGGGCCC CCCCTCGAGGTCGACTTAT AGTATTATATTTTCTGATTT GGTTATAGCAAGCAGCGTT T	185	GPM1t ターミネーター リバース

10

20

30

40

【表 1 4】

GPD プロモーター	OT800	GGGAACAAAAGCTGGAGC TCCACCGCGGTGGGGCG CGCCCTATTTTCGAGGAC CTTGTCACCTTGAGCC	190	GPD プロモーター フォワード
GPD プロモーター	OT758	TTAAGGTATCTTTATCCAT GGTGTTTGTTTATGTGTGT TTATTCGAAACT	191	GPD プロモーター リバース
GPD ターミネーター	OT754	TTGGGTACCGGGCCCCC CTCGAGGTCGACTGGCCA TTAATCTTTCCCATAT	192	GPD ターミネーター フォワード
GPD ターミネーター	OT755	TGTGTCCTAGCAGGTTAG GGCCTGCAGGGCCGTGAA TTTACTTTAAATCTTG	193	GPD ターミネーター リバース
FBA1 プロモーター	OT760	CGAAAATAGGGCGCGCCA CTGGTAGAGAGCGACTTT GTATGCCCCAATTG	194	FBA1 プロモーター フォワード
FBA1 プロモーター	OT792	CCCTTGACGAACTTGGCC TTCCTAGCATGCTGAATA TGTATTACTTGTTATGGT TATATATGACAAAAG	195	FBA1 プロモーター リバース
FBA1 ターミネーター	OT791	CCCTTGACGAACTTGGCC TTCCTAGCATGCTGAATA TGTATTACTTGTTATGGT TATATATGACAAAAG	196	FBA1 ターミネーター フォワード
FBA1 ターミネーター	OT765	GGAACAAAAGCTGGAGCT CCACCGCGGTGGTTTAAC GTATAGACTTCTAATATAT TTCTCCATACTTGGTATT	197	FBA1 ターミネーター リバース
ldhL	LDH EcoRV F	GACGTCATGACCACCCGC CGATCCCTTTT	198	ldhL フォワード
ldhL	LDH AatII R	GATATCCAACACCAGCGA CCGACGTATTAC	199	ldhL リバース
Cm	CmF	ATTTAAATCTCGAGTAGAG GATCCCAACAAACGAAAAT TGGATAAAG	200	Cm フォワード
Cm	CmR	ACGCGTTATTATAAAAGCC AGTCATTAGG	201	Cm リバース
P11	P11 F	TCGAGAGCGCTATAGTTG TTGACAGAATGGACATACT ATGATATATTGTTGCTATA GCGCCC	202	P11 プロモーター フォワード

【表 1 5】

P11	P11 R	GGGCGCTATAGCAACAAT ATATCATAGTATGTCCATT CTGTCAACAACCTATAGCGC TC	203	P11 プロモーター リバース
PldhL	PldhL F	GAGCTCGTCGACAAACCA ACATTATGACGTGTCTGGG C	204	ldhL プロモーター フォワード
PldhL	PldhL R	GGATCCTACCATGTTTGTG CAAATAAGTG	205	ldhL プロモーター リバース
PnisA	F-PnisA (EcoRV)	TTCAGTGATATCGACATAC TTGAATGACCTAGTC	206	PnisA フォワード
PnisA	R-PnisA (PmeI BamHI)	TTGATTAGTTTAACTGTA GGATCCTTTGAGTGCCTCC TTATAATTTA	207	PnisA リバース

10

20

【 0 1 2 1 】

【表 1 6】

表 5

配列決定および PCR スクリーニングプライマー

名称	配列	遺伝子特異的	配列番号
M13 フォワード	GTAAAACGACGGCCAGT	TOPO ベクター	45
M13 リバース	AACAGCTATGACCATG	TOPO ベクター	46
N7SeqF1	GCAGGAGATGCTGACGTAATAA	thIA	47
N7SeqR1	CCAACCTGCTTTTTCAATAGCTGC	thIA	48
N15SeqF1	CAGAGATGGGGTCAAAGAATG	thIB	49
N16SeqR1	GTGGTTTTATTCCGAGAGCG	thIB	50
N5SeqF2	GGTCTATACTTAGAATCTCC	hbd	51
N6SeqR2	CGGAACAGTTGACCTTAATATGGC	hbd	52
N22SeqF1	GCCTCATCTGGGTTTGGTCTTG	CAC0426	53
N22SeqF2	CGCCTAGGAGAAAGGACTATAAAA CTGG	CAC0426	54
N22SeqF3	CAGAGTTATAGGTGGTAGAGCC	CAC0426	55
N23SeqR1	CCATCCCGCTGTTCTATTCTTCT	CAC0426	56

30

40

【 0 1 2 2 】

【表 17】

N23SeqR2	CCAATCCTCTCCACCCATTACC	CAC0426	57
N23SeqR3	CGTCCATCCTTAATCTTCCC	CAC0426	58
N31SeqF2	CCAACATGGAATCCCTAGATGC	ald	59
N31SeqF3	GCATAGTCTGCGAAGTAAATGC	ald	60
N31SeqF4	GGATCTACTGGTGAAGGCATAACC	ald	61
N32SeqR1	GTTAGCCGCAAGTACACATC	ald	72
N32SeqR2	GGCATCATGAGTTCTGTCATGAC	ald	62
N32SeqR3	GCCTTCAATGATACTCTTACCAGCC	ald	63
N32SeqR4	GCATTTCCAGCAGCTATCATGC	ald	64
N32SeqR5	CCTTCCCATATGTGTTTCTTCC	ald	65
N11SeqF1	GTTGAAGTAGTACTAGCTATAG	bdhB	66
N11SeqF2	GACATAACACACGGCGTAGGGC	bdhB	67
N12SeqR1	TAAGTGTACACTCCAATTAGTG	bdhB	68
N12SeqR2	GCCATCTAACACAATATCCCATGG	bdhB	69
N9SeqF1	GCGATACATGGGACATGGTTAAAG	bdhA	70
N10SeqR1	TGCACTTAACTCGTGTTCCATA	bdhA	71
T7 プライマー	TAATACGACTCACTATAGGG	pET23 ベクター	82
Trc99aF	TTGACAATTAATCATCCGGC	p Trc99a ベクター	83
N5SeqF4	GGTCAACTGTTCCGGAAATTC	hbd	84
T-ald (BamHI)	TGATCTGGATCCAAGAAGGAGCCC TTCACCATGAATAAAGACACAC	ald	85
B-ald (EgTER)	CATCGCCATTTCTCACCCTCCTTT TTAGCCGGCAAGTACACATCTTCT TTGTC	ald	86
N3SeqF1	CCATCATACCATACTGACCC	crt	107
N3SeqF2	GCTACTGGAGCATTGCTCAC	crt	108
N3SeqF3	CCATTAACAGCTGCTATTACAGGC	crt	109
N4SeqR3	GGTCTCGGAATAACACCTGG	crt	110
N5SeqF3	CAAGCTTCATAACAGGAGCTGG	hbd	111
N7SeqR2	ATCCCACAATCCGTCAGTGATC	thIA	112
N31SeqF1	CTGAGATAAGAAAGGCCGCA	ald	113
N62SeqF2	CAACCCTGGGCGTGTTTCTG	EgTER	114
N62SeqF3	GTGGCGAAGATTGGGAACCTG	EgTER	115
N62SeqF4	GGGAAATGGCAGAAGATGTTTCAGC	EgTER	116
N63SeqR1	CGGTCTGATAACCTGCAAAATCGC	EgTER	117
N63SeqR2	CACCAGCGCTTTGGCAACAAC	EgTER	118
N63SeqR3	GAACGTGCATACAGACCTGCTTC	EgTER	119

10

20

30

40

【表 18】

N63SeqR4	CGGCTGAATAACTTTTGCGG	EgTER	120
Pamy SeqF2	GCCTTTGATGACTGATGATTTGGC	pFP988 ベクター	121
Pamy SeqF	TCTCCGGTAAACATTACGGCAAAC	pFP988 ベクター	122
Pamy SeqR	CGGTCAGATGCAATTCGACATGTG	pFP988 ベクター	123
SpacF Seq	GAAGTGGTCAAGACCTCACT	Pspac プロモーター	124
sacB Up	CGGGTTTGTACTGATAAAGCAGG	sacB	125
sacB Dn	CGGTTAGCCATTTGCCTGCTTTTA	sacB	126
HTR	ACAAAGATCTCCATGGACGCGT	pHT01 ベクター	127
Scr1	CCTTTCTTTGTGAATCGG	csc	160
Scr2	AGAAACAGGGTGTGATCC	csc	161
Scr3	AGTGATCATCACCTGTTGCC	csc	162
Scr4	AGCACGGCGAGAGTCGACGG	csc	163

10

【0124】

20

培養液中の1-ブタノール濃度を判定する方法

培養液中の1-ブタノール濃度は、当該技術分野で知られているいくつかの方法によって判定できる。例えば特定の高性能液体クロマトグラフィー（HPLC）法では、どちらもマサチューセッツ州ミルフォードのウォーターズ、コーポレーション（Waters Corporation (Milford, MA)）から購入される、ショウデックス（Shodex）SH-Gガードカラム付きショウデックス（Shodex）SH-1011カラムと共に、屈折率（RI）検出を利用した。クロマトグラフィーの分離は、流速0.5 mL/分の移動相として0.01 M H₂SO₄を使用してカラム温度50℃で達成した。1-ブタノールは使用した条件下で52.8分間の滞留時間を有した。あるいは、ガスクロマトグラフィー（GC）方法が利用できる。例えば特定のGC法では、デラウェア州ウィルミントンのアジレント・テクノロジーズ（Agilent Technologies (Wilmington, DE)）からのHP-イノワックス（INNOWax）カラム（内径30 m×0.53 mm、フィルム厚1 μm）と共に水素炎イオン化検出器（FID）を利用した。キャリアガスは、一定の上部圧力下、150℃における測定で流速4.5 mL/分のヘリウムであり、注入器スプリットは200℃で1:25であり、オープン温度は45℃で1分間、10℃/分で45から220℃、および220℃で5分間であり、FID検出を26 mL/分のヘリウム補給ガスと共に240℃で用いた。1-ブタノールの滞留時間は5.4分間であった。カリフォルニア州パロアルトのバリアン・インコーポレーテッド（Varian, Inc. (Palo Alto, CA)）からのバリアン（Varian）CP-WAX 58（FFAP）CBカラム（内径25 m×0.25 m×フィルム厚0.2 μm）を使用した同様のGC法もまた使用した。

30

40

【0125】

略語の意味は次のとおり。「s」は秒を意味し、「min」は分を意味し、「h」は時間を意味し、「psi」は平方インチあたりポンドを意味し、「nm」はナノメートルを意味し、「d」は日を意味し、「μL」はマイクロリットルを意味し、「mL」はミリリットルを意味し、「L」はリットルを意味し、「mm」はミリメートルを意味し、「nm」はナノメートルを意味し、「mM」はミリモル濃度を意味し、「M」はモル濃度を意味し、「mmol」はミリモルを意味し、「μmole」はマイクロモルを意味し、「g」はグラムを意味し、「μg」はマイクログラムを意味し、「ng」はナノグラムを意味し、「PCR」はポリメラーゼ連鎖反応を意味し、「OD」は光学濃度を意味し、「OD₆

50

「OD₅₅₀」は波長600nmで測定される光学濃度を意味し、「OD₅₅₀」は、波長550nmで測定される光学濃度を意味し、「kDa」はキロダルトンを意味し、「g」は、重力定数を意味し、「rpm」は毎分回転数を意味し、「bp」は塩基対を意味し、「kbp」はキロ塩基対を意味し、「%w/v」は重量/容積%を意味し、「%v/v」は容積/容積%を意味し、「HPLC」は高性能液体クロマトグラフィーを意味し、「GC」はガスクロマトグラフィーを意味する。

【0126】

実施例1

アセチル-CoAアセチルトランスフェラーゼのクローニングおよび発現

本実施例の目的は、ここでアセトアセチル-CoAチオラーゼとも称される酵素アセチル-CoAアセチルトランスフェラーゼを大腸菌 (*E. coli*) 中で発現することであった。C. アセトブチリカム (*acetobutylicum*) (ATCC 824) からアセトアセチル-CoAチオラーゼ遺伝子 *thlA* をクローニングして、大腸菌 (*E. coli*) 中で発現した。 *thlA* 遺伝子は、PCRを使用してC. アセトブチリカム (*acetobutylicum*) (ATCC 824) ゲノムDNAから増幅され、1.2kbpの生成物中で得られた。

【0127】

クロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) (ATCC 824) からのゲノムDNAは、バージニア州マナッサスの米国微生物系統保存機関 (ATCC) から購入され、あるいは下で述べられるようにクロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) (ATCC 824) 培養物から単離された。

【0128】

クロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) (ATCC 824) からのゲノムDNAは、嫌氣的に生育させた培養物から調製された。クロストリジウム (*Clostridium*) 株は、30℃の嫌気性チャンバー内で、ニュージャージー州バインランドのベルコ・ガラス・インコーポレーテッド (Bellco Glass Inc. (Vineland, NJ)) からの栓をして圧着した100mLベルコ (Bellco) 血清ボトル内の10mLのクロストリジウム属増殖培地 (ロペズ-コントレラス (Lopez-Contreras) ら、Appl. Environ. Microbiol. 69 (2)、869~877頁、2003年) 中で生育させた。接種材料はニューヨーク州ニューヨークの三菱ガス化学アメリカ・インコーポレーテッド (Mitsubishi Gas Chemical America Inc. (New York, NY)) からの2.5L MGCアナエロパック (AnaeroPak) (商標) 内で37℃で生育させた2×YTGプレートからの単一コロニーであった (キシイ (Kishii) ら、Antimicrobial Agents & Chemotherapy、47 (1)、77~81頁、2003年)。

【0129】

製造業者の使用説明書に修正を加えて、ミネソタ州ミネアポリスのジェントラシステムズ・インコーポレーテッド (Gentra Systems Inc. (Minneapolis, MN)) からのジェントラ・ピュアジーン (Gentra Puregene) (登録商標) キット (カタログ番号D-6000A) を使用して、ゲノムDNAを調製した (ウォン (Wong) ら、Current Microbiology、32、349~356頁、1996年)。それぞれ配列番号21および22で示されるプライマーN7およびN8 (表4参照) を使用して、PCRによりクロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) (ATCC 824) ゲノムDNAから *thlA* 遺伝子を増幅した。その他のPCR増幅試薬は、例えばウィスコンシン州マディソンのノバジェン・インコーポレーテッド (Novagen Inc. (Madison, WI)) からのKod HiFi DNAポリメラーゼ (カタログ番号71805-3) などの製造業者のキット内で提供され、製造業者のプロトコルに従って

10

20

30

40

50

使用した。カリフォルニア州フォスター・シティのPEアプライド・バイオシステムズ（PE Applied Biosystems (Foster city, CA)）からのDNAサーモサイクラーGeneAmp 9700内で増幅を実施した。

【0130】

発現研究のために、カリフォルニア州カールスバッドのインビトロジェン・コーポレーション（Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA)）からのゲートウェイ（Gateway）クローニング技術を使用した。エントリーベクターpENTR/SD/D-TOPOは定方向性クローニングを可能にし、対象とする遺伝子のためのシャイン・ダルガノ（Shine-Dalgarno）配列を提供した。目的ベクターpDEST14は、タグのない遺伝子の発現のためにT7プロモーターを使用した。順方向プライマーには翻訳開始コドンに隣接する4つの塩基（CACC）が組み込まれてインビトロジェン（Invitrogen）からのpENTR/SD/D-TOPO中への定方向性クローニングを可能にし、プラスミドpENTRSD-D-TOPOth1Aを発生させた。製造業者の推奨に従ってpENTRコンストラクトをインビトロジェン（Invitrogen）からの大腸菌（E. coli）Top10細胞に形質転換して播種した。形質転換体を一晚生育させ、製造業者の推奨に従ってカリフォルニア州バレンシアのキアゲン（Qiagen (Valencia, CA)）からのキアプレップ（QIAprep）スピン・ミニプレップキット（カタログ番号27106）を使用して、プラスミドDNAを調製した。それぞれ配列番号45および46で示されるM13フォワードおよびリバースプライマー（表5参照）によってクローンを配列決定し、遺伝子が正しい方向に挿入されたことを確認して配列を確認した。PCR生成物を完全に配列決定するために、それぞれ配列番号47および48で示される追加的配列決定プライマーN7SeqF1およびN7SeqR1（表5参照）が必要であった。この遺伝子の読み取り枠（ORF）のヌクレオチド配列、および酵素の予測されたアミノ酸配列は、それぞれ配列番号1および配列番号2で示される。

【0131】

発現クローンを作り出すために、遺伝子組み換えによってth1A遺伝子をpDEST14ベクター中に転移して、pDEST14th1Aを発生させた。pDEST14th1AベクターをBL21-AI細胞に形質転換した。形質転換体を50 μg/mLのアmpiシリンで栄養強化されたLB培地に接種して一晚生育させた。一晚培養物のアリコートを使用して、50 μg/mLのアmpiシリンで栄養強化された50 mLのLBに接種した。培養物を振盪しながら、37℃でOD₆₀₀が0.6～0.8に達するまでインキュベートした。培養物を2つの25 mL培養物に分割し、フラスコの1つにアラビノースを添加して最終濃度を0.2重量%にした。負の対照フラスコはアラビノースで誘導しなかった。フラスコを振盪しながら37℃で4時間インキュベートした。細胞を遠心分離によって収集し、細胞ペレットを50 mMのMOPS緩衝液（pH 7.0）中に再懸濁した。細胞を超音波処理によって、またはフレンチ・プレッシャー・セル（French Pressure Cell）を通過させることで破壊した。ホールセル溶解産物を遠心分離すると、上清または無細胞抽出物およびペレットまたは不溶性の画分が生じた。各画分のアリコート（ホールセル溶解産物、無細胞抽出物および不溶性画分）をインビトロジェン（Invitrogen）からのSDS（MES）ローディング緩衝液中に再懸濁し、85℃で10分間加熱してSDS-PAGE分析（インビトロジェン（Invitrogen）からのニューページ（NuPAGE）4-12%ビスートリスゲル、カタログ番号NP0322Box）を行った。核酸配列から推定されたような約41 kDaの予想された分子量のタンパク質が誘導培養物中に存在したが、非誘導対照中には存在しなかった。

【0132】

無細胞抽出物中のアセトアセチル-CoAチオラーゼ活性は、303 nmにおける吸光度の減少をモニタリングすることで、Mg²⁺-アセトアセチル-CoA複合体の分解として測定された。標準アッセイ条件は、100 mMのトリス-HCl pH 8.0、1 mMのDTT（ジチオスレイトール）、および10 mMのMgCl₂であった。37℃で5

10

20

30

40

50

分間カクテルを平衡化し、次に無細胞抽出物を添加した。0.05 mMのアセトアセチル-C o Aと0.2 mMのC o Aの添加によって反応を開始した。ブラッドフォード法またはシグマ (Sigma) からのビシンコニン酸キット (カタログ番号BCA-1) のどちらかによってタンパク質濃度を測定した。どちらの場合にもカリフォルニア州ハーキュリーズのバイオラッド (Bio-Rad (Hercules, CA)) からのウシ血清アルブミンを標準として使用した。典型的なアッセイでは、誘導培養物中のTh1Aタンパク質の比活性は、非誘導培養物の $0.27 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{分}^{-1}$ と比べて、 $16.0 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{分}^{-1}$ と判定された。

