

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6744819号
(P6744819)

(45) 発行日 令和2年8月19日 (2020.8.19)

(24) 登録日 令和2年8月4日 (2020.8.4)

(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 1/13 (2006.01)	C 1 2 N 1/13
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 P 5/00 (2006.01)	C 1 2 P 5/00

請求項の数 21 (全 166 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-553501 (P2016-553501)	(73) 特許権者	509240479
(86) (22) 出願日	平成27年2月20日 (2015.2.20)		ダニスコ・ユーエス・インク
(65) 公表番号	特表2017-506078 (P2017-506078A)		アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94
(43) 公表日	平成29年3月2日 (2017.3.2)		304、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 925
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/016954	(73) 特許権者	513158760
(87) 国際公開番号	W02015/127305		ザ・グッドイヤー・タイヤ・アンド・ラバー・カンパニー
(87) 国際公開日	平成27年8月27日 (2015.8.27)		アメリカ合衆国、オハイオ州 44316
審査請求日	平成30年2月20日 (2018.2.20)		、アクロン イノベーション・ウェイ 200
(31) 優先権主張番号	61/942,546	(74) 代理人	100071010
(32) 優先日	平成26年2月20日 (2014.2.20)		弁理士 山崎 行造
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100118647
前置審査			弁理士 赤松 利昭

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 メバロン酸、イソプレネン、イソプレノイド前駆体、イソプレノイド、およびアセチルC o A由来産物の生産向上のための組換え微生物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

イソプレネンを産生できる組換え細胞であって、

(i) Y f i Q ポリペプチドをコードする核酸であって、前記細胞が前記 Y f i Q ポリペプチドの活性が前記 Y f i Q ポリペプチドをコードする核酸発現の低下、減衰、または欠失によって調節されるように修飾されている、核酸；

(i i) M V A 経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸；および

(i i i) イソプレネンシンターゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸を含んでなり、適切な培地中の前記組換え細胞の培養がイソプレネンの生産を提供する、組換え細胞。

【請求項2】

イソプレノイド前駆体を産生できる組換え細胞であって、

(i) Y f i Q ポリペプチドをコードする核酸であって、前記細胞が前記 Y f i Q ポリペプチドの活性が前記 Y f i Q ポリペプチドをコードする核酸発現の低下、減衰、または欠失によって調節されるように修飾されている、核酸；および

(i i) M V A 経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸

を含んでなり、適切な培地中の前記組換え細胞の培養が前記イソプレノイド前駆体の生産を提供する、組換え細胞。

【請求項 3】

イソプレノイドを産生できる組換え細胞であって、

(i) Y f i Q ポリペプチドをコードする核酸であって、前記細胞が前記 Y f i Q ポリペプチドの活性が前記 Y f i Q ポリペプチドをコードする核酸発現の低下、減衰、または欠失によって調節されるように修飾されている、核酸；

(i i) M V A 経路の 1 つまたは複数のポリペプチドをコードする 1 つまたは複数の核酸；および

(i i i) ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードする異種核酸を含んでなり、適切な培地中の前記組換え細胞の培養が前記イソプレノイドの生産を提供する、組換え細胞。

10

【請求項 4】

前記細胞が、

(I) P a t ポリペプチドおよび A c u A ポリペプチドからなる群から選択される 1 つまたは複数のアセチルトランスフェラーゼをコードする 1 つまたは複数の核酸であって、前記細胞が前記 1 つまたは複数のアセチルトランスフェラーゼの活性が前記 1 つまたは複数のアセチルトランスフェラーゼをコードする核酸発現の低下、減衰、または欠失によって調節されるように修飾されている、核酸

をさらに含む、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の組換え細胞。

【請求項 5】

前記細胞が、

(I I) S r t N ポリペプチドから選択されるデアセチラーゼをコードする核酸であって、前記細胞が前記 S r t N ポリペプチドの活性が前記 S r t N ポリペプチドをコードする核酸発現の増大によって調節されるように修飾されている、核酸

をさらに含む、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の組換え細胞。

20

【請求項 6】

前記イソプレニンシンターゼ活性を有するポリペプチドが、クズ属 (P u e r a r i a) またはポプラ属 (P o p u l u s)、またはウラジロハコヤナギ (P o p u l u s a l b a) × ヤマナラシ (P o p u l u s t r e m u l a) 交配種に由来するポリペプチドである、請求項 1、4 および 5 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 7】

前記 M V A 経路の 1 つまたは複数のポリペプチドが、(a) 2 分子のアセチル C o A を縮合してアセトアセチル C o A を形成する酵素；(b) アセトアセチル C o A とアセチル C o A を縮合して H M G - C o A を形成する酵素；(c) H M G - C o A をメバロン酸に変換する酵素；(d) メバロン酸をメバロン酸 5 - リン酸にリン酸化する酵素；(e) メバロン酸 5 - リン酸をメバロン酸 5 - ピロリン酸に変換する酵素；および (f) メバロン酸 5 - ピロリン酸をイソペンテニルピロリン酸に変換する酵素から選択される、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の組換え細胞。

30

【請求項 8】

前記組換え細胞が、

(a) ホスホケトララーゼ活性を有するポリペプチドをコードする 1 つまたは複数の異種核酸；

(b) 1 つまたは複数の 1 - デオキシ-D - キシルロース-5 - リン酸 (D X P) 経路ポリペプチドをコードする 1 つまたは複数の核酸；

(c) 1 つまたは複数のペントースリン酸経路タンパク質をコードする 1 つまたは複数の核酸であって、前記細胞が、ペントースリン酸経路タンパク質をコードする核酸の発現および/またはペントースリン酸経路タンパク質の活性が調節されるように修飾されており、かつ前記ペントースリン酸経路タンパク質が、トランスケトララーゼ (t k t A)、トランスアルドラーゼ (t a l B)、リブロース-5 - リン酸-エピメラーゼ (r p e)、リボース-5 - リン酸エピメラーゼ (r p i A) およびホスホフルクトキナーゼ (p f k A) からなる群から任意的に選択される、1 つまたは複数の核酸；

40

50

(d) 1つまたは複数の酢酸循環タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸であって、前記細胞が、酢酸循環タンパク質をコードする核酸の発現、および／または酢酸循環タンパク質の活性が調節されるように修飾されており、かつ前記酢酸循環タンパク質が、アセチル補酵素Aシンセターゼ (acs)、酢酸キナーゼ (ackA)、およびホスホトランスアセチラーゼ (pta) からなる群から任意的に選択される、1つまたは複数の核酸； および

(e) sfcA、maeB、pdhR、aceE、aceF、lpdA、glta、acs、pta、ackA、actP、pfkA、rpe、rpiA、tkta、talB、pgl、edd、およびedaからなる群から選択される1つまたは複数のタンパク質をコードする1つまたは複数の核酸であって、前記細胞が核酸の発現および／またはタンパク質の活性が調節されるように修飾されている、1つまたは複数の核酸
のうちの1つまたは複数をさらに含んでなる、請求項1～7のいずれか一項に記載の細胞。

10

【請求項9】

1つまたは複数のアセチル化タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸、MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸、イソプレニンターゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸、ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードする核酸、ホスホケトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸、1つまたは複数のペントースリン酸経路タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸、1つまたは複数の酢酸循環タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸、または請求項8 (e) に記載の1つまたは複数のタンパク質をコードする1つまたは複数の核酸が、

20

(a) 誘導性プロモーターまたは構成的プロモーター下に置かれる；

(b) 1つまたは複数のマルチコピープラスミドにクローニングされる；または

(c) 前記細胞の染色体に組み込まれる、

請求項1～8のいずれか一項に記載の組換え細胞。

【請求項10】

前記組換え細胞が、グラム陽性細菌細胞、グラム陰性細菌細胞、真菌細胞、糸状菌細胞、藻類細胞または酵母細胞である、請求項1～9のいずれか一項に記載の組換え細胞。

【請求項11】

30

前記イソプレン生産が、アセチル化タンパク質をコードする核酸の発現および／またはアセチル化タンパク質の活性が調節されるように修飾されていない組換え細胞と比較して増大される、請求項1および4～10のいずれか一項に記載の組換え細胞。

【請求項12】

前記イソプレン生産の増大が、(i) 力価、(ii) 瞬間収率、(iii) 累積収率、(iv) イソプレン対二酸化炭素比、(v) 比生産性、または(vi) 細胞生産性指数の増大を含んでなる、イソプレン生産が少なくとも5%増大される、請求項11に記載の組換え細胞。

【請求項13】

(a) 請求項1および4～12のいずれか一項に記載の組換え細胞をイソプレンの生成に適した条件下で培養するステップと、(b) イソプレンを生産するステップと、任意的にさらに(c) イソプレンを回収するステップとを含んでなる、イソプレンを生産する方法。

40

【請求項14】

前記イソプレノイド前駆体が、メバロン酸(MVA)、ジメチルアリルニリン酸(DMAPP)、およびイソペンテニルピロリン酸(IPP) からなる群から選択される、請求項2、4、5および7～10のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項15】

前記イソプレノイド前駆体の生産が、アセチル化タンパク質をコードする核酸の発現および／またはアセチル化タンパク質の活性が調節されるように修飾されていない組換え細胞

50

胞と比較して増大される、請求項 2、4、5、7～10 および 14 のいずれか一項に記載の組換え細胞。

【請求項 16】

前記イソプレノイド前駆体の生産の増大が、(i) 力価、(ii) 瞬間収率、(iii) 累積収率、(iv) 比生産性、または (v) 細胞生産性指数の増大を含んでなる、イソプレノイド前駆体の生産が少なくとも 5 % 増大される、請求項 15 に記載の組換え細胞。

【請求項 17】

(a) 請求項 2、4、5、7～10 および 14～16 のいずれか一項に記載の組換え細胞を、イソプレノイド前駆体の生成に適した条件下で培養するステップと、(b) イソプレノイド前駆体を生産するステップと、さらに任意的に (c) イソプレノイド前駆体を回収するステップとを含んでなる、イソプレノイド前駆体を生産する方法。

10

【請求項 18】

前記イソプレノイドが、アビエタジエン、アモルファジエン、カレン、 α -ファルネセン、 β -ファルネセン、ファルネソール、ゲラニオール、ゲラニルゲラニオール、リナロール、リモネン、ミルセン、ネロリドール、オシメン、パトコウロール、 β -ピネン、サビネン、 γ -テルピネン、テルピネン、およびバレンセンからなる群から選択される、請求項 3～5 および 7～10 のいずれか一項に記載の組換え細胞。

【請求項 19】

前記イソプレノイドの生産が、アセチル化タンパク質をコードする核酸の発現および／またはアセチル化タンパク質の活性が調節されるように修飾されていない組換え細胞と比較して増大される、請求項 3～5、7～10 および 18 のいずれか一項に記載の組換え細胞。

20

【請求項 20】

前記イソプレノイド生産の増大が、(i) 力価、(ii) 瞬間収率、(iii) 累積収率、(iv) 比生産性、または (v) 細胞生産性指数の増大を含んでなる、イソプレノイド生産が少なくとも 5 % 増大される、請求項 19 に記載の組換え細胞。

【請求項 21】

(a) 請求項 3～5、7～10 および 18～20 のいずれか一項に記載の組換え細胞を、イソプレノイドの生成に適した条件下で培養するステップと、(b) イソプレノイドを生産するステップと、さらに任意的に (c) イソプレノイドを回収するステップとを含んでなる、イソプレノイドを生産する方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、組換え微生物における、メバロン酸、イソプレン、イソプレノイド、イソプレノイド前駆体、および／またはアセチル CoA 由来産物の生産を増大させるための組成物および方法、ならびに同物質を生産して使用する方法に関する。

【0002】

関連出願の相互参照

本出願は、その内容全体が参照により本明細書に援用される、2014年2月20日に

40

出願された、米国仮特許出願第 61 / 942, 546 号明細書の優先権を主張する。

【背景技術】

【0003】

メバロン酸は、アセチル CoA をイソペンテニル二リン酸とジメチルアリル二リン酸に変換する、メバロン酸依存性生合成経路の中間体である。アセチル CoA のメバロン酸への変換は、上流メバロン酸依存性生合成経路 (MVA 経路) のチオラーゼ、HMG-CoA シンターゼ、および HMG-CoA 還元酵素活性によって触媒され得る。

【0004】

商業的に、メバロン酸は、化粧品中の添加剤として、生分解性ポリマーの製造のために使用されており、その他の化学物質の合成のためのキラル構成要素としての価値を有し得

50

る。

【0005】

メバロン酸依存性経路の生成物は、イソペンテニルピロリン酸（IPP）およびジメチルアリルニリン酸（DMA PP）である。IPPおよびDMA PPは、イソプレンならびにイソプレノイドの前駆体である。イソプレン（2-メチルー1, 3-ブタジエン）は、天然ゴムの単量体であり、また集合的にイソプレノイドと称される非常に多様なその他の天然起源化合物の一般的構造モチーフでもある。それに加えてイソプレンは、多様な合成ポリマー、中でも注目すべきは合成ゴムのための重要な出発原料である。

【0006】

イソプレノイドは、イソプレノイド前駆体分子IPPおよびDMA PPに由来する化合物である。29, 000種を超えるイソプレノイド化合物が同定されており、新しいイソプレノイドが毎年発見されている。イソプレノイドは、イソプレノイドの比較的複雑な構造を形成するための基本的構成単位としてイソプレノイド前駆体分子を使用する、微生物および植物種などの天然物から単離し得る。イソプレノイドは、ほとんどの生きている生物および細胞に不可欠であり、細胞膜流動性および電子伝達を維持する手段を提供する。自然界では、イソプレノイドは、植物中の天然殺虫剤としての多様な役割において機能し、シナモン、クローブ、およびショウガに付随する香りを与える。さらに、製薬業界および化学産業界は、医薬品、栄養補給食品、着香剤、および農業害虫防除剤として、イソプレノイドを利用する。生物学的システムにおけるそれらの重要性と、広範な用途における有用性を考慮して、イソプレノイドは、科学者によって注視され続けてきた。

【0007】

メバロン酸およびイソプレノイドを得るための従来手段としては、生物学的材料（例えば、植物、微生物、および動物）からの抽出、および実験室での部分的または完全有機合成が挙げられる。しかしこのような手段は、概して満足のいくものではないことが判明している。特にイソプレノイドでは、それらの分子構造の往々にして複雑な性質を所与として、所望の製品を得るためにいくつかのステップが通常要求されることを考えると、有機合成は非実用的である。さらにこれらの化学合成ステップは、有毒溶媒の使用を伴い得て、生物学的材料からのイソプレノイド抽出もまた同様である。さらに生物学的材料は、典型的に、これらの分子を微量でのみ含有するため、これらの抽出および精製法は、通常、所望のイソプレノイドを比較的低収率でもたらす。不運にも、比較的大量のイソプレノイドを得ることに伴う困難さは、それらの実用的利用を制限してきた。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

イソプレン、イソプレノイド前駆体分子、およびイソプレノイドの生産における最近の進歩は、しっかりした商業的工程の要求を満たすのに十分であり得る、速度、力価、および純度で、イソプレンおよびイソプレノイドを生産する方法を開示する（例えば、国際公開第2009/076676A2号パンフレット、および米国特許第7, 915, 026号明細書を参照されたい）；しかしイソプレンおよびイソプレノイドの生産を向上させるためならびに同物質の生産量および収率を向上させるための改良が、依然として必要とされる。

【課題を解決するための手段】

【0009】

メバロン酸依存性生合成経路の中間体としてのメバロン酸の生産を増大させ；イソプレン、イソプレノイド前駆体、および／またはイソプレノイドなどのメバロン酸に由来する分子の生産を増大させ；アセチルCoA由来産物の生産を増大させる組成物および方法の開示によって、このような改善が本明細書で提供される。

【0010】

本明細書全体を通じて、様々な特許、特許出願およびその他の各種文献（例えば学術誌論文）に言及する。本明細書で引用される全ての特許、特許出願、および文献の開示は、

あらゆる目的のために、その内容全体を参照によって本明細書に援用する。

【0011】

提供される本明細書は、特に、組換え微生物における1つまたは複数のアセチル化タンパク質の発現および／または活性が調節されるように、組換え微生物／組換え細胞で1つまたは複数の特定の遺伝子操作を使用する、微生物におけるメバロン酸、イソプレン、イソプレノイド前駆体、イソプレノイド、および／またはアセチルC o A由来産物の生産を増大させるための組成物および方法を開示する。このような調節は、メバロン酸、イソプレン、イソプレノイド前駆体分子、イソプレノイド、および／またはアセチルC o A由来産物の生産増大をもたらす得る。

【0012】

10

したがって、一態様では、本明細書で提供されるのは、イソプレンを産生できる組換え細胞であり、細胞は、(i) 1つまたは複数のアセチル化タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸のどちらか、またはそれらの活性が調節されるように遺伝子操作されている1つまたは複数のアセチル化タンパク質；(ii) MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸；および(iii) イソプレシンターゼポリペプチドをコードする異種核酸、またはイソプレシンターゼ活性を有するポリペプチドを含んでなり、細胞は、核酸の発現および／またはアセチル化タンパク質の活性が調節されるように修飾または遺伝子操作されており、適切な培地中の組換え細胞の培養はイソプレンの生産を提供する。

【0013】

20

本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、1つまたは複数のアセチル化タンパク質の活性が減衰、欠失または増大するように、1つまたは複数のアセチル化タンパク質の活性が調節される。

【0014】

本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、アセチル化タンパク質はアセチルトランスフェラーゼである。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、アセチルトランスフェラーゼは、Y f i Q、P a t、およびA c u Aからなる群から選択される。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、アセチルトランスフェラーゼはY f i Qポリペプチドである。

【0015】

30

本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、アセチル化タンパク質はデアセチラーゼである。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、デアセチラーゼは、C o b BおよびS r t Nからなる群から選択される。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、デアセチラーゼはC o b Bポリペプチドである。

【0016】

本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、1つまたは複数のアセチル化タンパク質は、Y f i QポリペプチドおよびC o b Bポリペプチドからなる群から選択される。

【0017】

40

本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、アセチル化タンパク質はY f i Qポリペプチドである。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、Y f i Qポリペプチドの活性は、Y f i Qポリペプチドをコードする核酸の発現を低下、減衰、または欠失させることで調節される。

【0018】

本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、アセチル化タンパク質はC o b Bポリペプチドである。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、C o b Bポリペプチドの活性は、C o b Bポリペプチドをコードする核酸の発現を増大させることで調節される。

【0019】

50

本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドは、(a) 2分子のアセチルCoAを縮合してアセトアセチルCoAを形成する酵素；(b) アセトアセチルCoAとアセチルCoAを縮合してHMG-CoAを形成する酵素（例えば、HMGシンターゼ）；(c) HMG-CoAをメバロン酸に変換する酵素；(d) メバロン酸をメバロン酸5-リン酸にリン酸化する酵素；(e) メバロン酸5-リン酸をメバロン酸5-ピロリン酸に変換する酵素；および(f) メバロン酸5-ピロリン酸をイソペンテニルピロリン酸に変換する酵素から選択される。

【0020】

本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、イソプレニンシンターゼポリペプチドをコードする異種核酸、またはイソプレニンシンターゼ活性を有するポリペプチドは、植物イソプレニンシンターゼポリペプチドである。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、イソプレニンシンターゼポリペプチドまたはイソプレニンシンターゼ活性を有するポリペプチドは、ポリペプチドクズ属 (*Pueraria*) またはポプラ属 (*Populus*)、またはウラジロハコヤナギ (*Populus alba*) × ヤマナラシ (*Populus tremula*) 交配種に由来する。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、イソプレニンシンターゼポリペプチドまたはイソプレニンシンターゼ活性を有するポリペプチドは、プエラリア・モンタナ (*Pueraria montana*)、プエラリア・ロバタ (*Pueraria lobata*)、ポプルス・トレムロイデス (*Populus tremuloides*)、ウラジロハコヤナギ (*Populus alba*)、セイヨウハコヤナギ (*Populus nigra*)、およびコットンウッド (*Populus trichocarpa*) からなる群から選択される生物に由来する。

【0021】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される組換え細胞は、ホスホクトララーゼ活性を有するポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸をさらに含んでなる。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、ホスホクトララーゼ活性を有するポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸は、キシロロース-5-リン酸からグリセルアルデヒド-3-リン酸およびアセチルリン酸（本明細書で同義的にアセチルリン酸、アセチルリン酸、アセチル-P、Ac-Pと言及される）を合成する能力がある。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、ホスホクトララーゼ活性を有するポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸は、フルクトース-6-リン酸からエリスロース-4-リン酸およびアセチルリン酸を合成する能力がある。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、組換え細胞は、1つまたは複数の1-デオキシ-D-キシロロース-5-リン酸 (DXP) 経路ポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸をさらに含んでなる。

【0022】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される組換え細胞は、1つまたは複数のペントースリン酸経路タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸をさらに含んでなり、細胞は、ペントースリン酸経路タンパク質をコードする核酸の発現および／またはペントースリン酸経路タンパク質の活性が調節されるように修飾されている。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のペントースリン酸経路タンパク質の活性が増大される。

【0023】

特定の実施形態では、ペントースリン酸経路タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸の発現を増大させることで1つまたは複数のペントースリン酸経路タンパク質の活性が増大される。このような実施形態では、ペントースリン酸経路タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸は、トランスケトララーゼ (tktA)、トランスアルドラーゼ (talB)、リブロース-5-リン酸-エピメラーゼ (rpe)、およびリボース-5-リン酸エピメラーゼ (rpiA) からなる群から選択される。

【0024】

その他の実施形態では、1つまたは複数のペントースリン酸経路タンパク質の活性が低

10

20

30

40

50

下される。特定の実施形態では、ペントースリン酸経路タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸の発現を低下、減衰、または欠失させることで、1つまたは複数のペントースリン酸経路タンパク質の活性が低下される。このような実施形態では、ペントースリン酸経路タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸は、ホスホフルクトキナーゼ (p f k A) を含んでなる。

【0025】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される組換え細胞は、1つまたは複数の酢酸循環タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸をさらに含んでなり、細胞は、酢酸循環タンパク質をコードする核酸の発現および／または酢酸循環タンパク質の活性が調節されるように修飾されている。

10

【0026】

いくつかの実施形態では、1つまたは複数の酢酸循環タンパク質の活性が増大される。いくつかの実施形態では、酢酸循環タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸の発現を増大させることで、1つまたは複数の酢酸循環タンパク質の活性が増大される。このような実施形態では、酢酸循環タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸は、アセチル補酵素Aシンセターゼ (a c s)、酢酸キナーゼ (a c k A)、およびホスホトランスアセチラーゼ (p t a) からなる群から選択され得る。

【0027】

いくつかの実施形態では、1つまたは複数の酢酸循環タンパク質の活性が低下される。いくつかの実施形態では、酢酸循環タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸の発現を低下、減衰、または欠失させることで、1つまたは複数の酢酸循環タンパク質の活性が低下される。このような実施形態では、酢酸循環タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸は、ホスホトランスアセチラーゼ (p t a)、酢酸キナーゼ (a c k A)、および酢酸輸送体／酢酸ポンプ (a c t P) からなる群から選択され得る。

20

【0028】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される組換え細胞は、s f c A、m a e B、p d h R、a c e E、a c e F、l p d A、g l t a、a c s、p t a、a c k A、a c t P、p f k A、r p e、r p i A、t k t a、t a l B、p g l、e d d、およびe d aからなる群から選択される、1つまたは複数のタンパク質をコードする1つまたは複数の核酸をさらに含んでなり、細胞は、核酸の発現および／またはタンパク質の活性が調節されるように修飾されている。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のタンパク質をコードする1つまたは複数の核酸の発現を増大させることで、これらのタンパク質の1つまたは複数の活性が増大される。特定の実施形態では、増大される1つまたは複数のタンパク質をコードする1つまたは複数の核酸は、a c k A、p t a、s f c A、m a e B、a c e E、a c e F、l p d A、a c s、r p e、r p i A、t k t a、t a l B、およびp g lからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のタンパク質をコードする1つまたは複数の核酸の発現を低下、減衰、または欠失させることで、これらのタンパク質の1つまたは複数の活性が低下される。特定の実施形態では、低下される1つまたは複数のタンパク質をコードする1つまたは複数の核酸は、p d h R、g l t a、p t a、a c k A、a c t P、p f k A、p g l、e d d、およびe d aからなる群から選択される。

30

40

【0029】

本明細書に記載される組換え細胞のいずれか1つの中では、1つまたは複数のアセチル化タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸、MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸、イソプレニンシンターゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸、ホスホケトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸、1つまたは複数のペントースリン酸経路タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸、または1つまたは複数の酢酸循環タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸が、誘導性プロモーターまたは構成的プロモーター下に置かれる。

【0030】

50

本明細書に記載される組換え細胞のいずれか1つの中では、1つまたは複数のアセチル化タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸、MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸、イソプレニンターゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸、ホスホケトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸、1つまたは複数のペントースリン酸経路タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸、または1つまたは複数の酢酸循環タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸は、1つまたは複数のマルチコピープラスミドにクローニングされる。

【0031】

本明細書に記載される組換え細胞のいずれか1つの中では、1つまたは複数のアセチル化タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸、MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸、イソプレニンターゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸、ホスホケトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸、1つまたは複数のペントースリン酸経路タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸、または1つまたは複数の酢酸循環タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸は、細胞の染色体に組み込まれる。

【0032】

本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、組換え細胞は、グラム陽性細菌細胞またはグラム陰性細菌細胞である。本明細書で開示される実施形態のいずれかのその他の実施形態では、組換え細胞は、真菌細胞、糸状菌細胞、藻類細胞または酵母細胞である。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、組換え細胞は、バチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*)、ストレプトミセス・リビダンス (*Streptomyces lividans*)、ストレプトミセス・コエリカラー (*Streptomyces coelicolor*)、ストレプトミセス・グリセウス (*Streptomyces griseus*)、大腸菌 (*Escherichia coli*)、およびパントエア・シトレア (*Pantoea citrea* からなる群から選択される)。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、組換え細胞は、トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*)、アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、およびヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) からなる群から選択される。

【0033】

本明細書に記載される実施形態のいずれかでは、イソプレニン生産は、アセチル化タンパク質をコードする核酸の発現および／またはアセチル化タンパク質の活性が調節されるように修飾されていない組換え細胞と比較して、増大される。

【0034】

本明細書に記載される実施形態のいずれかでは、イソプレニン生産が少なくとも5%増大され、イソプレニン生産の増大は、(i) 力価、(ii) 瞬間収率、(iii) 累積収率、(iv) イソプレニン対二酸化炭素比、(v) 比生産性、または(vi) 細胞生産性指数の増大を含んでなる。