【0133】

実施例 2

アセチル-C o Aアセチルトランスフェラーゼのクローニングおよび発現

本実施例の目的は、ここでアセトアセチル-C o Aチオラーゼ酵素とも称されるアセチル-C o Aアセチルトランスフェラーゼを大腸菌 (E. coli) 中で発現することであった。アセトアセチル-C o Aチオラーゼ遺伝子th1BをC. アセトブチリカム (acetobutylicum) (ATCC 824) からクローニングし、大腸菌 (E. coli) 中で発現した。PCRを使用して、C. アセトブチリカム (acetobutylicum) (ATCC 824) ゲノムDNAからth1B遺伝子を増幅した。

【0134】

実施例1で述べられるth1A遺伝子と同一様式で、th1B遺伝子をクローニングして発現した。それぞれ配列番号27および28で示されるプライマーN15およびN16を使用したPCRによって、C. アセトブチリカム (acetobutylicum) (ATCC 824) ゲノムDNAを増幅して1.2 kbpの生成物を作成した。順方向プライマーには翻訳開始コドンに隣接する4つの塩基 (CCAC) が組み込まれて、インビトロジェン (Invitrogen) からのpENTR/SD/D-TOPOTh1B中への定方向性クローニングを可能にし、プラスミドpENTRSD-D-TOPOTh1Bを発生させた。それぞれ配列番号45および46で示されるM13フォワードおよびリバースプライマーでクローンを配列決定し、遺伝子が正しい方向に挿入されたことを確認し、配列を確認した。PCR生成物を完全に配列決定するために、それぞれ配列番号49および50で示される追加的配列決定プライマーN15 Seq F1およびN16 Seq R1 (表5参照) が必要であった。この遺伝子の読み取り枠 (ORF) のヌクレオチド配列および酵素の予測されたアミノ酸配列は、それぞれ配列番号3および配列番号4で示される。

【0135】

発現クローンを作り出すために、遺伝子組み換えによってth1B遺伝子をインビトロジェン (Invitrogen) からのpDEST14ベクター中に転移して、pDEST14th1Bを発生させた。pDEST14th1BベクターをBL21-AI細胞に形質転換し、アラビノースの添加によってT7プロモーターからの発現を誘導した。核酸配列から推定されたような約42 kDaの予想された分子量のタンパク質が誘導培養物中に存在したが、非誘導対照中には存在しなかった。実施例1で述べられるようにして酵素アッセイを実施した。典型的なアッセイでは、誘導培養物中のTh1Bタンパク質の比活性は、非誘導培養物の $0.28 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{分}^{-1}$ と比べて、 $14.9 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{分}^{-1}$ と判定された。

【0136】

実施例 3

3-ヒドロキシブチリル-C o Aデヒドロゲナーゼのクローニングおよび発現

本実施例の目的は、C. アセトブチリカム (acetobutylicum) (ATCC 824) からのhbd遺伝子をクローニングして、大腸菌 (E. coli) 中で発現することであった。PCRを使用して、hbd遺伝子をC. アセトブチリカム (acetobutylicum) (ATCC 824) ゲノムDNAから増幅した。

【0137】

実施例1で述べられる方法を使用して、hbd遺伝子をクローニングして発現した。そ

10

20

30

40

50

れぞれ配列番号19および20で示されるプライマーN5およびN6（表4参照）を使用したPCRによって、*C. アセトブチリカム*（*acetobutylicum*）（ATCC 824）ゲノムDNAから*hbd*遺伝子を増幅して881bpの生成物を生成した。順方向プライマーには翻訳開始コドンに隣接する4つの塩基（CACCC）が組み込まれて、インビトロジェン（Invitrogen）からのpENTR/SD/D-TOPPO中への定方向性クローニングを可能にし、プラスミドpENTRSDD-TOPPO*hbd*を発生させた。それぞれ配列番号45および46で示されるM13フォワードおよびリバースプライマーでクローンを配列決定し、遺伝子が正しい方向に挿入されたことを確認し、配列を確認した。PCR生成物を完全に配列決定するために、それぞれ配列番号51および52で示される追加的配列決定プライマーN5SeqF2およびN6SeqR2（表5参照）が必要であった。この遺伝子の読み取り枠（ORF）のヌクレオチド配列および酵素の予測されたアミノ酸配列は、それぞれ配列番号5および配列番号6で示される。

10

【0138】

発現クローンを作り出すために、遺伝子組み換えによって*hbd*遺伝子をインビトロジェン（Invitrogen）からのpDEST14ベクター中に転移して、pDEST14*hbd*を発生させた。pDEST14*hbd*ベクターをBL21-AI細胞に形質転換し、実施例1で述べられるようにしてアラビノースの添加によってT7プロモーターからの発現を誘導した。核酸配列から推定されたような約31kDaの予想された分子量のタンパク質が誘導培養物中に存在したが、非誘導対照中には存在しなかった。

20

【0139】

340nmにおける吸光度の減少により測定されるNADHの酸化速度を測定して、ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ活性を判定した。標準アッセイ混合物は、50mM MOPS、pH7.0、1mM DTT、および0.2mM NADHを含有した。カクテルを37℃で5分間平衡化し、次に無細胞抽出物を添加した。基質である0.1mMアセトアセチル-CoAの添加により反応を開始した。典型的なアッセイでは、誘導培養物中のBHBタンパク質の比活性は、非誘導培養物の0.885 $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{分}^{-1}$ と比べて、57.4 $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{分}^{-1}$ と判定された。

【0140】

実施例4

クロトナーゼのクローニングおよび発現

30

本実施例の目的は、*C. アセトブチリカム*（*acetobutylicum*）（ATCC 824）からの*crt*遺伝子をクローニングし、大腸菌（*E. coli*）中で発現するすることであった。PCRを使用して、*C. アセトブチリカム*（*acetobutylicum*）（ATCC 824）ゲノムDNAから*crt*遺伝子を増幅した。

【0141】

実施例1で述べられる方法を使用して、*crt*遺伝子をクローニングして発現した。それぞれ配列番号17および18で示されるプライマーN3およびN4（表4参照）を使用したPCRによって、*C. アセトブチリカム*（*acetobutylicum*）（ATCC 824）ゲノムDNAから*crt*遺伝子を増幅して794bpの生成物を生成した。順方向プライマーには翻訳開始コドンに隣接する4つの塩基（CACCC）が組み込まれて、インビトロジェン（Invitrogen）からのpENTR/SD/D-TOPPO中への定方向性クローニングを可能にし、プラスミドpENTRSDD-TOPPO*crt*を発生させた。それぞれ配列番号45および46で示されるM13フォワードおよびリバースプライマーでクローンを配列決定し、遺伝子が正しい方向に挿入されたことを確認し、配列を確認した。この遺伝子の読み取り枠（ORF）のヌクレオチド配列および酵素の予測されたアミノ酸配列は、それぞれ配列番号7および配列番号8で示される。

40

【0142】

発現クローンを作り出すために、遺伝子組み換えによって*crt*遺伝子をインビトロジェン（Invitrogen）からのpDEST14ベクター中に転移して、pDEST14*crt*を発生させた。pDEST14*crt*ベクターをBL21-AI細胞に形質転

50

換し、実施例1で述べられるようにしてアラビノースの添加によってT7プロモーターからの発現を誘導した。核酸配列から推定されたような約28kDaの予想された分子量のタンパク質が誘導培養物中に存在し、その量は非誘導対照よりもはるかに多かった。

【0143】

スターン (Stern)、Methods Enzymol. 1、559～566頁、1954年、で述べられるようにして、クロトナーゼ活性をアッセイした。典型的なアッセイでは、誘導培養物中のクロトナーゼタンパク質の比活性は、非誘導培養物中の47 $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{分}^{-1}$ と比べて444 $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{分}^{-1}$ と判定された。

【0144】

実施例5

ブチリル-CoAデヒドロゲナーゼのクローニングおよび発現

本実施例の目的は、ここでトランス-2-エノイル-CoAレダクターゼとも称される酵素ブチリル-CoAデヒドロゲナーゼを大腸菌 (E. coli) 中で発現することであった。推定上のトランス-2-エノイル-CoAレダクターゼ相同体であるCAC0462遺伝子をC. アセトブチリカム (acetobutylicum) (ATCC 824) からクローニングし、大腸菌 (E. coli) 中で発現した。PCRを使用して、C. アセトブチリカム (acetobutylicum) (ATCC 824) ゲノムDNAからCAC0462遺伝子を増幅した。

【0145】

実施例1で述べられる方法を使用して、CAC0462遺伝子をクローニングして発現した。それぞれ配列番号29および30で示されるプライマーN17およびN21 (表4参照) を使用したPCRによって、C. アセトブチリカム (acetobutylicum) (ATCC 824) ゲノムDNAからCAC0462遺伝子を増幅して1.3kbpの生成物を生成した。順方向プライマーには翻訳開始コドンに隣接する4つの塩基 (CAC) が組み込まれ、インビトロジェン (Invitrogen) からのpENTR/SD/D-TOPPO中への定方向性クローニングを可能にし、プラスミドpENTRSD/D-TOPPOCAC0462を発生させた。それぞれ配列番号45および46で示されるM13フォワードおよびリバースプライマーでクローンを配列決定し、遺伝子が正しい方向に挿入されたことを確認し、配列を確認した。PCR生成物を完全に配列決定するために、追加的配列決定プライマーN22SeqF1 (配列番号53)、N22SeqF2 (配列番号54)、N22SeqF3 (配列番号55)、N23SeqR1 (配列番号56)、N23SeqR2 (配列番号57)、およびN23SeqR3 (配列番号58) (表5参照) が必要であった。この遺伝子の読み取り枠 (ORF) のヌクレオチド配列および酵素の予測されたアミノ酸配列は、それぞれ配列番号9および配列番号10で示される。

【0146】

発現クローンを作り出すために、遺伝子組み換えによってCAC0462遺伝子をインビトロジェン (Invitrogen) からのpDEST14ベクター中に転移して、pDEST14CAC0462を発生させた。pDEST14CAC0462ベクターをBL21-AI細胞に形質転換し、実施例1で述べられるようにしてアラビノースの添加によってT7プロモーターからの発現を誘導した。SDS-PAGEによる分析は、負の対照または誘導培養物中に予想された分子量の過剰発現されたタンパク質を示さなかった。C. アセトブチリカム (acetobutylicum) CAC0462遺伝子は、多くの稀な大腸菌 (E. coli) コドンを使用した。コドン使用頻度の問題を回避するために、pDEST14CAC0462ベクターを保有するBL21-AI細胞に、ノバジェン (Novagen) からのpRAREプラスミドを形質転換した。pRAREベクターを保有する培養物でアラビノース誘導による発現研究を繰り返した。予想された約46kDaの分子量のタンパク質が誘導培養物中に存在したが、非誘導対照中には存在しなかった。

【0147】

ホフマイスター (Hoffmeister) ら、J. Biol. Chem. 280、4

10

20

30

40

50

329～4338頁、2005年、で述べられるようにして、トランス-2-エノイル-C_oAレダクターゼ活性をアッセイした。典型的なアッセイでは、誘導培養物中のT_{ER} CAC0462タンパク質の比活性は、非誘導培養物の0.0128 μmol mg⁻¹ 分⁻¹と比べて0.694 μmol mg⁻¹ 分⁻¹と判定された。

【0148】

実施例6

ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ（アセチル化）のクローニングおよび発現

本実施例の目的は、C. ベイジリンキ（*beijerinckii*）（ATCC 35702）からのald遺伝子をクローニングし、大腸菌（*E. coli*）中で発現することであった。PCRを使用して、ald遺伝子をC. ベイジリンキ（*beijerinckii*）（ATCC 35702）ゲノムDNAから増幅した。

【0149】

実施例1で述べられる方法を使用して、ald遺伝子をクローニングして発現した。それぞれ配列番号31および32で示されるプライマーN27 F1およびN28 R1（表4参照）を使用したPCRによって、C. ベイジリンキ（*beijerinckii*）（ATCC 35702）ゲノムDNA（実施例1で述べられるように嫌氣的に生育させた培養物から調製される）からald遺伝子を増幅して1.6 kbpの生成物を生成した。順方向プライマーには翻訳開始コドンに隣接する4つの塩基（CACC）が組み込まれ、インビトロジェン（Invitrogen）からのpENTR/SD/D-TOPO中への定方向性クローニングを可能にし、プラスミドpENTRSDD-TOPOaldを発生させた。それぞれ配列番号45および46で示されるM13フォワードおよびリバースプライマーでクローンを配列決定し、遺伝子が正しい方向に挿入されたことを確認し、配列を確認した。PCR生成物を完全に配列決定するために、追加的配列決定プライマーN31SeqF2（配列番号59）、N31SeqF3（配列番号60）、N31SeqF4（配列番号61）、N32SeqR1（配列番号72）、N31SeqR2（配列番号62）、N31SeqR3（配列番号63）、N31SeqR4（配列番号64）、およびN31SeqR5（配列番号65）（表5参照）が必要であった。この遺伝子の読み取り枠（ORF）のヌクレオチド配列および酵素の予測されたアミノ酸配列は、それぞれ配列番号11および配列番号12で示される。

【0150】

発現クローンを作り出すために、遺伝子組み換えによってald遺伝子をインビトロジェン（Invitrogen）からのpDEST14ベクター中に転移して、pDEST14aldを発生させた。pDEST14aldベクターをBL21-AI細胞に形質転換し、実施例1で述べられるようにしてアラビノースの添加によって、T7プロモーターからの発現を誘導した。核酸配列から推定されたような約51 kDaの予想された分子量のタンパク質が誘導培養物中に存在したが、非誘導対照中には存在しなかった。

【0151】

フーゼマン（Husemann）ら、Appl. Microbiol. Biotechnol. 31: 435～444頁、1989年、で述べられるように、340 nmにおける吸光度の増大によって測定されるNADHの形成をモニタリングして、アシル化アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を判定した。典型的なアッセイでは、誘導培養物中のAldタンパク質の比活性は、非誘導培養物中の0.01 μmol mg⁻¹ 分⁻¹と比べて、0.106 μmol mg⁻¹ 分⁻¹と判定された。

【0152】

実施例7

ブタノールデヒドロゲナーゼのクローニングおよび発現

本実施例の目的は、C. アセトブチリカム（*acetobutylicum*）（ATCC 824）からのbdhB遺伝子をクローニングして、大腸菌（*E. coli*）中で発現することであった。PCRを使用して、C. アセトブチリカム（*acetobutylicum*）（ATCC 824）ゲノムDNAからbdhB遺伝子を増幅した。

【0153】

実施例1で述べられる方法を使用して、bdhB遺伝子をクローニングして発現した。それぞれ配列番号25および26で示されるプライマーN11およびN12（表4参照）を使用したPCRによって、C. アセトブチリカム（*acetobutylicum*）（ATCC 824）ゲノムDNAからbdhB遺伝子を増幅して1.2kbpの生成物を生成した。順方向プライマーには、翻訳開始コドンに隣接する4つの塩基（CACCC）が組み込まれ、インビトロジェン（Invitrogen）からのpENTR/SD/D-TOPO中への定方向性クローニングを可能にし、プラスミドpENTRSDD-TOPObdhBを発生させた。翻訳開始コドンもまた、プライマー配列によって「GTG」から「ATG」に変更された。それぞれ配列番号45および46で示されるM13フォワードおよびリバースプライマーでクローンを配列決定し、遺伝子が正しい方向に挿入されたことを確認し、配列を確認した。PCR生成物を完全に配列決定するために、追加的配列決定プライマーN11SeqF1（配列番号66）、N11SeqF2（配列番号67）、N12SeqR1（配列番号68）、およびN12SeqR2（配列番号69）（表5参照）が必要であった。この遺伝子の読み取り枠（ORF）のヌクレオチド配列および酵素の予測されたアミノ酸配列は、それぞれ配列番号13および配列番号14で示される。

10

【0154】

発現クローンを作り出すために、遺伝子組み換えによってbdhB遺伝子をインビトロジェン（Invitrogen）からのpDEST14ベクター中に転移して、pDEST14bdhBを発生させた。pDEST14bdhBベクターをBL21-AI細胞に形質転換し、実施例1で述べられるようにしてアラビノースの添加によってT7プロモーターからの発現を誘導した。核酸配列から推定されたような約43kDaの予想された分子量のタンパク質が誘導培養物中に存在したが、非誘導対照中には存在しなかった。

20

【0155】

フーゼマン（Husemann）およびパポウトサキス（Papoutsakis）（前出）で述べられるように、340nmにおける吸光度の減少によって測定されるNADHの酸化速度から、ブタノールデヒドロゲナーゼ活性を判定した。典型的なアッセイでは、誘導培養物中のBdhBタンパク質の比活性は、非誘導培養物中の0.022μmol mg⁻¹分⁻¹と比べて、0.169μmol mg⁻¹分⁻¹と判定された。

30

【0156】

実施例8

ブタノールデヒドロゲナーゼのクローニングおよび発現

本実施例の目的は、C. アセトブチリカム（*acetobutylicum*）824からのbdhA遺伝子をクローニングして大腸菌（*E. coli*）中で発現することであった。PCRを使用して、C. アセトブチリカム（*acetobutylicum*）824ゲノムDNAからbdhA遺伝子を増幅した。

【0157】

実施例1で述べられる方法を使用して、bdhA遺伝子をクローニングして発現した。それぞれ配列番号23および24で示されるプライマーN9およびN10（表4参照）を使用したPCRによって、C. アセトブチリカム（*acetobutylicum*）824ゲノムDNAからbdhA遺伝子を増幅して1.2kbpの生成物を生成した。順方向プライマーには、翻訳開始コドンに隣接する4つの塩基（CACCC）が組み込まれ、インビトロジェン（Invitrogen）からのpENTR/SD/D-TOPO中への定方向性クローニングを可能にし、プラスミドpENTRSDD-TOPObdhAを発生させた。それぞれ配列番号45および46で示されるM13フォワードおよびリバースプライマーでクローンを配列決定し、遺伝子が正しい方向に挿入されたことを確認し、配列を確認した。PCR生成物を完全に配列決定するために、追加的配列決定プライマーN9SeqF1（配列番号70）およびN10SeqR1（配列番号71）（表5参照）が必要であった。この遺伝子の読み取り枠（ORF）のヌクレオチド配列および酵素の予測されたアミノ酸配列は、それぞれ配列番号15および配列番号16で示される。

40

50

【0158】

発現クローンを作り出すために、遺伝子組み換えによってb d h A遺伝子をインビトロジェン (Invitrogen) からのp D E S T 1 4ベクター中に転移して、p D E S T 1 4 b d h Aを発生させた。p D E S T 1 4 b d h AベクターをB L 2 1 - A I細胞に形質転換し、実施例1で述べられるようにしてアラビノースの添加によってT7プロモーターからの発現を誘導した。核酸配列から推定されたような約43 kDaの予想された分子量のタンパク質が誘導培養物中に存在したが、非誘導対照中には存在しなかった。

【0159】

フーゼマン (Husemann) およびパポウトサキス (Papoutsakis) (前出) で述べられるように、340 nmにおける吸光度の減少によって測定されるNADHの酸化速度から、ブタノールデヒドロゲナーゼ活性を判定した。典型的なアッセイでは、誘導培養物中のB d h Aタンパク質の比活性は、非誘導培養物中の $0.028 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{分}^{-1}$ と比べて、 $0.102 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{分}^{-1}$ と判定された。