【0035】

その他の態様では、(a) 本明細書で開示される実施形態のいずれかの組換え細胞をイソプレニン生産に適した条件下で培養するステップと、(b) イソプレニンを生産するステップとを含んでなる、イソプレニンを生産する方法もまた、本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、方法は、(c) イソプレニンを回収するステップをさらに含んでなる。

【0036】

別の態様では、本明細書で提供されるのは、イソプレノイド前駆体を産生できる組換え細胞であり、細胞は、(i) 1つまたは複数のアセチル化タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸のどちらか、またはそれらの活性が調節されるように遺伝子操作されてい

10

20

30

40

50

る1つまたは複数のアセチル化タンパク質；および（i i）MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸を含んでなり、細胞は、核酸の発現および／またはアセチル化タンパク質の活性が調節されるように修飾または遺伝子操作されており、適切な培地中の組換え細胞の培養は、イソプレノイド前駆体の生産を提供する。

【0037】

本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、1つまたは複数のアセチル化タンパク質の活性が減衰、欠失または増大するように、1つまたは複数のアセチル化タンパク質の活性が調節される。

【0038】

本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、アセチル化タンパク質はアセチルトランスフェラーゼである。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、アセチルトランスフェラーゼは、Y f i Q、P a t、およびA c u Aからなる群から選択される。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、アセチルトランスフェラーゼはY f i Qポリペプチドである。

【0039】

本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、アセチル化タンパク質はデアセチラーゼである。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、デアセチラーゼは、C o b BおよびS r t Nからなる群から選択される。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、デアセチラーゼはC o b Bポリペプチドである。

【0040】

本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、1つまたは複数のアセチル化タンパク質は、Y f i QポリペプチドおよびC o b Bポリペプチドからなる群から選択される。

【0041】

本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、アセチル化タンパク質はY f i Qポリペプチドである。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、Y f i Qポリペプチドの活性は、Y f i Qポリペプチドをコードする核酸の発現を低下、減衰、または欠失させることで調節される。

【0042】

本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、アセチル化タンパク質はC o b Bポリペプチドである。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、C o b Bポリペプチドの活性は、C o b Bポリペプチドをコードする核酸の発現を増大させることで調節される。

【0043】

本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドは、（a）2分子のアセチルC o Aを縮合してアセトアセチルC o Aを形成する酵素；（b）アセトアセチルC o AとアセチルC o Aを縮合してHMG-C o Aを形成する酵素（例えば、HMGシンターゼ）；（c）HMG-C o Aをメバロン酸に変換する酵素；（d）メバロン酸をメバロン酸5-リン酸にリン酸化する酵素；（e）メバロン酸5-リン酸をメバロン酸5-ピロリン酸に変換する酵素；および（f）メバロン酸5-ピロリン酸をイソペンテニルピロリン酸に変換する酵素から選択される。

【0044】

特定の実施形態では、組換え細胞は、ホスホケトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸をさらに含んでなる。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、ホスホケトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸は、キシロース5-リン酸からグリセルアルデヒド3リン酸およびアセチルリン酸を合成する能力がある。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、ホスホケトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸は、フルクトース-6-リン酸からエリスロース-4-

10

20

30

40

50

リン酸およびアセチルリン酸を合成する能力がある。

【0045】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される組換え細胞は、1つまたは複数のペントースリン酸経路タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸をさらに含んでなり、細胞は、ペントースリン酸経路タンパク質をコードする核酸の発現および／またはペントースリン酸経路タンパク質の活性が調節されるように修飾されている。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のペントースリン酸経路タンパク質の活性が増大される。

【0046】

特定の実施形態では、ペントースリン酸経路タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸の発現を増大させることで1つまたは複数のペントースリン酸経路タンパク質の活性が増大される。このような実施形態では、ペントースリン酸経路タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸は、トランスケトラーゼ (t k t A)、トランスアルドラーゼ (t a l B)、リブローズ-5-リン酸-エピメラーゼ (r p e)、およびリボース-5-リン酸エピメラーゼ (r p i A) からなる群から選択される。

【0047】

その他の実施形態では、1つまたは複数のペントースリン酸経路タンパク質の活性が低下される。特定の実施形態では、ペントースリン酸経路タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸の発現を低下、減衰、または欠失させることで、1つまたは複数のペントースリン酸経路タンパク質の活性が低下される。このような実施形態では、ペントースリン酸経路タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸は、ホスホフルクトキナーゼ (p f k A) を含んでなる。

【0048】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される組換え細胞は、1つまたは複数の酢酸循環タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸をさらに含んでなり、細胞は、酢酸循環タンパク質をコードする核酸の発現および／または酢酸循環タンパク質の活性が調節されるように修飾されている。

【0049】

いくつかの実施形態では、1つまたは複数の酢酸循環タンパク質の活性が増大される。いくつかの実施形態では、酢酸循環タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸の発現を増大させることで、1つまたは複数の酢酸循環タンパク質の活性が増大される。このような実施形態では、酢酸循環タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸は、アセチル補酵素Aシンセターゼ (a c s)、酢酸キナーゼ (a c k A)、およびホスホトランスアセチラーゼ (p t a) からなる群から選択され得る。

【0050】

いくつかの実施形態では、1つまたは複数の酢酸循環タンパク質の活性が低下される。いくつかの実施形態では、酢酸循環タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸の発現を低下、減衰、または欠失させることで、1つまたは複数の酢酸循環タンパク質の活性が低下される。このような実施形態では、酢酸循環タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸は、ホスホトランスアセチラーゼ (p t a)、酢酸キナーゼ (a c k A)、および酢酸輸送体／酢酸ポンプ (a c t P) からなる群から選択され得る。

【0051】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される組換え細胞は、s f c A、m a e B、p d h R、a c e E、a c e F、l p d A、g l t a、a c s、p t a、a c k A、a c t P、p f k A、r p e、r p i A、t k t a、t a l B、p g l、e d d、およびe d aからなる群から選択される、1つまたは複数のタンパク質をコードする1つまたは複数の核酸をさらに含んでなり、細胞は、核酸の発現および／またはタンパク質の活性が調節されるように修飾されている。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のタンパク質をコードする1つまたは複数の核酸の発現を増大させることで、これらのタンパク質の1つまたは複数の活性が増大される。特定の実施形態では、増大される1つまたは複数のタンパク質をコードする1つまたは複数の核酸は、a c k A、p t a、s f c A、m a e B、

10

20

30

40

50

aceE、aceF、lpdA、acs、rpe、rpiA、tkta、talB、およびpglからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のタンパク質をコードする1つまたは複数の核酸の発現を低下、減衰、または欠失させることで、これらのタンパク質の1つまたは複数の活性が低下される。特定の実施形態では、低下される1つまたは複数のタンパク質をコードする1つまたは複数の核酸は、pdhR、glta、pta、ackA、actP、pfkA、pgl、edd、およびedaからなる群から選択される。

【0052】

本明細書に記載される組換え細胞のいずれか1つの中では、1つまたは複数のアセチル化タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸、MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸、ホスホクトラゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸、1つまたは複数のペントースリン酸経路タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸、または1つまたは複数の酢酸循環タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸が、誘導性プロモーターまたは構成的プロモーター下に置かれる。

10

【0053】

本明細書に記載される組換え細胞のいずれか1つの中では、1つまたは複数のアセチル化タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸、MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸、ホスホクトラゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸、1つまたは複数のペントースリン酸経路タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸、または1つまたは複数の酢酸循環タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸が、1つまたは複数のマルチコピープラスミドにクローニングされる。

20

【0054】

本明細書に記載される組換え細胞のいずれか1つの中では、1つまたは複数のアセチル化タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸、MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸、ホスホクトラゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸、1つまたは複数のペントースリン酸経路タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸、または1つまたは複数の酢酸循環タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸が、細胞の染色体に組み込まれる。

【0055】

本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、組換え細胞は、グラム陽性細菌細胞またはグラム陰性細菌細胞である。本明細書で開示される実施形態のいずれかのその他の実施形態では、組換え細胞は、真菌細胞、糸状菌細胞、藻類細胞または酵母細胞である。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、組換え細胞は、バチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*)、ストレプトミセス・リビダンス (*Streptomyces lividans*)、ストレプトミセス・コエリカラー (*Streptomyces coelicolor*)、ストレプトミセス・グリセウス (*Streptomyces griseus*)、大腸菌 (*Escherichia coli*)、およびパントエア・シトレア (*Pantoea citrea*) からなる群から選択される)。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、組換え細胞は、トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*)、アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、およびヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) からなる群から選択される。

30

40

【0056】

本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、イソプレノイド前駆体は、メバロン酸 (MVA)、ジメチルアリルニリン酸 (DMA PP)、およびイソペンテニルピロリン酸 (IPP) からなる群から選択される。

【0057】

50

本明細書に記載される実施形態のいずれかでは、イソプレノイド前駆体の生産は、アセチル化タンパク質をコードする核酸の発現および／またはアセチル化タンパク質の活性が調節されるように修飾されていない組換え細胞と比較して、増大される。

【0058】

本明細書に記載される実施形態のいずれかでは、イソプレノイド前駆体の生産が少なくとも5%増大され、イソプレノイド前駆体の生産の増大は、(i)力価、(ii)瞬間収率、(iii)累積収率、(iv)比生産性、または(v)細胞生産性指数の増大を含んでなる。

【0059】

さらなる態様では、本明細書で提供されるのは、(a)本明細書で開示される実施形態のいずれかの組換え細胞をイソプレノイド前駆体の生産に適した条件下で培養するステップと、(b)イソプレノイド前駆体を生産するステップとを含んでなる、イソプレノイド前駆体を生産する方法である。いくつかの実施形態では、方法は、(c)イソプレノイド前駆体を回収するステップをさらに含んでなる。

10

【0060】

さらに別の態様では、本明細書で提供されるのはイソプレノイドを産生できる組換え細胞であり、細胞は、(i)1つまたは複数のアセチル化タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸のどちらか、またはそれらの活性が調節されるように遺伝子操作されている1つまたは複数のアセチル化タンパク質；(ii)MV A経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸；および(iii)ピロリン酸ポリプレニルシンターゼをコードする1つまたは複数の核酸を含んでなり、細胞は、核酸の発現および／またはアセチル化タンパク質の活性が調節されるように修飾または遺伝子操作されており、適切な培地中の組換え細胞の培養は、イソプレノイドの生産を提供する。

20

【0061】

本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、1つまたは複数のアセチル化タンパク質の活性が減衰、欠失または増大するように、1つまたは複数のアセチル化タンパク質の活性が調節される。

【0062】

本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、アセチル化タンパク質はアセチルトランスフェラーゼである。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、アセチルトランスフェラーゼは、YfiQ、Pat、およびAcuAからなる群から選択される。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、アセチルトランスフェラーゼはYfiQポリペプチドである。

30

【0063】

本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、アセチル化タンパク質はデアセチラーゼである。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、デアセチラーゼは、CobBおよびSrtNからなる群から選択される。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、デアセチラーゼはCobBポリペプチドである。

【0064】

本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、1つまたは複数のアセチル化タンパク質は、YfiQポリペプチドおよびCobBポリペプチドからなる群から選択される。

40

【0065】

本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、アセチル化タンパク質はYfiQポリペプチドである。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、YfiQポリペプチドの活性は、YfiQポリペプチドをコードする核酸の発現を低下、減衰、または欠失させることで調節される。

【0066】

本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、アセチル化タン

50

パク質はC o b Bポリペプチドである。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、C o b Bポリペプチドの活性は、C o b Bポリペプチドをコードする核酸の発現を増大させることで調節される。

【0067】

本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドは、(a) 2分子のアセチルC o Aを縮合してアセトアセチルC o Aを形成する酵素；(b) アセトアセチルC o AとアセチルC o Aを縮合してHMG-C o Aを形成する酵素（例えば、HMGシンターゼ）；(c) HMG-C o Aをメバロン酸に変換する酵素；(d) メバロン酸をメバロン酸5-リン酸にリン酸化する酵素；(e) メバロン酸5-リン酸をメバロン酸5-ピロリン酸に変換する酵素；および(f) メバロン酸5-ピロリン酸をイソペンテニルピロリン酸に変換する酵素から選択される。

10

【0068】

特定の実施形態では、組換え細胞は、ホスホケトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸をさらに含んでなる。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、ホスホケトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸は、キシロース5-リン酸からグリセルアルデヒド3リン酸およびアセチルリン酸を合成する能力がある。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、ホスホケトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸は、フルクトース6-リン酸からエリスロース4-リン酸およびアセチルリン酸を合成する能力がある。

20

【0069】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される組換え細胞は、1つまたは複数のペントースリン酸経路タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸をさらに含んでなり、細胞は、ペントースリン酸経路タンパク質をコードする核酸の発現および／またはペントースリン酸経路タンパク質の活性が調節されるように修飾されている。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のペントースリン酸経路タンパク質の活性が増大される。

【0070】

特定の実施形態では、ペントースリン酸経路タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸の発現を増大させることで1つまたは複数のペントースリン酸経路タンパク質の活性が増大される。このような実施形態では、ペントースリン酸経路タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸は、トランスケトラーゼ(t k t A)、トランスアルドラーゼ(t a l B)、リブロース5-リン酸-エピメラーゼ(r p e)、およびリボース5-リン酸エピメラーゼ(r p i A)からなる群から選択される。

30

【0071】

その他の実施形態では、1つまたは複数のペントースリン酸経路タンパク質の活性が低下される。特定の実施形態では、ペントースリン酸経路タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸の発現を低下、減衰、または欠失させることで、1つまたは複数のペントースリン酸経路タンパク質の活性が低下される。このような実施形態では、ペントースリン酸経路タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸は、ホスホフルクトキナーゼ(p f k A)を含んでなる。

40

【0072】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される組換え細胞は、1つまたは複数の酢酸循環タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸をさらに含んでなり、細胞は、酢酸循環タンパク質をコードする核酸の発現および／または酢酸循環タンパク質の活性が調節されるように修飾されている。

【0073】

いくつかの実施形態では、1つまたは複数の酢酸循環タンパク質の活性が増大される。いくつかの実施形態では、酢酸循環タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸の発現を増大させることで、1つまたは複数の酢酸循環タンパク質の活性が増大される。このような実施形態では、酢酸循環タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸は、アセチル

50

補酵素Aシンセターゼ (a c s)、酢酸キナーゼ (a c k A)、およびホスホトランスアセチラーゼ (p t a) からなる群から選択され得る。

【0074】

いくつかの実施形態では、1つまたは複数の酢酸循環タンパク質の活性が低下される。いくつかの実施形態では、酢酸循環タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸の発現を低下、減衰、または欠失させることで、1つまたは複数の酢酸循環タンパク質の活性が低下される。このような実施形態では、酢酸循環タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸は、ホスホトランスアセチラーゼ (p t a)、酢酸キナーゼ (a c k A)、および酢酸輸送体／酢酸ポンプ (a c t P) からなる群から選択され得る。

【0075】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される組換え細胞は、s f c A、m a e B、p d h R、a c e E、a c e F、l p d A、g l t a、a c s、p t a、a c k A、a c t P、p f k A、r p e、r p i A、t k t a、t a l B、p g l、e d d、およびe d aからなる群から選択される、1つまたは複数のタンパク質をコードする1つまたは複数の核酸をさらに含んでなり、細胞は、核酸の発現および／またはタンパク質の活性が調節されるように修飾されている。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のタンパク質をコードする1つまたは複数の核酸の発現を増大させることで、これらのタンパク質の1つまたは複数の活性が増大される。特定の実施形態では、増大される1つまたは複数のタンパク質をコードする1つまたは複数の核酸は、a c k A、p t a、s f c A、m a e B、a c e E、a c e F、l p d A、a c s、r p e、r p i A、t k t a、t a l B、およびp g lからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のタンパク質をコードする1つまたは複数の核酸の発現を低下、減衰、または欠失させることで、これらのタンパク質の1つまたは複数の活性が低下される。特定の実施形態では、低下される1つまたは複数のタンパク質をコードする1つまたは複数の核酸は、p d h R、g l t a、p t a、a c k A、a c t P、p f k A、p g l、e d d、およびe d aからなる群から選択される。

【0076】

本明細書に記載される組換え細胞のいずれか1つの中では、1つまたは複数のアセチル化タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸、MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸、1つまたは複数のペントースリン酸経路タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸、または1つまたは複数の酢酸循環タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸が、誘導性プロモーターまたは構成的プロモーター下に置かれる。

【0077】

本明細書に記載される組換え細胞のいずれか1つの中では、1つまたは複数のアセチル化タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸、MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸、ホスホトランスアセチラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸、1つまたは複数のペントースリン酸経路タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸、または1つまたは複数の酢酸循環タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸が、1つまたは複数のマルチコピープラスミドにクローニングされる。

【0078】

本明細書に記載される組換え細胞のいずれか1つの中では、1つまたは複数のアセチル化タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸、MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸、ホスホトランスアセチラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸、1つまたは複数のペントースリン酸経路タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸、または1つまたは複数の酢酸循環タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸が、細胞の染色体に組み込まれる。

【0079】

本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、組換え細胞は、グラム陽性細菌細胞またはグラム陰性細菌細胞である。本明細書で開示される実施形態の

10

20

30

40

50

いずれかのその他の実施形態では、組換え細胞は、真菌細胞、糸状菌細胞、藻類細胞または酵母細胞である。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、組換え細胞は、バチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*)、ストレプトミセス・リビダンス (*Streptomyces lividans*)、ストレプトミセス・コエリカラー (*Streptomyces coelicolor*)、ストレプトミセス・グリセウス (*Streptomyces griseus*)、大腸菌 (*Escherichia coli*)、およびパントエア・シトレア (*Pantoea citrea*) からなる群から選択される。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、組換え細胞は、トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*)、アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、およびヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) からなる群から選択される。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、イソプレノイドは、モノテルペノイド、セスキテルペノイド、ジテルペノイド、セスタテルペノイド、トリテルペノイド、およびテトラテルペノイドからなる群から選択される。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、イソプレノイドは、アビエタジエン、アモルファジエン、カレン、 α -ファルネセン、 β -ファルネセン、ファルネソール、ゲラニオール、ゲラニルゲラニオール、リナロール、リモネン、ミルセン、ネロリドール、オシメン、パチョロール、 β -ピネン、サビネン、 γ -テルピネン、テルピネン、およびバレンセンからなる群から選択される。

10

20

【0080】

本明細書に記載される実施形態のいずれかでは、イソプレノイド生産は、アセチル化タンパク質をコードする核酸の発現および／またはアセチル化タンパク質の活性が調節されるように修飾されていない組換え細胞と比較して、増大される。

【0081】

本明細書に記載される実施形態のいずれかでは、イソプレノイド生産が少なくとも5%増大され、イソプレノイド生産の増大は、(i) 力価、(ii) 瞬間収率、(iii) 累積収率、(iv) 比生産性、または(v) 細胞生産性指数の増大を含んでなる。

【0082】

さらなる態様では、本明細書で提供されるのは、(a) 本明細書で開示される実施形態のいずれかの組換え細胞をイソプレノイドの生産に適した条件下で培養するステップと、(b) イソプレノイドを生産するステップとを含んでなる、イソプレノイドを生産する方法である。いくつかの実施形態では、方法は、(c) イソプレノイドを回収するステップをさらに含んでなる。

30

【0083】

なおも別の態様では、本明細書で提供されるのは、アセチルCoA由来産物を産生できる組換え細胞であり、細胞は、(i) 1つまたは複数のアセチル化タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸のどちらか、またはそれらの活性が調節されるように遺伝子操作されている1つまたは複数のアセチル化タンパク質；および(ii) ホスホクエトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を含んでなり、細胞は核酸の発現および／またはアセチル化タンパク質の活性が調節されるように修飾または遺伝子操作されており、細胞はアセチルCoA由来産物を産生する。いくつかの実施形態では、細胞は、(i) を含まないアセチルCoA由来産物を産生する能力がある細胞と比較して、増大した量のアセチルCoA由来産物を産生する。

40

【0084】

いくつかの実施形態では、アセチルCoA由来産物は、脂肪酸、フェノール、プロスタグランジン、マクロライド抗生物質、イソプレン、およびイソプレノイドからなる群から選択される。

【0085】

50

本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、1つまたは複数のアセチル化タンパク質の活性が減衰、欠失または増大するように、1つまたは複数のアセチル化タンパク質の活性が調節される。

【0086】

本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、アセチル化タンパク質はアセチルトランスフェラーゼである。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、アセチルトランスフェラーゼは、Y f i Q、P a t、およびA c u Aからなる群から選択される。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、アセチルトランスフェラーゼはY f i Qポリペプチドである。

【0087】

本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、アセチル化タンパク質はデアセチラーゼである。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、デアセチラーゼは、C o b BおよびS r t Nからなる群から選択される。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、デアセチラーゼはC o b Bポリペプチドである。

【0088】

本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、1つまたは複数のアセチル化タンパク質は、Y f i QポリペプチドおよびC o b Bポリペプチドからなる群から選択される。

【0089】

本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、アセチル化タンパク質はY f i Qポリペプチドである。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、Y f i Qポリペプチドの活性は、Y f i Qポリペプチドをコードする核酸の発現を低下、減衰、または欠失させることで調節される。

【0090】

本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、アセチル化タンパク質はC o b Bポリペプチドである。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、C o b Bポリペプチドの活性は、C o b Bポリペプチドをコードする核酸の発現を増大させることで調節される。

【0091】

本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、ホスホクトラゼ活性を有するポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸は、キシロース5-リン酸からグリセルアルデヒド3リン酸およびアセチルリン酸を合成する能力がある。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、ホスホクトラゼ活性を有するポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸は、フルクトース6-リン酸からエリスロース4-リン酸およびアセチルリン酸を合成する能力がある。

【0092】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される組換え細胞は、1つまたは複数のペントースリン酸経路タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸をさらに含んでなり、細胞は、ペントースリン酸経路タンパク質をコードする核酸の発現および／またはペントースリン酸経路タンパク質の活性が調節されるように修飾されている。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のペントースリン酸経路タンパク質の活性が増大される。

【0093】

特定の実施形態では、ペントースリン酸経路タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸の発現を増大させることで1つまたは複数のペントースリン酸経路タンパク質の活性が増大される。このような実施形態では、ペントースリン酸経路タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸は、トランスケトラゼ(t k t A)、トランスアルドラーゼ(t a l B)、リブロース5-リン酸-エピメラーゼ(r p e)、およびリボース5-リン酸エピメラーゼ(r p i A)からなる群から選択される。

【0094】

10

20

30

40

50

その他の実施形態では、1つまたは複数のペントースリン酸経路タンパク質の活性が低下される。特定の実施形態では、ペントースリン酸経路タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸の発現を低下、減衰、または欠失させることで、1つまたは複数のペントースリン酸経路タンパク質の活性が低下される。このような実施形態では、ペントースリン酸経路タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸は、ホスホフルクトキナーゼ（p f k A）を含んでなる。

【0095】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される組換え細胞は、1つまたは複数の酢酸循環タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸をさらに含んでなり、細胞は、酢酸循環タンパク質をコードする核酸の発現および／または酢酸循環タンパク質の活性が調節されるように修飾されている。

10

【0096】

いくつかの実施形態では、1つまたは複数の酢酸循環タンパク質の活性が増大される。いくつかの実施形態では、酢酸循環タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸の発現を増大させることで、1つまたは複数の酢酸循環タンパク質の活性が増大される。このような実施形態では、酢酸循環タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸は、アセチル補酵素Aシンセターゼ（a c s）、酢酸キナーゼ（a c k A）、およびホスホトランスアセチラーゼ（p t a）からなる群から選択され得る。

【0097】

いくつかの実施形態では、1つまたは複数の酢酸循環タンパク質の活性が低下される。いくつかの実施形態では、酢酸循環タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸の発現を低下、減衰、または欠失させることで、1つまたは複数の酢酸循環タンパク質の活性が低下される。このような実施形態では、酢酸循環タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸は、ホスホトランスアセチラーゼ（p t a）、酢酸キナーゼ（a c k A）、および酢酸輸送体／酢酸ポンプ（a c t P）からなる群から選択され得る。

20

【0098】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される組換え細胞は、s f c A、m a e B、p d h R、a c e E、a c e F、l p d A、g l t a、a c s、p t a、a c k A、a c t P、p f k A、r p e、r p i A、t k t a、t a l B、p g l、e d d、およびe d aからなる群から選択される、1つまたは複数のタンパク質をコードする1つまたは複数の核酸をさらに含んでなり、細胞は、核酸の発現および／またはタンパク質の活性が調節されるように修飾されている。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のタンパク質をコードする1つまたは複数の核酸の発現を増大させることで、これらのタンパク質の1つまたは複数の活性が増大される。特定の実施形態では、増大される1つまたは複数のタンパク質をコードする1つまたは複数の核酸は、a c k A、p t a、s f c A、m a e B、a c e E、a c e F、l p d A、a c s、r p e、r p i A、t k t a、t a l B、およびp g lからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のタンパク質をコードする1つまたは複数の核酸の発現を低下、減衰、または欠失させることで、これらのタンパク質の1つまたは複数の活性が低下される。特定の実施形態では、低下される1つまたは複数のタンパク質をコードする1つまたは複数の核酸は、p d h R、g l t a、p t a、a c k A、a c t P、p f k A、p g l、e d d、およびe d aからなる群から選択される。

30

40

【0099】

本明細書に記載される組換え細胞のいずれか1つの中では、1つまたは複数のアセチル化タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸、MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸、イソプレニンシンターゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸、ホスホケトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸、1つまたは複数のペントースリン酸経路タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸、または1つまたは複数の酢酸循環タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸が、誘導性プロモーターまたは構成的プロモーター下に置かれる。

50

【0100】

本明細書に記載される組換え細胞のいずれか1つの中では、1つまたは複数のアセチル化タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸、MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸、イソプレニンターゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸、ホスホケトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸、1つまたは複数のペントースリン酸経路タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸、または1つまたは複数の酢酸循環タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸は、1つまたは複数のマルチコピープラスミドにクローニングされる。

【0101】

本明細書に記載される組換え細胞のいずれか1つの中では、1つまたは複数のアセチル化タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸、MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸、イソプレニンターゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸、ホスホケトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸、1つまたは複数のペントースリン酸経路タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸、または1つまたは複数の酢酸循環タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸は、細胞の染色体に組み込まれる。

【0102】

本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、組換え細胞は、グラム陽性細菌細胞またはグラム陰性細菌細胞である。本明細書で開示される実施形態のいずれかのその他の実施形態では、組換え細胞は、真菌細胞、糸状菌細胞、藻類細胞または酵母細胞である。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、組換え細胞は、バチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*)、ストレプトミセス・リビダンス (*Streptomyces lividans*)、ストレプトミセス・コエリカラー (*Streptomyces coelicolor*)、ストレプトミセス・グリセウス (*Streptomyces griseus*)、大腸菌 (*Escherichia coli*)、およびパントエア・シトレア (*Pantoea citrea* からなる群から選択される)。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、組換え細胞は、トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*)、アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、およびヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) からなる群から選択される。

【0103】

本明細書に記載される実施形態のいずれかでは、アセチルCoA由来産物の生産は、アセチル化タンパク質をコードする核酸の発現および／またはアセチル化タンパク質の活性が調節されるように修飾されていない組換え細胞と比較して、増大される。

【0104】

別の態様では、本明細書で提供されるのは、(a) 本明細書で開示される実施形態のいずれか1つの組換え細胞をアセチルCoA由来産物の生産に適した条件下で培養するステップと、(b) アセチルCoA由来産物を生産するステップとを含んでなる、アセチルCoA由来産物を生産する方法である。いくつかの実施形態では、方法は、(c) アセチルCoA由来産物を回収するステップをさらに含んでなる。

【図面の簡単な説明】

【0105】

【図1A】図1Aは、4時間にわたる、YfiQ遺伝子に欠失を有する細胞と対比した、対照野性型YfiQ細胞の増殖(OD600)を描写する。図1Bは、同細胞の一晩の増殖を描写する。

【図1B】図1Aは、4時間にわたる、YfiQ遺伝子に欠失を有する細胞と対比した、対照野性型YfiQ細胞の増殖(OD600)を描写する。図1Bは、同細胞の一晩の増

殖を描写する。

【図2】4時間にわたる、Y f i Q遺伝子に欠失を有する細胞と対比した、対照野性型Y f i Q細胞のイソプレレン比生産性を描写する。

【図3】経時的にそれぞれ15Lの発酵中で測定された、酢酸のプロス濃度を描写する。MCM2732 (Y f i Q欠失) (黒菱形) ; MCS1227 (Y f i Q野性型) (白四角形)。

【図4】経時的にそれぞれ15Lの発酵中で測定された、グルコース比取り込み速度を描写する。MCM2732 (y f i Q欠失) (黒色菱形) ; MCS1227 (y f i Q野性型) (白色四角形)。

【図5】経時的にそれぞれ15Lの発酵中で得られた、容積イソプレレン生産性を描写する。MCM2732 (y f i Q欠失) (黒色菱形) ; MCS1227 (y f i Q野性型) (白色四角形)。

10

【図6】経時的にそれぞれ15Lの発酵中で得られた、グルコース上のイソプレレンの累積収率を描写する。MCM2732 (y f i Q欠失) (黒色菱形) ; MCS1227 (y f i Q野性型) (白四角形)。

【図7】経時的にそれぞれ15Lの発酵中で得られた、細胞性能指数(CPI)を描写する。MCM2732 (y f i Q欠失) (黒色菱形) ; MCS1227 (y f i Q野性型) (白四角形)。

【図8】経時的にそれぞれ15Lの発酵中で得られた、平滑化イソプレレン比生産性を描写する。MCM2732 (y f i Q欠失) (黒色菱形) ; MCS1227 (y f i Q野性型) (白四角形)。

20

【図9】唯一の炭素源としての様々な濃度の酢酸上で培養された、y f i Q野性型およびy f i Q欠失イソプレレン産生細胞の増殖速度を描写する。

【図10】唯一の炭素源としての様々な濃度の酢酸上で培養された、y f i Q野性型およびy f i Q欠失イソプレレン産生細胞のイソプレレン比生産性を描写する。

【図11】唯一の炭素源としてのグルコース上で培養された、y f i Q野性型およびy f i Q欠失イソプレレン産生細胞増殖速度を描写する。

【図12】唯一の炭素源としてのグルコース上で培養された、y f i Q野性型およびy f i Q欠失イソプレレン産生細胞のイソプレレン比生産性を描写する。

【図13】プラスミドpMCS826PKL16 (M. ホミニス (M. hominis)) のマップを描写する。

30

【図14】プラスミドpEWL1421のマップを描写する。

【図15】プラスミドpMCS1019のマップを描写する。

【図16】経時的にそれぞれ15Lの発酵中で測定された、酢酸のプロス濃度を描写する。全ての細胞は、y f i Q欠失を有する。MCM2732対照細胞 (M. ホミニス (M. hominis)) ホスホケトラーゼ異種性発現およびpta過剰発現 (黒色菱形) ; MCM3151 (M. ホミニス (M. hominis)) ホスホケトラーゼ異種発現およびpta欠失 (白色四角形) ; MD1206 (M. ホミニス (M. hominis)) ホスホケトラーゼ異種発現およびpta欠失 (白色三角形) ; MD1207 (E. ガリナラム (E. gallinarum)) ホスホケトラーゼ異種発現およびpta欠失 (「x」で標識された線)。

40

【図17】経時的にそれぞれ15Lの発酵中で得られた、グルコース上のイソプレレンの累積収率を描写する。全ての細胞は、y f i Q欠失を有する。MCM2732対照細胞 (M. ホミニス (M. hominis)) ホスホケトラーゼ異種発現およびpta過剰発現 (黒色菱形) ; MCM3151 (M. ホミニス (M. hominis)) ホスホケトラーゼ異種発現およびpta欠失 (白色四角形) ; MD1206 (M. ホミニス (M. hominis)) ホスホケトラーゼ異種発現およびpta欠失 (白色三角形) ; MD1207 (E. ガリナラム (E. gallinarum)) ホスホケトラーゼ異種発現およびpta欠失 (「x」で標識された線)。

【図18】経時的にそれぞれ15Lの発酵中で得られた、(40時間にわたる) グルコー

50

ス上のイソプレン収率を描写する。全ての細胞は、*y f i Q*欠失を有する。MCM2732対照細胞（*M. hominis*）ホスホクトラーゼ異種発現および*p t a*過剰発現（黒色菱形）；MCM3151（*M. hominis*）ホスホクトラーゼ異種発現および*p t a*欠失（白色四角形）；MD1206（*M. hominis*）ホスホクトラーゼ異種発現および*p t a*欠失（白色三角形）；MD1207（*E. gallinarum*）ホスホクトラーゼ異種発現および*p t a*欠失（「x」で標識された線）

【図19】*a c t P*欠失および*a c k A*過剰発現対立遺伝子交換ベクターのマップを描写する。

【図20A】MD1207（対照）、MD1245（*a c t P*欠失）、およびDW1245（*a c k A*過剰発現）の増殖速度（図20A）、経時的二酸化炭素放出速度（CER）（図20B）、経時的ブロス酢酸（図20C）、および経時的ブロスMVA（図20D）を描写する。全ての細胞は、*E. gallinarum*ホスホクトラーゼ異種発現がある*y f i Q*および*p t a*欠失である。

10

【図20B】MD1207（対照）、MD1245（*a c t P*欠失）、およびDW1245（*a c k A*過剰発現）の増殖速度（図20A）、経時的二酸化炭素放出速度（CER）（図20B）、経時的ブロス酢酸（図20C）、および経時的ブロスMVA（図20D）を描写する。全ての細胞は、*E. gallinarum*ホスホクトラーゼ異種発現がある*y f i Q*および*p t a*欠失である。

【図20C】MD1207（対照）、MD1245（*a c t P*欠失）、およびDW1245（*a c k A*過剰発現）の増殖速度（図20A）、経時的二酸化炭素放出速度（CER）（図20B）、経時的ブロス酢酸（図20C）、および経時的ブロスMVA（図20D）を描写する。全ての細胞は、*E. gallinarum*ホスホクトラーゼ異種発現がある*y f i Q*および*p t a*欠失である。

20

【図20D】MD1207（対照）、MD1245（*a c t P*欠失）、およびDW1245（*a c k A*過剰発現）の増殖速度（図20A）、経時的二酸化炭素放出速度（CER）（図20B）、経時的ブロス酢酸（図20C）、および経時的ブロスMVA（図20D）を描写する。全ての細胞は、*E. gallinarum*ホスホクトラーゼ異種発現がある*y f i Q*および*p t a*欠失である。

【図21A】MD1207（対照）、MD1245（*a c t P*欠失）、およびDW1245（*a c k A*過剰発現）の瞬間イソプレン／CO₂生産（図21A）、経時的に生じたイソプレン力価（図21B）、経時的に生じたイソプレン収率%（図21C）、および経時的イソプレン比生産性（図21D）を描写する。全ての細胞は、*E. gallinarum*ホスホクトラーゼ異種発現がある*y f i Q*および*p t a*欠失である。

30

【図21B】MD1207（対照）、MD1245（*a c t P*欠失）、およびDW1245（*a c k A*過剰発現）の瞬間イソプレン／CO₂生産（図21A）、経時的に生じたイソプレン力価（図21B）、経時的に生じたイソプレン収率%（図21C）、および経時的イソプレン比生産性（図21D）を描写する。全ての細胞は、*E. gallinarum*ホスホクトラーゼ異種発現がある*y f i Q*および*p t a*欠失である。

40

【図21C】MD1207（対照）、MD1245（*a c t P*欠失）、およびDW1245（*a c k A*過剰発現）の瞬間イソプレン／CO₂生産（図21A）、経時的に生じたイソプレン力価（図21B）、経時的に生じたイソプレン収率%（図21C）、および経時的イソプレン比生産性（図21D）を描写する。全ての細胞は、*E. gallinarum*ホスホクトラーゼ異種発現がある*y f i Q*および*p t a*欠失である。

【図21D】MD1207（対照）、MD1245（*a c t P*欠失）、およびDW1245（*a c k A*過剰発現）の瞬間イソプレン／CO₂生産（図21A）、経時的に生じたイソプレン力価（図21B）、経時的に生じたイソプレン収率%（図21C）、および経時的

50

的イソプレン比生産性（図21D）を描写する。全ての細胞は、E. ガリナーラム（E. gallinarum）ホスホケトラーゼ異種発現がある y f i Q および p t a 欠失である。

【図22】ペントースリン酸経路上方制御対立遺伝子交換ベクターのマップを描写する。

【図23】p f k A 下方制御対立遺伝子交換ベクターのマップを描写する。

【図24】最後のアミノ酸位置から3つ目に、イソロイシン（I）、アルギニン（R）、またはスレオニン（T）変異がある、P f k A : : T m R N A タンパク質分解タグを発現する細胞の増殖速度を描写する。

【図25A】MD1207（対照）およびMD1284（PPP過剰発現）の増殖速度（図25A）、経時的二酸化炭素放出速度（CER）（図25B）、ブ経時的ロス酢酸（図25C）、および経時的ブロスMVA（図25D）を描写する。全ての細胞は、E. ガリナーラム（E. gallinarum）ホスホケトラーゼ異種発現がある y f i Q および p t a 欠失である。

10

【図25B】MD1207（対照）およびMD1284（PPP過剰発現）の増殖速度（図25A）、経時的二酸化炭素放出速度（CER）（図25B）、ブ経時的ロス酢酸（図25C）、および経時的ブロスMVA（図25D）を描写する。全ての細胞は、E. ガリナーラム（E. gallinarum）ホスホケトラーゼ異種発現がある y f i Q および p t a 欠失である。

【図25C】MD1207（対照）およびMD1284（PPP過剰発現）の増殖速度（図25A）、経時的二酸化炭素放出速度（CER）（図25B）、ブ経時的ロス酢酸（図25C）、および経時的ブロスMVA（図25D）を描写する。全ての細胞は、E. ガリナーラム（E. gallinarum）ホスホケトラーゼ異種発現がある y f i Q および p t a 欠失である。

20

【図25D】MD1207（対照）およびMD1284（PPP過剰発現）の増殖速度（図25A）、経時的二酸化炭素放出速度（CER）（図25B）、ブ経時的ロス酢酸（図25C）、および経時的ブロスMVA（図25D）を描写する。全ての細胞は、E. ガリナーラム（E. gallinarum）ホスホケトラーゼ異種発現がある y f i Q および p t a 欠失である。

【図26A】MD1207（対照）およびMD1284（PPP過剰発現）の瞬間イソプレン／CO₂生産（図26A）、経時的に生じたイソプレン力価（図26B）、経時的に生じたイソプレン%収率的（図26C）、および経時的イソプレン比生産性（図26D）を描写する。全ての細胞は、E. ガリナーラム（E. gallinarum）ホスホケトラーゼ異種発現がある y f i Q および p t a 欠失である。

30

【図26B】MD1207（対照）およびMD1284（PPP過剰発現）の瞬間イソプレン／CO₂生産（図26A）、経時的に生じたイソプレン力価（図26B）、経時的に生じたイソプレン%収率的（図26C）、および経時的イソプレン比生産性（図26D）を描写する。全ての細胞は、E. ガリナーラム（E. gallinarum）ホスホケトラーゼ異種発現がある y f i Q および p t a 欠失である。

【図26C】MD1207（対照）およびMD1284（PPP過剰発現）の瞬間イソプレン／CO₂生産（図26A）、経時的に生じたイソプレン力価（図26B）、経時的に生じたイソプレン%収率的（図26C）、および経時的イソプレン比生産性（図26D）を描写する。全ての細胞は、E. ガリナーラム（E. gallinarum）ホスホケトラーゼ異種発現がある y f i Q および p t a 欠失である。

40

【図26D】MD1207（対照）およびMD1284（PPP過剰発現）の瞬間イソプレン／CO₂生産（図26A）、経時的に生じたイソプレン力価（図26B）、経時的に生じたイソプレン%収率的（図26C）、および経時的イソプレン比生産性（図26D）を描写する。全ての細胞は、E. ガリナーラム（E. gallinarum）ホスホケトラーゼ異種発現がある y f i Q および p t a 欠失である。

【図27A】MD1207（対照）、MD1284（PPP過剰発現）、MD1286（PPP過剰発現およびP f k A I タグ）、MD1285（PPP過剰発現およびP f k A

50

Tタグ)、MD1287((PPP過剰発現およびPfkARタグ))の増殖速度(図27A)および経時的に生じたイソプレニ力価(図27B)を描写する。全ての細胞は、E. ガリナーラム(*E. gallinarum*)ホスホクトラゼ異種発現があるyfiQおよびpta欠失である。

【図27B】MD1207(対照)、MD1284(PPP過剰発現)、MD1286(PPP過剰発現およびPfkAIタグ)、MD1285(PPP過剰発現およびPfkATタグ)、MD1287((PPP過剰発現およびPfkARタグ))の増殖速度(図27A)および経時的に生じたイソプレニ力価(図27B)を描写する。全ての細胞は、E. ガリナーラム(*E. gallinarum*)ホスホクトラゼ異種発現があるyfiQおよびpta欠失である。

10

【図28】メバロン酸、イソプレニ、イソプレノイド、イソプレノイド前駆体、および／またはアセチルCoA由来産物を生成する細胞内の代謝を描写する。

【発明を実施するための形態】

【0106】

本発明は、特に、タンパク質のアセチル化(「アセチル化タンパク質(acetylating proteins)」または「アセチル化タンパク質(acetylation proteins)」)に関与するポリペプチドをコードする遺伝子の発現を調節するために遺伝子操作されている組換え微生物中で、メバロン酸、イソプレニ、イソプレノイド前駆体分子、イソプレノイド、および／またはアセチルCoA由来産物の生産を増大させる組成物および方法を提供する。より具体的には、本発明は、特に、その中で1つまたは複数のアセチル化タンパク質の活性が調節されている細胞を含んでなる、組換え微生物、またはそれらの子孫を提供する。これらのアセチル化タンパク質としては、制限なしに、アセチルトランスフェラーゼポリペプチド(アセチルトランスフェラーゼ)および／またはデアセチラーゼポリペプチドが挙げられる。いくつかの実施形態では、前記1つまたは複数のアセチル化タンパク質の活性は、前記1つまたは複数のアセチル化タンパク質の活性が、低下、減衰、欠失または増大するように調節される。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、1つまたは複数のアセチル化タンパク質は、YfiQポリペプチド、Patポリペプチド、AcuAポリペプチド、サルモネラ・エンテリカ(*Salmonella enterica*)アセチルトランスフェラーゼ(gi|16503810|emb|CAD05835.1|配列番号51)、ロドシュードモナス・パルストリス(*Rhodopseudomonas palustris*)GCN5ファミリーN-アセチルトランスフェラーゼ(gi|499473135|ref|WP_011159775.1|配列番号52)、ストレプトミセス・リビダンス(*Streptomyces lividans*)タンパク質アセチルトランスフェラーゼ(EFD66247配列番号53)、マイコバクテリウム・ツベルクロシス(*Mycobacterium tuberculosis*)アセチルトランスフェラーゼ(gi|15608138|ref|NP_215513.1|配列番号54)、およびマイコバクテリウム・スメグマチス(*Mycobacterium smegmatis*)アセチルトランスフェラーゼ(gi|118468187|ref|YP_889697.1|配列番号55)からなる群から選択される。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、1つまたは複数のアセチル化タンパク質は、CobBポリペプチド、SrtNポリペプチド、サルモネラ・エンテリカ(*Salmonella enterica*)NAD依存性デアセチラーゼ(gi|16764576|ref|NP_460191.1|配列番号56)、ロドシュードモナス・パルストリス(*Rhodopseudomonas palustris*)NAD依存性デアセチラーゼ(gi|499471434|ref|WP_011158074.1|配列番号57)、およびマイコバクテリウム・ツベルクロシス(*Mycobacterium tuberculosis*)NAD依存性タンパク質デアシラーゼ(gi|614103494|sp|P9WGG3.1|NPD_MYCTU配列番号58)からなる群から選択される。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、1つまたは複数のアセチル化タン

20

30

40

50

パク質は、Y f i QポリペプチドおよびC o b Bポリペプチドからなる群から選択される。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、アセチル化タンパク質はY f i Qポリペプチドである。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、Y f i Qポリペプチドの活性は、Y f i Qポリペプチドをコードする遺伝子／核酸の発現を低下、減衰、または欠失させることで調節される。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、Y f i Qポリペプチドをコードする遺伝子の発現を増大させることで、Y f i Qポリペプチドの活性が調節される。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、アセチル化タンパク質はC o b Bポリペプチドである。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、C o b Bポリペプチドの活性は、C o b Bポリペプチドをコードする遺伝子の発現を低下、減衰、または欠失させることで調節される。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、C o b Bポリペプチドの活性は、C o b Bポリペプチドをコードする遺伝子の発現を増大させることで調節される。

10

【0107】

本明細書で詳述されるように、アセチル化は、迅速に変化する条件に応答して、タンパク質の活性を調節しならびに遺伝子発現を制御するために、細胞によって使用される翻訳後修飾である（C e r e z o e t a l . , 2011, M o l e c . M i c r o b . , 82(5):1110-28）。細胞タンパク質のアセチル化は、細胞内で利用可能なアセチルC o Aのアセチル基を標的タンパク質上に転移するアセチルトランスフェラーゼ、およびタンパク質中のアミノ酸からアセチル基を除去するデアセチラーゼとして知られている酵素によって調節される。本明細書で開示されるように、本発明者らは、特に、細胞内アセチル化の制御に関与する遺伝子の調節が、イソプレン、イソプレノイド前駆体、およびイソプレノイドをはじめとする、メバロン酸由来分子の生産に、ならびにアセチルC o A由来分子の生産に、実質的で驚くべき改善をもたらすことを発見した。

20

【0108】

一態様では、本明細書で開示される組換え微生物は、細胞（細菌、真菌、または藻類細胞など）であり、それは、1つまたは複数のメバロン酸（M V A）経路ポリペプチドをコードする核酸を異種発現するように、さらに遺伝子操作または修飾されている。メバロン酸依存性合成経路は、イソプレノイド前駆体分子ジメチルアリルニリン酸（D M A P P）およびイソペンテニルピロリン酸（I P P）の生産に、特に重要である。上流メバロン酸経路の酵素は、3つの酵素反応を通じて、アセチルC o Aをメバロン酸に変換する。理論に束縛されることなく、上流メバロン酸依存性合成経路への導入のために細胞内で利用可能なアセチルC o Aの量の増大は、メバロン酸の細胞内濃度、ひいてはD M A P PおよびI P Pなどの下流イソプレノイド前駆体分子の濃度を実質的に増大させると考えられる。したがってこれらの株によるメバロン酸生産の収量増大は、商業的応用に有利である。組換え微生物のあらゆる子孫もまた、本発明の範囲内であることが検討される。

30

【0109】

さらに、細胞代謝中の炭素利用に関与する追加的な遺伝子の調節、またはアセチルC o Aの利用可能な細胞内供給に関与するとされるものもまた調節されて、メバロン酸、イソプレン、イソプレノイド前駆体、および／またはイソプレノイドの生産が改善されてもよい。これらとしては、より多くの炭素流がメバロン酸の生産に向かうように、代謝経路中の酵素活性を増大または低下させるように調節され得る、ホスホケトラーゼ、クエン酸シンターゼ、ホスホトランスアセチラーゼ、酢酸キナーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、リンゴ酸酵素および／またはピルビン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子が挙げられるが、これに限定されるものではない。その調節が、細胞内でメバロン酸の生産に向かう炭素流を増大させ得るその他の要素としては、6-ホスホグルコノラクトナーゼ、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ、マグネシウム欠乏時R s s B活性インヒビタータンパク質、多剤排出ポンプA c r A B-T o l CのA c r A成分、およびフマル酸および硝酸還元R N Aが挙げられる。これは次に、イソプレン、イソプレノイド前駆体、およびイソプレノイドの生産のためのより多くの基質をもたらし得る。したがって本出願の組成物およ

40

50

び方法は、メバロン酸、イソプレン、イソプレノイド前駆体分子、イソプレノイド、およびアセチルCoA由来産物の生産を増大させるために利用可能な微生物株の数、ならびに細胞（細菌、真菌、または藻類細胞など）によって生産されるこれらの化合物（例えば、メバロン酸）の量の双方において、当該技術分野で以前実施されていたものの改善に相当する。

【0110】

一般技術

特に断りのない限り、本発明の実施は、当該分野の技術範囲内である、（組換え技術をはじめとする）従来の分子生物学技術、微生物学、細胞生物学、生化学、および免疫学を採用する。このような技術は、文献、“Molecular Cloning: A Laboratory Manual”，第2版（Sambrook et al., 1989）；“Oligonucleotide Synthesis”（M. J. Gait編，1984）；“Animal Cell Culture”（R. I. Freshney編，1987）；“Methods in Enzymology”（Academic Press, Inc.）；“Current Protocols in Molecular Biology”（F. M. Ausubel et al., 編., 1987, and periodic updates）；“PCR: The Polymerase Chain Reaction”，（Mullis et al., 編，1994）. Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 第2版, J. Wiley & Sons (New York, N. Y. 1994)、およびMarch, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 第4版, John Wiley & Sons (New York, N. Y. 1992)で詳しく説明され、当業者に、本出願で使用される多くの用語について、一般的指針を提供する。

【0111】

定義

「完全メバロン酸（MVA）経路」または「全メバロン酸（MVA）経路」という用語は、アセチルCoAをピロリン酸ジメチルアリル（DMA PP）およびイソペンテニルピロリン酸（IPP）に変換する、細胞代謝経路を指し、それは、酵素アセトアセチル補酵素Aシンターゼ（例えば、チオラーゼ）、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル補酵素Aシンターゼ、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル補酵素A還元酵素、メバロン酸キナーゼ（MVK）、ホスホメバロン酸キナーゼ（PMK）、ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ（MVD）、およびイソペンテニルニリン酸イソメラーゼ（IDI）によって触媒される。

【0112】

本明細書の用法では、「上流メバロン酸経路」または「上流MVA経路」という用語は、酵素アセトアセチル補酵素Aシンターゼ（例えば、チオラーゼ）、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル補酵素Aシンターゼ、および3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル補酵素A還元酵素によって触媒される、細胞内の一連の反応を指す。

【0113】

「下流メバロン酸経路」または「下流MVA経路」という用語は、酵素メバロン酸キナーゼ（MVK）、ホスホメバロン酸キナーゼ（PMK）、ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ（MVD）、およびイソペンテニルニリン酸イソメラーゼ（IDI）によって触媒される、細胞内の一連の反応を指す。

【0114】

「イソプレン」という用語は、2-メチル-1, 3-ブタジエン（CAS # 78-79-5）を指す。それは、3, 3-ジメチルアリルニリン酸（DMA PP）からのピロリン酸除去からの、直接および最終揮発性C5炭化水素生成物であり得る。これは、IPP分子のDMA PP分子への結合または重合を伴わなくてもよい。「イソプレン」という用

語は、本明細書で特に断りのない限り、通常、その生産方法に限定されることは意図されない。

【0115】

本明細書の用法では、「ポリペプチド」という用語は、ポリペプチド、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド断片、および融合ポリペプチドを含む。

【0116】

本明細書の用法では、「単離ポリペプチド」は、2、5、10、20、50以上の異なるポリペプチドライブラリーなどのポリペプチドライブラリーの一部でなく、それが自然界で一緒に存在する少なくとも1つの構成要素から分離される。単離ポリペプチドは、例えば、ポリペプチドをコードする組換え核酸の発現によって得られ得る。

10

【0117】

「異種ポリペプチド」とは、宿主細胞とは異なる生物、種、または株に由来する核酸配列によってコードされる、ポリペプチドを意味する。いくつかの実施形態では、異種ポリペプチドは、自然界で同一宿主細胞に見られる、野生型ポリペプチドと同じでない。

【0118】

本明細書の用法では、「核酸」は、一本鎖または二本鎖形態のどちらかで、共有結合的に共に連結した2つ以上のデオキシリボヌクレオチドおよび／またはリボヌクレオチドを指す。

【0119】

「組換え核酸」とは、それに関心のある核酸が由来する生物の天然ゲノム中で、関心のある核酸の側面に位置する1つまたは複数の核酸（例えば、遺伝子）を含まない、関心のある核酸を意味する。したがって用語は、例えば、ベクターに、自己複製プラスミドまたはウイルスに、または原核生物または真核生物ゲノムDNAに、組み込まれた組換えDNA、またはその他の配列から独立した別個の分子（例えば、PCRまたは制限エンドヌクレアーゼ消化によって生じる、cDNA、ゲノムDNA断片、またはcDNA断片）として存在する組換えDNAを含む。