【0160】

実施例9

1-ブタノール生合成経路(下流経路)中の遺伝子のための形質転換ベクターの構築

1-ブタノール生合成経路中の6ステップをコードする遺伝子を含んでなる形質転換ベクターを構築するために、経路中の6ステップをコードする遺伝子を2つのオペロンに分割した。上流経路は、アセチル-CoAアセチルトランスフェラーゼ、3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ、クロトナーゼ、およびブチリル-CoAデヒドロゲナーゼによって触媒される最初の4ステップを含んでなる。下流経路は、ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼおよびブタノールデヒドロゲナーゼによって触媒される最後の2ステップを含んでなる。

【0161】

本実施例の目的は、下流経路オペロンを構築することであった。上流経路オペロンの構築については実施例10で述べる。

【0162】

後のクローニングのための制限部位を組み込んだプライマー、および最適化された大腸菌 (E. coli) リボソーム結合部位 (A A A G G A G G) を含有する順方向プライマーを用いたPCRによって、個々の遺伝子を増幅した。PCR産物をp C R 4 B l u n t - T O P Oベクター中にT O P Oクローニングして、インビトロジェン (Invitrogen) からの大腸菌 (E. coli) T o p 1 0細胞に形質転換した。T O P OクローニングからプラスミドDNAを調製して、遺伝子配列を確認した。マサチューセッツ州ベヴァリーのニュー・イングランド・バイオラブズ (New England Biolabs (Beverly, MA)) の制限酵素およびT4 DNAリガーゼを製造業者の推奨に従って使用した。クローニング実験のために、キアゲン (Qiagen) からのキアquick (QIAquick) ゲル抽出キットを使用したゲル電気泳動法によって、制限酵素断片を精製した。

【0163】

配列確認後、クローニングプラットフォームとして改変p U C 1 9ベクター中に、遺伝子をサブクローニングした。p U C 1 9ベクターをH i n d I I I / S a p I消化によって改変し、p U C 1 9 d H Sを作り出した。消化によってM C S (複数クローニング部位) に隣接するl a cプロモーターが除去され、ベクター中へのオペロンの転写が防止された。

【0164】

それぞれ配列番号41および42で示されるプライマーN58およびN59(表4参照)を使用したPCRによって、C. ベイジリンク (beijerinckii) A T C C 3 5 7 0 2ゲノムDNAからa l d遺伝子を増幅し、1.5 kbpの生成物を作り出した。順方向プライマーには制限部位A v a IおよびB s t E I IおよびR B S (リボソーム結合部位) が組み込まれた。逆方向プライマーにはH p a I制限部位が組み込まれた。

PCR産物をpCRBlunt II-TOPOにクローニングし、pCRBlunt II-a1dを作り出した。TOPOクローンからプラスミドDNAを調製し、プライマーM13フォワード（配列番号45）、M13リバー（配列番号46）、N31SeqF2（配列番号59）、N31SeqF3（配列番号60）、N31SeqF4（配列番号61）、N32SeqR1（配列番号72）、N31SeqR2（配列番号62）、N31SeqR3（配列番号63）、N31SeqR4（配列番号64）、およびN31SeqR5（配列番号65）（表5参照）で遺伝子配列を確認した。

【0165】

それぞれ配列番号43および44で示されるプライマーN64およびN65（表4参照）を使用したPCRによって、C. アセトブチリカム（*acetobutylicum*）（ATCC 824）ゲノムDNAからbdhB遺伝子を増幅し、1.2kbpの生成物を作り出した。順方向プライマーにはHpaI制限部位およびRBSが組み込まれた。逆方向プライマーにはPmeIおよびSphI制限部位が組み込まれた。PCR産物をpCRBlunt II-TOPOにクローニングして、pCRBlunt II-bdhBを作り出した。TOPOクローンからプラスミドDNAを調製し、プライマーM13フォワード（配列番号45）、M13リバー（配列番号46）、N11SeqF1（配列番号66）、N11SeqF2（配列番号67）、N12SeqR1（配列番号68）、およびN12SeqR2（配列番号69）（表5参照）で遺伝子配列を確認した。

【0166】

下流経路オペロンを構築するために、pCRBlunt II-bdhBからの1.2kbpのSphIおよびHpaI断片、pCRBlunt II-a1dからの1.4kbpのHpaIおよびSphI断片、およびAvaIおよびSphI消化されたpUC19dHSからの大型断片を共にライゲートした。三元ライゲーションによって、pUC19dHS-a1d-bdhBが作り出された。

【0167】

pUC19dHS-a1d-bdhBベクターをBstEIIおよびPmeIで消化して2.6kbpの断片を放出し、それを大腸菌（*E. coli*）-枯草菌（*Bacillus subtilis*）シャトルベクターであるpBenBP中にクローニングした。pBE93ベクターの改変によって、ナガラジャン（*Nagராஜன்*）の国際公開第93/24631号パンフレット（実施例4）で述べられるプラスミドpBenBPを作り出した。NcoI/HindIII消化によって、バチルス・アミロリケファシエン（*Bacillus amyloliquefaciens*）中性プロテアーゼプロモーター（NPR）、シグナル配列、およびphoA遺伝子をpBE93から除去した。それぞれ配列番号73および75で示されるプライマーBenFおよびBenBPRによって、pBE93からNPRプロモーターをPCR増幅した。プライマーBenBPRには、プロモーター下流のBstEII、PmeI、およびHindIII部位が組み込まれた。PCR産物をNcoIおよびHindIIIで消化し、断片をベクターpBE93の対応する部位にクローニングしてpBenBPを作り出した。下流オペロン断片をpBenBP中のBstEIIおよびPmeI部位にサブクローニングして、pBen-a1d-bdhBを作り出した。

【0168】

上述の方法を使用して、粗製抽出物について、ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼおよびブタノールデヒドロゲナーゼ活性のためのアッセイを行った。空のベクターを含有する対照株を超えるレベルで、双方の酵素活性が実証された。

【0169】

実施例10（予測的）

1-ブタノール生合成経路（上流経路）中の遺伝子のための形質転換ベクターの構築

この予測的实施例の目的は、どのように上流経路オペロンをアセンブルするかを述べることである。一般アプローチは実施例9で述べられるのと同じである。

【0170】

それぞれ配列番号33および34で示されるプライマー対N44およびN45（表4参照）を使用したPCRによって、*C. アセトブチリカム*（*acetobutylicum*）（ATCC 824）ゲノムDNAから*thlA*遺伝子を増幅して、1.2 kbpの生成物を作り出す。順方向プライマーには*SphI*制限部位およびリボソーム結合部位（RBS）が組み込まれる。逆方向プライマーには*AscI*および*PstI*制限部位が組み込まれる。PCR産物をpCR4Blunt-TOPO中にクローニングして、pCR4Blunt-TOPO-*thlA*を作り出す。プラスミドDNAをTOPOクローンから調製して、遺伝配列子をプライマーM13フォワード（配列番号45）、M13リバー（配列番号46）、N7SeqF1（配列番号47）、およびN7SeqR1（配列番号48）（表5参照）で確認する。

10

【0171】

それぞれ配列番号35および36で示されるプライマー対N42およびN43（表4参照）を使用したPCRによって、*C. アセトブチリカム*（*acetobutylicum*）（ATCC 824）ゲノムDNAから*hbd*遺伝子を増幅し、0.9 kbpの生成物を作り出す。順方向プライマーには*SalI*制限部位およびRBSが組み込まれる。逆方向プライマーには*SphI*制限部位が組み込まれる。PCR産物をpCR4Blunt-TOPO中にクローニングして、pCR4Blunt-TOPO-*hbd*を作り出す。TOPOクローンからプラスミドDNAを調製し、遺伝子配列をプライマーM13フォワード（配列番号45）、M13リバー（配列番号46）、N5SeqF2（配列番号51）、およびN6SeqR2（配列番号52）（表5参照）で確認する。

20

【0172】

一次宿主として大腸菌（*E. coli*）、二次宿主として枯草菌（*B. subtilis*）中での発現のために、CAC0462遺伝子をコドン最適化する。配列番号76で示される新しい遺伝子はCaTERと称され、ニュージャージー州ピスカタウェイのジェンスクリプト・コーポレーション（Genscript Corp. (Piscataway, NJ)）によって合成される。遺伝子CaTERは、*BamHI*-*SalI*断片としてpUC57ベクター中でクローニングされ、RBSを含み、プラスミドpUC57-CaTERを生成する。

【0173】

それぞれ配列番号39および40で示されるプライマー対N38およびN39（表4参照）を使用したPCRによって、*C. アセトブチリカム*（*acetobutylicum*）（ATCC 824）ゲノムDNAから*crt*遺伝子を増幅し、834 bp生成物を作り出す。順方向プライマーには*EcoRI*および*MluI*制限部位およびRBSが組み込まれる。逆方向プライマーには*BamHI*制限部位が組み込まれる。PCR産物をpCR4Blunt-TOPO中にクローニングして、pCR4Blunt-TOPO-*crt*を作り出す。TOPOクローンからプラスミドDNAを調製し、遺伝子配列をプライマーM13フォワード（配列番号45）およびM13リバー（配列番号46）（表5参照）で確認する。

30

【0174】

配列確認後、クローニングプラットフォームとして改変pUC19ベクター中に遺伝子をサブクローニングする。*SphI*/*SapI*消化によってpUC19ベクターを改変し、pUC19dSSを作り出す。消化によって、MCSに隣接する*lac*プロモーターを除去し、ベクター中へのオペロン転写を防止する。

40

【0175】

上流経路オペロンを構築するために、pCR4Blunt-TOPO-*crt*を*EcoRI*および*BamHI*で消化して、0.8 kbpの*crt*断片を放出する。pUC19dSSベクターもまた*EcoRI*および*BamHI*で消化して、2.0 kbpベクター断片を放出する。ニュー・イングランド・バイオラプズ（New England Biolabs）からのT4 DNAリガーゼを使用して、*crt*断片およびベクター断片を共にライゲートしてpUC19dSS-*crt*を形成する。pUC57-CaTERを*BamHI*

50

I および Sal I で消化して、1.2 kbp の CaT ER 断片を放出し、CaT ER 遺伝子を pUC19dSS-crt 中に挿入する。pUC19dSS-crt を BamHI および Sal I で消化し、大型ベクター断片を CaT ER 断片とライゲートして pUC19dSS-crt-CaT ER を作り出す。オペロンを完成させるために、pCR4Blunt-TOPO-hbd からの 884 bp の Sal I および Sph I 断片、pCR4Blunt-TOPO-thlA からの 1.2 kb の Sph I および Pst I thlA 断片、および pUC19dSS-crt-CaT ER の Sal I および Pst I 消化からの大型断片をライゲートする。三元ライゲーションの生成物は、pUC19dSS-crt-CaT ER-hbd-thlA である。

【0176】

pUC19dSS-crt-CaT ER-hbd-thlA ベクターを Mlu I および Asc I で消化して 4.1 kbp の断片を放出し、それを pBenMA と称される大腸菌 (*E. coli*) - 枯草菌 (*B. subtilis*) シャトルベクターである pBE93 の誘導体中にクローニングする (カイミ (Caimi) の国際公開第 2004/018645 号パンフレット、39~40 頁)。pBE93 ベクターの改変によって、プラスミド pBenMA を作り出した。Nco I / Hind III 消化によって、バチルス・アミロリケファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*) 中性プロテアーゼプロモーター (NPR)、シグナル配列および phoA 遺伝子を pBE93 から除去する。それぞれ配列番号 73 および 74 で示されるプライマー BenF および BenMAR によって、pBE93 から NPR プロモーターを PCR 増幅する。プライマー BenMAR には、プロモーター下流の Mlu I、Asc I、および Hind III 部位が組み込まれる。PCR 産物を Nco I および Hind III で消化し、断片をベクター pBE93 中の対応する部位にクローニングして pBenMA を作り出す。上流オペロン断片を pBenMA 中の Mlu I および Asc I 部位にサブクローニングして、pBen-crt-hbd-CaT ER-thlA を作り出す。

【0177】

実施例 11 (予測的)

大腸菌 (*E. coli*) 中での 1-ブタノール生合成経路の発現

この予測的実施例の目的は、大腸菌 (*E. coli*) 中でどのように 1-ブタノール生合成経路を発現するかについて述べることである。

【0178】

それぞれ実施例 10 および 9 で述べられるようにして構築されるプラスミド pBen-crt-hbd-CaT ER-thlA および pBen-ald-bdhB を大腸菌 (*E. coli*) NM522 (ATCC 47000) に形質転換して、SDS-PAGE 分析、酵素アッセイおよびウェスタン分析によって各オペロン中の遺伝子発現をモニターする。ウェスタン法では、テキサス州ザ・ウッドランズのシグマジェノシス (Sigma-Genosys (The Woodlands, TX)) からの合成ペプチドに対する抗体を生じさせる。全遺伝子の発現確認後、pBen-ald-bdhB を EcoRI および PmeI で消化して、NPR プロモーター-ald-bdhB 断片を放出させる。断片の EcoRI 消化物は、ニュー・イングランド・バイオラブズ (New England Biolabs) からの DNA ポリメラーゼ (カタログ番号 M0210S) のクレノウ (Klenow) 断片を使用して平滑末端化する。プラスミド pBen-crt-hbd-CaT ER-thlA を PvuII で消化して、直線化された平滑末端化ベクター断片を作り出す。ベクターおよび NPR-ald-bdhB 断片をライゲートして、向きが反対である NPR プロモーター-ald-bdhB 断片と共に、完全な 1-ブタノール生合成経路を含有する p1B1 O. 1 および p1B1 O. 2 を作り出す。プラスミド p1B1 O. 1 および p1B1 O. 2 を大腸菌 (*E. coli*) NM522 に形質転換し、前述のようにして遺伝子発現をモニターする。

【0179】

50 mL の培地を含有する 250 mL 振盪フラスコに、大腸菌 (*E. coli*) NM5

10

20

30

40

50

22/p1B1 O. 1またはNM522/p1B1 O. 1株を接種し、250rpmおよび35℃で振盪する。培地は、5g/Lのデキストロース、0.05MのMOPS、0.01Mの硫酸アンモニウム、0.005Mのリン酸二水素カリウム、1% (v/v)のS10金属ミックス、0.1% (w/v)の酵母抽出物、0.1% (w/v)のカザミノ酸、0.1mg/Lのチアミン、0.05mg/Lのプロリン、および0.002mg/Lのビオチンから構成され、KOHでpH7.0に滴定する。S10金属ミックスは200mMのMgCl₂、70mMのCaCl₂、5mMのMnCl₂、0.1mMのFeCl₃、0.1mMのZnCl₂、0.2mMの塩酸チアミン、172μMのCuSO₄、253μMのCoCl₂、および242μMのNa₂MoO₄を含有する。18~24時間後に一般法セクションで述べるようにして、HPLCまたはGC分析によって1-ブタノールを検出する。

10

【0180】

実施例12 (予測的)

枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 中での1-ブタノール生合成経路の発現
この予測的実施例の目的は、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 中でどのように1-ブタノール生合成経路を発現するかについて述べることである。実施例11で述べられるのと同アプローチを使用する。

【0181】

それぞれ実施例10および9で述べられるようにして構築される上流および下流オペロンを使用する。プラスミドp1B1 O. 1およびp1B1 O. 2を枯草菌 (*Bacillus subtilis*) BE1010 (J. Bacteriol. 173:2278-2282 (1991)) に形質転換し、各オペロンの遺伝子発現を実施例11で述べるようにモニターする。

20

【0182】

50mLの培地を含有する250mL振盪フラスコに、枯草菌 (*B. subtilis*) BE1010/p1B1 O. 1またはBE1010/p1B1 O. 2株を接種し、250rpmおよび35℃で18時間振盪する。培地は、5g/Lのデキストロース、0.05MのMOPS、0.02Mのグルタミン酸、0.01Mの硫酸アンモニウム、0.005Mのリン酸二水素カリウム緩衝液、1% (v/v)のS10金属ミックス (実施例11で述べられる)、0.1% (w/v)の酵母抽出物、0.1% (w/v)のカザミノ酸、50mg/Lのトリプトファン、50mg/Lのメチオニン、および50mg/Lのリジンから構成され、KOHでpH7.0に滴定する。18~24時間後に一般法セクションで述べるようにして、HPLCまたはGC分析によって1-ブタノールを検出する。

30

【0183】

実施例13

組み換え大腸菌 (*E. coli*) を使用したグルコースからの1-ブタノール生成

この実施例は、大腸菌 (*E. coli*) 中での1-ブタノール生成について述べる。1-ブタノール生合成経路の6つのステップをコードする遺伝子の発現を3つのオペロンに分割した。上流経路は、1つのオペロン中のthlA、hbd、crt、およびEgTERによってコードされる最初の4つのステップを含んでなった。aldによってコードされる次のステップは、第2のオペロンにより提供された。yqhDによってコードされる経路の最後のステップは、第3のオペロン中で提供された。3つのオペロンを含んでなる大腸菌 (*E. coli*) 株中で、1-ブタノール生成を実証した。

40

【0184】

テキスト中特に断りのない限り、本実施例で述べられるクローニングプライマーは、表4中のそれらの配列番号によって参照され、配列決定およびPCRスクリーニングプライマーは、表5中のそれらの配列番号によって参照される。

【0185】

アセチル-CoAアセチルトランスフェラーゼ

それぞれ配列番号33および34で示されるプライマー対N44およびN45 (表4参

50

照)を使用したPCRによって、C. アセトブチリカム (*acetobutylicum*) (ATCC 824) ゲノムDNAから *thlA* 遺伝子を増幅し、1.2 kbpの生成物を作り出す。順方向プライマーには *SphI* 制限部位およびRBSが組み込まれた。逆方向プライマーには *AscI* および *PstI* 制限部位が組み込まれた。PCR産物をカリフォルニア州カールスバッドのインビトロジェン・コーポレーション (*Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA)*) からの pCR4 Blunt-TOPO中にクローニングして、pCR4 Blunt-TOPO-*thlA* を作り出す。プラスミドDNAをTOPOクローンから調製し、遺伝子配列をプライマー M13 フォワード (配列番号45)、M13 リバース (配列番号46)、N7 Seq F1 (配列番号47)、および N7 Seq R1 (配列番号48) (表5参照) で確認した。

10

【0186】

3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ

それぞれ配列番号35および36で示されるプライマー対N42およびN43 (表4参照)を使用したPCRによって、C. アセトブチリカム (*acetobutylicum*) (ATCC 824) ゲノムDNAから *hbd* 遺伝子を増幅し、0.9 kbp生成物を作り出した。順方向プライマーには *SalI* 制限部位およびRBSが組み込まれた。逆方向プライマーには *SphI* 制限部位が組み込まれた。PCR産物をpCR4 Blunt-TOPO中にクローニングして、pCR4 Blunt-TOPO-*hbd* を作り出した。TOPOクローンからプラスミドDNAを調製し、遺伝子配列をプライマー M13 フォワード (配列番号45)、M13 リバース (配列番号46)、N5 Seq F2 (配列番号51)、および N6 Seq R2 (配列番号52) (表5参照) で確認した。

20

【0187】

クロトナーゼ

それぞれ配列番号39および40で示されるプライマー対N38およびN39 (表4参照)を使用したPCRによって、C. アセトブチリカム (*acetobutylicum*) (ATCC 824) ゲノムDNAから *crt* 遺伝子を増幅し、834 bp生成物を作り出す。順方向プライマーには *EcoRI* および *MluI* 制限部位およびRBSが組み込まれた。逆方向プライマーには *BamHI* 制限部位が組み込まれた。PCR産物をpCR4 Blunt-TOPO中にクローニングし、pCR4 Blunt-TOPO-*crt* を作り出した。TOPOクローンからプラスミドDNAを調製し、遺伝子配列をプライマー M13 フォワード (配列番号45) および M13 リバース (配列番号46) (表5参照) で確認した。