20

【0120】

「異種核酸」は、宿主細胞とは異なる生物、種または株に由来する核酸配列を意味する。いくつかの実施形態では、異種核酸は、天然で同一宿主細胞に見られる野生型核酸と同じでない。例えば、大腸菌（E. coli）染色体に形質転換されまたは組み込まれたmvaEおよびmvaS遺伝子によってコードされる核酸は、異種核酸である。

30

【0121】

本明細書の用法では、「発現調節配列」は、興味深い核酸の転写を誘導する核酸配列を意味する。発現調節配列は、構成的または誘導性プロモーターなどのプロモーター、またはエンハンサーであり得る。発現調節配列は、「天然」または異種であり得る。天然発現調節配列は、発現される遺伝子と同じ生物、種、または株に由来する。異種発現調節配列は、発現される遺伝子と異なる生物、種、または株に由来する。「誘導性プロモーター」は、環境的または発生的調節下において、活性のプロモーターである。

【0122】

「作動可能に連結する」とは、核酸発現制御配列（プロモーターなど）と第2の核酸配列の間の機能的連結を意味し、発現調節配列は、第2の配列に対応する、核酸の転写を誘導する。

40

【0123】

本明細書の用法では、「最少培地（単数）」または「最少培地（複数）」という用語は、細胞増殖で可能な最少栄養素を含有して、通常はアミノ酸が不在である増殖培地を指す。最少培地は、典型的に、（1）微生物（例えば、細菌、真菌、または藻類細胞）増殖のための炭素源；（2）微生物（例えば、細菌）種および増殖条件間で変動し得る様々な塩；および（3）水を含有する。炭素源は、下でより詳細に考察されるように、グルコースのような単糖類から、酵母抽出物などの他のバイオマスのより複雑な加水分解物まで、著しく変動し得る。塩は、通常、マグネシウム、窒素、リン、およびイオウなどの必須元素

50

を提供して、細胞がタンパク質および核酸を合成できるようにする。最少培地はまた、特定のプラスミドの維持などについて選択するために、抗生物質などの選択的薬剤によって補足し得る。例えば、微生物が、アンピシリンまたはテトラサイクリンなどの特定の抗生物質に耐性があれば、抵抗性を欠く細胞が増殖するのを防ぐために、その抗生物質を培地に添加し得る。培地は、特定のアミノ酸などの所望の生理学的または生化学的特性について選択するために、必要に応じて、その他の化合物で補足し得る。

【0124】

本明細書の用法では、「イソプレノイド」という用語は、各単位が特定パターンに配列された5つの炭素原子からなる、2つ以上の炭化水素単位から構成される天然有機化合物クラスの大規模かつ多様なクラスを指す。本明細書の用法では、「イソプレン」は、「イソプレノイド」の定義から明示的に除外される。

10

【0125】

本明細書の用法では、「テルペノイド」という用語は、多様な様式で構築および修飾されて、グループ構成員中で使用されるイソプレノイド単位数に基づいてグループ分けされた、五炭素イソプレノイド単位に由来する有機分子の大規模かつ多様なクラスを指す。ヘミテルペノイドは、1つのイソプレノイド単位を有する。モノテルペノイドは、2つのイソプレノイド単位を有する。セスキテルペノイドは、3つのイソプレノイド単位を有する。ジテルペノイドは、4つのイソプレノイド単位を有する。セスタテルペノイドは、5つのイソプレノイド単位を有する。トリテルペノイドは、6つのイソプレノイド単位を有する。テトラテルペノイドは、8つのイソプレノイド単位を有する。ポリテルペノイドは、8つを超えるイソプレノイド単位を有する。

20

【0126】

本明細書の用法では、「イソプレノイド前駆体」は、テルペノイドまたはイソプレノイドの生合成において、生物によって使用される任意の分子を指す。イソプレノイド前駆体分子の非限定的例としては、例えば、イソペンテニルピロリン酸 (IPP)、およびジメチルアリル二リン酸 (DMA PP) が挙げられる。

【0127】

本明細書の用法では、「質量収率」という用語は、細胞（細菌、真菌、または藻類細胞など）によって消費されたグルコース質量で除して100を乗じた、細胞（細菌、真菌、または藻類細胞など）によって生産された産物の質量を指す。

30

【0128】

「比生産性」とは、生成物生成時間、細胞密度、および培養物容積で除した、細胞（細菌、真菌、または藻類細胞など）によって生成された生成物の質量を意味する。

【0129】

「力価」は、培養液の容積で除した、細胞（細菌、真菌、または藻類細胞など）によって生成された生成物の質量を意味する。

【0130】

本明細書の用法では、「細胞生産性指標 (CPI)」という用語は、培養物中に生じた細胞（細菌、真菌、または藻類細胞など）の質量で除した、細胞（細菌、真菌、または藻類細胞など）によって産生された生成物の質量を指す。

40

【0131】

本明細書の用法では、「アセチルCoA由来産物」という用語は、アセチルCoAに由来する二次代謝産物を指す。二次代謝産物の例としては、脂肪酸、フェノール、プロスタグランジン、マクロライド抗生物質、イソプレン、およびイソプレノイドが挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0132】

本明細書で特に断りのない限り、本明細書で使用される全ての技術的および科学的用語は、本発明が関係する技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。

【0133】

50

本明細書の用法では、単数の用語「a」、「an」、および「the」は、文脈上明白に別段の記載がない限り、複数への言及を含む。

【0134】

本明細書全体を通じて記載されるあらゆる最大数値限界は、あたかもより低い数値限界が本明細書に明示的に記載されているかのように、あらゆるより低い数値限界を含むことが意図される。本明細書全体を通じて示されるあらゆる最小数値限界は、あたかもより高い数値限界が本明細書に明示的に記載されているかのように、あらゆるより高い数値限界を含む。本明細書全体を通じて示されるあらゆる数値範囲は、あたかもより狭い数値範囲が本明細書に明示的に記載されているかのように、このようなより広い数値範囲に含まれるあらゆるより狭い数値範囲を含む。

10

【0135】

細胞アセチル化機構の調節

タンパク質中の残基のアセチル化は、原核および真核細胞全体を通じて見られる翻訳後修飾である。リジン残基のアセチル化は、観察される一般的な翻訳後修飾である。翻訳後修飾として、アセチル化は、迅速に変化する条件に応答してタンパク質の活性を調節し、ならびに遺伝子発現を制御するために、細胞によって使用され得る (Cerez et al., 2011, Molec. Microb., 82 (5): 1110-28)。細胞タンパク質のアセチル化は、アセチルCoA分子のアセチル基を標的タンパク質上に転移する、アセチルトランスフェラーゼ (アセチルCoA依存性アセチルトランスフェラーゼまたはGcn5様タンパク質N-アセチルトランスフェラーゼなど、例えばYfiQ) として知られている酵素によって調節される。本明細書の用法では、「YfiQ」という用語は、「タンパク質リジンアセチラーゼ」または「pka」という用語と同義的に使用され得る yfiQ によってコードされる、アセチルトランスフェラーゼポリペプチドを指す。対照的に、細胞内タンパク質の脱アセチル化は、NAD⁺依存性 (Sir2様) タンパク質デアセチラーゼ (サーチュインとしてもまた知られている、例えばCobB) などのデアセチラーゼとして知られている酵素によって調節される。

20

【0136】

微生物におけるタンパク質アセチル化の1つの重要な標的は、AMP形成アセチル補酵素Aシンセターゼ (Acs) であり、これは酢酸から中央代謝のキーストーン分子である高エネルギー中間体アセチルCoAへの変換に関与する、遍在性酵素である (Cerez et al., 2011, Molec. Microb., 82 (5): 1110-28)。CobBのデアセチラーゼの活性は、生体外においてAcs上で実証している (Zhao et al., 2004, J. Mol. Biol., 337: 731-41)。理論に束縛されることなく、Acsのアセチル化はその酵素的不活性化をもたらすので、Acsアセチル化の量を低下させるように遺伝子操作された細胞は、より大量のアセチルCoAを産生することが予期され得る。

30

【0137】

細胞内タンパク質アセチル化に関与する経路を遺伝子操作することで、組換え微生物は、調節された内在性アセチルトランスフェラーゼおよび/またはデアセチラーゼ遺伝子発現またはタンパク質活性を有しない微生物と比較して、酢酸の産生量が低下し得る。酢酸の産生量の低下は、当業者に公知の日常的アッセイによって測定され得る。酢酸の量低下は、アセチル化タンパク質の1つまたは複数をコードする1つまたは複数の核酸を含んた細胞と比較して、少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%であり、前記細胞は、核酸発現および/またはアセチル化タンパクの活性が調節されるように遺伝子操作されている。

40

【0138】

アセチルトランスフェラーゼ (YfiQ (pka)、Pat、またはAcuAなどであるが、これに限定されるものではない) またはデアセチラーゼ (CobBおよびSrtN

50

などであるが、これに限定されるものではない)の活性はまた、タンパク質活性または遺伝子発現の分子操作によって低下され得る。タンパク質活性または遺伝子発現の低下は、操作が実施されていない場合と比較した、遺伝子発現、比活性または全活性の任意の量の低下であり得る。場合によっては、酵素活性の低下は、少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%低下される。

【0139】

アセチルトランスフェラーゼ(YfiQ(pka)、Pat、またはAcuAなどであるが、これに限定されるものではない)またはデアセチラーゼ(CobBおよびSrtNなどであるが、これに限定されるものではない)の活性はまた、タンパク質活性または遺伝子発現の分子操作によって増大され得る。タンパク質活性または遺伝子発現の増大は、操作が実施されていない場合と比較した、遺伝子発現、比活性または全活性の任意の量の増大であり得る。場合によっては、酵素活性の増大は、少なくとも約1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%、750%、1000%以上増大される。

【0140】

いくつかの実施形態では、前記1つまたは複数のアセチル化タンパク質の活性は、前記1つまたは複数のアセチル化タンパク質の活性が、減衰、欠失または増大するように調節される。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、1つまたは複数のアセチル化タンパク質は、YfiQポリペプチドおよびCobBポリペプチドからなる群から選択される。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、アセチル化タンパク質はYfiQポリペプチドである。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、YfiQポリペプチドの活性は、YfiQポリペプチドをコードする遺伝子の発現を低下、減衰、または欠失させることで調節される。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、YfiQポリペプチドをコードする遺伝子の発現を増大させることで、YfiQポリペプチドの活性が調節される。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、アセチル化タンパク質はCobBポリペプチドである。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、CobBポリペプチドの活性は、CobBポリペプチドをコードする遺伝子の発現を低下、減衰、または欠失させることで調節される。本明細書で開示される実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、CobBポリペプチドの活性は、CobBポリペプチドをコードする遺伝子の発現を増大させることで調節される。

【0141】

場合によっては、アセチルトランスフェラーゼおよび/またはデアセチラーゼ遺伝子の活性(転写時(すなわち、遺伝子発現)および/または翻訳レベル(すなわち、タンパク質活性))のどちらかの調節は、アセチルトランスフェラーゼおよび/またはデアセチラーゼ活性の調節を有しない細胞と比較して、メバロン酸依存性生合成経路に向かうより多くの炭素流をもたらす。

【0142】

メバロン酸産生能力がある組換え細胞

メバロン酸依存性生合成経路(MVA経路)は、全ての高等真核生物および特定の細菌に存在する、主要代謝経路である。タンパク質プレニル化、細胞膜保守、タンパク質固着、およびN-グリコシル化などの多様なプロセスで使用される分子の生成に重要であるのに加えて、メバロン酸経路は、テルペン、テルペノイド、イソプレノイド、およびイソプレノ生合成のための基礎原料の役割を果たす、イソプレノイド前駆体分子DMAPPおよびIPPの主要な供給源を提供する。

【0143】

MVA経路の上流部分では、チオラーゼ、HMG-CoA還元酵素活性、およびHMG

10

20

30

40

50

ーC o Aシンターゼ酵素活性のいずれかを有するポリペプチドの作用によって、細胞代謝中に生成されたアセチルC o Aがメバロン酸に変換される。最初に、アセチルC o Aが、チオラーゼの作用によって、アセトアセチルC o Aに変換される。次に、アセトアセチルC o Aが、HMG-C o Aシンターゼの酵素作用によって、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリルC o A (HMG-C o A)に変換される。このC o A誘導体は、HMG C o A還元酵素によってメバロン酸に還元され、これはイソプレノイド生産のメバロン酸経路の律速段階である。メバロン酸は、次にメバロン酸キナーゼ作用によって、メバロン酸5-リン酸に変換され、それは引き続いてホスホメバロン酸キナーゼの酵素活性によって、メバロン酸5-ピロリン酸に変換される。最後に、メバロン酸5-ピロリン酸デカルボキシラーゼ酵素の活性によって、メバロン酸5-ピロリン酸からI P Pが生成される。

10

【0144】

いくつかの態様では、本明細書で言及される酵素のいずれかの調節は、発現（例えば、転写または翻訳）、生産、翻訳後修飾または任意のその他の酵素機能に影響を及ぼし得る。いくつかの実施形態では、組換え細胞内の酵素機能（例えば、触媒能力）は、このような調節のために遺伝子操作されていない細胞と比較して、増大または低下される。一実施形態では、酵素機能（例えば、活性）は、遺伝子操作されていない細胞と比較して増大される。別の実施形態では、酵素機能（例えば、活性）は、遺伝子操作されていない細胞と比較して低下される。

【0145】

上流および下流MVA経路からの酵素のいずれでも、本明細書に記載される遺伝子操作宿主細胞との組み合わせで使用されてもよい。MVA経路ポリペプチドの非限定的例としては、アセチルC o Aアセチルトランスフェラーゼ（AA-C o Aチオラーゼ）ポリペプチド、アセトアセチル-C o Aシンターゼ（nphT7）、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリルC o Aシンターゼ（HMG-C o Aシンターゼ）ポリペプチド、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリルC o A還元酵素（HMG-C o A還元酵素）ポリペプチド、メバロン酸キナーゼ（MVK）ポリペプチド、ホスホメバロン酸キナーゼ（PMK）ポリペプチド、ジホスホメバロン酸（diphosphomevalonate）デカルボキシラーゼ（MVD）ポリペプチド、ホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ（PMDK）ポリペプチド、イソペンテニルリン酸キナーゼ（IPK）ポリペプチド、IDIポリペプチド、およびMVA経路ポリペプチドの2つ以上の活性を有するポリペプチド（例えば、融合ポリペプチド）が挙げられる。MVA経路ポリペプチドとしては、MVA経路ポリペプチドの少なくとも1つの活性を有する、ポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、および融合ポリペプチドが挙げられる。例示的なMVA経路核酸としては、MVA経路ポリペプチドの少なくとも1つの活性を有する、ポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、または融合ポリペプチドをコードする核酸が挙げられる。例示的なMVA経路ポリペプチドおよび核酸としては、本明細書に記載される起源生物のいずれかに由来する、天然ポリペプチドおよび核酸が挙げられる。

20

30

【0146】

使用され得るMVA経路ポリペプチドの非限定的例は、国際公開第2009/076676号パンフレット；国際公開第2010/003007号パンフレット、および国際公開第2010/148150号パンフレットに記載される。

40

【0147】

mv a Eおよびmv a Sポリペプチドをコードする遺伝子

いくつかの微生物（L. グレイー（L. grayi）、E. フェシウム（E. faecium）、E. ガリナラム（E. gallinarum）、E. カセリフラブス（E. casseliflavus）、およびE. ファエカリス（E. faecalis）などであるが、これに限定されるものではない）において、mv a E遺伝子は、チオラーゼおよびHMG-C o A還元酵素活性の双方を持つポリペプチドをコードする。事実上、mv a E遺伝子産物は、真正細菌中で発見された最初のI P P生合成の二機能性酵素、および天然で別のタンパク質に融合するHMG-C o A還元酵素の最初の例に相当する（Hed

50

l, et al., J Bacteriol. 2002 April; 184 (8) : 2116-2122)。他方、mvaS遺伝子は、HMG-CoAシンターゼ活性を有するポリペプチドをコードする。異なる細菌種、E. フェカリス (E. faecalis) mvaEおよびmvaS遺伝子が、以前、メバロン酸を生産するために大腸菌 (E. coli) 株に組み込まれている (その開示が参照により本明細書に援用される米国特許出願公開第2005/0287655A1号明細書を参照されたい; Tabata, K. and Hashimoto, S. -I. Biotechnology Letters 26: 1487-1491, 2004)。

【0148】

したがって、細胞 (例えば、大腸菌 (E. coli) などの細菌細胞) は、1つまたは複数のmvaEおよびmvaS遺伝子 (L. グレイー (L. grayi)、E. フェシウム (E. faecium)、E. ガリナーラム (E. gallinarum)、E. カセリフラブス (E. casseliflavus)、および/またはE. フェカリス (E. faecalis) に由来するmvaEおよびmvaS遺伝子などであるが、これに限定されるものではない) を発現するように遺伝子操作されて、メバロン酸の生産量、ピーク力価、および細胞生産性が増大され得る。1つまたは複数のmvaEおよびmvaS遺伝子は、マルチコピープラスミド上で発現させ得る。プラスミドは、高コピー数プラスミド、低コピー数プラスミド、または中程度コピー数プラスミドであり得る。代案としては、1つまたは複数のmvaEおよびmvaS遺伝子は、宿主細胞の染色体に組み込み得る。プラスミド上の、または宿主細胞の染色体に組み込まれた部分としての双方の、1つまたは複数のmvaEおよびmvaS遺伝子の異種発現で、遺伝子の発現は、誘導性プロモーターまたは構成的発現プロモーターのどちらかによって駆動され得る。プロモーターは、1つまたは複数のmvaEおよびmvaS遺伝子発現の強力な駆動機構であり得て、それは発現の弱い駆動機構であり得て、またはそれは発現の中程度の駆動機構であり得る。

【0149】

上流MVA経路ポリペプチドをコードする任意の遺伝子が、本発明で使用され得る。特定の実施形態では、mvaEおよびmvaS遺伝子 (L. グレイー (L. grayi)、E. フェシウム (E. faecium)、E. ガリナーラム (E. gallinarum)、E. カセリフラブス (E. casseliflavus)、および/またはE. フェカリス (E. faecalis) に由来するmvaEおよびmvaS遺伝子などであるが、これに限定されるものではない) 様々な選択肢が、単独で、または上流MVA経路からのタンパク質をコードする1つまたは複数のその他のmvaEおよびmvaS遺伝子との組み合わせで、本発明の範囲内で検討される。したがって、特定の態様では、表1で検討される遺伝子のいずれかの組み合わせが、上に記載される様式のいずれかで、細胞 (細菌、真菌、または藻類細胞など) 内で発現され得る。

【0150】

【表 1】

表 1:検討された宿主細胞内における *MvaE* および *MvaS* 遺伝子の発現選択肢

	<i>L. グレイ</i> (<i>L. grayi</i>), <i>mvaE</i>	<i>E. フェシウム</i> (<i>E. faecium</i>), <i>mvaE</i>	<i>E. ガリナーラム</i> (<i>E. gallinarum</i>), <i>mvaE</i>	<i>E. カセリフラブス</i> (<i>E. casseliflavus</i>), <i>mvaE</i>	<i>E. ファエカリス</i> (<i>E. faecalis</i>), <i>mvaE</i>
<i>L. グレイ</i> (<i>L. grayi</i>), <i>mvaS</i>	<i>L. グレイ</i> (<i>L. grayi</i>), <i>mvaE</i> <i>L. グレイ</i> (<i>L. grayi</i>), <i>mvaS</i>	<i>E. フェシウム</i> (<i>E. faecium</i>), <i>mvaE</i> <i>L. グレイ</i> (<i>L. grayi</i>), <i>mvaS</i>	<i>E. ガリナーラム</i> (<i>E. gallinarum</i>), <i>mvaE</i> <i>L. グレイ</i> (<i>L. grayi</i>), <i>mvaS</i>	<i>E. カセリフラブス</i> (<i>E. casseliflavus</i>), <i>mvaE</i> <i>L. グレイ</i> (<i>L. grayi</i>), <i>mvaS</i>	<i>E. ファエカリス</i> (<i>E. faecalis</i>), <i>mvaE</i> <i>L. グレイ</i> (<i>L. grayi</i>), <i>mvaS</i>
<i>E. フェシウム</i> (<i>E. faecium</i>), <i>mvaS</i>	<i>L. グレイ</i> (<i>L. grayi</i>), <i>mvaE</i> <i>E. フェシウム</i> (<i>E. faecium</i>), <i>mvaS</i>	<i>E. フェシウム</i> (<i>E. faecium</i>), <i>mvaE</i> <i>E. フェシウム</i> (<i>E. faecium</i>), <i>mvaS</i>	<i>E. ガリナーラム</i> (<i>E. gallinarum</i>), <i>mvaE</i> <i>E. フェシウム</i> (<i>E. faecium</i>), <i>mvaS</i>	<i>E. カセリフラブス</i> (<i>E. casseliflavus</i>), <i>mvaE</i> <i>E. フェシウム</i> (<i>E. faecium</i>), <i>mvaS</i>	<i>E. ファエカリス</i> (<i>E. faecalis</i>), <i>mvaE</i> <i>E. フェシウム</i> (<i>E. faecium</i>), <i>mvaS</i>
<i>E. ガリナーラム</i> (<i>E. gallinarum</i>), <i>mvaS</i>	<i>L. グレイ</i> (<i>L. grayi</i>), <i>mvaE</i> <i>E. ガリナーラム</i> (<i>E. gallinarum</i>), <i>mvaS</i>	<i>E. フェシウム</i> (<i>E. faecium</i>), <i>mvaE</i> <i>E. ガリナーラム</i> (<i>E. gallinarum</i>), <i>mvaS</i>	<i>E. ガリナーラム</i> (<i>E. gallinarum</i>), <i>mvaE</i> <i>E. ガリナーラム</i> (<i>E. gallinarum</i>), <i>mvaS</i>	<i>E. カセリフラブス</i> (<i>E. casseliflavus</i>), <i>mvaE</i> <i>E. ガリナーラム</i> (<i>E. gallinarum</i>), <i>mvaS</i>	<i>E. ファエカリス</i> (<i>E. faecalis</i>), <i>mvaE</i> <i>E. ガリナーラム</i> (<i>E. gallinarum</i>), <i>mvaS</i>
<i>E. カセリフラブス</i> (<i>E. casseliflavus</i>), <i>mvaS</i>	<i>L. グレイ</i> (<i>L. grayi</i>), <i>mvaE</i> <i>E. カセリフラブス</i> (<i>E. casseliflavus</i>), <i>mvaS</i>	<i>E. フェシウム</i> (<i>E. faecium</i>), <i>mvaE</i> <i>E. カセリフラブス</i> (<i>E. casseliflavus</i>), <i>mvaS</i>	<i>E. ガリナーラム</i> (<i>E. gallinarum</i>), <i>mvaE</i> <i>E. カセリフラブス</i> (<i>E. casseliflavus</i>), <i>mvaS</i>	<i>E. カセリフラブス</i> (<i>E. casseliflavus</i>), <i>mvaE</i> <i>E. カセリフラブス</i> (<i>E. casseliflavus</i>), <i>mvaS</i>	<i>E. ファエカリス</i> (<i>E. faecalis</i>), <i>mvaE</i> <i>E. カセリフラブス</i> (<i>E. casseliflavus</i>), <i>mvaS</i>
<i>E. ファエカリス</i> (<i>E. faecalis</i>), <i>mvaS</i>	<i>L. グレイ</i> (<i>L. grayi</i>), <i>mvaE</i> <i>E. ファエカリス</i> (<i>E. faecalis</i>), <i>mvaS</i>	<i>E. フェシウム</i> (<i>E. faecium</i>), <i>mvaE</i> <i>E. ファエカリス</i> (<i>E. faecalis</i>), <i>mvaS</i>	<i>E. ガリナーラム</i> (<i>E. gallinarum</i>), <i>mvaE</i> <i>E. ファエカリス</i> (<i>E. faecalis</i>), <i>mvaS</i>	<i>E. カセリフラブス</i> (<i>E. casseliflavus</i>), <i>mvaE</i> <i>E. ファエカリス</i> (<i>E. faecalis</i>), <i>mvaS</i>	<i>E. ファエカリス</i> (<i>E. faecalis</i>), <i>mvaE</i> <i>E. ファエカリス</i> (<i>E. faecalis</i>), <i>mvaS</i>

10

20

30

【0151】

例示的な *MvaE* ポリペプチドおよび核酸

mvaE 遺伝子は、チオラーゼおよび HMG-CoA 還元酵素活性の双方を持つポリペプチドをコードする。*mvaE* 遺伝子によってコードされるポリペプチドのチオラーゼ活性が、アセチル CoA をアセトアセチル CoA に変換するのに対し、ポリペプチドの HMG-CoA 還元酵素の酵素活性は、3-ヒドロキシー 3-メチルグルタリル CoA をメバロン酸に変換する。例示的な *MvaE* ポリペプチドおよび核酸としては、*MvaE* ポリペ

40

【0152】

変異 *MvaE* ポリペプチドとしては、*MvaE* ポリペプチド活性（すなわちアセチル CoA をアセトアセチル CoA に変換する能力、ならびに 3-ヒドロキシー 3-メチルグルタリル CoA をメバロン酸に変換する能力）を保ちながら、その中で 1 つまたは複数のアミノ酸残基がアミノ酸置換を受けたものが挙げられる。アミノ酸置換は、保存的または非保存的であり得て、このような置換アミノ酸残基は、遺伝コードによってコードされ得て、またはコードされ得ない。標準的な 20 のアミノ酸「アルファベット」が、それらの側

50

鎖類似性に基づいて、化学物質ファミリーに分類されている。これらのファミリーとしては、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、 β -分枝側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）のあるアミノ酸が挙げられる。「保存的アミノ酸置換」は、その中でアミノ酸残基が、化学的に類似した側鎖を有するアミノ酸残基で置換されるものである（すなわち塩基性側鎖を有するアミノ酸が、塩基性側鎖を有する別のアミノ酸で置換される）。「非保存的アミノ酸置換」は、その中でアミノ酸残基が、化学的に異なる側鎖を有するアミノ酸残基で置換されるものである（すなわち塩基性側鎖を有するアミノ酸が、芳香族側鎖を有する別のアミノ酸で置換される）。

10

【0153】

MvaEポリペプチド内にアミノ酸置換を導入して、分子の機能性を改善し得る。例えば、基質に対するMvaEポリペプチドの結合親和性を増大させ、またはアセチルCoAをアセトアセチルCoAに変換する能力および／または3-ヒドロキシー-3-メチルグルタルルCoAをメバロン酸に変換する能力を改善するアミノ酸置換をMvaEポリペプチドに導入し得る。いくつかの態様では、変異MvaEポリペプチドは、1つまたは複数の保存的アミノ酸置換を含有する。

20

【0154】

一態様では、メバロン酸、イソプレネン、イソプレノイド前駆体、および／またはイソプレノイドを生成するために、分解されないまたは分解を起こしにくいmvaEタンパク質を使用し得る。使用し得る、分解されないまたは分解を起こしにくいmvaEの遺伝子産物の例としては、生物E. faecium (E. faecium)、E. gallinarum (E. gallinarum)、E. casseliflavus (E. casseliflavus)、E. faecalis (E. faecalis)、およびL. grayi (L. grayi)からのものが挙げられるが、これに限定されるものではない。当業者は、任意の標準的分子生物学的技術によって、大腸菌 (E. coli) BL21 (DE3) 中でmvaEタンパク質を発現させて、断片の不在を探し得る。例えば、断片の不在は、Hisタグ媒介精製に続いて、Saferestain染色されたSDS-PAGEゲル上で同定し得て、またはメバロン酸、イソプレネン、またはイソプレノイド産生大腸菌 (E. coli) BL21内で発現される場合は、本明細書に記載される検出方法を使用して同定し得る。

30

【0155】

Hedl et al., (J Bacteriol. 2002年4月; 184 (8) : 2116-2122) に記載されるものなどの標準法を使用して、アセトアセチルCoAチオラーゼならびにHMG-CoA還元酵素活性を測定することで、ポリペプチドがmvaE活性を有するかどうかを判定し得る。例示的なアッセイでは、アセトアセチルCoAチオラーゼ活性が、分光光度計によって測定され、アセトアセチルCoAの形成またはチオ開裂に伴う302nmにおける吸光度の変化が、モニターされる。アセトアセチルCoAの合成を判定するための各反応の標準アッセイ条件は、1mMのアセチルCoA、10mMのMgCl₂、50mMのトリス、pH10.5であり、反応は酵素の添加によって開始される。アッセイは、200μLの最終容量を採用し得る。アッセイでは、1酵素単位 (eu) が、1分間の1μmolアセトアセチルCoA中の合成またはチオ開裂に相当する。別の例示的なアッセイでは、分光光度計によって、340nmにおけるNADPH (H) の出現または消失によって、HMG-CoA還元酵素活性をモニターし得る。HMG-CoAのメバロン酸への還元脱アシル化を示すために測定される各反応の標準アッセイ条件は、0.4mMのNADPH、1.0mMの (R, S)-HMG-CoA、100mMのKCl、および100mMのK_xPO₄、pH6.5である。アッセイは、200μLの最終容量を採用する。反応は、酵素を添加することで開始される。アッセイでは、

40

50

1 e u は、1 分間の 1 μmol の NADP (H) 中の代謝回転に相当する。これは、0.5 μmol の HMG-CoA または メバロン酸の代謝回転に相当する。

【0156】

代案としては、細胞（細菌、真菌、または藻類細胞など）内のメバロン酸の生成は、制限なしに、ガスクロマトグラフィー（米国特許出願公開第 2005/0287655 A1 号明細書を参照されたい）または HPLC（米国特許出願第 12/978, 324 号明細書 A1 を参照されたい）によって測定し得る。例示的なアッセイとして、1 つまたは複数の抗生物質で補足された LB ブロスを含む振盪管に、培養物を接種して、34℃、250 rpm で、14 時間培養し得る。次に、1% グルコース、0.1% 酵母抽出物、および 200 μM の IPTG で補足された TM3 培地を含むウェルプレート内で、培養物を 0.2 の最終 OD に希釈し得る。次にプレートを Breath Easier メンブレン（Diversified Biotech）で密封し、振盪機/インキュベーター内で、34℃、600 rpm で 24 時間培養する。次に 1 mL の各培養物を 3,000 $\times$ g で 5 分間遠心分離する。次に上清を 20% 硫酸に添加して、氷上で 5 分間インキュベートする。次に混合物を 3,000 $\times$ g で 5 分間遠心分離して、HPLC 分析のために上清を収集する。サンプル中のメバロン酸濃度は、メバロン酸（Sigma）の標準曲線と比較することで判定される。グルコース濃度は、当該技術分野で公知のいずれかの方法に従って、グルコースオキシダーゼアッセイを実施することでさらに測定し得る。HPLC を使用して、各サンプルの屈折率応答と、既知濃度の様々なメバロン酸を含む溶液を通過させて得られる検量線とを比較することにより、メバロン酸レベルを定量化し得る。

【0157】

例示的な mvaE 核酸としては、mvaE ポリペプチドの少なくとも 1 つの活性を有する、ポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、または融合ポリペプチドをコードする核酸が挙げられる。例示的な MvaE ポリペプチドおよび核酸としては、本明細書に記載される起源生物のいずれかからの天然ポリペプチドおよび核酸、ならびに本明細書に記載される起源生物のいずれかに由来する変異ポリペプチドおよび核酸が挙げられる。例示的な MvaE 核酸としては、例えば、リステリア・グレイ（*Listeria grayi*）DSM 20601、エンテロコッカス・フェシウム（*Enterococcus faecium*）、エンテロコッカス・ガリナルム（*Enterococcus gallinarum*）EG2、エンテロコッカス・カセリフラブス（*Enterococcus casseliflavus*）、および/またはエンテロコッカス・ファエカリス（*Enterococcus faecalis*）から単離された mvaE 核酸が挙げられる。リステリア・グレイ（*Listeria grayi*）DSM 20601 mvaE 遺伝子によってコードされる mvaE 核酸は、配列番号 1 と、少なくとも約 99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85% の配列同一性を有し得る。別の態様では、リステリア・グレイ（*Listeria grayi*）DSM 20601 mvaE 遺伝子によってコードされる mvaE 核酸は、配列番号 1 と、少なくとも約 84%、83%、82%、81%、または 80% の配列同一性を有し得る。エンテロコッカス・フェシウム（*Enterococcus faecium*）mvaE 遺伝子によってコードされる mvaE 核酸は、配列番号 3 と、少なくとも約 99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または 85% の配列同一性を有し得る。別の態様では、エンテロコッカス・フェシウム（*Enterococcus faecium*）mvaE 遺伝子によってコードされる mvaE 核酸は、配列番号 3 と、少なくとも約 84%、83%、82%、81%、または 80% の配列同一性を有し得る。エンテロコッカス・ガリナルム（*Enterococcus gallinarum*）EG2 mvaE 遺伝子によってコードされる mvaE 核酸は、配列番号 5 と、少なくとも約 99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または 85% の配列同一性を有し得る。別の態様では、エンテロコッカス・ガリナルム（*Enterococcus gallinar*

um) EG2 mvaE遺伝子によってコードされるmvaE核酸は、配列番号5と、少なくとも約84%、83%、82%、81%、または80%の配列同一性を有し得る。エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*) mvaE遺伝子によってコードされるmvaE核酸は、配列番号7と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の配列同一性を有し得る。別の態様では、エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*) mvaE遺伝子によってコードされるmvaE核酸は、配列番号7と、少なくとも約84%、83%、82%、81%、または80%の配列同一性を有し得る。エンテロコッカス・ファエカリス (*Enterococcus faecalis*) mvaE 10 遺伝子によってコードされるmvaE核酸は、配列番号18と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の配列同一性を有し得る。本明細書の態様のいずれにおいても、上流MVA経路ポリペプチドは、配列番号1~8および18~19のいずれか1つと、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、または80%配列同一性がある核酸によってコードされてもよい。本明細書の態様のいずれにおいても、上流MVA経路ポリペプチドは、配列番号1~8および18~19のいずれか1つがある核酸によってコードされてもよい。

【0158】

代表的MvaEポリペプチドとしては、少なくとも1つのMvaEポリペプチド活性を有する、ポリペプチド、ペプチド、または融合ポリペプチドの断片が挙げられる。代表的mvaEポリペプチドとしては、本明細書に記載される起源生物のいずれかに由来する天然ポリペプチド、ならびに本明細書に記載される起源生物のいずれかに由来する変異ポリペプチドが挙げられる。代表的MvaEポリペプチドとしては、例えば、リステリア・グレイ (*Listeria grayi*) DSM20601、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*) EG2、および/またはエンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*) から単離される、MvaEポリペプチドが挙げられる。リステリア・グレイ (*Listeria grayi*) DSM 20601 mvaE遺伝子によってコードされるMvaE 30 ポリペプチドは、配列番号11と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%の配列同一性を有し得る。別の態様では、リステリア・グレイ (*Listeria grayi*) DSM 20601 mvaE遺伝子によってコードされるMvaEポリペプチドは、配列番号11と、少なくとも約84%、83%、82%、81%、または80%の配列同一性を有し得る。エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) mvaE遺伝子によってコードされるMvaEポリペプチドは、配列番号13と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の配列同一性を 40 有し得る。別の態様では、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) mvaE遺伝子によってコードされるMvaEポリペプチドは、配列番号13と、少なくとも約84%、83%、82%、81%、または80%の配列同一性を有し得る。エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*) EG2 mvaE遺伝子によってコードされるMvaEポリペプチドは、配列番号9と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の配列同一性を有し得る。別の態様では、エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*) EG2 mvaE遺伝子によってコードされるMvaEポリペプチドは、配列番号9と、少なくとも約84%、83%、82%、81%、または80%の配 50

列同一性を有し得る。エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*) mvaE 遺伝子によってコードされる MvaE ポリペプチドは、配列番号 15 と、少なくとも約 99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または 85% の配列同一性を有し得る。別の態様では、エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*) mvaE 遺伝子によってコードされる MvaE ポリペプチドは、配列番号 15 と、少なくとも約 84%、83%、82%、81%、または 80% の配列同一性を有し得る。本明細書の態様のいずれにおいても、上流 MVA 経路ポリペプチドは、配列番号 9~16 および 20~21 のいずれか 1 つと、少なくとも約 99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、または 80% 配列同一性があるポリペプチドによってコードされてもよい。本明細書の態様のいずれにおいても、上流 MVA 経路ポリペプチドは、配列番号 9~16 および 20~21 のいずれか 1 つがあるポリペプチドによってコードされてもよい。

【0159】

mvaE 核酸は、細胞（細菌、真菌、または藻類細胞など）内で、マルチコピープラスミド上で発現させ得る。プラスミドは、高コピー数プラスミド、低コピー数プラスミド、または中程度コピー数プラスミドであり得る。代案としては、mvaE 核酸は、宿主細胞の染色体に組み込み得る。プラスミド上の、または宿主細胞の染色体に組み込まれた部分としての双方の、mvaE 核酸の異種性発現で、核酸の発現は、誘導性プロモーターまたは構成的発現プロモーターのどちらかによって駆動され得る。プロモーターは、mvaE 核酸発現の強力な駆動機構であり得て、それは発現の弱い駆動機構であり得て、またはそれは発現の中程度の駆動機構であり得る。

【0160】

例示的な mvaS ポリペプチドおよび核酸

mvaS 遺伝子は、HMG-CoA シンターゼ活性を持つポリペプチドをコードする。このポリペプチドは、アセトアセチル CoA を 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル CoA (HMG-CoA) に変換し得る。例示的な MvaS ポリペプチドおよび核酸としては、MvaS ポリペプチドの少なくとも 1 つの活性を有する、本明細書に記載される起源生物のいずれかからの天然ポリペプチドおよび核酸、ならびに本明細書に記載される起源生物のいずれかに由来する変異ポリペプチドおよび核酸が挙げられる。

【0161】

変異 MvaS ポリペプチドとしては、MvaS ポリペプチド活性（すなわちアセトアセチル CoA を 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル CoA に変換する能力）を保ちながら、その中で 1 つまたは複数のアミノ酸残基がアミノ酸置換を受けたものが挙げられる。MvaS ポリペプチドにアミノ酸置換を導入して、分子機能性を改善し得る。例えば、MvaS ポリペプチドの基質に対する結合親和性を増大させ、またはアセトアセチル CoA を 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル CoA に変換する能力を改善するアミノ酸置換を、MvaS ポリペプチドに導入し得る。いくつかの態様では、変異 MvaS ポリペプチドは、1 つまたは複数の保存的アミノ酸置換を含有する。

【0162】

Quant et al. (Biochem J., 1989, 262: 159-164) に記載されるものなどの標準法を使用して、HMG-CoA シンターゼ活性を測定することで、ポリペプチドが mvaS 活性を有するかどうかを判定し得る。例示的なアッセイでは、303 nm における吸光度の変化をモニターすることで、アセトアセチル CoA のエノール形態の消失を分光光度的に測定することで、HMG-CoA シンターゼ活性をアッセイし得る。30℃で、50 mm のトリス/HCl、pH 8.0、10 mM の MgCl₂、および 0.2 mM のジチオスレイトールを含有する、標準 1 mL アッセイシステム；5 mM-アセチルリン酸、10 mM アセトアセチル CoA、および 5 μ l の抽出物サンプルを添加し得て、アセチル CoA (100 μ M) および 10 単位の PTA の同時添加が

それに続く。次にHMG-CoAシンターゼ活性をアセチルCoA添加前後の速度差として測定する。使用された条件下(pH 8.0、10mM-MgCl₂)におけるアセトアセチルCoAの吸収係数は、 $12.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ である。定義上、1単位の酵素活性は、1分あたり1μmolのアセトアセチルCoAの変換を引き起こす。

【0163】

代案としては、細胞(細菌、真菌、または藻類細胞など)内のメバロン酸の生成は、制限なしに、ガスクロマトグラフィー(米国特許出願公開第2005/0287655A1号明細書を参照されたい)またはHPLC(米国特許出願第12/978,324号明細書を参照されたい)によって測定し得る。例示的なアッセイとして、培養物を、1つまたは複数の抗生物質で補足されたLBブロスを含む振盪管に接種して、34℃、250 rpmで、14時間培養し得る。次に、1%グルコース、0.1%酵母抽出物、および200 μMのIPTGで補足されたTM3培地を含むウェルプレート内で、培養物を0.2の最終ODに希釈し得る。次に、プレートをBreath Easierメンブレン(Diversified Biotech)で密封し、振盪機/インキュベーター内で、34℃、600 rpmで24時間培養する。次に、1mLの各培養物を3,000×gで5分間遠心分離する。次に、上清を20%硫酸に添加して、氷上で5分間インキュベートする。次に、混合物を3000×gで5分間遠心分離して、HPLC分析のために上清を収集する。サンプル中のメバロン酸濃度は、メバロン酸(Sigma)の標準曲線と比較することで判定される。グルコース濃度は、当該技術分野で公知のいずれかの方法に従って、グルコースオキシダーゼアッセイを実施することでさらに測定し得る。HPLCを使用して、各サンプルの屈折率応答と、既知濃度の様々なメバロン酸を含む溶液を通過させて得られる検量線とを比較することにより、メバロン酸レベルを定量化し得る。

【0164】

例示的なmvaS核酸としては、mvaSポリペプチドの少なくとも1つの活性を有する、ポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、または融合ポリペプチドをコードする核酸が挙げられる。例示的なmvaSポリペプチドおよび核酸としては、本明細書に記載される起源生物のいずれかからの天然ポリペプチドおよび核酸、ならびに本明細書に記載される起源生物のいずれかに由来する変異ポリペプチドおよび核酸が挙げられる。例示的なmvaS核酸としては、例えば、リステリア・グレイ(Listeria grayi) DSM 20601、エンテロコッカス・フェシウム(Enterococcus faecium)、エンテロコッカス・ガリナルム(Enterococcus gallinarum) EG2、および/またはエンテロコッカス・カセリフラブス(Enterococcus casseliflavus)から単離されたmvaS核酸が挙げられる。リステリア・グレイ(Listeria grayi) DSM 20601 mvaS遺伝子によってコードされるmvaS核酸は、配列番号2と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の配列同一性を有し得る。リステリア・グレイ(Listeria grayi) DSM 20601 mvaS遺伝子によってコードされるmvaS核酸はまた、配列番号2と、少なくとも約84%、83%、82%、81%、または80%の配列同一性を有し得る。エンテロコッカス・フェシウム(Enterococcus faecium) mvaS遺伝子によってコードされるmvaS核酸は、配列番号4と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の配列同一性を有し得る。エンテロコッカス・フェシウム(Enterococcus faecium) mvaS遺伝子によってコードされるmvaS核酸は、配列番号4と、少なくとも約84%、83%、82%、81%、または80%の配列同一性を有し得る。エンテロコッカス・ガリナルム(Enterococcus gallinarum) EG2 mvaS遺伝子によってコードされるmvaS核酸は、配列番号6と、少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、95%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、または85%の配列同一性を有し得る。エンテロコッカス・ガリナ

ルム (*Enterococcus gallinarum*) EG2 *mvaS* 遺伝子によってコードされる *mvaS* 核酸は、配列番号 6 と少なくとも約 2 %、83 %、82 %、81 %、または 80 % の配列同一性を有し得る。エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*) *mvaS* 遺伝子によってコードされる *mvaS* 核酸は、配列番号 8 と、少なくとも約 99 %、98 %、97 %、96 %、95 %、95 %、93 %、92 %、91 %、90 %、89 %、88 %、87 %、86 %、または 85 % の配列同一性を有し得る。エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*) *mvaS* 遺伝子によってコードされる *mvaS* 核酸は、配列番号 8 と、少なくとも約 84 %、83 %、82 %、81 %、または 80 % の配列同一性を有し得る。

10

【0165】

代表的 *MvaS* ポリペプチドとしては、少なくとも 1 つの *MvaS* ポリペプチド活性を有する、ポリペプチド、ペプチド、または融合ポリペプチドの断片が挙げられる。代表的 *mvaS* ポリペプチドとしては、本明細書に記載される起源生物のいずれかに由来する天然ポリペプチドおよびポリペプチド、ならびに本明細書に記載される起源生物のいずれかに由来する変異ポリペプチドが挙げられる。代表的 *MvaS* ポリペプチドとしては、例えば、リステリア・グレイ (*Listeria grayi*) DSM20601、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*) EG2、および／またはエンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*) から単離される、*MvaS* ポリペプチドが挙げられる。リステリア・グレイ (*Listeria grayi*) DSM 20601 *mvaS* 遺伝子によってコードされる *MvaS* ポリペプチドは、配列番号 12 と、少なくとも約 99 %、98 %、97 %、96 %、95 %、95 %、93 %、92 %、91 %、90 %、89 %、88 %、87 %、86 %、または 85 % の配列同一性を有し得る。リステリア・グレイ (*Listeria grayi*) DSM 20601 *mvaS* 遺伝子によってコードされる *MvaS* ポリペプチドはまた、配列番号 12 と、少なくとも約 84 %、83 %、82 %、81 %、または 80 % の配列同一性を有し得る。エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) *mvaS* 遺伝子によってコードされる *MvaS* ポリペプチドは、配列番号 14 と、少なくとも約 99 %、98 %、97 %、96 %、95 %、95 %、93 %、92 %、91 %、90 %、89 %、88 %、87 %、86 %、または 85 % の配列同一性を有し得る。エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) *mvaS* 遺伝子によってコードされる *MvaS* ポリペプチドは、配列番号 14 と、少なくとも約 84 %、83 %、82 %、81 %、または 80 % の配列同一性を有し得る。エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*) EG2 *mvaS* 遺伝子によってコードされる *MvaS* ポリペプチドは、配列番号 10 と、少なくとも約 99 %、98 %、97 %、96 %、95 %、95 %、93 %、92 %、91 %、90 %、89 %、88 %、87 %、86 %、または 85 % の配列同一性を有し得る。エンテロコッカス・ガリナルム (*Enterococcus gallinarum*) EG2 *mvaS* 遺伝子によってコードされる *MvaS* ポリペプチドは、配列番号 10 と、少なくとも約 84 %、83 %、82 %、81 %、または 80 % の配列同一性を有し得る。エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*) *mvaS* 遺伝子によってコードされる *MvaS* ポリペプチドは、配列番号 16 と、少なくとも約 99 %、98 %、97 %、96 %、95 %、95 %、93 %、92 %、91 %、90 %、89 %、88 %、87 %、86 %、または 85 % の配列同一性を有し得る。エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*) *mvaS* 遺伝子によってコードされる *MvaS* ポリペプチドは、配列番号 16 と、少なくとも約 84 %、83 %、82 %、81 %、または 80 % の配列同一性を有し得る。

20

30

40

【0166】

50

m v a S 核酸は、細胞（細菌、真菌、または藻類細胞など）内で、マルチコピープラスミド上で発現させ得る。プラスミドは、高コピー数プラスミド、低コピー数プラスミド、または中程度コピー数プラスミドであり得る。代案としては、m v a S 核酸は、宿主細胞の染色体に組み込み得る。プラスミド上の、または宿主細胞の染色体に組み込まれた部分としての双方の、m v a S 核酸の異種性発現で、核酸の発現は、誘導性プロモーターまたは構成的発現プロモーターのどちらかによって駆動され得る。プロモーターは、m v a S 核酸発現の強力な駆動機構であり得て、それは発現の弱い駆動機構であり得て、またはそれは発現の中程度の駆動機構であり得る。

【0167】

アセトアセチルC o A シンターゼポリペプチドをコードする核酸

10

一態様では、本明細書に記載される細胞（細菌、真菌、または藻類細胞など）のいずれかは、アセトアセチルC o A シンターゼポリペプチドをコードする、1つまたは複数の異種核酸を含有し得る。アセトアセチルC o A シンターゼ遺伝子（別名n p h T 7）は、マロニルC o A およびアセチルC o A からアセトアセチルC o A を合成する活性を有して、2つのアセチルC o A 分子からアセトアセチルC o A を合成する最小の活性（例えば、皆無の活性）を有する酵素をコードする遺伝子である。n p h T 7に関する教示については、例えば、その内容を本明細書に明示的に援用する、Okamura et al., PNAS Vol 107, No. 25, pp. 11265-11270 (2010)を参照されたい。ストレプトミセス属 (Streptomyces) CL190株の放線菌類に由来するアセトアセチルC o A シンターゼ遺伝子は、そのそれぞれの開示が参照により本明細書に援用される、特開第2008-61506A号公報、および米国特許出願公開第2010/0285549号明細書に記載される。アセトアセチルC o A シンターゼはまた、アセチルC o A : マロニルC o A アシル基転移酵素とも称され得る。使用され得る代表的なアセトアセチルC o A シンターゼ（またはアセチルC o A : マロニルC o A アシル基転移酵素）は、Genbank AB540131.1である。

20

【0168】

一態様では、本発明のアセトアセチルC o A シンターゼは、不可逆反応を通じて、マロニルC o A およびアセチルC o A からアセトアセチルC o A を合成する。アセチルC o A を生成するためのアセトアセチルC o A シンターゼの使用は、この反応が不可逆的でありながら、2つのアセチルC o A 分子からアセトアセチルC o A を合成するアセトアセチルC o A チオラーゼ酵素の作用は可逆的である、という追加的な利点を提供する。その結果、マロニルC o A およびアセチルC o A からアセトアセチルC o A を合成するためのアセトアセチルC o A シンターゼの使用は、同一最終生成物を生成するためのチオラーゼの使用と比較して、イソプレンの生産性に顕著な改善をもたらし得る。

30

【0169】

さらに、イソプレンを生産するためのアセトアセチルC o A シンターゼの使用は、アセトアセチルC o A シンターゼがマロニルC o A の脱炭酸を通じて、マロニルC o A をアセチルC o A に変換し得るという別の利点を提供する。したがって、出発基質の貯蔵は、アセチルC o A の出発量によって制限されない。出発基質がマロニルC o A のみの場合でも、アセトアセチルC o A シンターゼによるアセトアセチルC o A の合成はなおも起こり得る。一態様では、より多くのマロニルC o A を有する宿主株を使用して、出発マロニルC o A のプールが増大される。このような貯留の増大は、自然発生的であり、または分子操作によって操作され得る。例えば、Fowler, et al., Applied and Environmental Microbiology, Vol. 75, No. 18, pp. 5831-5839 (2009)を参照されたい。

40

【0170】

本明細書に記載される態様または実施形態のいずれにおいても、マロニルC o A およびアセチルC o A からアセトアセチルC o A を合成する能力を有する酵素を使用し得る。このような酵素の非限定的例は、本明細書に記載される。本明細書に記載される特定の実施形態では、マロニルC o A およびアセチルC o A からアセトアセチルC o A を合成する活

50

性を有する、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) の放線菌に由来するアセトアセチルC o Aシンターゼ遺伝子を使用し得る。

【0171】

このようなアセトアセチルC o Aシンターゼ遺伝子の一例は、る配列番号17のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝子である。このようなタンパク質は、マロニルC o AおよびアセチルC o AからアセトアセチルC o Aを合成する活性を有するアセトアセチルC o Aシンターゼに対応する配列番号17のアミノ酸配列を有し、2つのアセチルC o A分子からアセトアセチルC o Aを合成する活性を有しない。

【0172】

一実施形態では、配列番号17のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝子は、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) 種CL190株の放線菌類から入手されるゲノムDNAをテンプレートとして、および特開第2008-61506A号公報を参照してデザインし得る1対のプライマーを使用して、核酸増幅法 (例えばPCR) によって得られ得る。

【0173】

本明細書に記載されるように、本発明で使用するためのアセトアセチルC o Aシンターゼ遺伝子は、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) 種CL190株の放線菌類からの配列番号17のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝子に限定されない。マロニルC o AおよびアセチルC o AからアセトアセチルC o Aを合成する能力を有して、2つのアセチルC o A分子からアセトアセチルC o Aを合成しない、タンパク質をコードする任意の遺伝子を本明細書に記載する方法で使用し得る。特定の実施形態では、アセトアセチルC o Aシンターゼ遺伝子は、配列番号17のアミノ酸配列と高度に類似し、またはそれと実質的に同一のアミノ酸配列を有して、マロニルC o AおよびアセチルC o AからアセトアセチルC o Aを合成する機能を有する、タンパク質をコードする遺伝子であり得る。「高度に類似」または「実質的に同一」という表現は、例えば、少なくとも約80%の同一性、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、および少なくとも約99%の同一性を指す。上で使用されるように、同一性は、異なるアミノ酸配列および配列番号17のアミノ酸配列中のアミノ酸残基間の同一性の百分率に相当し、それは配列類似性を検索するプログラムを使用して、配列番号17および異なるアミノ酸配列の、アミノ酸配列のアライメントを実施することで計算される。