30

【0188】

ブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ (トランス-2-エノイル-CoAレダクターゼ)

一次宿主として、大腸菌 (*E. coli*)、および二次宿主として枯草菌 (*B. subtilis*) 中でのコドン使用頻度向上のためにCAC0462遺伝子を合成した。新しい遺伝子 (CaTER、配列番号76) は、ニュージャージー州ピスカタウェイのジェンスクリプト・コーポレーション (*Genscript Corporation (Piscataway, NJ)*) によって、pUC57ベクター中で *BamHI-SalI* 断片として合成され、クローニングされてRBSを含む。

40

【0189】

大腸菌 (*E. coli*) および枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 中でのコドン使用頻度向上のために、ミドリムシ (*Euglena gracilis*) (TER、ジェンバンク番号Q5EU90) からのブチリル-CoAデヒドロゲナーゼのための代案の遺伝子を合成した。遺伝子は、ジェンスクリプト・コーポレーション (*Genscript Corporation*) によって合成され、pUC57中にクローニングされてpUC57::EgTERが作り出された。プライマーN85およびN86 (それぞれ配列番号80および81) は、テンプレートDNAとしてpUC57::EgTERと共に、pUC57::EgTER DNAからの1224 bpを含んでなるPCR断片を提供した。1224 bpの配列は配列番号77で示され、そこでbp1~1218はEg

50

TER (opt) のコード配列 (c d s) である。EgTER (opt) はコドン最適化 TER 遺伝子であり、大腸菌 (E. coli) 中で機能できるように正常なミトコンドリア配列を欠いている (ホフマイスター (Hoffmeister) ら、J. Biol. Chem. 280、4329 頁、2005 年)。

【0190】

EgTER (opt) を pCR4Blunt-TOPO 中にクローニングし、その配列をプライマー M13 フォワード (配列番号 45) および M13 リバース (配列番号 46) で確認した。PCR 産物を完全に配列決定するために、追加的配列決定プライマー N62SeqF2 (配列番号 114)、N62SeqF3 (配列番号 115)、N62SeqF4 (配列番号 116)、N63SeqR1 (配列番号 117)、N63SeqR2 (配列番号 118)、N63SeqR3 (配列番号 119) および N63SeqR4 (配列番号 120) が必要であった。次に 1.2 kbp の EgTER (opt) 配列を HincII および PmeI で切除して、HincII で直線化したノバジェン (Novagen) からの pET23+ 中にクローニングした。プライマー T7 プライマー および N63SeqR2 (それぞれ配列番号 82 および 118) でのコロニー PCR スクリーニングによって、プロモーターに対する EgTER (opt) 遺伝子の配向性を確認した。得られたプラスミド pET23+:EgTER (opt) を発現研究のためにノバジェン (Novagen) からの BL21 (DE3) に形質転換した。

【0191】

ホフマイスター (Hoffmeister) ら、J. Biol. Chem. 280、4329 頁、2005 年、で述べられるようにして、トランス-2-エノイル-CoA レダクターゼ活性をアッセイした。典型的なアッセイでは、誘導 BL21 (DE3) / pET23+:EgTER (opt) 培養物中の EgTER (opt) タンパク質の比活性は、非誘導培養物中の $0.547 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{分}^{-1}$ と比べて、 $1.9 \mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{分}^{-1}$ と判定された。

【0192】

次に trc プロモーターの制御下にある pTrc99a ベクター中に、EgTER (opt) 遺伝子をクローニングした。pET23+:EgTER (opt) からの 1287 bp の BamHI / SalI 断片として、EgTER (opt) 遺伝子を単離した。4.2 kbp ベクター pTrc99a を BamHI / SalI で直線化した。ベクターおよび断片をライゲートして、5.4 kbp の pTrc99a-EgTER (opt) を作り出した。0.5 kb 生成物を生成するプライマー Trc99aF および N63SeqR3 (それぞれ配列番号 83 および 119) でのコロニー PCR によって、陽性のクローンを確認した。

【0193】

アセチル-CoA アセチルトランスフェラーゼ (thlA)、3-ヒドロキシブチリル-CoA デヒドロゲナーゼ (hbd)、クロトナーゼ (crt)、および ブチリル-CoA デヒドロゲナーゼ (トランス-2-エノイル-CoA レダクターゼ、EgTER (opt)) をコードする遺伝子を含んでなるプラスミド pTrc99a-E-C-H-T の構築上流経路 (EgTER (opt)、crt、hbd、および thlA) を含んでなる 4 つの遺伝子オペロンの構築を開始するために、pCR4Blunt-TOPO-crt を EcoRI および BamHI で消化して、0.8 kbp の crt 断片を放出した。pUC19dSS ベクター (実施例 10 で述べられる) もまた、EcoRI および BamHI で消化して、2.0 kbp ベクター断片を放出した。ニュー・イングランド・バイオラブズ (New England Biolabs) からの T4 DNA リガーゼを使用して、crt 断片およびベクター断片を共にライゲートして、pUC19dSS-crt を形成した。pUC57-CaTER を BamHI および SalI で消化して 1.2 kbp の CaTER 断片を放出し、CaTER 遺伝子を pUC19dSS-crt 中に挿入した。pUC19dSS-crt を BamHI および SalI で消化し、大型ベクター断片を CaTER 断片とライゲートして、pUC19dSS-crt-CaTER を作り出した。オペ

ロンを完成するために、pCR4Blunt-TOPO-hbdからの884bpのSalIおよびSphI断片、pCR4Blunt-TOPO-thlAからの1.2kbSphIおよびPstI-thlA断片、およびpUC19dss-crt-CaTERのSalIおよびPstI消化からの大型断片をライゲートした。三元ライゲーションの生成物をpUC19dss-crt-CaTER-hbd-thlAまたはpUC19dss::Operon1と命名した。

【0194】

より高いブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ活性は、CaTERコンストラクトよりもpTrc99a-EgTER(opt)から得られたので、pTrc99a-EgTER(opt)に由来するオペロンを構築した。BamHI/SalIで消化し、5327bpベクター断片をゲル精製して、pUC19dss::Operon1からCaTER遺伝子を除去した。ベクターをクレノウ(Klenow)で処理し、再度ライゲートしてpUC19dss::Operon1ΔCaTerを作り出した。次にpUC19dss:オペロン1ΔCaTerからのEcoRI/PstI断片として、2934bpのcrt-hbd-thlA(C-H-T)断片を単離した。C-H-T断片をクレノウ(Klenow)で処理して、平滑末端化した。ベクターpTrc99a-EgTER(opt)をSalIで消化し、末端をクレノウ(Klenow)で処理した。平滑末端化されたベクターおよび平滑末端化されたC-H-T断片をライゲートして、pTrc99a-E-C-H-Tを作り出した。プライマーN62SeqF4およびN5SeqF4(それぞれ配列番号116および84)でコロニーPCR反応を実施して挿入断片の向きを確認した。

【0195】

ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ(aldおよびald(opt))をコードする遺伝子を含んでなるプラスミドpBHR T7-aldおよびpBHR-Ptrc-ald(opt)の構築

pDEST14-ald(実施例6)からのPT7-aldオペロンをドイツ国ゲッティンゲンのモビテック(Mobitec(Goettingen, Germany))からの広宿主域プラスミドpBHR 1中にサブクローニングして、pBHR 1PT7-aldを作り出した。pBHR 1プラスミドはpUC19またはpBR322プラスミドと適合性であるため、pBHR 1PT7-aldは、大腸菌(E. coli)中での1-ブタノール生成のための上流経路オペロンを保有するpUC19またはpBR322誘導体と組み合わせて使用できる。pDEST14-aldプラスミドをBglIIで消化し、DNAポリメラーゼのクレノウ(Klenow)断片で処理して平滑末端を作った。次にプラスミドをEcoRIで消化し、2,245bpのPT7-ald断片をゲル精製した。プラスミドpBHR 1をScaIおよびEcoRIで消化し、4,883bpの断片をゲル精製した。PT7-ald断片をpBHR 1ベクターとライゲートしてpBHR T7-aldを作り出した。プライマーT-ald(BamHI)およびB-ald(EgTER)(それぞれ配列番号85および86)での形質転換体のコロニーPCR増幅によって、予想された1.4kbのPCR産物を確認した。EcoRIおよびDrdIでのpBHR T7-aldクローンの制限酵素マッピングにより、予想された4,757および2,405bpの断片を確認した。

【0196】

ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性アッセイのために、プラスミドpBHR T7-aldをインビトロジェン(Invitrogen)からのBL21Star(商標)(DE3)細胞に形質転換し、実施例1で述べられるように、L-アラビノースの添加によってT7プロモーターからの発現を誘導した。実施例6で述べられるようにして、340nmでの吸光度増大によって測定されるNADH形成をモニタリングして、アシル化アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を判定した。

【0197】

ニュージャージー州ピスカタウェイのジェンスクリプト・コーポレーション(Gens

10

20

30

40

50

cript Corporationscataway, NJ)) によって、クロストリジウム・バイジェリッキー (*Clostridium beijerinckii*) ATCC 35702 からの *ald* 遺伝子のための代案の DNA 配列が合成され (大腸菌 (*E. coli*) および枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 中でのコドン使用頻度に最適化された)、pUC57 中にクローニングされて、プラスミド pUC57-*ald* (*opt*) が作られた。pUC57-*ald* (*opt*) を *Sac*I および *Sal*I で消化して、コドン最適化された遺伝子 *ald* (*opt*) および大腸菌 (*E. coli*) のための RBS を含んでなる 1498 bp の断片を放出した。1498 bp の断片の配列は、配列番号 78 で示される。

【0198】

pTrc99a を *Sac*I および *Sal*I で消化して 4153 bp ベクター断片を得て、それを 1498 bp *ald* (*opt*) 断片とライゲートして pTrc-*ald* (*opt*) を作り出した。合成遺伝子、*ald* (*opt*) の発現は、IPTG-誘導性 Pプロモーターの制御下にある。

【0199】

上述の上流経路プラスミドと適合性であるために、Pald (*opt*) オペロンをモビテック (MoBitec) からの広宿主域プラスミド pBHR1 中にサブクローニングした。対応するプライマー内に *Bsp*EI および *Sca*I 制限部位を組み込む、T-P (*Bsp*EI) および B-*ald* (*opt*) (*Sca*I) (それぞれ配列番号 87 および 88) で、Pald (*opt*) 断片を pTrc99A::*ald* (*opt*) から PCR 増幅した。PCR 産物を *Bsp*EI および *Sca*I で消化した。プラスミド pBHR1 を *Sca*I および *Bsp*EI で消化して、4, 883 bp の断片をゲル精製した。Pald (*opt*) 断片を pBHR1 ベクターとライゲートして、pBHR-PcatPald (*opt*) を作り出した。*Sca*I および *Bsp*EI での pBHR-PcatPald (*opt*) クローンの制限酵素マッピングによって、予想された 4, 883 および 1, 704 bp の断片を確認した。プラスミド由来の *cat* プロモーター (Pcat) 領域を除去するために、プラスミド pBHR-PcatPald (*opt*) を *Bsp*EI および *Aat*II で消化して、6, 172 bp の断片をゲル精製した。50 mM の NaCl、10 mM トリス-HCl、および 10 mM の MgCl₂ (pH 7.9) を含有する溶液中に、T-BspEIAatII および B-BspEIAatII (それぞれ配列番号 89 および 90) を最終濃度 100 μM に混合し、75 °C で 5 分間インキュベートして室温に緩慢に冷却してハイブリダイズした。ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドを 6, 172 bp の断片とライゲートして、pBHR-Pald (*opt*) を作り出した。

【0200】

ブタノールデヒドロゲナーゼ (*yqhD*) を発現する大腸菌 (*E. coli*) 株の構築
大腸菌 (*E. coli*) は、1, 3-プロパンジオールデヒドロゲナーゼ (米国特許第 6, 514, 733 号明細書) として同定された天然遺伝子 (*yqhD*) を含有する。*yqhD* 遺伝子は、有望な NADH-依存ブタノールデヒドロゲナーゼであるクロストリジウム (*Clostridium*) 中の遺伝子 *adhB* と 40% 同一性を有する。λ レッド技術 (ダツセンコ (Datsenko) およびワーナー (Wanner)、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97: 6640 頁、2000 年) を使用して、*yqhD* 遺伝子を大腸菌 (*E. coli*) MG1655 1.6 *yqhD*::Cm 株 (国際公開第 2004/033646 号パンフレット) 中のグルコースイソメラーゼプロモーター 1.6 GI (配列番号 91) 変異型の構成的発現下に置いた。同様に天然プロモーターを 1.5 GI プロモーター (国際公開第 2003/089621 号パンフレット) (配列番号 92) によって置換して MG1655 1.5 GI-*yqhD*::Cm 株を作り出し、したがって MG1655 1.6 *yqhD*::Cm の 1.6 GI プロモーターを 1.5 GI プロモーターで置換する。

【0201】

MG1655 1.5G I y q h D : : CmからP1溶解産物を調製し、大腸菌 (E. coli) MG1655株およびインビトロジェン (Invitrogen) からのλ DE3溶原化キットから調製される発現株MG1655 (DE3) にカセットを移動させ、インビトロジェン (Invitrogen) からのBL21 (DE3) は、それぞれMG1655 (DE3) 1.5G I y q h D : : CmおよびBL21 (DE3) 1.5G I y q h D : : Cmを作り出す。

【0202】

組み換え大腸菌 (E. coli) からの1-ブタノール生成の実証

大腸菌 (E. coli) MG1655 (DE3) 1.5G I y q h D : : Cm株をプラスミドpTrc99a-E-C-H-TおよびpBHR T7-a1dで形質転換し、MG1655 (DE3) 1.5G I y q h D : : Cm/pTrc99a-E-C-H-T/pBHR T7-a1d株を生成した。最初に50 μg/mLのカナマイシンおよび100 μg/mLのカルベニシリンを含有するLB培地中で、2つの独立した単離物を生育させた。細胞を使用して、それぞれ高、中、および低酸素条件に相当する、15、50、および150 mLのTM3a/グルコース培地を含有する (適切な抗生物質を添加した) 振盪フラスコ (総容積およそ175 mL) に接種した。TM3a/グルコース培地は1 Lあたり、10 gのグルコース、13.6 gのKH₂PO₄、2.0 gのクエン酸一水和物、3.0 gの(NH₄)₂SO₄、2.0 gのMgSO₄・7H₂O、0.2 gのCaCl₂・2H₂O、0.33 gのクエン酸第二鉄アンモニウム、1.0 mgのチアミン・HCl、0.50 gの酵母抽出物、および10 mLの微量元素溶液を含有し、NH₄OHでpH6.8に調節した。微量元素溶液はクエン酸・H₂O (4.0 g/L)、MnSO₄・H₂O (3.0 g/L)、NaCl (1.0 g/L)、FeSO₄・7H₂O (0.10 g/L)、CoCl₂・6H₂O (0.10 g/L)、ZnSO₄・7H₂O (0.10 g/L)、CuSO₄・5H₂O (0.010 g/L)、H₃BO₃ (0.010 g/L)、およびNa₂MoO₄・2H₂O (0.010 g/L) を含有した。≤0.01単位の開始OD₆₀₀でフラスコを接種し、300 rpmで振盪しながら34℃でインキュベートした。15および50 mLの培地を含有するフラスコは通気式キャップでキャッピングし、150 mLを含有するフラスコは非通気式キャップでキャッピングして、空気交換を最小化した。IPTGを0.04 mMの最終濃度に添加した。添加時のフラスコのOD₆₀₀は≥0.4単位であった。

【0203】

誘導のおよそ15時間後に一般法セクションで述べられるようにして、1-ブタノール含量について、屈折率 (RI) 検出付きHPLC (ショウデックス・シュガー (Shodex Sugar) SH1011カラム)、および蛍光イオン化検出 (FID) 付きGC (バリアン (Varian) CP-WAX58 (FFAP) CBカラム、内径2.5 mm×0.25 mm×フィルム厚0.2 μm) によって、ブロスのアリコート进行分析した。1-ブタノールの判定結果を表6に示す。

【0204】

【表 19】

表 6

大腸菌 MG1655(DE3)1.5Gl-yqhD::Cm/
pTrc99a-E-C-H-T/pBHR T7-ald 株による 1-ブタノール生成

株	O ₂ レベル	1-ブタノール、mM	モル収率、%
MG1655 a	高	0.11	0.2
MG1655 b	高	0.12	0.2
MG1655 a	中	0.13	0.3
MG1655 b	中	0.13	0.2
MG1655 a	低	0.15	0.4
MG1655 b	低	0.18	0.5

- ・ 値は HPLC 分析から判定された
- ・ 株接尾辞の「a」および「b」は別個の単離物を示す

【0205】

培地が 5 g / L 酵母抽出物を含有したこと以外は同一の様式で、MG1655 (DE3) 1.5Gl-yqhD::Cm/pTrc99a-E-C-H-T/pBHR T7-ald の 2 つの独立した単離物を 1-ブタノール生成について試験した。結果を表 7 に示す。

【0206】

【表 20】

表 7

大腸菌 MG1655(DE3)1.5Gl-yqhD::Cm/
pTrc99a-E-C-H-T/pBHR T7-ald 株による 1-ブタノール生成

株	O ₂ レベル	1-ブタノール、mM	モル収率、%
MG1655 a	高	-	-
MG1655 b	高	-	-
MG1655 a	中	0.08	0.1
MG1655 b	中	0.06	0.1
MG1655 a	低	0.14	0.3
MG1655 b	低	0.14	0.3

- ・ 定量的値は HPLC 分析から判定された
- ・ 「-」=検出されず
- ・ 株接尾辞の「a」および「b」は別個の単離物を示す

【0207】

大腸菌 (E. coli) BL21 (DE3) 1.5GI-yqhD::Cm株をプラスミド pTrc99a-E-C-H-T および pBHR T7-ald で形質転換し、BL21 (DE3) 1.5GI-yqhD::Cm/pTrc99a-E-C-H-T/pBHR T7-ald 株を生成した。上述したのと全く同じようにして、2つの独立した単離物を 1-ブタノール生成について試験した。結果を表8および9に示す。

【0208】

【表21】

表8

大腸菌 BL21(DE3)1.5GI-yqhD::Cm/
pTrc99a-E-C-H-T/pBHR T7-ald 株による 1-ブタノール生成

株	O ₂ レベル	1-ブタノール、mM	モル収率、%
DEa	高	+	+
DEb	高	-	-
DEa	中	0.80	1.4
DEb	中	0.77	1.4
DEa	低	0.06	0.2
DEb	低	0.07	0.2

- ・ 定量的値は HPLC 分析から判定された
- ・ 「-」は検出されなかったことを示す
- ・ 「+」は検出限界が HPLC よりも低い GC による陽性の定性的同定を示す
- ・ 株接尾辞の「a」および「b」は別個の単離物を示す

【0209】

【表 2 2】

表 9
大腸菌 BL21(DE3)1.5GI-yqhD::Cm/
pTrc99a-E-C-H-T/pBHR T7-ald 株による 1-ブタノール生成

株	O ₂ レベル	1-ブタノール、mM	モル収率、%
DEa	高	+	+
DEb	高	+	+
DEa	中	0.92	1.7
DEb	中	1.03	1.9
DEa	低	+	+
DEb	低	+	+

- ・ 定量的値は HPLC 分析から判定された
- ・ 「-」は検出されなかったことを示す
- ・ 「+」は検出限界が HPLC よりも低い GC による陽性の定性的同定を示す
- ・ 株接尾辞の「a」および「b」は別個の単離物を示す