【0174】

その他の実施形態では、アセトアセチルC o Aシンターゼ遺伝子は、1つ以上アミノ酸の置換、欠失、付加、または挿入によって、配列番号17のアミノ酸配列から誘導されるアミノ酸配列を有し、マロニルC o AおよびアセチルC o AからアセトアセチルC o Aを合成する機能を有する、タンパク質をコードする遺伝子であってもよい。本明細書では、「より多くのアミノ酸」という表現は、例えば、2~30個のアミノ酸、好ましくは2~20個のアミノ酸、より好ましくは2~10個のアミノ酸、最も好ましくは2~5個のアミノ酸を指す。

【0175】

なおも別の実施形態では、アセトアセチルC o Aシンターゼ遺伝子は、ストリンジェントな条件下で、配列番号17のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドの部分または全体とハイブリダイズでき、マロニルC o AおよびアセチルC o AからアセトアセチルC o Aを合成する機能を有するタンパク質をコードできる、ポリヌクレオチドからなってもよい。本明細書では、ストリンジェントな条件下のハイブリダイゼーションは、60℃で2×SSC洗浄条件下における結合維持に相当する。ハイブリダイゼーションは、J. Sambrook et al. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory (2001)

に記載される方法などの従来の既知の方法によって実施し得る。

【0176】

本明細書に記載されるように、配列番号17のアミノ酸配列と異なるアミノ酸配列を有するアセトアセチルCoAシンターゼをコードする遺伝子は、例えば、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) 種CL190株から得られたのではない放線菌類などの、潜在的にあらゆる生物から単離し得る。さらに、本明細書の用途のためのアセトアセチルCoAシンターゼ遺伝子は、当該技術分野で知られている方法によって、配列番号17のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを改変することで得られ得る。ヌクレオチド配列の変異誘発は、クンケル法またはギャップド二本鎖法、またはそれらのどちらかに類似した方法などの既知の方法によって実施し得る。例えば、変異誘発は、変異誘発キット (例えば製品名; Mutant-KおよびMutant-G (TAKARA Bio))、部位特異的変異誘発のための製品名; LA PCR in vitro Mutagenesis シリーズキット (TAKARA Bio) などを使用して、実施してもよい。

10

【0177】

配列番号17のアミノ酸配列と異なるアミノ酸配列を有するアセトアセチルCoAシンターゼの活性は、下述するように評価し得る。具体的には、評価されるタンパク質をコードする遺伝子を、その中で遺伝子が発現し得るように、最初に宿主細胞に導入し、クロマトグラフィーなどの技術によるタンパク質の精製がそれに続く。評価される得られたタンパク質含有する緩衝液に、基質としてマロニルCoAおよびアセチルCoAを添加し、例えば、所望の温度 (例えば、10℃~60℃) での培養がそれに続く。反応完了後、失われた基質量および/または生成された生成物量 (アセトアセチルCoA) を判定する。したがって試験されるタンパク質が、マロニルCoAおよびアセチルCoAからアセトアセチルCoAを合成する機能を有するかどうかを評価し、合成程度を評価することが可能である。このような場合、評価される得られたタンパク質を含有する緩衝液に、基質としてアセチルCoAのみを入れて、失われた基質量および/または生成された生成物量を同様に判定することで、タンパク質が2つのアセチルCoA分子から、アセトアセチルCoAを合成する活性を有するかどうかを調べることが可能である。

20

【0178】

メバロン酸の生産増大能力がある組換え微生物

本明細書に記載される組換え微生物 (例えば、組換え細菌、真菌、または藻類細胞) は、本明細書に記載される様々な遺伝子または酵素経路に対するいかなる操作もない同一細胞を上回る量および/または濃度で、メバロン酸を産生する能力を有する。メバロン酸に向かう炭素流を増大させるために、本明細書に記載される様々な経路の調節のために遺伝子操作されている組換え微生物 (例えば、細菌細胞) が、メバロン酸を生産するために使用され得る。いくつかの態様では、細胞は、1つまたは複数のアセチル化タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸を含有し、前記細胞は、核酸の発現および/またはアセチル化タンパク質の活性が調節されるように遺伝子操作されている。アセチル化タンパク質は、アセチルトランスフェラーゼ (YfiQなどであるが、これに限定されるものではない) および/またはデアセチラーゼ (CobBなどであるが、これに限定されるものではない) であり得る。いくつかの実施形態では、YfiQポリペプチドの活性は、YfiQポリペプチドをコードする遺伝子の発現を低下、減衰、または欠失させることで (内在性yfiQ遺伝子の欠失などであるが、これに限定されるものではない) 調節される。その他の実施形態では、CobBポリペプチドの活性は、CobBタンパク質をコードする遺伝子の発現を増大させることで (内在性cobB遺伝子の発現の増大、またはcobBをコードする核酸の異種発現などであるが、これに限定されるものではない) 調節される。その他の態様では、本明細書に記載される組換え細胞を適切な培地中で培養することは、1つまたは複数のアセチル化タンパク質を含まない、メバロン酸を産生する能力がある細胞と比較して、改善されたメバロン酸の生産をもたらす、前記タンパク質は、それらの発現および/または活性が調節されるように遺伝子操作される。その他の実施形態では、改善されたメバロン酸の生産は、メバロン酸比生産性の増大、メバロン酸力価の増大、メバ

30

40

50

ロン酸収率の増大、細胞生存率の増大、および／または酢酸生成量の低下の1つまたは複数によって特徴付けられる。

【0179】

一態様では、核酸の発現および／またはアセチル化タンパク質の活性が調節されるように遺伝子操作されている本明細書に記載される組換え細胞（細菌、真菌、または藻類細胞など）は、核酸の発現および／またはアセチル化タンパク質の活性が調節されるように遺伝子操作されていない同一細胞を上回る濃度で、メバロン酸を産生する能力を有する。細胞（細菌、真菌、または藻類細胞など）は、包括的に、約30mg/L/hr/OD、40mg/L/hr/OD、50mg/L/hr/OD、60mg/L/hr/OD、70mg/L/hr/OD、80mg/L/hr/OD、90mg/L/hr/OD、100mg/L/hr/OD、110mg/L/hr/OD、120mg/L/hr/OD、130mg/L/hr/OD、140mg/L/hr/OD、150mg/L/hr/OD、160mg/L/hr/OD、170mg/L/hr/OD、180mg/L/hr/OD、190mg/L/hr/OD、または200mg/L/hr/ODを超えて、ならびにこれら数字の間の任意の数値メバロン酸を産生し得る。例示的一実施形態では、細胞は、約85mg/L/hr/ODを超えるメバロン酸を産生し得る。

10

【0180】

核酸の発現および／またはアセチル化タンパク質の活性が調節されるように遺伝子操作されている宿本明細書に記載される主細胞（細菌、真菌、または藻類細胞などの）は、核酸の発現および／またはアセチル化タンパク質の活性が調節されるように遺伝子操作されていない同一細胞と比較して、より高いピーク力価のメバロン酸を産生する能力を有する。別の態様では、細本明細書に記載される胞（細菌、真菌、または藻類細胞など）は、1つまたは複数のアセチル化タンパク質を含有するように修飾されていない同一細胞よりも高いピーク力価でメバロン酸を産生し、前記タンパク質は、適切な培地中で培養されると、それらの発現および／または活性が調節されるように遺伝子操作される。細胞（細菌、真菌、または藻類細胞など）は、48時間の発酵後に、包括的に、約50g/L、60g/L、70g/L、80g/L、90g/L、100g/L、110g/L、120g/L、130g/L、140g/L、150g/L、160g/L、170g/L、180g/L、190g/L、200g/L、210g/L、220g/L、230g/L、240g/L、250g/L、260g/L、270g/L、280g/L、290g/L、300g/Lを超えるピーク力価、ならびにこれらの数字の間の任意の数値のメバロン酸を産生し得る。例示的な一実施形態では、細胞は、48時間の発酵後に、約105g/Lのピーク力価を超えるメバロン酸を産生する。

20

30

【0181】

核酸の発現および／またはアセチル化タンパク質の活性が調節されるように遺伝子操作されている宿本明細書に記載される主細胞（細菌、真菌、または藻類細胞などの）は、核酸の発現および／またはアセチル化タンパク質の活性が調節されるように遺伝子操作されていない同一細胞と比較して、より高い細胞生産性指数（CPI）を生じる能力を有する。いくつかの態様では、本明細書に記載される細胞（細菌、真菌、または藻類細胞など）は、1つまたは複数のアセチル化タンパク質を含有するように修飾されていない同一細胞よりも高いCPIを有し、前記タンパク質は、それらの発現および／または活性が調節されるように遺伝子操作される。一態様では、細胞は、最少培地中で培養され得る。細胞（細菌、真菌、または藻類細胞など）は、メバロン酸について、包括的に、少なくとも約1（g/g）、2（g/g）、3（g/g）、4（g/g）、5（g/g）、6（g/g）、7（g/g）、8（g/g）、9（g/g）、10（g/g）、11（g/g）、12（g/g）、13（g/g）、14（g/g）、15（g/g）、20（g/g）、25（g/g）、または30（g/g）、ならびにこれらの数字の間の任意の数値のCPIを有し得る。例示的一実施形態では、細胞は、メバロン酸について少なくとも約4.5（g/g）のCPIを有する。

40

【0182】

50

核酸の発現および／またはアセチル化タンパク質の活性が調節されるように遺伝子操作されている宿主明細書に記載される主細胞（細菌、真菌、または藻類細胞などの）は、核酸の発現および／またはアセチル化タンパク質の活性が調節されるように遺伝子操作されていない同一細胞と比較して、より高い質量収率のメバロン酸を生産する能力を有する。いくつかの態様では、本明細書に記載される細胞（細菌、真菌、または藻類細胞など）は、1つまたは複数のアセチル化タンパク質前記タンパク質を含有するように修飾されていない同一細胞よりも、グルコースからのメバロン酸のより高い質量収率を有し、前記タンパク質は、それらの発現および／または活性が調節されるように遺伝子操作される。一態様では、細胞は、最少培地中で培養され得る。細胞（細菌、真菌、または藻類細胞など）は、グルコースから、包括的に、少なくとも約25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、または55%、ならびにこれらの数字の間の任意の数値の質量収率のメバロン酸を生産し得る。例示的一実施形態では、細胞は、グルコースから、少なくとも約38%質量収率のメバロン酸を生産する。

組換え細胞を使用して多量のメバロン酸を生産する方法。

【0183】

本明細書でまた提供されるのは、メバロン酸を生産する方法である。いくつかの態様では、メバロン酸を生産する方法は、(a) 1つまたは複数のアセチル化タンパク質を含んでなるように修飾されている組換え細胞（細菌、真菌、または藻類細胞など）を含んでなる組成物を培養するステップと、(b) メバロン酸を生産するステップとを含んでなり、前記タンパク質は、本明細書に記載されるように、（上に記載される細菌細胞などの細胞のいずれかをはじめとする）またはメバロン酸を生産する能力があるそれらの子孫の発現および／または活性が調節されるように遺伝子操作される。いくつかの態様では、メバロン酸を生産する方法は、メバロン酸の生産に適した条件下で、本明細書に記載される組換え細胞のいずれかを培養して、組換え細胞にメバロン酸を生産させるステップとを含んでなる。いくつかの態様では、メバロン酸を生産する方法は、メバロン酸を回収するステップをさらに含んでなる。

【0184】

メバロン酸を生産する方法はまた、(a) 1つまたは複数のアセチル化タンパク質を異種性に発現する細胞を培養するステップと、(b) メバロン酸を生産するステップとを含んでなり得て、前記タンパク質は、それらの発現および／または活性が調節されるように遺伝子操作される。さらに、細胞は、1つまたは複数のアセチル化タンパク質が欠損している同一細胞を上回る濃度でメバロン酸を生産し得て、前記タンパク質は、それらの発現および／または活性が調節されるように遺伝子操作される。

【0185】

メバロン酸は、包括的に、約30mg/L/hr/OD、40mg/L/hr/OD、50mg/L/hr/OD、60mg/L/hr/OD、70mg/L/hr/OD、80mg/L/hr/OD、90mg/L/hr/OD、100mg/L/hr/OD、110mg/L/hr/OD、120mg/L/hr/OD、130mg/L/hr/OD、140mg/L/hr/OD、150mg/L/hr/OD、160mg/L/hr/OD、170mg/L/hr/OD、180mg/L/hr/OD、190mg/L/hr/OD、または200mg/L/hr/ODを超えるメバロン酸、ならびにこれらの数字の間の任意の数値の量で生産され得る。いくつかの態様では、メバロン酸を生産する方法は、メバロン酸を回収するステップをさらに含んでなる。例示的一実施形態では、本メバロン酸生産方法は、約85mg/L/hr/ODを超えるメバロン酸を生産し得る。

【0186】

メバロン酸を生産する方法は同様に、(a) 本明細書に記載されるように、メバロン酸に向かう炭素流が増大するように遺伝子操作されている細胞を培養するステップと、(b) メバロン酸を生産するステップとを含んでなり得て、細胞は1つまたは複数のアセチル

10

20

30

40

50

化タンパク質を異種発現し、前記タンパク質は、それらの発現および／または活性が調節されるように遺伝子操作された細胞は数時間の発酵後に、1つまたは複数のアセチル化タンパク質が欠損している同一細胞よりも高いピーク力価でメバロン酸を産生し、前記タンパク質は、それらの発現および／または活性が調節されるように遺伝子操作される。

【0187】

本明細書で提供される細胞（細菌、真菌、または藻類細胞など）は、包括的に、48時間の発酵後に、約50 g/L、60 g/L、70 g/L、80 g/L、90 g/L、100 g/L、110 g/L、120 g/L、130 g/L、140 g/L、150 g/L、160 g/L、170 g/L、180 g/L、190 g/L、または200 g/Lを超えるピーク力価、ならびにこれらの数字の間の任意の数値のメバロン酸を産生し得る。いくつかの態様では、メバロン酸を生産する方法は、メバロン酸を回収するステップをさらに含んでなる。例示的一実施形態では、本メバロン酸生産方法は、48時間の発酵後に、約105 g/Lを超えるピーク力価のメバロン酸を生産し得る。

【0188】

メバロン酸を生産する方法は同様に、(a) 本明細書に記載されるように、メバロン酸に向かう炭素流が増大するように遺伝子操作されている細胞を培養するステップと、(b) メバロン酸を生産するステップとを含んでなり得て、細胞は、1つまたは複数のアセチル化タンパク質を含んでなり、前記タンパク質は、それらの発現および／または活性が調節されるように遺伝子操作される。細胞は、1つまたは複数の上流MVA経路ポリペプチドをコードする上流MVA経路遺伝子の1つまたは複数のコピーが欠損しメバロン酸生産に向かう炭素流が増大するように遺伝子操作されていない同一細胞よりも高い、メバロン酸CPIを有する。例示的一実施形態では、本メバロン酸生産方法は、メバロン酸について少なくとも4.5 (g/g) のCPIがある細胞を使用して、メバロン酸を生産し得る。代案としては、細胞（細菌、真菌、または藻類細胞などの）は、包括的に、少なくとも1 (g/g)、2 (g/g)、3 (g/g)、4 (g/g)、5 (g/g)、6 (g/g)、7 (g/g)、8 (g/g)、9 (g/g)、10 (g/g)、11 (g/g)、12 (g/g)、13 (g/g)、14 (g/g)、15 (g/g)、20 (g/g)、25 (g/g)、または30 (g/g)、ならびにこれらの数字の間の任意の数値のCPIを有し得る。いくつかの態様では、メバロン酸を生産する方法は、メバロン酸を回収するステップをさらに含んでなる。

【0189】

本明細書で提供されるのは、上述の細胞のいずれかを使用して、メバロン酸の生産を向上させる方法である。細胞によるメバロン酸の生産は、1つまたは複数のアセチル化タンパク質の発現によって向上され得て、前記タンパク質は、それらの発現および／または活性が調節されるように遺伝子操作される。メバロン酸の生産は、1つまたは複数のアセチル化タンパク質の発現がない細胞によるメバロン酸の生産と比較して、約1,000,000倍（例えば、約1～約500,000倍、約1～約50,000倍、約1～約5,000倍、約1～約1,000倍、約1～約500倍、約1～約100倍、約1～約50倍、約5～約100,000倍、約5～約10,000倍、約5～約1,000倍、約5～約500倍、約5～約100倍、約10～約50,000倍、約50～約10,000倍、約100～約5,000倍、約200～約1,000倍、約50～約500倍、または約50～約200倍）向上され得て、前記タンパク質は、それらの発現および／または活性が調節されるように遺伝子操作される。

【0190】

イソプレンの産生が可能な組換え細胞

イソプレン（2-メチルー1,3-ブタジエン）は、幅広い用途で利用される重要な有機化合物である。例えば、イソプレンは、合成ゴムの製造をはじめとする、多数の化学薬品組成物およびポリマーの合成において、中間体または出発原料として用いられる。イソプレンはまた、多数の植物および動物によって天然に合成される重要な生物学的材料である。

【0191】

イソプレンは、イソプレンシンターゼの酵素作用によって、DMA P Pから生成される。そのため、理論に束縛されることなく、上述の組成物および方法のいずれかによって、細胞（細菌、真菌、または藻類細胞など）内のメバロン酸の細胞産生を増大させることは、より大量のイソプレン生産も同様にもたらすと考えられる。グルコースからのメバロン酸生成のモル収率を増大させることは、メバロン酸キナーゼ、ホスホメバロン酸キナーゼ、ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ、イソペンテニルニリン酸イソメラーゼの、およびイソプレンおよびイソプレノイド生産のためのその他の適切な酵素の、適切な酵素活性レベルと組み合わせると、グルコースから生成されるイソプレノイド前駆体およびイソプレンを含むイソプレノイドのより高いモル収率につながる。

10

【0192】

イソプレンの生産は、酵素活性が調節されてイソプレン生産に向かう炭素流が増大するように酵素経路の1つまたは複数が操作されている、明細書に記載される組換え宿主細胞のいずれかを使用して実施され得る。メバロン酸生成への炭素流動増大のために操作された様々な酵素経路を有する、本明細書に記載される組換え微生物を使用して、イソプレンが生産され得る。上に記載されるメバロン酸の生産増大能力がある、1つまたは複数のアセチル化タンパク質を発現する（前記タンパク質は、それらの発現および／または活性が調節されるように遺伝子操作されている）組換え宿主細胞のいずれも、イソプレンの生産増大能力があり得る。いくつかの態様では、これらの細胞は、全MVA経路のポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸と、イソプレンシンターゼポリペプチドまたはイソプレンシンターゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸とをさらに含んでなる。その他の態様では、これらの細胞は、ホスホケトラゼをコードする1つまたは複数の異種核酸ポリペプチドをさらに含んでなる。

20

【0193】

下流MVA経路のポリペプチドをコードする核酸

本発明のいくつかの態様では、本明細書に記載される細胞または方法のいずれかに記載される細胞は、下流メバロン酸（MVA）経路ポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸をさらに含んでなる。いくつかの態様では、下流MVA経路ポリペプチドは、内在性ポリペプチドである。いくつかの態様では、下流MVA経路をコードする内在性核酸は、構成的プロモーターと作動可能に連結する。いくつかの態様では、下流MVA経路をコードする内在性核酸は、誘導性プロモーターと作動可能に連結する。いくつかの態様では、下流MVA経路をコードする内在性核酸は、強力プロモーターと作動可能に連結する。特定の態様では、細胞は、野生型細胞と比較して、内在性下流MVA経路ポリペプチドを過剰発現するように操作される。いくつかの態様では、下流MVA経路をコードする内在性核酸は、弱いプロモーターと作動可能に連結する。

30

【0194】

下流メバロン酸生合成経路は、メバロン酸キナーゼ（MVK）、ホスホメバロン酸キナーゼ（PMK）、およびジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ（MVD）を含んでなる。いくつかの態様では、下流MVA経路は、イソペンテニルニリン酸イソメラーゼ（IDI）をさらに含んでなり得る。本明細書で提供される細胞は、イソプレンシンターゼ、1つまたは複数の上流MVA経路ポリペプチド、および／または1つまたは複数の下流MVA経路ポリペプチドをコードする、少なくとも1つの核酸を含んでなり得る。下流MVA経路のポリペプチドは、（a）メバロン酸をメバロン酸5-リン酸にリン酸化する；（b）メバロン酸5-リン酸をメバロン酸5-ピロリン酸に変換する；および（c）メバロン酸5-ピロリン酸をイソペンテニルピロリン酸に変換する任意の酵素であり得る。より具体的には、メバロン酸をメバロン酸5-リン酸にリン酸化する酵素は、M. マゼイ（*M. mazei*）メバロン酸キナーゼポリペプチド、ラクトバチルス属（*Lactobacillus*）メバロン酸キナーゼポリペプチド、M. ブルトニイ（*M. burtonii*）メバロン酸キナーゼポリペプチド、ラクトバチルス・サケイ（*Lactobacillus sakei*）メバロン酸キナーゼポリペプチド、酵母メバロン酸キナーゼポリペプチ

40

50

ド、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*) メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトコッカス・ニューモニアエ (*Streptococcus pneumoniae*) メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) メバロン酸キナーゼポリペプチド、およびストレプトミセス属 (*Streptomyces*) CL190 メバロン酸キナーゼポリペプチドからなる群に由来し得る。別の態様では、メバロン酸をメバロン酸5-リン酸にリン酸化する酵素は、M. マゼイ (*M. mazei*) メバロン酸キナーゼである。

【0195】

いくつかの態様では、下流MVA経路ポリペプチドは、異種ポリペプチドである。いくつかの態様では、細胞は、下流MVA経路ポリペプチドをコードする異種核酸の2つ以上のコピーを含んでなる。いくつかの態様では、下流MVA経路をコードする異種核酸は、構成的プロモーターと作動可能に連結する。いくつかの態様では、下流MVA経路をコードする異種核酸は、誘導性プロモーターと作動可能に連結する。いくつかの態様では、下流MVA経路をコードする異種核酸は、強力プロモーターと作動可能に連結する。いくつかの態様では、下流MVA経路をコードする異種核酸は、弱いプロモーターと作動可能に連結する。いくつかの態様では、異種下流MVA経路ポリペプチドは、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、エンテロコッカス・ファエカリス (*Enterococcus faecalis*)、またはメタノサルシナ・マゼイ (*Methanosarcina mazei*) からのポリペプチドである。

【0196】

下流MVA経路ポリペプチドをコードする核酸は、細胞のゲノムに組み込まれ得て、または細胞内で安定して発現され得る。下流MVA経路ポリペプチドをコードする核酸は、ベクター上にさらに存在し得る。

【0197】

例示的な下流MVA経路ポリペプチドを以下にさらに提供する：(i) メバロン酸キナーゼ (MVK)；(ii) ホスホメバロン酸キナーゼ (PMK)；(iii) ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ (MVD)；および(iv) イソペンテニルニリン酸イソメラーゼ (IDI)。具体的には、下流MVKポリペプチドは、メタノサルシナ属 (*Methanosarcina*) に由来し得て、より具体的には、下流MVKポリペプチドは、メタノサルシナ・マゼイ (*Methanosarcina mazei*) に由来し得る。他の態様では、下流MVKポリペプチドは、M. ブルトニイ (*M. burtonii*) に由来し得る。下流MVA経路ポリペプチドの追加的な例は、下流MVK経路ポリペプチドおよび下流MVK経路ポリペプチド変異体に関して、その内容全体を明示的に参照によって本明細書に援用する、米国特許出願公開第2010/0086978号明細書にある。

【0198】

本明細書に記載される細胞のいずれでも、IDI核酸 (例えば、IDIをコードする内在性または異種核酸) を含んでなり得る。イソペンテニルニリン酸イソメラーゼポリペプチド (イソペンテニルニリン酸ΔイソメラーゼまたはIDI) は、イソペンテニルニリン酸 (IPP) とジメチルアリルニリン酸 (DMA PP) の相互変換を触媒する (例えば、IPPをDMA PPに変換し、および/またはDMA PPをIPPに変換する)。例示的なIDIポリペプチドとしては、IDIポリペプチドの少なくとも1つの活性を有する、ポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、および融合ポリペプチドが挙げられる。(本明細書に記載されるものなどの) 標準法を使用して、ポリペプチドが、試験管内で、細胞内抽出物中で、または生体内で、IPPおよびDMA PPを相互転換する能力を測定することで、ポリペプチドがIDIポリペプチド活性を有するかどうかを判定し得る。例示的なIDI核酸としては、IDIポリペプチドの少なくとも1つの活性を有する、ポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、または融合ポリペプチドをコードする核酸が挙げられる。例示的なIDIポリペプチドおよび核酸としては、本明細書に記載される起源生物のいずれかからの天然ポリペプチドおよび核酸、ならびに本明細書に記載される起源生

物のいずれかに由来する変異ポリペプチドおよび核酸が挙げられる。

【0199】

下流MVA経路ポリペプチドとしては、下流MVA経路ポリペプチドの少なくとも1つの活性を有する、ポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、および融合ポリペプチドが挙げられる。例示的な下流MVA経路核酸としては、下流MVA経路ポリペプチドの少なくとも1つの活性を有する、ポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、または融合ポリペプチドをコードする核酸が挙げられる。例示的な下流MVA経路ポリペプチドおよび核酸としては、本明細書に記載される起源生物のいずれかに由来する、天然ポリペプチドおよび核酸が挙げられる。さらに、より良いイソプレン生産の結果をもたらす、下流MVA経路ポリペプチド変異体もまた使用し得る。

10

【0200】

いくつかの態様では、下流MVA経路ポリペプチドは、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、エンテロコッカス・ファエカリス (*Enterococcus faecalis*)、またはメタノサルシナ・マゼイ (*Methanosarcina mazei*) からのポリペプチドである。いくつかの態様では、MVKポリペプチドは、ラクトバチルス属 (*Lactobacillus*) メバロン酸キナーゼポリペプチド、ラクトバチルス・サケイ (*Lactobacillus sakei*) メバロン酸キナーゼポリペプチド、酵母メバロン酸キナーゼポリペプチド、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*) メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトコッカス・ニューモニアエ (*Streptococcus pneumoniae*) メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) メバロン酸キナーゼポリペプチド、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) CL190 メバロン酸キナーゼポリペプチド、M. ブルトニイ (*M. burtonii*) メバロン酸キナーゼポリペプチド、およびメタノサルシナ・マゼイ (*Methanosarcina mazei*) メバロン酸キナーゼポリペプチドからなる群から選択される。本明細書に記載されるいずれかのプロモーター（例えば、誘導性プロモーターおよび構成的プロモーターをはじめとする、本明細書に記載されて、本開示の実施例で同定されるプロモーター）を使用して、本明細書に記載されるMVAポリペプチドのいずれかの発現を駆動し得る。