【0 2 1 0】

大腸菌 (E. coli) MG1655 1.5GI-yqhD::Cm 株をプラスミド pTrc99a-E-C-H-T および pBHR-Ptrc-ald (opt) で形質転換して、MG1655 1.5GI-yqhD::Cm/pTrc99a-E-C-H-T/pBHR-Ptrc-ald (opt) 株を生成した。50 μg/mL カナマイシンおよび 100 μg/mL カルベニシリンを含有する LB 培地中で、2つの単離物を最初に生育させた。細胞を使用して、50 および 150 mL の TM3a/グルコース培地（適切な抗生物質を添加した）を含有する振盪フラスコ（総容積およそ 175 mL）に接種した。フラスコを ≤ 0.04 単位の開始 OD₅₅₀ で接種し、誘導ありまたはなしで上述のようにインキュベートした。IPTG を 0.4 mM の最終濃度に添加した。添加時のフラスコの OD₅₅₀ は、0.6 ~ 1.2 単位の間であった。この場合、IPTG 誘導性プロモーターの漏出および 1.5GI プロモーターの構成的性質のため、1-ブタノール経路遺伝子発現のために誘導は必要でなかった。しかし誘導はより幅広い発現を提供した。

【0 2 1 1】

誘導のおよそ 15 時間後、上述のように 1-ブタノール含量について、炎光イオン化検出付き GC によってブロスのアリコート进行分析した。結果を表 10 に示す。組み換え大腸菌 (E. coli) 株では、全例で 1-ブタノールが生成された。別の実験では、野性型大腸菌 (E. coli) 株は、検出可能な 1-ブタノールを生成しないことが示された（データ示さず）。

【0 2 1 2】

【表 2 3】

表 10

大腸菌 MG1655 1.5GI-yqhD::Cm/pTrc99a-E-C-H-T/
pBHR-Ptrc-ald(opt)株による 1-ブタノール生成

株	O ₂ レベル	1-ブタノール、mM	IPTG 誘導
MG1655 a	中	0.14	No
MG1655b	中	0.14	No
MG1655 a	中	0.03	Yes
MG1655b	中	0.07	Yes
MG1655 a	低	0.04	No
MG1655b	低	0.04	No
MG1655 a	低	0.02	Yes
MG1655b	低	0.03	Yes

・株接尾辞の「a」および「b」は別個の単離物を示す

【0 2 1 3】

実施例 1 4

組み換え枯草菌 (*B. subtilis*) を使用したグルコースからの 1-ブタノール生成

本実施例は、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 中での 1-ブタノール生成について述べる。6つの酵素活性をコードする 1-生合成経路の 6つの遺伝子を発現のための 2つのオペロンに分割し、経路の最初の 3つの遺伝子 (*thl*、*hbd*、および *cr*) を枯草菌 (*Bacillus subtilis*) BE1010 染色体中に組み込んだ (ペイン (Payne) およびジャクソン (Jackson)、J. Bacteriol. 173: 2278~2282 頁、1991 年)。最後の 3つの遺伝子 (*EgTER*、*ald*、および *bdb*) を発現プラスミド中にクローニングして、組み込まれた 1-ブタノール遺伝子を保有するバチルス (*Bacillus*) 株に形質転換した。

【0 2 1 4】

テキスト中特に断りのない限り、本実施例で述べられるクローニングプライマーは、表 4 中のそれらの配列番号によって参照され、配列決定および PCR スクリーニングプライマーは、表 5 中のそれらの配列番号によって参照される。

【0 2 1 5】

組み込みプラスミド

プラスミド pFP988 は、pBR322 からの大腸菌 (*E. coli*) レプリコンと、大腸菌 (*E. coli*) 中での選択のためのアンピシリン抗生物質マーカーと、相同的組換えによってベクターおよび介在配列の組み込みを指示するバチルス (*Bacillus*) 染色体中の *sacB* 遺伝子に対する相同性がある 2つのセクションとを含有するバチルス (*Bacillus*) 組み込みベクターである。*sacB* 相同性領域の間に、クローニングされた遺伝子の合成および分泌を指示できる *Pamy* プロモーターおよびシグナル配列、*His-Tag*、バチルス (*Bacillus*) の選択可能なマーカーとしてのエリスロマイシンがある。*Pamy* プロモーターおよびシグナル配列は、バチルス・アミロリケファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*) α アミラ

ーゼに由来する。プロモーター領域はまた、lacIリプレッサータンパク質による発現調節のためのlacO配列を含有する。pFP988 (6509bp)の配列は配列番号79で示される。

【0216】

1-ブタノール経路遺伝子は細胞質中で発現させる予定であったため、アミラーゼシグナル配列を消去した。プラスミドpFP988をプライマーPamy/lacO FおよびPamy/lacO Rで増幅して、Pamy/lacO プロモーターを含有する317bp (0.3kbp)生成物を作り出した。Pamy/lacO Fの5'末端にはBsrGI制限部位が組み込まれ、EcoRI部位がそれに続いた。Pamy/lacO Rプライマーの5'末端にはBsrGI制限部位が組み込まれ、PmeI制限部位がそれに続いた。PCR産物をpCR4Blunt-TOPO中にTOPOクローニングして、pCR4Blunt-TOPO-Pamy/lacOを作り出した。一晚培養物からプラスミドDNAを調製して、M13フォワードおよびM13リバースプライマー（それぞれ配列番号45および配列番号46）で配列決定して、突然変異がプロモーター中に導入されなかったことを確実にした。pCR4Blunt-TOPO-Pamy/lacOのクローンをBsrGIで消化して、0.3kbpの断片をゲル精製した。ベクターpFP988をBsrGIで消化して、5'sacB相同性領域からの11bpの欠失、およびPamy/lacOプロモーターおよびシグナル配列およびHis-tagの除去をもたらした。6kbpのBsrGI消化ベクターをゲル精製して、Pamy/lacO BsrGI挿入断片とライゲートした。得られたプラスミドをプライマーPamy Seq F 2およびPamy Seq Rでスクリーンし、プロモーターの方向を判定した。正しいクローンは、Pamy/lacO プロモーターをその元の方向に復元し、pFP988Dssと命名された。

【0217】

SOE（オーバーラップ伸長によるスプライシング）によって、遺伝子thl-crtのカセットを構築した。テンプレートとしてpUC19dss::Operon1を使用して、遺伝子を増幅した。thlプライマーは、0.9kbp生成物を増幅するトップTFおよびBot TRであった。crtプライマーは、1.3kbp生成物を増幅するトップCFおよびBot CRであった。プライマートップTFおよびBot CRを使用したPCR増幅でSOEによって2つの遺伝子を結合し、2.1kbp生成物を発生させ、それをpCR4Blunt-TOPO中にTOPOクローニングしてpCR4Blunt-TOPO-T-Cを作り出した。クローンを配列決定して配列確認した。プラスミドpCR4Blunt-TOPO-T-CをBstEIIおよびPmeIで消化して、2.1kbpの断片を放出し、それをゲル精製した。挿入断片をクレノウ（Klenow）ポリメラーゼで処理して、BstEII部位を平滑化した。ベクターpFP988DssをPmeIで消化し、ニュー・イングランド・バイオラブズ（New England Biolabs）からの仔ウシ腸管アルカリホスファターゼで処理して自己ライゲーションを防止した。2.1kbp thl-crt断片と消化されたpFP988Dssとをライゲートして、大腸菌（E. coli）Top10細胞に形質転換した。Pamy Seq F 2およびN7 Seq R 2でのPCR増幅によって、0.7kbp生成物について形質転換体をスクリーンし、正しい生成物をpFP988Dss-T-Cと称した。

【0218】

thl-crtカセットの構築は、2つの遺伝子間に固有のSalIおよびSpeI部位を作り出した。hbd遺伝子のカセットに付加するために、hbd遺伝子をpCR4Blunt-TOPO-hbdから0.9kbp SalI/SpeI断片としてサブクローニングした。ベクターpFP988Dss-T-CをSalIおよびSpeIで消化し、8kbpベクター断片をゲル精製した。ベクターとhbd挿入断片とをライゲートして、大腸菌（E. coli）Top10細胞に形質転換した。プライマーPamy Seq F およびN3 Seq F 3でのPCR増幅によって形質転換体を3.0kbpの断片についてスクリーンした。得られたプラスミドをpFP988Dss-T-H-Cと命名した。

【0219】

続いてPamyプロモーターをプラスミドpMUTIN4からのPspacプロモーターで置換した(ヴァグネル(Vagner)ら、Microbiol. 144:3097~3104頁、1998年)。プライマーSpacFおよびSpacRでPspacプロモーターをpMUTIN4から0.4kbp生成物として増幅し、pCR4Blunt-TOPO中にTOPOクローニングした。M13フォワードおよびM13リバースプライマーでのPCR増幅によって、形質転換体を0.5kbp挿入断片の存在についてスクリーンした。同一プライマーで陽性クローンを配列決定した。プラスミドpCR4Blunt-TOPO-PspacをSmaIおよびXhoIで消化し、0.3kbpの断片をゲル精製した。ベクターpFP988Dss-T-H-CをSmaIおよびXhoIで消化し、9kbpベクターをゲル精製によって単離した。消化されたベクターとPspac挿入断片とをライゲートして、大腸菌(E. coli) Top10細胞に形質転換した。プライマーSpacF SeqおよびN7SeqR2でのPCR増幅によって形質転換体をスクリーンした。陽性クローンは0.7kbpの生成物を与えた。陽性クローンからプラスミドDNAを調製し、プライマーSpacF SeqおよびN3SeqF2でのPCR増幅によってさらにスクリーンした。陽性クローンは3kbp PCR産物を与えて、pFP988DssPspac-T-H-Cと命名された。

10

【0220】

外来性thl、hbd、およびcrt遺伝子を含んでなる枯草菌(B. subtilis) ΔsacB::T-H-C::erm#28を形成するための枯草菌(B. subtilis) BE1010中への組み込み

20

Doyleら、J. Bacteriol. 144:957~966頁、1980年、で述べられるようにして、枯草菌(B. subtilis) BE1010のコンピテント細胞を調製した。コンピテント細胞を遠心分離によって収集し、細胞ペレットを少量の細胞上清に再懸濁した。1容積のコンピテント細胞に対して、2容積のSPII-EGTA培地(P. Gerhardtら編「一般および分子細菌学方法(Methods for General and Molecular Bacteriology)」米国微生物学会、Washington, DC、1994年)を添加した。細胞の0.3mLのアリコートを試験管内に分配して、プラスミドpFP988DssPspac-T-H-Cを試験管に添加した。細胞を振盪しながら37℃で30分間インキュベートし、その後0.1mLの10%酵母抽出物を各試験管に添加して、細胞をさらに60分間インキュベートした。二重寒天オーバーレイ法を使用して、形質転換体を選択のためにLBエリスロマイシンプレート上に播種した(「一般および分子細菌学方法(Methods for General and Molecular Bacteriology)」、前出)。プライマーPamy SeqFおよびN5SeqF3でのPCR増幅によって、形質転換体を最初にスクリーンした。予想された2kbp PCR産物を増幅した陽性クローンをPCR増幅によってさらにスクリーンした。ダブルクロスオーバー事象を通じて、染色体中へのカセットの挿入が起きた場合、プライマーセットsacBUpおよびN7SeqR2、およびプライマーセットsacBDnおよびN4SeqR3は、それぞれ1.7kbpおよび2.7kbp生成物を増幅する。陽性クローンを同定して、枯草菌(B. subtilis) ΔsacB::T-H-C::erm#28と命名した。

30

40

【0221】

EgTER、ald、およびbdhB遺伝子のプラスミド発現

残る3つの1-ブタノール遺伝子をモビテック(MoBitec)からのプラスミドpHT01から発現した。プラスミドpHT01は、シータ機序を通じて複製するバチルス(Bacillus)-大腸菌(E. coli)シャトルベクターである。クローニングされたタンパク質は、lacO配列に縮合したGroELプロモーターから発現される。lacOの下流はgsiB遺伝子からの効率的なRBSであり、MCSがそれに続く。テンプレートとしてpUC19dHS-ald-bdhB(実施例9で述べられる)を使用し、プライマーAFBamHIおよびARAat2でのPCRによってald遺伝子を増

50

幅して、1.4 kbp 生成物を作り出した。生成物を pCR4-TOPO 中に TOPO クローニングして、大腸菌 (*E. coli*) Top10 細胞に形質転換した。形質転換体を M13 フォワードおよび M13 リバースプライマーでスクリーンした。陽性クローンは、1.6 kbp 生成物を増幅した。クローンをプライマー M13 フォワードおよび M13 リバース、N31 Seq F2、N31 Seq F3、N32 Seq R2、N32 Seq R3、および N32 Seq R4 で配列決定した。プラスミドを pCR4-TOPO-B/A-ald と命名した。

【0222】

ベクター pHT01 およびプラスミド pCR4-TOPO-B/A-ald をどちらも BamHI および AatII で消化した。7.9 kbp ベクター断片と 1.4 kbp ald 断片とを共にライゲートして、pHT01-ald を作り出した。ライゲーションを大腸菌 (*E. coli*) Top10 細胞に形質転換し、プライマー N31 Seq F1 および HT-R での PCR 増幅によって、形質転換体を 1.3 kbp 生成物についてスクリーンした。

【0223】

pHT01 ベクターへの経路の最後の 2 ステップに付け加えるために、2 つのクローニングスキームをデザインした。どちらのスキームでも、SOE によって EgTER および bdhB が共に増幅された。続いて、EgTER-bdhB 断片を pHT01-ald 中にクローニングして pHT01-ald-EB を作り出し、あるいは pCR4-TOPO-B/A-ald 中にクローニングして pCR4-TOPO-ald-EB を作り出した。次に TOPO ベクターからの ald-EgTer-bdhB 断片を pHT01 中にクローニングして、pHT01-AEB を作り出した。

【0224】

配列番号 208 で示されるテンプレート DNA を使用して、プライマーフォワード 1 (E) およびリバース 2 (B) を使用して、EgTER-bdhB 断片を PCR 増幅した。得られた 2.5 kbp の PCR 産物を pCR4 Blunt-TOPO 中に TOPO クローニングして、pCR4 Blunt-TOPO-E-B を作り出した。TOPO 反応物を大腸菌 (*E. coli*) Top10 細胞に形質転換した。M13 フォワードおよび M13 リバースプライマーでの PCR 増幅によって、コロニーをスクリーンした。陽性クローンは 2.6 kbp 生成物を発生させた。プライマー M13 フォワードおよびリバース、N62 Seq F2、N62 Seq F3、N62 Seq F4、N63 Seq R1、N63 Seq R2、N63 Seq R3、N11 Seq F1 および N11 Seq F2、N12 Seq R1 および N12 Seq R2 で、pCR4 Blunt-TOPO-E-B のクローンを配列決定した。

【0225】

プラスミド pCR4 Blunt-TOPO-E-B を HpaI および AatII で消化して、2.4 kbp の断片を放出した。E-B 断片をクレノウ (Klenow) ポリメラーゼで処理して平滑末端化し、次にゲル精製した。プラスミド pHT01-ald を AatII で消化し、クレノウ (Klenow) ポリメラーゼで処理して平滑末端化した。次にベクターを仔ウシ腸管アルカリホスファターゼで処理してゲル精製した。E-B 断片を直線化ベクター pHT01-ald にライゲートして、大腸菌 (*E. coli*) Top10 細胞に形質転換し、100 µg/mL アンピシリン含有 LB プレート上で選択した。プライマー N31 Seq F1 および N63 Seq R1 での PCR 増幅によって形質転換体をスクリーンし、2.4 kbp 生成物を得た。得られたプラスミド pHT01-ald-EB を recA⁺ 大腸菌 (*E. coli*) 株である JM103 細胞に形質転換した。recA⁺ 株から調製されたプラスミドは、recA⁻ 株よりも多くの多量体を形成する。枯草菌 (*Bacillus subtilis*) は、プラスミド単量体よりもむしろ多量体でより効率的に形質転換する (「一般および分子細菌学方法 (Methods for General and Molecular Bacteriology)」、前出)。プラスミド DNA を JM103 から調製してコンピテント枯草菌 (*B. subtilis*)

$\Delta sacB::T-H-C::erm\#28$ に形質転換し、枯草菌 (*B. subtilis*) $\Delta sacB::T-H-C::erm\#28/pHT01-ald-EB$ 株を形成した。前述のようにして、コンピテント細胞を調製し形質転換した。形質転換体を $5\mu g/mL$ クロラムフェニコール含有LBプレート上で選択し、プライマーN31SeqF1およびN63SeqR4でコロニーPCRによって、 $1.3kbp$ 生成物についてスクリーンした。

【0226】

代案のクローニング手法では、 $pCR4Blunt-TOPO-EB$ をHpaIおよびAatIIで消化して $2.4kbp$ の断片を放出し、それをゲル精製した。プラスミド $pCR4-TOPO-B/A-ald$ をHpaIおよびAatIIで消化し、 $5.4kbp$ ベクター断片をゲル精製した。 $pCR4-TOPO-B/A-ald$ からのベクター断片とHpaI-AatII-EB断片とをライゲートして、 $pCR4-TOPO-ald-EB$ を作り出した。ライゲーションを大腸菌 (*E. coli*) Top10細胞に形質転換し、プライマーN11SeqF2およびN63SeqR4でのPCR増幅によって得られた形質転換体を $2.1kbp$ 生成物についてスクリーンした。プラスミド $pCR4-TOPO-ald-EB$ をBamHIおよびAatIIおよびSphIで消化した。BamHI/AatII消化によって $3.9kbp$ $ald-EB$ 断片を放出し、それをゲル精製した。SphI消化の目的は、残るベクターが $ald-EB$ 挿入断片と共にゲル上で共遊走しないように、それをより小さな断片に切断することであった。ベクター $pHT01$ をBamHIおよびAatIIで消化し、 $7.9kbp$ ベクター断片をゲル精製した。ベクターと $ald-EB$ 挿入断片とをライゲートしてプラスミド $pHT01-AEB$ を形成し、大腸菌 (*E. coli*) Top10細胞に形質転換した。プライマーN62SeqF4およびHT RでのPCR増幅によって、コロニーを $1.5kbp$ 生成物についてスクリーンした。プラスミドを調製してJM103に形質転換した。プラスミドDNAをJM103から調製し、コンピテント枯草菌 (*B. subtilis*) $\Delta sacB::T-H-C::erm\#28$ に形質転換して、枯草菌 (*B. subtilis*) $\Delta sacB::T-H-C::erm\#28/pHT01-AEB$ 株を形成した。コンピテントBE1010細胞を調製し、前述のようにして形質転換した。プライマーN31SeqF1およびN63SeqR4でのPCR増幅によって、バチルス (*Bacillus*) 形質転換体を $1.3kbp$ 生成物についてスクリーンした。

【0227】

組み換え枯草菌 (*B. subtilis*) からの1-ブタノール生成の実証

枯草菌 (*B. subtilis*) $\Delta sacB::T-H-C::erm\#28/pHT01-ald-EB$ および枯草菌 (*B. subtilis*) $\Delta sacB::T-H-C::erm\#28/pHT01-AEB$ の各株の3つの独立した単離物を $15mL$ の培地を含有する振盪フラスコ (総容積およそ $175mL$) に接種した。外来性の1-ブタノールの6つの遺伝子経路を欠く枯草菌 (*B. subtilis*) BE1010株もまた、負の対照として含めた。培地は ($1L$ あたり) $10mL$ の $1M$ (NH_4)₂SO₄、 $5mL$ の $1M$ リン酸カリウム緩衝液 ($pH7.0$)、 $100mL$ の $1M$ MOPS/KOH緩衝液 ($pH7.0$)、 $20mL$ の $1M$ L-グルタミン酸カリウム塩、 $10g$ のグルコース、各 $10mL$ の $5g/L$ のL-メチオニンとL-トリプトファンとL-リジン、各 $0.1g$ の酵母抽出物とカザミノ酸、 $20mL$ の金属ミックス、および適切な抗生物質 (組み換え株のための $5mg$ のクロラムフェニコールおよびエリスロマイシン) を含有した。金属ミックスは、 $200mM$ のMgCl₂、 $70mM$ のCaCl₂、 $5mM$ のMnCl₂、 $0.1mM$ のFeCl₃、 $0.1mM$ のZnCl₂、 $0.2mM$ の塩酸チアミン、 $172\mu M$ のCuSO₄、 $253\mu M$ のCoCl₂、および $242\mu M$ のNa₂MoO₄を含有した。 ≤ 0.1 単位の開始OD₆₀₀でフラスコに接種して、非通気式キャップで密封し、およそ $200rpm$ で振盪しながら $37^\circ C$ でインキュベートした。

【0228】

接種のおよそ 24 時間後に、一般法セクションで述べられるようにして、屈折率 (RI

）検出付きHPLC（ショーデックス・シュガー（Shodex Sugar）SH1011カラム）、および蛍光イオン化検出（FID）付きGC（バリアン（Varian）CP-WAX 58（FFAP）CBカラム、0.25mm×0.2μm×25m）で、ブロスのアリコートに1-ブタノール含量について分析した。1-ブタノールの判定結果を表11に示す。

【0229】

【表24】

表 11

枯草菌 $\Delta sacB::T-H-C::erm\#28/pHT01-ald-EB$ 株および枯草菌 $\Delta sacB::T-H-C::erm\#28/pHT01-AEB$ 株による 1-ブタノール生成

株	1-ブタノール、 HPLC RI ピーク面積	1-ブタノール、mM *
BE1010 対照	検出されず	検出されず
pHT01-ald-EB a	4629	0.19
pHT01-ald-EB b	3969	判定されず
pHT01-ald-EBc	4306	判定されず
pHT01-AEB a	4926	0.16
pHT01-AEB b	3984	判定されず
pHT01-AEBc	3970	判定されず

・ * GC によって判定された濃度

・ 株接尾辞の「a」、「b」および「c」は別個の単離物を示す

【0230】

実施例 15

組み換え大腸菌（*E. coli*）によるグルコースまたはスクロースからの 1-ブタノール生成

1-ブタノール生成のために炭素およびエネルギー源としてスクロースを使用する能力を大腸菌（*E. coli*）MG1655に与えるために、プラスミド pScRI からスクロース使用遺伝子クラスター（*cscBKA*）（下述）をこの生物中の pBHR-Ptrc-ald（opt）（実施例 13 で述べられる）中にサブクロニングした。スクロース使用遺伝子（*cscA*、*cscK*、および *cscB*）は、配列番号 157 で示されるスクロースヒドロラーゼ（*CscA*）、配列番号 158 で示される D-フルクトキナーゼ（*CscK*）、および配列番号 159 で示されるスクロースパーミターゼ（*CscB*）をコードする。それらの天然プロモーターからの 3 つの遺伝子の構成的発現を可能にするために、遺伝子クラスターを調節するスクロース特定リプレッサー遺伝子 *cscR* はコンストラクト中に存在しない。

【0231】

プラスミド pBHR-Ptrc-ald（opt）中でのスクロース使用遺伝子クラスター *cscBKA* のクロニングおよび発現

大腸菌（*E. coli*）ATCC 13281 株に由来するスクロース利用大腸菌（*E. coli*）株のゲノム DNA から、配列番号 156 で示されるスクロース使用遺伝子クラスター *cscBKA* を単離した。ゲノム DNA を BamHI および EcoRI で完全に消化した。アガロースゲルから約 4 kbp の平均サイズを有する断片を単離して、マサ

10

20

30

40

50

チューセッツ州ベヴァリーのニュー・イングランド・バイオラブズ (New England Biolabs (Beverly, MA)) からのプラスミド pLitmus 28 にライゲートして、次にそれを BamHI および EcoRI で消化した。得られた DNA をカリフォルニア州カールスバッドのインビトロジェン (Invitrogen (Carlsbad, CA)) からのウルトラコンピテント大腸菌 (*E. coli*) TOP10F' に形質転換した。1% スクロースおよび 100 μ g/mL アンピシリン含有マッコンキー寒天プレート上に形質転換体を播種して、紫色のコロニーについてスクリーンした。紫色の形質転換体からプラスミド DNA を単離し、プライマー M13 フォワード (配列番号 45)、M13 リバース (配列番号 46)、scr1 (配列番号 160)、scr2 (配列番号 161)、scr3 (配列番号 162)、および scr4 (配列番号 163) を使用して配列決定した。cscB、cscK、および cscA (cscBKA) 遺伝子を含むプラスミドを pScr1 と称した。

10

【0232】

プラスミド pScr1 を XhoI で消化し、DNA ポリメラーゼのクレノウ (Klenow) 断片で処理して平滑末端を作った。次にプラスミドを AgeI で消化し、4, 179 bp の cscBKA 遺伝子クラスター断片をゲル精製した。実施例 13 で述べられるようにしてプラスミド pBHR-Ptrc-ald(opt) を調製し、AgeI および NaeI で消化した。得られた 6, 003 bp の pBHR-Ptrc-ald(opt) 断片をゲル精製した。cscBKA 断片を pBHR-Ptrc-ald(opt) とライゲートして、pBHR-Ptrc-ald(opt)-cscAKB を生じさせた。プラスミド pBHR-Ptrc-ald(opt)-cscAKB をウィスコンシン州マディソンのノバジェン (Novagen (Madison, WI)) からの大腸菌 (*E. coli*) NovaXG エレクトロコンピテント細胞に形質転換し、形質転換体を 2% スクロースおよび 25 μ g/mL カナマイシン含有マッコンキー寒天プレートに播種して、スクロース使用を確認した。pBHR-Ptrc-ald(opt)-cscAKB コンストラクトでは、スクロース使用遺伝子を cscA、cscK、および cscB の順に別個の断片として、Ptrc-ald(opt) 下流でクローニングした。

20

【0233】

あるいは、スクロース使用遺伝子を pBHR-Ptrc-ald(opt) 中で反対方向にクローニングした。プラスミド pBHR-Ptrc-ald(opt) を ScaI および AgeI で消化し、5, 971 bp pBHR-Ptrc-ald(opt) 断片をゲル精製した。上述のように調製された 4, 179 bp の cscBKA 断片と pBHR-Ptrc-ald(opt) 断片とをライゲートして、pBHR-Ptrc-ald(opt)-cscBKA を生じさせた。プラスミド pBHR-Ptrc-ald(opt)-cscBKA をウィスコンシン州マディソンのノバジェン (Novagen (Madison, WI)) からの大腸菌 (*E. coli*) NovaXG エレクトロコンピテント細胞に形質転換し、2% スクロースおよび 25 μ g/mL カナマイシン含有マッコンキー寒天プレートに形質転換体を播種して、スクロース使用を確認した。pBHR-Ptrc-ald(opt)-cscBKA コンストラクトでは、スクロース使用遺伝子を cscB、cscK、および cscA の順で別個の断片として、Ptrc-ald(opt) 下流でクローニングした。

30

40

【0234】

組み換え大腸菌 (*E. coli*) を使用したグルコースまたはスクロースからの 1-ブタノール生成の実証

大腸菌 (*E. coli*) MG1655 1.5GI-yqhD::Cm 株 (実施例 13 で述べられる) をプラスミド spTrc99a-E-C-H-T (実施例 13 で述べられるようにして調製される) および pBHR-Ptrc-ald(opt)-cscAKB または pBHR-Ptrc-ald(opt)-cscBKA で形質転換して、2つの株 MG1655 1.5GI-yqhD::Cm/pTrc99a-E-C-H-T/pBHR-Ptrc-ald(opt)-cscAKB #9、および MG1655 1.5G

50

I-yqhD::Cm/pTrc99a-E-C-H-T/pBHR-Ptrc-ald (opt)-cscBKA#1を生成した。25 µg/mLカナマイシンおよび100 µg/mLカルベニシリン含有LB培地中で細胞を生育させて、2つの株のスタータカルチャを調製した。次にこれらの細胞を使用して、実施例13で述べられるように、それぞれ高、中および低酸素条件に相当する50、70、および150 mLのTM3a/グルコース培地（適切な抗生物質を添加した）を含有する振盪フラスコ（総容積およそ175 mL）に接種した。100 µg/mLカルベニシリン含有TM3a/グルコース培地内で生育させた、第3の株である大腸菌（E. coli）MG1655/pScr1を負の対照として使用した。各株について、同一のフラスコセットをTM3a/スクロース培地（適切な抗生物質を添加した）で調製した。TM3a/スクロース培地は、スクロース（10 g/L）でグルコースを置換したこと以外は、TM3a/グルコース培地と同じである。実施例13で述べるようにして、 ≤ 0.03 単位の開始OD₅₅₀でフラスコを接種しインキュベートした。ただし負の対照フラスコでは、培養物が0.2~1.8単位の間のOD₅₅₀に達したら、フラスコにIPTGを添加した（最終濃度0.04 mM）。培養物のOD₅₅₀が少なくとも3倍に増大したら、細胞を収集した。

10

【0235】

接種のおよそ24時間後、一般法セクションで述べられるようにして、ブロスのアリコート屈折率（RI）検出付きHPLC（ショーデックス・シュガー（Shodex Sugar）SH1011カラム）、および炎光イオン化検出（FID）付きGC（HP-イノワックス（INNOWax）カラム、内径3.0 mm×0.53 mm、フィルム厚1 µm）で1-ブタノール含量について分析した。

20

【0236】

グルコースおよびスクロース含有培地中での生育に続く培養物中の1-ブタノール濃度をそれぞれ表12および表13に示す。どちらの組み換え大腸菌（E. coli）株も1-ブタノール生合成経路を含有し、全ての酸素条件下でグルコースおよびスクロースから1-ブタノールを生成するのに対し、負の対照株は検出可能な1-ブタノールを生成しなかった。

【0237】

【表 2 5】

表 12

組み換え大腸菌株 MG1655 1.5Gl-yqhD::Cm/pTrc99a-E-C-H-T/pBHR-Ptrc-ald(opt)-
 cscAKB #9 および MG1655 1.5Gl-yqhD::Cm/pTrc99a-E-C-H-T/pBHR-Ptrc-ald(opt)-
 cscBKA #1 によるグルコースからの 1-ブタノールの生成

株	O ₂ レベル	1-ブタノール、mM	モル収率、%
cscBKA # 1	高	0.01	0.03
cscBKA # 1	中	0.20	0.43
cscBKA # 1	低	0.07	0.21
cscAKB # 9	高	0.01	0.02
cscAKB # 9	中	0.17	0.35
cscAKB # 9	低	0.04	0.12
pScr1	高	検出されず	検出されず
pScr1	中	検出されず	検出されず
pScr1	低	検出されず	検出されず

【0 2 3 8】

【表 2 6】

表 13

組み換え大腸菌株によるスクロースからの 1-ブタノール生成

株	O ₂ レベル	1-ブタノール、mM	モル収率、%
cscBKA # 1	高	0.02	0.10
cscBKA # 1	中	0.02	0.11
cscBKA # 1	低	0.01	0.09
cscAKB # 9	高	0.03	0.11
cscAKB # 9	中	0.03	0.15
cscAKB # 9	低	0.02	0.10
pScr1	高	検出されず	検出されず
pScr1	中	検出されず	検出されず
pScr1	低	検出されず	検出されず

【0 2 3 9】

実施例 1 6

組み換え枯草菌 (B. subtilis) を使用したスクロースからの 1-ブタノール生

10

20

30

40

50

成

本実施例は、組み換え枯草菌 (*Bacillus subtilis*) を使用したスクロースからの 1-ブタノール生成について述べる。本質的に実施例 14 で述べるようにして、枯草菌 (*B. subtilis*) $\Delta sacB::T-H-C::erm\#28/pHT01-ald-EB$ 株 (実施例 14) の 2 つの独立した単離物を 1-ブタノール生成について調べた。20 mL または 100 mL の培地のどちらかを含有する振盪フラスコ (総容積およそ 175 mL) 内に株を接種して、それぞれ高および低酸素条件をシミュレートした。培地 A は、グルコースが 5 g/L スクロースで置換されたこと以外は、実施例 14 で述べられるのと全く同じであった。培地 B は、グルコースが 10 g/L スクロースで置換され、培地が (1 L あたり) 各 10 mL の 5 g/L の L-メチオニン、L-トリプトファン、および L-リジン溶液で栄養強化されたこと以外は、実施例 13 で述べられる TM 3a/グルコース培地と同一であった。 ≤ 0.1 単位の開始 OD_{550} でフラスコを接種し、通気式キャップでキャッピングして 300 rpm で振盪しながら 34 °C でインキュベートした。

10

【0240】

接種のおよそ 24 時間後、一般法セクションで述べられるようにして、ブロスのアリコートで FID 検出付き GC (HP-イノワックス (INNOWax) カラム、内径 3.0 mm $\times$ 0.53 mm、フィルム厚 1.0 μ m) で、1-ブタノール含量について分析した。1-ブタノールの判定結果を表 14 に示す。1-ブタノール生合成経路を含有する組み換えバチルス (*Bacillus*) 株は、どちらの培地中でも高および低酸素条件下で検出可能なレベルの 1-ブタノールを生成した。

20

【0241】

【表 27】

表 14
 枯草菌 Δ sacB::T-H-C::erm#28/pHT01-ald-EB 株による
 スクロースからの 1-ブタノール生成

株	培地	O ₂ レベル	1-BuOH、mM ^{1,2}
なし	A	該当せず	検出されず
pHT01-ald-EB a	A	高	+
pHT01-ald-EB b	A	高	+
pHT01-ald-EB a	A	低	0.01
pHT01-ald-EB b	A	低	0.01
なし	B	該当せず	検出されず
pHT01-ald-EB a	B	高	+
pHT01-ald-EB b	B	高	+
pHT01-ald-EB a	B	低	0.04
pHT01-ald-EB b	B	低	0.03

・¹ GC によって判定された濃度

・² 「+」は 1-ブタノールの定性的存在を示す

・株接尾辞の「a」および「b」は別個の単離物を示す

【0242】

実施例 17

組み換えサッカロミセス・セレヴィシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) を使用したグルコースおよびスクロースからの 1-ブタノール生成

本実施例は、酵母サッカロミセス・セレヴィシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 中での 1-ブタノール生成について述べる。1-ブタノール生合成経路のステップを触媒する酵素をコードする 6 つの遺伝子の内、5 つを 3 つの適合性酵母 2 ミクロン (2 μ) プラスミド中にクローニングして、サッカロミセス・セレヴィシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 中で同時発現した。「上流経路」は、アセチル-CoA アセチルトランスフェラーゼ (thlA, チオラーゼ)、3-ヒドロキシブチリル-CoA デヒドロゲナーゼ (hbd)、およびクロトナーゼ (crt) によって触媒される最初の 3 つの酵素的ステップと定義した。下流経路は、経路の第 4 (ブチル-CoA デヒドロゲナーゼ、ter) および第 5 (ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ、ald) の酵素的ステップと定義した。1-ブタノール経路の最後の酵素的ステップはアルコールデヒドロゲナーゼによって触媒され、それは例えば adhI および adhII などの内在性酵母遺伝子によってコードされてもよい。

【0243】

酵母中での遺伝子発現は典型的にプロモーターを必要とし、対象とする遺伝子および転写ターミネーターがそれに続く。1-ブタノール生合成経路をコードする遺伝子発現カセットを構築する上で、FBA、GPD、および GPM プロモーターをはじめとする、いく

つかの構成的酵母プロモーターを使用した。例えばGAL1、GAL10、CUP1などのいくつかの誘導性プロモーターもまた中間体プラスミド構築で使用したが、最終実証株では使用しなかった。FBAt、GPDt、GPMt、ERG10t、およびGAL1tをはじめとするいくつかの転写ターミネーターも使用した。最初にプロモーターおよびターミネーターが側面にある酵母プラスミド中に、1-ブタノール生合成経路をコードする遺伝子をサブクローニングして、各遺伝子の発現カセットを生成した。発現カセットは下で述べられるように、場合によりギャップ修復クローニングによって単一ベクター中で組み合わせた。例えば上流経路をコードする3つの遺伝子カセットを酵母2 μ プラスミド中にサブクローニングした。terおよびald遺伝子は、2 μ プラスミド中でそれぞれ個々に発現された。単一酵母株中での3つの全プラスミドの同時形質転換は、機能性1-ブタノール生合成経路をもたらした。あるいはギャップ修復クローニングによって、プロモーター、遺伝子、およびターミネーターをコードするいくつかのDNA断片を単一ベクター中で直接組み合わせた。

10

【0244】

酵母サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae* 中) でプラスミドおよび株を構築する方法

形質転換、細胞生育、遺伝子発現、ギャップ修復遺伝子組み換えなどをはじめとする基本的酵母分子生物学プロトコルについては、クリスティン・ガスリー (Christine Guthrie) およびジェラルドR. フィンク (Gerald R. Fink) 編、「酵素学における方法 (Methods in Enzymology)」、第194巻、「酵母の遺伝学と分子および細胞生物学ガイド (Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology)」(パートA)、Elsevier Academic Press、San Diego, CA) 2004年、で述べられる。

20

【0245】

本実施例で使用されるプラスミドは、メリーランド州ロックビルの米国微生物系統保存機関 (American Type Culture Collection (Rockville, MD) からの大腸菌 (*E. coli*) -S. セレビシエ (*cerevisiae*) シャトルベクター、pRS423、pRS424、pRS425、およびpRS426であり、それは大腸菌 (*E. coli*) 複製基点 (例えばpMB1)、酵母2 μ 複製起点、および栄養的選択のためのマーカーを含む。これらの4つのベクターの選択マーカーは、His3 (ベクターpRS423)、Trp1 (ベクターpRS424)、Leu2 (ベクターpRS425)、およびUra3 (ベクターpRS426) である。これらのベクターは、大腸菌 (*E. coli*) および酵母株の双方の中での株増殖を可能にする。アラバマ州ハンツビルのリサーチ・ジェネティックス (Research Genetics (Huntsville, AL)) から酵母半数体株BY4741 (MATa his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0) (ATCC 201388からもまた入手できる)、およびアラバマ州ハンツビルのリサーチ・ジェネティックス (Research Genetics (Huntsville, AL)) から二倍体株BY4743 (MATa/ α his3 Δ 1/his3 Δ 1 leu2 Δ 0/leu2 Δ 0 lys2 Δ 0/LYS2 MET15/met15 Δ 0 ura3 Δ 0/ura3 Δ 0) (ATCC 201390からもまた入手できる) を遺伝子クローニングおよび発現のための宿主として使用した。大腸菌 (*E. coli*) 中での標準分子クローニング技術、または酵母中でのギャップ修復遺伝子組み換え法のどちらかによって、1-ブタノール生合成経路酵素をコードする遺伝子のための発現ベクターの構築を実施した。

30

40

【0246】

ギャップ修復クローニングアプローチは、酵母中での高度に効率的な相同的組換えを活用する。典型的に酵母ベクターDNAは消化されて (例えばその複数クローニング部位内に)、その配列中に「ギャップ」を作り出す。5' および 3' 末端の双方に ≥ 21 bp配