20

30

【0201】

イソプレニンシンターゼポリペプチドをコードする核酸

本発明のいくつかの態様では、（本明細書に記載されるような、炭素流を増大するように操作されている宿主細胞をはじめとする）本明細書に記載される組成物または方法のいずれかに記載される細胞は、イソプレニンシンターゼポリペプチドをコードし、またはイソプレニンシンターゼ活性を有するポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸をさらに含んでなる。いくつかの態様では、イソプレニンシンターゼポリペプチドは、内在性ポリペプチドである。いくつかの態様では、イソプレニンシンターゼポリペプチドまたはイソプレニンシンターゼ活性を有するポリペプチドをコードする内在性核酸は、構成的プロモーターと作動可能に連結する。いくつかの態様では、イソプレニンシンターゼポリペプチドまたはイソプレニンシンターゼ活性を有するポリペプチドをコードする内在性核酸は、誘導性プロモーターと作動可能に連結する。いくつかの態様では、イソプレニンシンターゼポリペプチドまたはイソプレニンシンターゼ活性を有するポリペプチドをコードする内在性核酸は、強力なプロモーターと作動可能に連結する。特定の態様では、細胞は、野生型細胞と比較して、内在性イソプレニンシンターゼ経路ポリペプチドを過剰発現するように操作される。いくつかの態様では、イソプレニンシンターゼポリペプチドまたはイソプレニンシンターゼ活性を有するポリペプチドをコードする内在性核酸は、弱いプロモーターと作動可能に連結する。いくつかの態様では、イソプレニンシンターゼポリペプチドまたはイソプレニンシンターゼ活性を有するポリペプチドは、クズ属 (*Pueraria*) またはポプラ属 (*Populus*) またはウラジロハコヤナギ (*Populus alba*) × ヤマナラシ (*Pop*

40

50

ulus tremula)などの雑種からのポリペプチドである。

【0202】

いくつかの態様では、イソプレニンターゼポリペプチドは、異種ポリペプチドである。いくつかの態様では、細胞は、イソプレニンターゼポリペプチドをコードする異種核酸の2つ以上のコピーを含んでなる。いくつかの態様では、イソプレニンターゼポリペプチドをコードする異種核酸は、構成的プロモーターと作動可能に連結する。いくつかの態様では、イソプレニンターゼポリペプチドをコードする異種核酸は、誘導性プロモーターと作動可能に連結する。いくつかの態様では、イソプレニンターゼポリペプチドをコードする異種核酸は、強力なプロモーターと作動可能に連結する。いくつかの態様では、イソプレニンターゼポリペプチドをコードする異種核酸は、弱いプロモーターと作動可能に連結する。

10

【0203】

イソプレニンターゼポリペプチドをコードする核酸は、宿主細胞ゲノムに組み込み得て、または細胞内で安定して発現させ得る。イソプレニンターゼをコードする核酸は、さらにベクター上に存在し得る。

【0204】

例示的なイソプレニンターゼ核酸としては、イソプレニンターゼポリペプチドの少なくとも1つの活性を有する、ポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、または融合ポリペプチドをコードする核酸が挙げられる。イソプレニンターゼポリペプチドは、ジメチルアリルリニン酸(DMA PP)をイソプレニンに変換する。例示的なイソプレニンターゼポリペプチドとしては、イソプレニンターゼポリペプチドの少なくとも1つの活性を有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、および融合ポリペプチドが挙げられる。例示的なイソプレニンターゼポリペプチドおよび核酸としては、本明細書に記載される起源生物のいずれかからの天然ポリペプチドおよび核酸が挙げられる。さらに、イソプレニンターゼ変異体は、改善された酵素活性などの改善された活性を有し得る。いくつかの態様では、イソプレニンターゼ変異体は、改善された安定性(例えば、熱安定性)、および/または改善された溶解度などのその他の改善された特性を有する。

20

【0205】

標準法を使用して、ポリペプチドが、試験管内で、細胞抽出物中で、または生体内で、DMA PPをイソプレニンに変換する能力を測定することで、ポリペプチドがイソプレニンターゼポリペプチド活性を有するかどうかを判定し得る。細胞抽出物中のイソプレニンターゼポリペプチド活性は、例えば、Silver et al., J. Biol. Chem. 270:13010-13016, 1995に記載されるようにして、測定し得る。1つの例示的なアッセイでは、窒素流下で、DMA PP(Sigma)を蒸発するまで乾燥させて、100mMリン酸カリウム緩衝液、pH 8.2中で100mMの濃度に再水和して、-20℃で保存し得る。アッセイを実施するために、金属ねじ蓋およびテフロン(商標)被覆ケイ素隔壁付き20mLのHeadspaceバイアル(Agilent Technologies)内の25μLの細胞抽出物に、5μLの1M MgCl₂、1mMの(250μg/mL)DMA PP、65μLの植物抽出緩衝液(PEB)(50mMのTris-HCl、pH 8.0、20mMのMgCl₂、5%グリセロール、および2mMのDTT)の溶液を添加して、振盪しながら37℃で15分間培養し得る。反応は、200μLの250mM EDTAを添加することでクエンチし、GC/MSによって定量化し得る。

30

40

【0206】

いくつかの態様では、イソプレニンターゼポリペプチドは、植物イソプレニンターゼポリペプチドまたはその変異体である。いくつかの態様では、イソプレニンターゼポリペプチドは、クズ属(Pueraria)からのイソプレニンターゼまたはその変異体である。いくつかの態様では、イソプレニンターゼポリペプチドは、ポプラ属(Populus)からのイソプレニンターゼまたはその変異体である。いくつかの態様では、イソプレニンターゼポリペプチドは、ポプライソプレニンターゼポリペプチドまた

50

はその変異体である。いくつかの態様では、イソブレンシンターゼポリペプチドは、クズイソブレンシンターゼポリペプチドまたはその変異体である。いくつかの態様では、イソブレンシンターゼポリペプチドは、クズ属 (*Pueraria*) またはポプラ属 (*Populus*) または雑種ウラジロハコヤナギ (*Populus alba*) × ヤマナラシ (*Populus tremula*) からのポリペプチドまたはそれらの変異体である。

【0207】

いくつかの態様では、イソブレンシンターゼポリペプチド、イソブレンシンターゼ活性を有するポリペプチドまたは対応する核酸は、マメ亜科 (*Faboideae*) などのマメ科 (*Fabaceae*) に由来する。いくつかの態様では、イソブレンシンターゼポリペプチド、イソブレンシンターゼ活性を有するポリペプチドまたは対応する核酸は、プエラリア・モンタナ (*Pueraria montana*) (クズ) (Sharkey et al., *Plant Physiology* 137:700-712, 2005)、プエラリア・ロバタ (*Pueraria lobata*)、ポプラ (ウラジロハコヤナギ (*Populus alba*))、セイヨウハコヤナギ (*Populus nigra*)、コットンウッド (*Populus trichocarpa*)、またはウラジロハコヤナギ (*Populus alba*) とヤマナラシ (*Populus tremula*) 交雑種 (*Populus alba* × *tremula*) (CAC35696) など (Miller et al., *Planta* 213:483-487, 2001)、アスペン (ポプルス・トレムロイデス (*Populus tremuloides*)) など (Silver et al., *JBC* 270(22):13010-1316, 1995)、ヨーロッパナラ (*Quercus robur*) (Zimmer et al., 国際公開第98/02550号パンフレット)、またはそれらの変種に由来する。いくつかの態様では、イソブレンシンターゼポリペプチド、イソブレンシンターゼ活性を有するポリペプチド、または対応する核酸は、プエラリア・モンタナ (*Pueraria montana*)、プエラリア・ロバタ (*Pueraria lobata*)、ポプルス・トレムロイデス (*Populus tremuloides*)、ウラジロハコヤナギ (*Populus alba*)、セイヨウハコヤナギ (*Populus nigra*)、またはコットンウッド (*Populus trichocarpa*) またはそれらの変種に由来する。いくつかの態様では、イソブレンシンターゼポリペプチド、イソブレンシンターゼ活性を有するポリペプチド、または対応する核酸は、ウラジロハコヤナギ (*Populus alba*) またはそれらの変種に由来する。いくつかの態様では、イソブレンシンターゼ (例えば、ウラジロハコヤナギ (*Populus alba*) からのイソブレンシンターゼまたはその変異体) をコードする核酸は、コドン最適化される。

【0208】

いくつかの態様では、イソブレンシンターゼ核酸またはポリペプチドは、天然ポリペプチドまたは核酸 (例えば、ポプラ属 (*Populus*) からの天然ポリペプチドまたは核酸) である。いくつかの態様では、イソブレンシンターゼ核酸またはポリペプチドは、野生型または天然ポリペプチドまたは核酸でない。いくつかの態様では、イソブレンシンターゼ核酸またはポリペプチドは、野生型または天然ポリペプチドまたは核酸の変異体 (例えば、ポプラ属 (*Populus*) からの野生型または天然ポリペプチドまたは核酸の変種) である。

【0209】

いくつかの態様では、イソブレンシンターゼポリペプチドは、変種である。いくつかの態様では、イソブレンシンターゼポリペプチドは、野生型または天然起源イソブレンシンターゼの変種である。いくつかの態様では、変種は、野生型または天然起源イソブレンシンターゼと比較して、改善された触媒活性などの改善された活性を有する。活性 (例えば、触媒活性) の増大は、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%のいずれかであり得る。いくつかの態様では、触媒活性などの活性の増大は、少なくとも約1倍、2倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、75倍、または100倍のいずれかである。いくつかの態様では、触

媒活性などの活性の増大は、約10%～約100倍（例えば、約20%～約100倍、約50%～約50倍、約1倍～約25倍、約2倍～約20倍、または約5倍～約20倍）である。いくつかの態様では、変種は、野生型または天然起源イソプレニンターゼと比較して、改善された溶解度を有する。溶解度の増大は、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%のいずれかであり得る。溶解度の増大は、少なくとも約1倍、2倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、75倍、または100倍のいずれかであり得る。いくつかの態様では、溶解度の増大は、約10%～約100倍（例えば、約20%～約100倍、約50%～約50倍、約1倍～約25倍、約2倍～約20倍、または約5倍～約20倍）である。いくつかの態様では、イソプレニンターゼポリペプチドは、天然起源イソプレニンターゼの変異体であり、天然起源イソプレニンターゼと比較して、改善された安定性（熱安定性など）を有する。

10

【0210】

いくつかの態様では、変異体は、野生型または天然起源イソプレニンターゼの少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約100%、少なくとも約110%、少なくとも約120%、少なくとも約130%、少なくとも約140%、少なくとも約150%、少なくとも約160%、少なくとも約170%、少なくとも約180%、少なくとも約190%、または少なくとも約200%の活性を有する。変異体は、野生型または天然起源イソプレニンターゼと、配列類似性を共有し得る。いくつかの態様では、野生型または天然起源イソプレニンターゼの変異体は、野生型または天然起源イソプレニンターゼと、少なくとも約40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、または99.9%のいずれかのアミノ酸配列同一性を有し得る。いくつかの態様では、野生型または天然起源イソプレニンターゼの変異体は、野生型または天然起源イソプレニンターゼと、約70%～約99.9%、約75%～約99%、約80%～約98%、約85%～約97%、または約90%～約95%のアミノ酸配列同一性のいずれかを有する。

20

【0211】

いくつかの態様では、変異体は、野生型または天然起源イソプレニンターゼ中に、変異を含んでなる。いくつかの態様では、変異体は、少なくとも1つのアミノ酸置換、少なくとも1つのアミノ酸挿入、および／または少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する。いくつかの態様では、変異体は、少なくとも1つのアミノ酸置換を有する。いくつかの態様では、変異体と、野生型または天然起源イソプレニンターゼの間で異なるアミノ酸残基の数は、例えば、1、2、3、4、5、10、15、20、30、40、50以上のアミノ酸残基など、1つまたは複数であり得る。天然起源イソプレニンターゼとしては、例えば、葛イソプレニンターゼ、ポプライソプレニンターゼ、ヨーロッパナライソプレニンターゼ、および柳イソプレニンターゼなど、植物からの任意のイソプレニンターゼが挙げられる。いくつかの態様では、変異体は、ウラジロハコヤナギ（*Populus alba*）からのイソプレニンターゼの変異体である。いくつかの態様では、ウラジロハコヤナギ（*Populus alba*）からのイソプレニンターゼの変異体は、少なくとも1種のアミノ酸置換、少なくとも1種のアミノ酸挿入、および／または少なくとも1種のアミノ酸欠失を有する。いくつかの態様では、変異体は、トランケート型ウラジロハコヤナギ（*Populus alba*）イソプレニンターゼである。いくつかの態様では、変異体（例えば、ウラジロハコヤナギ（*Populus alba*）からのイソプレニンターゼの変異体をコードする核酸は、コドン最適化される（例えば、その中で異種イソプレニンターゼが発現される宿主細胞に基づいてコドン最適化される）。その他の態様では、ウラジロハコヤナギ（*Populus alba*）に由来するイソプレニンターゼの変異体は、表2に示されるアミノ酸残基に、少なくとも1つのアミノ酸置換、少なくとも1つのアミノ酸挿入、および／または少なくとも1つのアミノ酸欠失を有

30

40

50

する。別の態様では、イソプレシンターゼの変異体は、表 2 に示されるアミノ酸残基のいずれかに、少なくとも 1 つのアミノ酸置換、少なくとも 1 つのアミノ酸欠失、または少なくとも 1 つのアミノ酸挿入を含んでなり、アミノ酸残基番号は、M E A ウラジロハコヤナギ (P. a l b a) イソプレシンターゼ (配列番号 2 4) のアミノ酸残番号に対応する。一態様では、ウラジロハコヤナギ (P. a l b a) イソプレシンターゼは、例えば、完全長イソプレシンターゼよりアミノ酸 1 6 個分短い M E A イソプレシンターゼなどのトランケート型イソプレシンターゼである。

【 0 2 1 2 】

【表 2】

表 2: ウラジロハコヤナギ(*P. alba*)(MEA)のイソプレニンターゼ変異体

A118E	E472R	S510C	D323Y	W392S
S22K	K463F	S510V	D323D	W392T
S21R	K463T	I342I	G99D	W392V
S22K	R71K	K348F	K161K	A118P
S22R	R71L	K348Y	W392A	A118Q
E58L	R71M	K348K	W392C	A118A
T481V	R71V	C437L	W392F	E41M
T481Y	R71R	T240C	S288Y	G111S
T502F	K393L	M460M	M228Y	S74Q
T381L	F542L	R461A	A3T	S74S
T381M	P538K	H424P	W392Y	K36D
T381Y	P538R	H424H	W392W	S282H
T383H	P538P	A448L	F89D	S282I
T383L	A503A	A448Q	F89E	S282W
E480I	L436I	A448V	F89F	S282Y
E480R	L436Y	G389D	E41Y	S282S
K393V	L436F	S444E	E41E	K36S
K393I	E488L	S444S	R43E	K36T
E415H	E488M	H511Y	R43L	K36W
E415V	E488T	H511H	K36E	K36Y
E415Y	E488W	R071I	K36H	K36K
R71H	E488E	R071K	K36N	
R71I	I342Y	R071L	K36P	
E58Y	C437M	K374Y	K36Q	
E135G	C437W	K374K	A453I	
A363L	C437Y	L526E	A453V	
K374Y	C437C	L526Q	A453A	
T381I	M460A	L526L	V409I	
L436L	I447T	R242G	V409T	
H254R	I447V	R242R	K161C	
H254C	I447Y	A443G	K161E	
E488C	S444D	A443Q	K161N	
E488F	G389E	A443R	K161Q	
T383Y	L376I	A443S	G99E	
K414I	L376M	S13S	G99G	
K414R	L376L	V268I	S288A	
K414S	I504F	V268V	S288C	
K414W	I504I	K161A	S288T	
E472C	E467H	V409V	W392I	
E472L	E467W	D323F	W392M	

【0213】

一実施形態では、MEAウラジロハコヤナギ(*P. alba*)イソプレニンターゼはトランケート型であり、完全長ウラジロハコヤナギ(*P. alba*)イソプレニンターゼよりもアミノ酸16個分短い。

【0214】

本明細書で提供されるイソプレニンターゼポリペプチドは、イソプレニンターゼお

10

20

30

40

50

よびイソプレニンシンターゼ変異体に関して、その内容全体を明示的に参照によって本明細書に援用する、国際公開第2009/132220号パンフレット、国際公開第2010/124146号パンフレット、および米国特許出願公開第2010/0086978号明細書に記載される、イソプレニンシンターゼまたはイソプレニンシンターゼ変異体のいずれかであり得る。

【0215】

本明細書に記載されるプロモーター（例えば、誘導性プロモーターおよび構成的プロモーターをはじめとする、本明細書に記載されて、本開示の実施例で同定されるいずれかのプロモーター）を使用して、本明細書に記載されるイソプレニンシンターゼのいずれかの発現を駆動し得る。

10

【0216】

適切なイソプレニンシンターゼとしては、Genbank受入番号AY341431、AY316691、AY279379、AJ457070、およびAY182241によって同定されるものが挙げられるが、これに限定されるものではない。本明細書に記載される組成物、またはイソプレニンシンターゼをコードする微生物を作成する方法をはじめとする方法のいずれかで、使用し得るイソプレニンシンターゼのタイプは、国際公開第2009/076676号パンフレット、国際公開第2010/003007号パンフレット、国際公開第2009/132220号パンフレット、国際公開第2010/031062号パンフレット、国際公開第2010/031068号パンフレット、国際公開第2010/031076号パンフレット、国際公開第2010/013077号パンフレット、国際公開第2010/031079号パンフレット、国際公開第2010/148150号パンフレット、国際公開第2010/124146号パンフレット、国際公開第2010/078457号パンフレット、国際公開第2010/148256号パンフレット、および国際公開第2013/166320号パンフレットにもまた記載される。

20

【0217】

DXP経路ポリペプチドをコードする核酸

本発明のいくつかの態様では、（本明細書に記載されるように炭素流を増大させるように操作されている宿主細胞をはじめとする）本明細書に記載される組成物また方法のいずれかに記載される細胞は、DXSポリペプチドまたはその他のDXP経路ポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸をさらに含んでなる。いくつかの態様では、細胞は、DXSポリペプチドまたはその他のDXP経路ポリペプチドをコードする内在性核酸の染色体のコピーをさらに含んでなる。いくつかの態様では、大腸菌（*E. coli*）細胞は、IDIポリペプチドおよびDXSポリペプチドまたはその他のDXP経路ポリペプチドをコードする、1つまたは複数の核酸をさらに含んでなる。いくつかの態様では、1つの核酸が、イソプレニンシンターゼポリペプチド、IDIポリペプチド、およびDXSポリペプチドまたはその他のDXP経路ポリペプチドをコードする。いくつかの態様では、1つのプラスミドが、イソプレニンシンターゼポリペプチド、IDIポリペプチド、およびDXSポリペプチドまたはその他のDXP経路ポリペプチドをコードする。いくつかの態様では、複数のプラスミドが、イソプレニンシンターゼポリペプチド、IDIポリペプチド、およびDXSポリペプチドまたはその他のDXP経路ポリペプチドをコードする。

30

40

【0218】

例示的なDXSポリペプチドとしては、DXSポリペプチドの少なくとも1つの活性を有する、ポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、および融合ポリペプチドが挙げられる。（本明細書に記載されるものなどの）標準法を使用して、ポリペプチドが、試験管内、細胞抽出物中、または生体内で、ピルビン酸およびD-グリセルアルデヒド3-リン酸を1-デオキシ-D-キシルロース-5-リン酸に変換する能力を測定することで、ポリペプチドがDXSポリペプチド活性を有するかどうかを判定し得る。例示的なDXSポリペプチドおよび核酸およびDXS活性を測定する方法は、国際公開第2009/076676号パンフレット、米国特許出願第12/335,071号明細書（米国特許出願公開第2009/0203102号明細書）、国際公開第2010/003007号パンフ

50

レット、米国特許出願公開第2010/0048964号明細書、国際公開第2009/132220号パンフレット、および米国特許出願公開第2010/0003716号明細書に、より詳細に記載される。

【0219】

例示的なDXP経路ポリペプチドとしては、DXP経路ポリペプチドの1つまたは2つ以上の活性を有する、DXSポリペプチド、DXRポリペプチド、MCTポリペプチド、CMKポリペプチド、MCSポリペプチド、HDSポリペプチド、HDRポリペプチド、およびポリペプチド（例えば、融合ポリペプチド）のいずれかが挙げられるが、これに限定されるものではない。特に、DXP経路ポリペプチドとしては、DXP経路ポリペプチドの少なくとも1つの活性を有する、ポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、および融合ポリペプチドが挙げられる。例示的なDXP経路核酸としては、DXP経路ポリペプチドの少なくとも1つの活性を有する、ポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、または融合ポリペプチドをコードする核酸が挙げられる。例示的なDXP経路ポリペプチドおよび核酸としては、本明細書に記載される起源生物のいずれかからの天然ポリペプチドおよび核酸、ならびに本明細書に記載される起源生物のいずれかに由来する変異ポリペプチドおよび核酸が挙げられる。例示的なDXP経路ポリペプチド、および核酸、およびDXP経路ポリペプチド活性を測定する方法は、国際公開第2010/148150号パンフレットにより詳細に記載される。

10

【0220】

例示的なDXSポリペプチドとしては、DXSポリペプチドの少なくとも1つの活性を有する、ポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、および融合ポリペプチドが挙げられる。（本明細書に記載されるものなどの）標準法を使用して、ポリペプチドが、試験管内、細胞抽出物中、または生体内で、ピルビン酸およびD-グリセルアルデヒド-3-リン酸を1-デオキシ-D-キシルロース-5-リン酸に変換する能力を測定することで、ポリペプチドがDXSポリペプチド活性を有するかどうかを判定し得る。例示的なDXSポリペプチド、および核酸、およびDXS活性を測定する方法は、国際公開第2009/076676号パンフレット、米国特許出願第12/335,071号明細書（米国特許出願公開第2009/0203102号明細書）、国際公開第2010/003007号パンフレット、米国特許出願公開第2010/0048964号明細書、国際公開第2009/132220号パンフレット、および米国特許出願公開第2010/0003716号明細書により詳細に記載される。

20

30

【0221】

特に、DXSポリペプチドは、ピルビン酸およびD-グリセルアルデヒド3-リン酸を1-デオキシ-d-キシルロース5-リン酸（DXP）に変換する。標準法を使用して、ポリペプチドが、試験管内、細胞抽出物中、または生体内で、ピルビン酸およびD-グリセルアルデヒド3-リン酸を変換する能力を測定することで、ポリペプチドがDXSポリペプチド活性を有するかどうかを判定し得る。

【0222】

DXRポリペプチドは、1-デオキシ-d-キシルロース5-リン酸（DXP）を2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸（MEP）に変換する。標準法を使用して、ポリペプチドが、試験管内、細胞抽出物中、または生体内で、DXPを変換する能力を測定することで、ポリペプチドがDXRポリペプチド活性を有するかどうかを判定し得る。

40

【0223】

MCTポリペプチドは、2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸（MEP）を4-（シチジン5'-ジホスホ）-2-メチル-D-エリスリトール（CDP-ME）に変換する。標準法を使用して、ポリペプチドが、試験管内、細胞抽出物中、または生体内で、MEPを変換する能力を測定することで、ポリペプチドがMCTポリペプチド活性を有するかどうかを判定し得る。

【0224】

CMKポリペプチドは、4-（シチジン5'-ジホスホ）-2-C-メチル-D-エリ

50

スリトール（CDP-ME）を2-ホスホ-4-（シチジン5'-ジホスホ）-2-C-メチル-D-エリスリトール（CDP-MEP）に変換する。標準法を使用して、ポリペプチドが、試験管内、細胞抽出物中、または生体内で、CDP-MEを変換する能力を測定することで、ポリペプチドがCMKポリペプチド活性を有するかどうかを判定し得る。

【0225】

MCSポリペプチドは、2-ホスホ-4-（シチジン5'-ジホスホ）-2-C-メチル-D-エリスリトール（CDP-MEP）を2-C-メチル-D-エリスリトール2、4-シクロニリン酸（ME-CPPまたはcMEPP）に変換する。標準法を使用して、ポリペプチドが、試験管内、細胞抽出物中、または生体内で、CDP-MEPを変換する能力を測定することで、ポリペプチドがMCSポリペプチド活性を有するかどうかを判定し得る。

10

【0226】

HDSポリペプチドは、2-C-メチル-D-エリスリトール2、4-シクロニリン酸を（E）-4-ヒドロキシ-3-メチルブテ-2-エン-1-イルニリン酸（HMBPPまたはHDMAPP）に変換する。標準法を使用して、ポリペプチドが、試験管内、細胞抽出物中、または生体内で、ME-CPPを変換する能力を測定することで、ポリペプチドがHDSポリペプチド活性を有するかどうかを判定し得る。

【0227】

HDRポリペプチドは、（E）-4-ヒドロキシ-3-メチルブテ-2-エン-1-イルニリン酸をイソペンテニルニリン酸（IPP）およびジメチルアリルニリン酸（DMAPP）に変換する。標準法を使用して、ポリペプチドが、試験管内、細胞抽出物中、または生体内で、HMBPPを変換する能力を測定することで、ポリペプチドがHDRポリペプチド活性を有するかどうかを判定し得る。

20

【0228】

下流MVA経路、イソプレニンシンターゼ、IDI、およびDXP経路ポリペプチドの起源生物

イソプレニンシンターゼ、IDI、DXP経路、および／またはMVA経路核酸（およびそれらがコードするポリペプチド）は、イソプレニンシンターゼ、IDI、DXP経路、および／またはMVA経路核酸を天然に含有する、任意の生物から得られ得る。イソプレンは、細菌、酵母、植物、および動物などの多様な生物によって、天然に形成される。いくつかの生物が、イソプレンを生成するためのMVA経路を含有する。イソプレニンシンターゼ核酸は、例えば、イソプレニンシンターゼを含有する任意の生物から得られ得る。MVA経路核酸は、例えば、MVA経路を含有する任意の生物から得られ得る。IDIおよびDXP経路核酸は、例えば、IDIおよびDXP経路を含有する任意の生物から得られ得る。