50

列を含有する、対象とするいくつかの挿入DNAが生じ、それは連続的に互いに重なり、ベクターDNAの5'および3'末端と重なる。例えば「Gene X」の酵母発現ベクターを構築するために、酵母プロモーターおよび酵母ターミネーターを発現カセットのために選択する。プロモーターおよびターミネーターを酵母ゲノムDNAから増幅し、Gene Xをその生物源からPCR増幅し、あるいはGene X配列を含んでなるクローニングベクターから得る。直線化ベクター5'末端とプロモーター配列の間、プロモーターとGene Xの間、Gene Xとターミネーター配列の間、およびターミネーターと直線化ベクター3'末端の間には、少なくとも21bpの重複配列がある。次に「ギャップド」ベクターおよび挿入DNAを酵母株に同時形質転換し、SD最小ドロップアウト培地上に播種して、コロニーを培養生育について選択し、プラスミドDNAのミニプレッ

10

【0247】

酵母培養物は、グルコース（SD培地）とプラスミド上の栄養選択マーカの補完を可能にする適切な化合物混合物を含有する、YPD天然培地または合成最小ドロップアウト培地中で生育させた（「酵素学における方法（Methods in Enzymology）」、第194巻、「酵母の遺伝学と分子および細胞生物学ガイド（Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology）」（パートA）、Elsevier Academic Press、San Diego, CA）2004年）。SDドロップアウト培地中の糖構成成分は、2%グルコースであった。1-ブタノール生成のために、酵母培養物を2%スクロース添加合成最小ドロップアウト培地（SS培地）中でも生育させた。

20

【0248】

酵素活性分析のために、各株の単一コロニーをSD最小ドロップアウト培地を含有する新鮮なプレートに画線培養し、30℃で2日間インキュベートした。このプレート上の細胞を使用して、20mLのSDドロップアウト培地に接種し、125mL振盪フラスコ内で、250rpmで振盪しながら30℃で一晩生育させた。一晩培養物の光学濃度（OD₆₀₀）を測定し、1.0L振盪フラスコ内の250mLの同一培地で培養物をOD₆₀₀=0.1に希釈して、250rpmで振盪しながら30℃で、0.8~1.0の間のOD₆₀₀に生育させた。次に2000×gで10分間の遠心分離によって細胞を収集し、20mLの50mMトリス-HCl緩衝液（pH8.5）に再懸濁した。酵素アッセイを上述のように実施した。

30

【0249】

t h l Aおよびh b dの同時発現のためのプラスミドpNY102の構築

t h l Aおよびh b d遺伝子の同時発現のために、いくつかの二重発現ベクターを構築した。サッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）ERG10遺伝子は、t h l A遺伝子の機能性オルソログである。最初に酵母GAL1-GAL10分岐二重プロモーターである、GAL1ターミネーター（GAL1t）およびERG10ターミネーター（ERG10t）を使用して、ERG10およびh b dの二重ベクターを構築した。プライマーOT731（配列番号164）およびOT732（配列番号165）を使用して、サッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）BY4743株のゲノムDNAから、ERG10遺伝子-ERG10t DNA断片をPCR増幅した。酵母GAL1-GAL10分岐プロモーターはまた、プライマーOT733（配列番号166）およびOT734（配列番号167）を使用して、PCRによってBY4743ゲノムDNAから増幅した。PCRプライマーOT735（配列番号168）およびOT736（配列番号169）を使用して、h

40

50

b d 遺伝子を大腸菌 (*E. coli*) プラスミド pTrc99a-E-C-H-T (実施例 13 で述べられる) から増幅した。プライマー OT737 (配列番号 170) および OT738 (配列番号 171) を使用して、GAL1t を BY4743 ゲノム DNA から増幅した。このようにして各隣接する PCR 断片間におよそ 25 bp の重複配列がある 4 つの PCR 断片、erg10-ERG10t、GAL1-GAL10 プロモーター、hbd、および GAL1t が得られた。GAL1t および ERG10-ERG10t 断片は、それぞれ酵母ベクター pRS425 とおよそ 25 bp の重複配列を含有する。これらの配列をギャップ修復遺伝子組み換えによってアセンブルするために、BamHI および HindIII 酵素で消化したベクター pRS425 と共に、DNA 断片を酵母 BY4741 株に同時形質転換した。SD-Leu 最小プレートからコロニーを選択し、挿入断片があるクローンを PCR 増幅によって同定した。新しいプラスミドを pNY6 (pRS425. ERG10t-erg10-GAL10-GAL1-hbd-GAL1t) と命名した。制限酵素マッピングによって、さらなる確認を実施した。

【0250】

プラスミド pNY6 を *S. cerevisiae* (BY4741) に形質転換して調製された酵母 BY4741 (pNY6) 株は、良好な Hbd 活性を示したが、チオラーゼ活性は示さなかった。チオラーゼ活性の欠損のために、ギャップ修復遺伝子組み換えによって、ERG10 遺伝子を thlA 遺伝子で置換した。SphI 制限部位を付加するプライマー OT797 (配列番号 172)、および AscI 制限部位を付加する OT798 (配列番号 173) を使用した PCR によって、thlA 遺伝子が大腸菌 (*E. coli*) ベクター pTrc99a-E-C-H-T から増幅した。プラスミド pNY6 を SphI および PstI 制限酵素で消化し、ゲル精製して、thlA の PCR 産物と共に酵母 BY4741 に同時形質転換した。thlA の PCR 産物と消化された pNY6 間の 30 bp の重複配列のために、GAL10 プロモーターと ERG10t ターミネーターの間で、pNY6 に thlA 遺伝子を遺伝子組み換えした。これによってプラスミド pNY7 (pRS425. ERG10t-thlA-GAL10-GAL1-hbd-GAL1t) が生じ、これは PCR および制限酵素マッピングによって確認された。

【0251】

引き続きギャップ修復遺伝子組み換えに基づくクローニングステップでは、pNY7 中の GAL10 プロモーターを CUP1 プロモーターで置換し、GAL1 プロモーターを強力な GPD プロモーターで置換した。このプラスミド pNY10 (pRS425. ERG10t-thlA-CUP1-GPD-hbd-GAL1t) は、銅誘導性プロモーターである CUP1 下での thlA 遺伝子の発現、および GPD プロモーター下での hbd 遺伝子の発現を可能にする。プライマー OT806 (配列番号 174)、および OT807 (配列番号 175) を使用して、酵母 BY4743 ゲノム DNA から CUP1 プロモーター配列を PCR 増幅した。プライマー OT808 (配列番号 176) および OT809 (配列番号 177) を使用して、GPD プロモーターを BY4743 ゲノム DNA から増幅した。CUP1 および GPD プロモーターの PCR 産物を NcoI および SphI 制限酵素で消化した pNY7 プラスミドと組み合わせた。このギャップ修復クローニングステップから、プラスミド pNY10 を構築し、それを PCR および制限酵素マッピングによって確認した。pNY10 を含有する酵母 BY4741 株は、Hbd 活性を有したが ThlA 活性は有さなかった。GPD プロモーター下の Hbd 活性は、GAL1 プロモーター制御 Hbd 活性と比べて顕著に改善された (1.8 U/mg 対 0.40 U/mg)。配列決定分析からは、pNY10 中の thlA 遺伝子が 3' 末端近くで 1 塩基の欠失を有し、それが短縮タンパク質をもたらすことが明らかになった。これが株中のチオラーゼ活性欠損を説明する。

【0252】

プラスミド pNY12 を正しい thlA 遺伝子配列で構築した。SphI および AscI での消化によってベクター pTrc99a-E-C-H-T から thlA 遺伝子を切断した。プライマー OT799 (配列番号 178) および OT761 (配列番号 179) を

10

20

30

40

50

使用してFBA1プロモーターをBY4743ゲノムDNAからPCR増幅し、SalIおよびSphI制限酵素で消化した。thlA遺伝子断片およびFBA1プロモーター断片をAscIおよびSalI部位でプラスミドpNY10中にライゲートしてプラスミドpNY12 (pRS425. ERG10t-thlA-FBA1)を発生させ、それを制限酵素マッピングによって確認した。pNY12を酵母BY4741株に形質転換し、得られた形質転換体は1.66 U/mgのThlA活性を示した。

【0253】

pNY12からのFBA1プロモーター-thlA遺伝子断片をpNY10中に再度サブクローニングした。pNY10ベクターをAscI制限酵素で切断し、プラスミドpNY12から単離されたAscI消化されたFBA1プロモーター-thlA遺伝子断片とライゲートした。これによって2つの可能な挿入断片方向がある新しいプラスミドを作り出した。互いに反対方向で隣接して位置するFBA1およびGPDプロモーターによるクロンを選択し、このプラスミドをpNY102と命名した。pNY102 (pRS425. ERG10t-thlA-FBA1-GPD-hbd-GAL1t)を制限酵素マッピングによって確認した。pNY102を酵母BY4741株に形質転換してDPD5206株を作った。DPD5206のThlA活性は1.24 U/mgであり、Hbd活性は0.76 U/mgであった。

【0254】

crt発現のためのプラスミドpNY11の構築

酵母におけるギャップ修復遺伝子組み換えを使用して、ベクターpRS426中でGPM1プロモーター、crt遺伝子、およびGPM1ターミネーターを組み合わせて、crt遺伝子発現カセットを構築した。プライマーOT803 (配列番号180)およびOT804 (配列番号181)を使用して、酵母BY4743ゲノムDNAからGPM1プロモーターをPCR増幅した。大腸菌 (E. coli) プラスミドpTrc99a-EC-H-TからのPCRプライマーOT785 (配列番号182)およびOT786 (配列番号183)を使用して、crt遺伝子を増幅した。OT787 (配列番号184)およびOT805 (配列番号185)を使用して、酵母BY4743ゲノムDNAからGPM1ターミネーターをPCR増幅した。酵母ベクターpRS426をBamHIおよびHindIIIで消化してゲル精製した。GPM1プロモーターPCR産物、crt遺伝子、およびGPM1ターミネーターで、このDNAを酵母BY4741コンピテント細胞に同時形質転換した。正しい挿入断片を有するクロンをPCRおよび制限酵素マッピングによって確認し、得られた酵母BY4741 (pNY11: pRS426-GPM1-crt-GPM1t)株は85 U/mgのCrt活性を有した。

【0255】

thlA、hbd、およびcrtの同時発現のためのプラスミドpNY103の構築

上流1-ブタノール経路酵素の同時発現のために、pNY11からのcrt遺伝子カセットをプラスミドpNY102中にサブクローニングして、hbd、thlA、およびcrt発現ベクターを作り出した。GPM1プロモーター、crt遺伝子、およびGPM1ターミネーターを含有する2,347bpのDNA断片をSacIおよびNotI制限酵素でプラスミドpNY11から切断し、ベクターpNY102中にクローニングして、それをNotIで消化し、部分的にSacIで消化し、発現ベクターpNY103 (pRS425. ERG10t-thlA-FBA1-GPD-hbd-GAL1t-GPM1t-crt-GPM1)を生成した。HindIIIでの消化によるpNY103中の全3つのカセット存在の確認に続き、プラスミドを酵母BY4743細胞に形質転換し、DPD5200と命名された酵母株に形質転換した。標準条件下で生育させた場合、DPD5200は、それぞれ0.49 U/mg、0.21 U/mg、および23.0 U/mgのThlA、Hbd、およびCrt酵素活性を示した。

【0256】

ald発現のためのプラスミドpNY8の構築

サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae

）の好ましいコドンを使用して、*Ter*タンパク質（配列番号187）をコードする *tery* と命名されたコドン最適化遺伝子（配列番号186）、および *Al*dタンパク質（配列番号189）をコードする *aldy*（配列番号188）と命名されたコドン最適化遺伝子を合成した。カリフォルニア州パロアルトのDNA2.0（*Palo Alto, CA*）により、コドン最適化 *ter* 遺伝子を含有するプラスミド *pTERy* とコドン最適化 *ald* 遺伝子を含有する *pALDy* が作られた。

【0257】

pNY8（*pRS426-GPD-ald-GPDt*）をアセンブルするために、ギャップ修復遺伝子組み換えクローニングを通じて、*GPD* プロモーターの *PCR* 産物（プライマー *OT800*（配列番号190）および *OT758*（配列番号191）、および *BY4743* ゲノムDNAから合成される）、*NcoI* および *SfiI* での消化によって *pALDy* から切除された *aldy* 遺伝子断片（配列番号188）、および *GPD* ターミナーの *PCR* 産物（プライマー *OT754*（配列番号192）および *OT755*（配列番号193）、および *BY4743* ゲノムDNAから合成される）を含む3つの挿入断片を *BamHI* と *HindIII* で消化された *pRS426* ベクターと遺伝子組み換えした。酵母 *BY4741* 形質転換クローンを *PCR* マッピングによって分析した。このようにして構築された新しいプラスミド *pNY8* を制限酵素マッピングによってさらに確認した。*pNY8* を含有する酵母 *BY4741* 形質転換体を *Al*d 活性について分析し、ブチリル-CoA に対する比活性はおよそ 0.07 U/mg であった。

【0258】

ter 発現のためのプラスミド *pNY9* および *pNY13* の構築

ギャップ修復クローニングによって、*FBA1* プロモーターの制御下で、コドン最適化 *tery* 遺伝子をベクター *pRS426* 中にクローニングした。プライマー *OT760*（配列番号194）および *OT792*（配列番号195）を使用して、酵母 *BY4743* ゲノムDNAから *FBA1* プロモーターを *PCR* 増幅した。*SphI* および *NotI* 制限酵素によるプラスミド *pTERy* の消化によって *tery* 遺伝子を得て、配列番号186で示される断片をもたらした。プライマー *OT791*（配列番号196）および *OT765*（配列番号197）を使用した *PCR* によって、酵母 *BY4743* ゲノムDNAから *FBA1* ターミナーの *PCR* 断片が発生した。*FBA1* プロモーター、*ter* 遺伝子、および *FBA1* ターミナーの3つのDNA断片と、*BamHI* および *HindIII* で消化された *pRS426* ベクターとを組み合わせ、ギャップ修復遺伝子組み換えによって酵母 *BY4741* に形質転換した。得られたプラスミド *pNY9*（*pRS426-FBA1-tery-FBA1t*）を *PCR* マッピングならびに制限酵素消化によって確認した。*pNY9* の酵母 *BY4741* 形質転換体からは、 0.26 U/mg の *Ter* 活性が生じた。

【0259】

最終1-ブタノール生合成経路株を作るために、それぞれが固有の栄養選択マーカーを有する、いくつかのプラスミドを含有する酵母発現株を構築することが必要であった。親ベクター *pRS426* は *Ura* 選択マーカーを含有したので、*His3* マーカーを含有するベクター *pRS423* 中に、*ter* 発現カセットをサブクローニングした。*FBA1-tery-FBA1t* カセットを含有する 3.2 kb 断片を *SacI* および *XhoI* 制限酵素での消化によってプラスミド *pNY9* から単離し、ベクター *pRS423* 中にライゲートして、それを同じ2つの酵素で切断した。新しいプラスミド *pNY13*（*pRS423-FBA1-tery-FBA1t*）を制限酵素消化によってマッピングした。*pNY13* を *BY4741* 株に形質転換し、形質転換体を *SD-His* 培地中で培養して、 0.19 U/mg の *Ter* 活性がある株を生じさせた。

【0260】

1-ブタノール生成を実証するための1-ブタノール生合成経路遺伝子を含有する酵母株の構築

上述のように、プラスミド *pNY103* を *S. cerevisiae*（*cerevisiae*）

10

20

30

40

50

BY4743株に形質転換して、*thlA*、*hbd*、および*crt*遺伝子の同時発現を可能にする酵母DPD5200株を構築した。上述のようにDPD5200の酵母コンピテント細胞を調製し、プラスミドpNY8およびpNY13をDPD5200に同時形質転換して、DPD5213株を生じさせた。DPD5213は、1-ブタノール生合成経路中の5つの遺伝子である*thlA*、*hbd*、*crt*、*ter*および*ald*の同時構成的発現を可能にする。DPD5212株（空のプラスミドpRS425およびpRS426で形質転換された*S. cerevisiae*）BY4743株）を負の対照として使用した。2%グルコースまたは2%スクロースどちらかの存在下、SD-Ura、-Leu、-Hisドロップアウト最少培地上でDPD5213株の4つの独立した単離物を生育させて、全3つのプラスミドの生育補完を可能にした。DPD5212に単一単離物も同様に適切な培地中で生育させた。

10

【0261】

好気性培養物による1-ブタノール生成を実証するために、SD最小ドロップアウト増殖培地（含有する2%グルコース）またはSS最小ドロップアウト増殖培地（含有する2%スクロース）を含有する新鮮な寒天プレート上に各株の単一コロニーを画線培養し、30℃で2日間インキュベートした。これらのプレートからの細胞を使用して、125mLプラスチック振盪フラスコ内の20mLの最小ドロップアウト培地（SDまたはSSのどちらか）に接種し、250rpmで振盪しながら30℃で一晩生育させた。一晩培養物の光学濃度（OD₆₀₀）を測定し、125mL振盪フラスコ内の25mLの同一培地で培養物を0.1のOD₆₀₀に希釈して、250rpmで振盪しながら30℃で生育させた。

20

【0262】

一般法セクションで述べられるようにして、FID検出による1-ブタノール生成のGC分析（HP-イノワックス（INNOWax）カラム、内径30m×0.53mm、フィルム厚1μm）のために、培養物のアリコートを実験後24時間および48時間除去した。GC分析の結果を表15に示す。

【0263】

【表 28】

表 15

S.セレヴィシエ DPD5213 株による
グルコースおよびスクロースからの 1-ブタノール生成

株 ¹	糖	24時間における 1-ブタノール、mg/L ²	48時間における 1-ブタノール、mg/L ²
DPD5212	グルコース	検出されず	検出されず
DPD5213 a	グルコース	0.4	0.5
DPD5213 b	グルコース	0.9	0.2
DPD5213 c	グルコース	1.0	0.6
DPD5213 d	グルコース	0.8	0.3
DPD5212	スクロース	検出されず	検出されず
DPD5213 a	スクロース	検出されず	1.7
DPD5213 b	スクロース	検出されず	1.3
DPD5213 c	スクロース	0.2	1.5
DPD5213 d	スクロース	0.6	0.9

・¹ 独立した単離物を a～d によって示す・² GC によって判定された濃度

【0264】

実施例 18（予測的）

ラクトバチルス・プランタルム（*Lactobacillus plantarum*）中
での 1-ブタノール生合成経路の発現

この予測的実施例の目的は、ラクトバチルス・プランタルム（*Lactobacillus plantarum*）中でどのように 1-ブタノール生合成経路を発現するかについて述べることである。6つの酵素活性をコードする 1-ブタノール経路の 6つの遺伝子を発現のために 2つのオペロンに分割する。ホルス（Hols）ら、*Appl. Environ. Microbiol.* 60:1401～1413 頁、1994 年、で述べられる方法を使用した相同的組換えによって、経路の最初の 3つの遺伝子（それぞれ酵素アセチル-CoA アセチルトランスフェラーゼ、3-ヒドロキシブチリル-CoA デヒドロゲナーゼ、およびクロトナーゼをコードする *thl*、*hbd*、および *crt*）をラクトバチルス・プランタルム（*Lactobacillus plantarum*）染色体中に組み込む。最後の 3つの遺伝子（それぞれ酵素ブチリル-CoA デヒドロゲナーゼ、ブチアルデヒドデヒドロゲナーゼ、およびブタノールデヒドロゲナーゼをコードする *EgTER*、*ald*、および *bdbB*）を発現プラスミド中にクローニングして、組み込まれた上流経路 1-ブタノール遺伝子を保有する乳酸桿菌（*Lactobacillus*）株に形質転換する。ミシガン州デトロイトのディフコ・ラボラトリーズ（*Difco Laboratories*（*Detroit, MI*））からの MRS 培地中で、乳酸桿菌（*Lactobacillus*）を 37℃で生育させる。モレイラ（*Moreira*）ら、*BMC Microbiol.* 5:15 頁、2005 年、で述べられるようにして、ラクトバチルス・プランタルム（*Lactobacillus plantarum*）から染色体 DNA を単離する。

10

20

30

40

50

【0265】

組み込み

相同的組換えによって、合成P11プロモーターの制御下にある $thl-hbd-crt$ カセット（(Rud)ら、*Microbiology* 152:1011~1019頁、2006年）をラクトバチルス・プランタルム（*Lactobacillus plantarum*）ATCC BAA-793（NCIMB8826）の染色体中に $ldhL$ 遺伝子座で組み込む。 $ldhL$ 組み込み標的ベクターを構築するために、 $ldhL$ と同一性があるラクトバチルス・プランタルム（*Lactobacillus plantarum*）（ジェンバンクNC_004567）からのDNA断片をプライマーLDHEC oRVF（配列番号198）およびLDHAat IIR（配列番号199）でPCR増幅する。1986bpのPCR断片をpCR4Blunt-TOPO中にクローニングして、配列決定する。pCR4Blunt-TOPO- $ldhL$ クローンをEcoRVおよびAat IIで消化して1982bpの $ldhL$ 断片を放出し、それをゲル精製する。実施例14で述べられる組み込みベクターpFP988をHind IIIで消化し、クレノウ（Klenow）DNAポリメラーゼで処理して末端を平滑化する。次に直線化プラスミドをAat IIで消化し、2931bpベクター断片をゲル精製する。EcoRV/Aat II $ldhL$ 断片とpFP988ベクター断片とをライゲートして、大腸菌（*E. coli*）Top10細胞に形質転換する。アンピシリン（100 μ g/mL）含有LB寒天プレート上で形質転換体を選択し、コロニーPCRによってスクリーンして、pFP988- $ldhL$ の構築を確認する。

10

20

【0266】

一体化DNAに選択可能なマーカーを付加するために、Cm遺伝子をそのプロモーターと共にpC194（ジェンバンクNC_002013）から、プライマーCmF（配列番号200）およびCmR（配列番号201）でPCR増幅して、836bpのPCR産物を増幅する。単位複製配列をpCR4Blunt-TOPO中にクローニングし、大腸菌（*E. coli*）Top10細胞に形質転換して、pCR4Blunt-TOPO-Cmを作り出す。配列決定してPCRによるエラーが導入されなかったことを確認した後、CmカセットをpCR4Blunt-TOPO-Cmから828bpのMlu I/Swa I断片として消化し、ゲル精製する。 $ldhL$ -同一性含有組み込みベクターpFP988- $ldhL$ をMlu IおよびSwa Iで消化し、4740bpベクター断片をゲル精製する。Cmカセット断片とpFP988- $ldhL$ ベクターとをライゲートして、pFP988-D $ldhL$::Cmを作り出す。

30

【0267】

最後に実施例14で述べられるpFP988Dss-T-H-Cからの $thl-hbd-crt$ カセットを改変して、アミラーゼプロモーターを合成P11プロモーターで置換する。次にオペロン全体をpFP988-D $ldhL$::Cm中に移動させる。プライマーP11F（配列番号202）およびP11R（配列番号203）とのオリゴヌクレオチドアニーリングによって、P11プロモーターを構築する。アニールされたオリゴヌクレオチドをカリフォルニア州サンディエゴのエンビ・テック（Embi Tec (San Diego, CA)）からの6%ウルトラPAGEゲル上でゲル精製する。プラスミドpFP988Dss-T-H-CをXho IおよびSma Iで消化し、9kbpベクター断片をゲル精製する。単離されたP11断片と、消化されたpFP988Dss-T-H-Cとをライゲートして、pFP988-P11-T-H-Cを作り出す。プラスミドpFP988-P11-T-H-CをXho IおよびBamHIで消化し、3034bp P11-T-H-C断片をゲル精製する。pFP988-D $ldhL$::CmをXho IおよびBamHIで消化し、5558bpベクター断片を単離する。上流経路オペロンと組み込みベクターとをライゲートして、pFP988-D $ldhL$ -P11-THC::Cmを作り出す。

40

【0268】

外来性 thl 、 hbd 、および crt 遺伝子を含んでなるL. プランタルム（*plant*

50

arum) $\Delta l d h L 1::T-H-C::Cm$ を形成するためのL. プランタルム (plantarum) BAA-793中へのpFP988-DldhL-P11-THC::Cmの組み込み

ニコロフ (Nickoloff), J. A. 編、「分子生物学における方法 (Methods in Molecular Biology)」より、第47巻、アウクルスト (Aukrust), T. W. ら、「微生物のための電気穿孔プロトコル (Electroporation Protocols for Microorganisms)」、Humana Press, Inc., Totowa, NJ、201~208頁、1995年、で述べられるようにして、L. プランタルム (plantarum) のエレクトロコンピテント細胞を調製する。電気穿孔後、アウクルスト (Aukrust) ら (前出) によって述べられるようにして、細胞をMRSSM培地 (0.5Mスクロースおよび0.1MMgCl₂で栄養強化されたMRS培地) 中で攪拌せずに37℃で2時間増殖させる。電気穿孔された細胞を選択のためにクロラムフェニコール (10μg/mL) 含有MRSPレート上に播種して、37℃でインキュベートする。形質転換体を最初にコロニーPCR増幅によってスクリーンして組み込みを確認し、次に最初の陽性クローンを一群のプライマーでのPCR増幅によってより厳密にスクリーンする。

10

【0269】

EgTER、ald、およびbdhB遺伝子のプラスミド発現

L. プランタルム (plantarum) l d h Lプロモーター (フェライン (Feain) ら、J. Bacteriol. 176:596~601頁、1994年) の制御下にあるプラスミドpTRKH3 (オサリバン (O'Sullivan) DJおよびクラエンハマー (Klaenhammer) TR, Gene 137:227~231頁、1993年) から、残る3つのl-ブタノール遺伝子を発現する。L. プランタルム (plantarum) ATCC BAA-793のゲノムから、l d h LプロモーターをプライマーPldhLF (配列番号204) およびPldhLR (配列番号205) でPCR増幅する。369bpのPCR産物をpCR4Blunt-TOPO中にクローニングして配列決定する。得られたプラスミドpCR4Blunt-TOPO-PldhLをSacIおよびBamHIで消化し、359bpのPldhL断片を放出する。

20

【0270】

実施例14で述べられるpHT01-ald-EBをSacIおよびBamHIで消化し、10503bpベクター断片をゲル精製によって回収する。PldhL断片とベクターとをライゲートして、pHT01-PldhL-ald-EBを作り出す。

30

【0271】

l d h Lプロモーター-ald-EgTER-bdhカセットをサブクローンするために、pHT01-PldhL-ald-EBをMluIで消化し、末端をクレノウ (Klenow) DNAポリメラーゼで処理する。直線化ベクターをSalIで消化し、PldhL-AEB断片を含有する4270bpの断片をゲル精製する。プラスミドpTRKH3をSalIおよびEcoRVで消化し、ゲル精製されたベクター断片とPldhL-AEB断片とをライゲートする。ライゲーション混合物を大腸菌 (E. coli) トップ10細胞に形質転換し、形質転換体をエリスロマイシン (150mg/L) を含有するミシガン州デトロイトのディフコ・ラボラトリーズ (Difco Laboratories, (Detroit, MI)) からの脳心臓浸出物 (BHI) プレート上に播種する。形質転換体をPCRによってスクリーンし、pTRKH3-ald-EBの構築を確認する。上述のように電気穿孔によって、発現プラスミドpTRKH3-ald-EBをL. プランタルム (plantarum) $\Delta l d h L 1::T-H-C::Cm$ に形質転換する。

40

【0272】

エリスロマイシン (10μg/mL) を添加した50mLのMRS培地を含有する250mL振盪フラスコに、pTRKH3-ald-EBを含有するL. プランタルム (plantarum) $\Delta l d h L 1::T-H-C::Cm$ を接種して、37℃で振盪せず

50

に18～24時間生育させる。18～24時間後、一般法セクションで述べられるようにしてHPLCまたはGC分析により、1-ブタノールを検出する。

【0273】

実施例19（予測的）

エンテロコッカス・フェカーリス（*Enterococcus faecalis*）中での1-ブタノール生合成経路の発現

この予測的実施例の目的は、エンテロコッカス・フェカーリス（*Enterococcus faecalis*）中でどのように1-ブタノール生合成経路を発現するかについて述べることである。本実施例において1-ブタノール生合成経路の発現のための宿主株として使用されるエンテロコッカス・フェカーリス（*Enterococcus faecalis*）V583株の完全なゲノム配列は公開されている（ポールセン（Paulsen）ら、*Science* 299：2071～2074頁、2003年）。大腸菌（*E. coli*）／グラム陽性シャトルベクターであるプラスミドpTRKH3（オサリバン（O'Sullivan）DJおよびクラエンハマー（Klaenhammer）TR, *Gene* 137：227～231頁、1993年）を、1オペロン中の1-ブタノール経路の6つの遺伝子（*thlA*、*hbd*、*crt*、*EgTER*、*ald*、*bdhB*）の発現のために使用する。pTRKH3は、大腸菌（*E. coli*）プラスミドp15A複製基点およびpAMβ1レプリコン、および2つの抗生物質抵抗性選択マーカーであるテトラサイクリン抵抗性およびエリスロマイシン抵抗性を含有する。テトラサイクリン抵抗性は大腸菌（*E. coli*）中でのみ発現し、エリスロマイシン抵抗性は大腸菌（*E. coli*）およびグラム陽性細菌の双方で発現する。プラスミドpAMβ1誘導体は*E. faecalis*（*faecalis*）中で複製できる（ポイヤー（Poyart）ら、*FEMS Microbiol. Lett.* 156：193～198頁、1997年）。エンテロコッカス・フェカーリス（*Enterococcus faecalis*）をはじめとする多様なグラム陽性細菌中でのナイシンによる遺伝子発現の効率的な制御のために使用される、誘導性*nisA*プロモーター（*PnisA*）（アイヘンバウム（Eichenbaum）ら、*Appl. Environ. Microbiol.* 64：2763～2769頁、1998年）を使用して、1-ブタノール生合成経路の酵素をコードする6つの所望の遺伝子の発現を制御する。

【0274】

ラクトコッカス・ラクティス（*Lactococcus lactis*）ゲノムDNAから、*nisA*プロモーターを含有する線状DNA断片（215bp）（チャンドラパティ（Chandrapati）ら、*Mol. Microbiol.* 46（2）：467～477頁、2002年）をプライマーF-P*nisA*（*EcoRV*）（配列番号206）およびR-P*nisA*（PmeI *BamHI*）（配列番号207）でPCR増幅する。215bpのPCR断片を*EcoRV*および*BamHI*で消化し、得られた*PnisA*断片をゲル精製する。プラスミドpTRKH3を*EcoRV*および*BamHI*で消化し、ベクター断片をゲル精製する。直線化pTRKH3と*PnisA*断片とをライゲートする。電気穿孔によってライゲーション混合物を大腸菌（*E. coli*）Top10細胞に形質転換し、エリスロマイシン（25μg/mL）含有LB寒天プレート上での37℃での一晚の生育に続いて、形質転換体を選択する。次に形質転換体をプライマーF-P*nisA*（*EcoRV*）およびR-P*nisA*（*BamHI*）でコロニーPCRによってスクリーンし、pTRKH3-P*nisA*の正しいクローンを確認する。

【0275】

プラスミドpTRKH3-P*nisA*をPmeIおよび*BamHI*で消化し、ベクターをゲル精製する。実施例14で述べられるようにしてプラスミドpHTO1-*ald*-*EgTER*-*bdhB*を構築し、*SmaI*および*BamHI*で消化し、2,973bpの*ald*-*EgTER*-*bdhB*断片をゲル精製する。2,973bpの*ald*-*EgTER*-*bdhB*断片をpTRKH3-P*nisA*ベクター中にPmeIおよび*BamHI*部位でライゲートする。電気穿孔によってライゲーション混合物を大腸菌（*E. coli*）T

o p 1 0 細胞に形質転換し、エリスロマイシン (25 μ g/mL) 含有LB寒天プレート上で37℃で一晩のインキュベーションに続いて、形質転換体を選択する。次に形質転換体をプライマー a l d フォワードプライマー N 2 7 F 1 (配列番号 3 1) および b d h B リバースプライマー N 6 5 (配列番号 4 4) でコロニーPCRによってスクリーンする。得られたプラスミドを p T R K H 3 - P n i s A - a l d - E g T E R - b d h B (= p T R K H 3 - A - E - B) と命名する。

【0276】

形質転換体からプラスミド p T R K H 3 - A - E - B を精製し、b d h B 遺伝子下流に位置する B a m H I 部位中への残る遺伝子 (t h l A、h b d、c r t) のさらなるクローニングのために使用する。プラスミド p T R K H 3 - A - E - B を B a m H I で消化し、DNAポリメラーゼのクレノウ (K l e n o w) 断片で処理して平滑末端を作る。実施例 1 4 で述べられるようにしてプラスミド p F P 9 8 8 D s s - t h l A - h b d - c r t (= p F P 9 8 8 D s s - T - H - C) を構築し、S m a I および B a m H I で消化する。得られた 2, 9 7 3 b p の t h l A - h b d - c r t 断片を DNA ポリメラーゼのクレノウ (K l e n o w) 断片で処理して平滑末端を作り、ゲル精製する。2, 9 7 3 b p の t h l A - h b d - c r t 断片と直線化 p T R K H 3 - A - E - B とをライゲートする。電気穿孔によってライゲーション混合物を大腸菌 (E. c o l i) T o p 1 0 細胞に形質転換し、エリスロマイシン (25 μ g/mL) 含有LB寒天プレート上での37℃で一晩生育に続いて、形質転換体を選択する。次に形質転換体をプライマー t h l A フォワードプライマー N 7 (配列番号 2 1) および c r t リバースプライマー N 4 (配列番号 1 8) でのコロニーPCRによってスクリーンする。得られたプラスミドを p T R K H 3 - P n i s A - a l d - E g T E R - b d h B - t h l A - h b d - c r t (= p T R K H 3 - A - E - B - T - H - C) と命名する。プラスミド p T R K H 3 - A - E - B - T - H - C を大腸菌 (E. c o l i) 形質転換体から調製し、当該技術分野で既知の方法 (ニコロフ (N i c k o l o f f), J. A. 編、「分子生物学における方法 (M e t h o d s i n M o l e c u l a r B i o l o g y)」より、第47巻、アウクルスト (A u k r u s t), T. W. ら、「微生物のための電気穿孔プロトコル (E l e c t r o p o r a t i o n P r o t o c o l s f o r M i c r o o r g a n i s m s)」, H u m a n a P r e s s, I n c., T o t o w a, N J, 2 1 7 ~ 2 2 6 頁、1 9 9 5 年) を使用して、電気穿孔によりエレクトロコンピテント E. フェカリス (f a e c a l i s) V 5 8 3 細胞に形質転換し、E. フェカリス (f a e c a l i s) V 5 8 3 / p T R K H 3 - A - E - B - T - H - C を得る。

【0277】

n i s A 調節遺伝子である n i s R と n i s K、a d d 9 スペクチノマイシン抵抗性遺伝子、および p S H 7 1 複製起点を含有する第2のプラスミドを、電気穿孔によって E. フェカリス (f a e c a l i s) V 5 8 3 / p T R K H 3 - A - E - B - T - H - C に形質転換する。p S H 7 1 複製起点を含有するプラスミドは、E. フェカリス (f a e c a l i s) 中の p A M β 1 誘導体と適合性である (アイヘンバウム (E i c h e n b a u m) ら、前出)。エリスロマイシン (25 μ g/mL) およびスペクチノマイシン (100 μ g/mL) 含有LB寒天プレート上で二重薬剤抵抗性形質転換体を選択する。

【0278】

酵母抽出物 (0. 2 %) (フィシェッティ (F i s c h e t t i) ら、J. E x p. M e d. 1 6 1 : 1 3 8 4 ~ 1 4 0 1 頁、1 9 8 5 年)、ナイシン (20 μ g/mL) (アイヘンバウム (E i c h e n b a u m) ら、前出)、エリスロマイシン (25 μ g/mL)、およびスペクチノマイシン (100 μ g/mL) で栄養強化された50mLのトッド-ヒューウィット・ブロス含有する250mL振盪フラスコに、2つのプラスミド、すなわち発現プラスミド (p T R K H 3 - A - E - B - T - H - C) および調節プラスミド (p S H 7 1 - n i s R K) を保有する得られた E. フェカリス (f a e c a l i s) V 5 8 3 B 株を接種する。フラスコを振盪せずに37℃で18~24時間インキュベートした後、一般法セクションで述べられるようにしてHPLCまたはGC分析により1-ブ

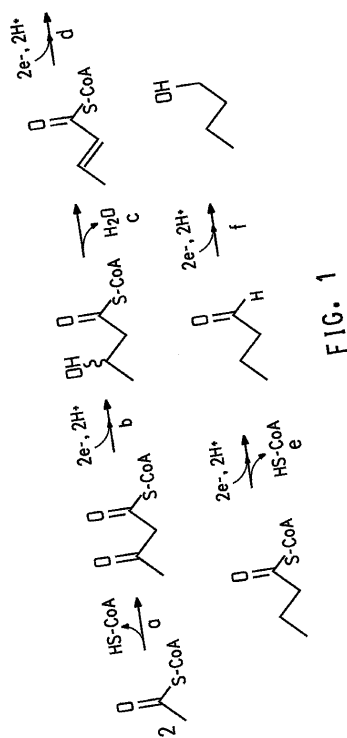
タノール生成を測定する。

【図面の簡単な説明】

【0279】

【図1】 1-ブタノール生合成経路を示す。「a」、「b」、「c」、「d」、「e」、および「f」と標識されたステップは、下で述べられる基質から産物への変換に相当する。

【図1】



【配列表】

0005276985000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 フアング, リクスアン・リサ
 アメリカ合衆国デラウェア州19707 ホツケシン・オールドウイルミントンロード1423
- (72)発明者 マツジオーホール, ロリ・アン
 アメリカ合衆国デラウェア州19810 ウイルミントン・ノースロツクフィールドドライブ3413
- (72)発明者 ナガラジヤン, バサンサ
 アメリカ合衆国デラウェア州19807 ウイルミントン・ホープトンロード702
- (72)発明者 ナカムラ, チャールズ・イー
 アメリカ合衆国デラウェア州19703 クレイモント・マウントバーノンドライブ2
- (72)発明者 スー, ウオンチュル
 アメリカ合衆国デラウェア州19707 ホツケシン・ピアソンズリッジ・サリナコート8

審査官 濱田 光浩

- (56)参考文献 J. Bacteriology, (2002), Vol. 184, No. 3, p. 821-830
 Applied and Environmental Microbiology, (1998), Vol. 64, No. 3, p. 1079-1085
 Trends in Biotechnol., (1995), Vol. 13, p. 259-264

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/00

C12N 15/00

C12P 7/00

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

PubMed