30

【0229】

イソプレニンシンターゼ、DXP経路、IDI、および／またはMVA経路核酸の核酸配列は、細菌、真菌、植物、藻類、またはラン藻から単離され得る。例示的な起源生物としては、例えば、サッカロミセス属（*Saccharomyces*）（例えば、*S. cerevisiae*）種などの酵母、エシェリキア属（*Escherichia*）（例えば、大腸菌（*E. coli*））種などの細菌、またはメタノサルシナ属（*Methanosarcina*）の種（例えば、メタノサルシナ・マゼイ（*Methanosarcina mazei*）、葛またはポプラ（例えば、ウラジロハコヤナギ（*Populus alba*）またはウラジロハコヤナギ（*Populus alba*）×ヤマナラシ（*Populus tremula*）CAC35696）またはアスペン（例えば、ポプルス・トレムロイデス（*Populus tremuloides*））などの植物が挙げられる。使用し得る例示的なイソプレニンシンターゼ、IDI、および／またはMVA経路ポリペプチド起源は、国際公開第2009/076676号パンフレット、国際公開第2010/003007号パンフレット、国際公開第2009/132220号パンフレット、国際公開第2010/031062号パンフレット、国際公開第2010/031

40

50

068号パンフレット、国際公開第2010/031076号パンフレット、国際公開第2010/013077号パンフレット、国際公開第2010/031079号パンフレット、国際公開第2010/148150号パンフレット、国際公開第2010/078457号パンフレット、および国際公開第2010/148256号パンフレットにもまた記載される。

【0230】

イソプレンの生産増大能力がある組換え細胞

イソプレンに向かう炭素流が増大するように遺伝子操作されている、本明細書に記載される組換え細胞は、イソプレンに向かう炭素流が増大するように遺伝子操作されていない同一細胞を上回る濃度で、イソプレンを産生する能力を有する。一態様では、本明細書に記載される組換え細胞（細菌、真菌、または藻類細胞など）は、1つまたは複数のアセチル化タンパク質を含んでなり、前記タンパク質は、それらの発現および／または活性が調節されるように遺伝子操作されて、1つまたは複数のアセチル化タンパク質が欠損している同一細胞を上回る濃度で、イソプレンを産生する能力を有し、前記タンパク質は、それらの発現および／または活性が調節されるように遺伝子操作される。アセチル化タンパク質は、アセチルトランスフェラーゼ（YfiQなどであるが、これに限定されるものではない）および／またはデアセチラーゼ（CobBなどであるが、これに限定されるものではない）であり得る。いくつかの実施形態では、YfiQポリペプチドの活性は、YfiQポリペプチドをコードする遺伝子の発現を低下、減衰、または欠失させることで（内在性yfiQ遺伝子の欠失などであるが、これに限定されるものではない）調節される。その他の実施形態では、CobBポリペプチドの活性は、CobBタンパク質をコードする遺伝子の発現を増大させることで（内在性cobB遺伝子の発現の増大、またはcobBをコードする核酸の異種発現などであるが、これに限定されるものではない）調節される。その他の実施形態では、適切な培地中でこれらの細胞培養することは、1つまたは複数のアセチル化タンパク質を含まないイソプレンを産生する細胞と比較して、改善されたイソプレンの生産を提供し、前記タンパク質は、それらの発現および／または活性が調節されるように遺伝子操作される。いくつかの態様では、細胞は、イソプレンシンターゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸をさらに含んでなる。特定の態様では、これらの細胞は、全MVA経路のポリペプチドをコードする異種核酸、ホスホケトラーゼをコードする1つまたは複数の異種核酸ポリペプチド、および／またはイソプレンシンターゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸の1つまたは複数のコピーをさらに含んでなり得る。本明細書で開示される細胞の態様のいずれにおいても、1つまたは複数の異種核酸が宿主細胞の染色体に組み込まれ得る。その他の態様では、改善されたイソプレンの生産は、イソプレン比生産性の増大、イソプレン力価の増大、イソプレン収率の増大、細胞生存率の増大、および／または酢酸生成量の低下の1つまたは複数によって特徴付けられる。

【0231】

例示的一実施形態では、本明細書で開示される細胞は、イソプレンに向かう炭素流が増大するように遺伝子操作されていないイソプレン産生細胞と比較して、少なくとも5%高い量のイソプレンを産生し得る。その他の態様では、細胞（細菌、真菌、または藻類細胞など）は、1つまたは複数のアセチル化タンパク質を含まないイソプレン産生細胞（細菌、真菌、または藻類細胞など）と比較して、少なくとも5%高い量のイソプレンを産生し得て、前記タンパク質は、それらの発現および／または活性が調節されるように遺伝子操作される。代案としては、細胞（細菌、真菌、または藻類細胞など）は、包括的に、約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、または15%を超える、ならびにこれらの数字の間の任意の数値のイソプレンを産生し得る。

【0232】

本発明の一態様では、イソプレンに向かう炭素流が増大するように遺伝子操作された細胞が提供され、細胞は、1つまたは複数のアセチル化タンパク質を含んでなり、前記タン

10

20

30

40

50

10

20

30

40

【 0 2 3 5 】

50

複数のアセチル化タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸、全MVA経路のポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸、およびイソプレニンシンターゼポリペプチドを含んでなる組換え細胞（細菌、真菌、または藻類細胞など）を培養することで生産され得て、前記細胞は、核酸の発現および／またはアセチル化タンパク質の活性が調節されるように遺伝子操作されている。特定の実施形態では、組換え細胞は、ホスホケトラーゼポリペプチドをコードする、1つまたは複数の核酸をさらに含んでなり得る。イソプレンは、本明細書に記載される細胞のいずれかから、本明細書に記載される方法のいずれかによって、生産され得る。細胞のいずれでも、グルコースなどであるが、これに限定されるものではない炭水化物、または酢酸などであるが、これに限定されるものではないその他の炭素源から、イソプレンを生産する目的で使用され得る。

10

【0236】

したがって、本明細書でまた提供されるのは、（a）1つまたは複数のアセチル化タンパク質を含んでなる細胞を培養するステップと、（b）イソプレンを生産するステップとを含んでなるイソプレンを生産する方法であり、細胞は、アセチル化タンパク質の発現および／または活性が調節されるように遺伝子操作されている。その他の態様では、本明細書で提供されるのは、（a）イソプレンを生産するための適切な培地中で、1つまたは複数のアセチル化タンパク質を含んでなる細胞（細菌、真菌、または藻類細胞など）を培養するステップと、（b）イソプレンを生産するステップとを含んでなるイソプレンを生産する方法であり、前記タンパク質は、それらの活性が調節されるように遺伝子操作される。細胞は、上述されるような全MVA経路のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸分子、ホスホケトラーゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸分子、および上に記載されるイソプレニンシンターゼポリペプチドのいずれかを含んでなり得る。いくつかの態様では、細胞（細菌、真菌、または藻類細胞など）は、本明細書に記載される細胞のいずれかであり得る。本明細書に記載されるイソプレニンシンターゼまたはその変異体のいずれか、本明細書に記載される微生物（例えば、細菌）または植物系統のいずれか、本明細書に記載されるプロモーターのいずれか、および／または本明細書に記載されるベクターのいずれかはまた、本明細書に記載される方法で使用され得る、本明細書に記載されるエネルギー源（例えば、グルコースまたは任意のその他の六炭糖）のいずれかを使用して、イソプレンを生産するのに使用され得る。いくつかの態様では、イソプレンを生産する方法は、イソプレンを回収するステップをさらに含んでなる。

20

30

【0237】

いくつかの態様では、生産されたイソプレンの量が、ピーク絶対生産性時点で測定される。いくつかの態様では、細胞ピーク絶対生産性は、本明細書で開示されるイソプレニン量のいずれかに関する。いくつかの態様では、生産されたイソプレンの量が、ピーク比生産性時点で測定される。いくつかの態様では、細胞ピーク比生産性は、本明細書で開示される細胞あたりのイソプレニン量のいずれかに関する。いくつかの態様では、生産されたイソプレンの累積総量が測定される。いくつかの態様では、細胞累積総生産性は、本明細書で開示されるイソプレニン量のいずれかに関する。

【0238】

いくつかの態様では、アセチル化タンパク質の発現および／または活性が調節されるように遺伝子操作されている本明細書に記載される細胞（例えば、培養中の細胞）のいずれもが、1、10、25、50、100、150、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1,000、1,250、1,500、1,750、2,000、2,500、3,000、4,000、5,000 nmol/g_{wc}m/hr以上のイソプレニンイソプレニン／湿潤細胞重量グラム／時間（nmol/g_{wc}m/hr）を生産する。いくつかの態様では、イソプレニンの量は、約2～約100 nmol/g_{wc}m/hr、約100～約500 nmol/g_{wc}m/hr、約150～約500 nmol/g_{wc}m/hr、約500～約1,000 nmol/g_{wc}m/hr、約1,000～約2,000 nmol/g_{wc}m/hr、または約2,000～約5,000 nmol/g_{wc}m/hrなど、約2～約5,000 nmol/g_{wc}m/hrである。い

40

50

くつかの態様では、イソプレンの量は、約20～約5,000nmole/g_{w c m}/hr、約100～約5,000nmole/g_{w c m}/hr、約200～約2,000nmole/g_{w c m}/hr、約200～約1,000nmole/g_{w c m}/hr、約300～約1,000nmole/g_{w c m}/hr、または約400～約1,000nmole/g_{w c m}/hrである。

【0239】

いくつかの態様では、アセチル化タンパク質の発現および／または活性が調節されるように遺伝子操作されている細胞は、約1、10、25、50、100、150、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1,000、1,250、1,500、1,750、2,000、2,500、3,000、4,000、5,000、10,000、100,000ngイソプレン/g湿潤細胞重量/hr (ng/g_{w c m}/h)以上のイソプレンを生成する。いくつかの態様では、イソプレンの量は、約2～約100ng/g_{w c m}/h、約100～約500ng/g_{w c m}/h、約500～約1,000ng/g_{w c m}/h、約1,000～約2,000ng/g_{w c m}/h、または約2,000～約5,000ng/g_{w c m}/hなどの約2～約5,000ng/g_{w c m}/hである。いくつかの態様では、イソプレンの量は、約20～約5,000ng/g_{w c m}/h、約100～約5,000ng/g_{w c m}/h、約200～約2,000ng/g_{w c m}/h、約200～約1,000ng/g_{w c m}/h、約300～約1,000ng/g_{w c m}/h、または約400～約1,000ng/g_{w c m}/hである。

【0240】

いくつかの態様では、アセチル化タンパク質の発現および／または活性が調節されるように遺伝子操作されている細胞は、1、10、25、50、100、150、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1,000、1,250、1,500、1,750、2,000、2,500、3,000、4,000、5,000、10,000、50,000、100,000mgイソプレン/Lブロス (mg/L_{b r o t h}、式中、ブロス容積は、細胞および細胞培地の容積を含む)以上のいずれかをほぼ超える、またはそのいずれかである、イソプレンの累積力価(総量)を生成する。いくつかの態様では、イソプレンの量は、約2～約5,000mg/L_{b r o t h}などの約2～約100mg/L_{b r o t h}、約100～約500mg/L_{b r o t h}、約500～約1,000mg/L_{b r o t h}、約1,000～約2,000mg/L_{b r o t h}、または約2,000～約5,000mg/L_{b r o t h}である。いくつかの態様では、イソプレンの量は、約20～約5,000mg/L_{b r o t h}、約100～約5,000mg/L_{b r o t h}、約200～約2,000mg/L_{b r o t h}、約200～約1,000mg/L_{b r o t h}、約300～約1,000mg/L_{b r o t h}、または約400～約1,000mg/L_{b r o t h}である。

【0241】

いくつかの態様では、アセチル化タンパク質の発現および／または活性が調節されるように遺伝子操作されている細胞は、容量基準で発酵発生気体の少なくとも約1、2、5、10、15、20、または25%を構成する。いくつかの態様では、イソプレンは、発生気体の容量基準で約5～約15%、約15～約25%、約10～約20%、または約1～約10%などの約1～約25%を構成する。

【0242】

これらの細胞内のアセチル化タンパク質の発現および／または活性が調節されるように遺伝子操作されている本明細書に記載される組換え細胞によるイソプレンの生産は、約5%～約1,000,000倍向上され得る。イソプレンの生産は、野生型レベルの1つまたは複数のアセチル化タンパク質、イソプレニンシンターゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸、全MVA経路のポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸、DXP経路ポリペプチド、および／またはIDIポリペプチドを発現して、イソプレン生産に向かう炭素流を増大させるように操作されていない細胞によるイソプレンの生

産と比較して、約10%～約1,000,000倍（例えば、約50%～約1,000,000倍、約1～約500,000倍、約1～約50,000倍、約1～約5,000倍、約1～約1,000倍、約1～約500倍、約1～約100倍、約1～約50倍、約5～約100,000倍、約5～約10,000倍、約5～約1,000倍、約5～約500倍、約5～約100倍、約10～約50,000倍、約50～約10,000倍、約100～約5,000倍、約200～約1,000倍、約50～約500倍、または約50～約200倍）向上され得る。

【0243】

イソプレンの生産はまた、天然細胞による、または1つまたは複数のアセチル化タンパク質、イソプレシンターゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸、全MVA経路のポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸、DXP経路ポリペプチド、および／またはIDIポリペプチドを発現せず、イソペンレン生産に向かう炭素流が増大するように遺伝子操作されていない細胞によるイソプレンの生産と比較して、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1倍、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍、200倍、500倍、1000倍、2000倍、5000倍、10,000倍、20,000倍、50,000倍、100,000倍、200,000倍、500,000倍、または1,000,000倍のいずれか向上され得て、前記タンパク質は、それらの活性が調節されるように遺伝子操作される。

10

【0244】

イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドを産生できる組換え細胞

20

イソプレノイドは、多数の生物中で、MVA経路の最終生成物であるイソプレノイド前駆体分子の合成から生成され得る。上述のように、イソプレノイドは、重要なクラスの化合物に相当し、例えば、食品および飼料補給剤、フレーバーおよび臭気化合物、および抗がん、抗マラリア、抗真菌、および抗菌化合物を含む。

【0245】

分子クラスとして、イソプレノイドは、化合物に含まれるイソペンレン単位数に基づいて分類される。モノテルペンは、10個の炭素または2個のイソペンレン単位を含んでなり、セスキテルペンは、15個の炭素または3個のイソペンレン単位を含んでなり、ジテルペンは、20炭素または4個のイソペンレン単位を含んでなり、セステルテルペンは、25個の炭素または5個のイソペンレン単位を含んでなり、以下同じように続く。ステロイド（一般的に約27個の炭素を含んでなる）は、イソプレノイドの切断または再構成生成物である。

30

【0246】

イソプレノイドは、イソプレノイド前駆体分子IPPおよびDMA PPから生成され得る。これらの多様な化合物は、これらの比較的単純な汎用前駆体から誘導され、保存的ポリプレニルピロリン酸シンターゼのグループによって合成される（Hsieh et al., Plant Physiol. 2011年3月; 155(3): 1079-90）。それらの特有の生理学的機能を反映する、これらの直鎖プレニルピロリン酸の様々な鎖長は、一般に、アリル性基質（ジメチルアリルニリン酸（C₅-DMA PP）、ピロリン酸ゲラニル（C₁₀-GPP）、ピロリン酸ファルネシル（C₁₅-FPP）、ゲラニルゲラニルピロリン酸（C₂₀-GGPP））と、対応する数のイソペンテニルピロリン酸（C₅-IPP）との縮合反応を通じて、ポリプレニルピロリン酸シンターゼの非常に発達した活性部位によって判定される（Hsieh et al., Plant Physiol. 2011年3月; 155(3): 1079-90）。ピロリン酸ポリプレニルシンターゼの例としては、ピロリン酸ファルネシル（FPP）シンターゼ（例えば、大腸菌（E. coli）のためにコドン最適化されたファルネセンシンターゼ（配列番号26）または大腸菌（E. coli）のためにコドン最適化されたアモルファジエンシンターゼ（配列番号25））；ピロリン酸ゲラニルシンターゼ；またはゲラニルゲラニルピロリン酸シンターゼが挙げられるが、これに限定されるものではない。

40

50

【0247】

イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドの生産は、酵素活性が調節されてイソプレノイド生産に向かう炭素流が増大するように、酵素経路の1つまたは複数の操作されている、本明細書に記載される組換え宿主細胞のいずれかを使用して実施され得る。さらに、これらの細胞は、1つまたは複数のアセチル化タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸、全MVA経路のポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸、および／またはホスホケトラーゼをコードする1つまたは複数の異種核酸ポリペプチド、および／またはイソプレニンターゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を発現し得て、前記細胞は、核酸の発現および／またはアセチル化タンパク質の活性が調節されるように遺伝子操作されている。いくつかの態様では、これらの細胞は、上述のID Iおよび／またはDX P経路ポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸、および／またはポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードする異種核酸をさらに含んでなる。理論により拘束されることなく、上述の組成物および方法のいずれかによって、細胞内で、アセチルCoAまたはメバロン酸の細胞産生を増大させることは、同様により大量のイソプレノイド前駆体分子および／またはイソプレノイド生成をもたらすと考えられる。グルコースからのアセチルCoAおよび／またはメバロン酸生成のモル収率を増大させることは、メバロン酸キナーゼ、ホスホメバロン酸キナーゼ、ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ、イソペンテニルニリン酸イソメラーゼ、およびイソプレノおよびイソプレノイド生成のためのその他の適切な酵素の適切な酵素活性レベルとグルコースを組み合わせると生成される、イソプレノをはじめとするイソプレノイド前駆体分子および／またはイソプレノイドのより高いモル収率につながる。

10

20

【0248】

イソプレノイドのタイプ

メバロン酸への炭素流動増大のために操作された本発明の細胞は、イソプレノイドおよびイソプレノイド前駆体分子DMAPPおよびIPPの産生を増大できる。イソプレノイドの例としては、制限なしに、ヘミテルペン、モノテルペノイド、セスキテルペノイド、ジテルペノイド、セステルテルペノイド、トリテルペノイド、テトラテルペノイド、より高級なポリテルペノイドが挙げられる。いくつかの態様では、ヘミテルペノイドは、プレノール（すなわち3-メチル-2-ブテン-1-オール）、イソプレノール（すなわち3-メチル-3-ブテン-1-オール）、2-メチル-3-ブテン-2-オール、またはイソ吉草酸である。いくつかの態様では、モノテルペノイドは、制限なしに、ピロリン酸ゲラニル、ユーカリプトール、リモネン、またはピネンであり得る。いくつかの態様では、セスキテルペノイドは、ピロリン酸ファルネシル、アルテミシニン、またはビスボロールである。いくつかの態様では、ジテルペノイドは、制限なしに、ゲラニルゲラニルピロリン酸、レチノール、レチナール、フィトール、タキソール、フォルスコリン、またはアフィジコリンであり得る。いくつかの態様では、トリテルペノイドは、制限なしに、スクアレンまたはラノステロールであり得る。イソプレノイドはまた、アビエタジエン、アモルファジエン、カレン、 α -ファルネセン、 β -ファルネセン、ファルネソール、ゲラニオール、ゲラニルゲラニオール、リナロール、リモネン、ミルセン、ネロリドール、オシメン、パトコウロール、 β -ピネン、サビネン、 γ -テルピネン、テルピネン、およびバレンセンからなる群から選択し得る。

30

40

【0249】

いくつかの態様では、テトラテルペノイドは、リコペンまたはカロテン（カロテノイド）である。本明細書の用法では、「カロテノイド」という用語は、植物の葉緑体および有色体中、藻類などのいくつかのその他の光合成生物の葉緑体および有色体中、ある種の真菌およびいくつかの細菌中に生じる、一群の天然有機色素を指す。カロテノイドとしては、酸素含有キサントフィルおよび酸素非含有カロテンが挙げられる。いくつかの態様では、カロテノイドは、キサントフィルおよびカロテンからなる群から選択される。いくつかの態様では、キサントフィルは、ルテインまたはゼアキサントシンである。いくつかの態様では、カロテノイドは、 α -カロテン、 β -カロテン、 γ -カロテン、 β -クリプトキサ

50

ンチンまたはリコペンである。

【0250】

ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードする異種核酸

本発明のいくつかの態様では、本明細書の組成物または方法のいずれかに記載されるイソプレノイドへの炭素流動増大のために操作された細胞は、上述の下流メバロン酸（MVA）経路ポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸、ならびにポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードする、1つまたは複数の核酸をさらに含んでなる。ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドは、内在性ポリペプチドであり得る。ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードする内在性核酸は、構成的プロモーターと作動可能に連結し得て、または同様に誘導性プロモーターと作動可能に連結し得る。ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードする内在性核酸は、強力なプロモーターとさらに作動可能に連結し得る。代案としては、ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードする内在性核酸は、弱いプロモーターと作動可能に連結し得る。特に、細胞は、野生型細胞と比較して、内在性ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドを過剰発現するように改変し得る。

10

【0251】

いくつかの態様では、ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドは、異種ポリペプチドである。本発明の細胞は、ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードする異種核酸の2つ以上のコピーを含んでなり得る。いくつかの態様では、ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードする異種核酸は、構成的プロモーターと作動可能に連結する。いくつかの態様では、ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードする異種核酸は、誘導性プロモーターと作動可能に連結する。いくつかの態様では、ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードする異種核酸は、強力なプロモーターと作動可能に連結する。いくつかの態様では、ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードする異種核酸は、弱いプロモーターと作動可能に連結する。

20

【0252】

ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードする核酸は、宿主細胞ゲノムに組み込み得て、または細胞内で安定して発現させ得る。ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードする核酸は、さらにベクター上に存在し得る。

【0253】

例示的なポリプレニルピロリン酸シンターゼ核酸としては、ポリプレニルピロリン酸シンターゼの少なくとも1つの活性を有する、ポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、または融合ポリペプチドをコードする核酸が挙げられる。ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドは、イソプレノイド前駆体分子をより複雑なイソプレノイド化合物に変換する。例示的なシンターゼポリペプチドとしては、ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドの少なくとも1つの活性を有するポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、および融合ポリペプチドが挙げられる。例示的なポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドおよび核酸としては、本明細書に記載される起源生物のいずれかからの天然ポリペプチドおよび核酸が挙げられる。さらに、ポリプレニルピロリン酸シンターゼ変異体は、改善された酵素活性などの改善された活性を有し得る。いくつかの態様では、ポリプレニルピロリン酸シンターゼ変異体は、改善された安定性（例えば、熱安定性）、および／または改善された溶解度などのその他の改善された特性を有する。例示的なポリプレニルピロリン酸シンターゼ核酸としては、制限なしに、ゲラニルニリン酸（GPP）シンターゼ、ピロリン酸ファルネシル（FPP）シンターゼ、およびゲラニルゲラニルピロリン酸（GGPP）シンターゼ、または任意のその他の既知のポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドなどのポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードする核酸が挙げられる。

30

40

【0254】

本発明のいくつかの態様では、本明細書の組成物または方法のいずれかに記載されるイソプレノイドへの炭素流動増大のために操作された細胞は、ピロリン酸ファルネシル（F

50

P P) シンターゼをコードする、1つまたは複数の核酸をさらに含んでなる。F P P シンターゼポリペプチドは、内在性遺伝子によってコードされる内在性ポリペプチドであり得る。いくつかの態様では、F P P シンターゼポリペプチドは、大腸菌 (*E. coli*) 中で、内在性 *ispA* 遺伝子によってコードされる (例えば、配列番号 23)。F P P シンターゼポリペプチドをコードする内在性核酸は、構成的プロモーターと作動可能に連結し得て、または同様に誘導性プロモーターと作動可能に連結し得る。F P P シンターゼポリペプチドをコードする内在性核酸は、強力なプロモーターとさらに作動可能に連結し得る。特に、細胞は、野生型細胞と比較して、内在性 F P P シンターゼポリペプチドを過剰発現するように改変し得る。

【0255】

いくつかの態様では、F P P シンターゼポリペプチドは異種ポリペプチドである。本発明の細胞は、F P P シンターゼポリペプチドをコードする異種核酸の2つ以上のコピーを含んでなり得る。いくつかの態様では、F P P シンターゼポリペプチドをコードする異種核酸は、構成的プロモーターと作動可能に連結する。いくつかの態様では、F P P シンターゼポリペプチドをコードする異種核酸は、誘導性プロモーターと作動可能に連結する。いくつかの態様では、ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードする異種核酸は、強力なプロモーターと作動可能に連結する。

【0256】

F P P シンターゼポリペプチドをコードする核酸は、宿主細胞ゲノムに組み込み得て、または細胞内で安定して発現させ得る。F P P シンターゼをコードする核酸は、さらにベクター上に存在し得る。

【0257】

標準法を使用して、ポリペプチドが、試験管内で、細胞抽出物中で、または生体内で、I P P を高級イソプレノイドに変換する能力を測定することで、ポリペプチドがポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチド活性を有するかどうかを判定し得る。これらの方法は、当該技術分野で周知であり、例えば、米国特許第7,915,026号明細書、Hsieh et al., *Plant Physiol.* 2011年3月;155(3):1079-90; Danner et al., *Phytochemistry*. 2011年4月12日 [印刷前のデジタル出版]; Jones et al., *J Biol Chem.* 2011年3月24日 [印刷前のデジタル出版]; Keeling et al., *BMC Plant Biol.* 2011年3月7日;11:43; Martin et al., *BMC Plant Biol.* 2010年11月21日;10:226; Kumeta & Ito, *Plant Physiol.* 2010年12月;154(4):1998-2007; および Kollner & Bolland, *J Org Chem.* 2010年8月20日;75(16):5590-600に記載される。

【0258】

イソプレノイド前駆体および/またはイソプレノイドの生産増大能力がある組換え細胞

本明細書に記載される組換え微生物 (例えば、組換え細菌、真菌、または藻類細胞) は、本明細書に記載される様々な酵素経路に対する任意の操作のない同一細胞を上回る量および/または濃度で、イソプレノイド前駆体および/またはイソプレノイドを産生する能力を有する。さらに、本明細書に記載される細胞は、イソプレノイドに向かう炭素流を増大させるために遺伝子操作されておらず1つまたは複数のアセチル化タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸が欠失している同一細胞を上回る量および/または濃度で、イソプレノイド前駆体および/またはイソプレノイドを産生する能力を有し、細胞は、核酸の発現および/またはアセチル化タンパク質の活性、およびピロリン酸ポリプレニルシンターゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸が調節されるように、遺伝子操作されている。アセチル化タンパク質は、アセチルトランスフェラーゼ (YfiQ などであるが、これに限定されるものではない) および/またはデアセチラーゼ (CobB などであるが、これに限定されるものではない) であり得る。いくつかの実施形態では、YfiQ ポリペプチドの活性は、YfiQ ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を低下、

10

20

30

40

50

減衰、または欠失させることで（内在性 y f i Q 遺伝子の欠失などであるが、これに限定されるものではない）調節される。その他の実施形態では、C o b B ポリペプチドの活性は、C o b B タンパク質の活性を増大させることで（内在性 c o b B 遺伝子の発現の増大、または c o b B をコードする核酸の異種発現などであるが、これに限定されるものではない）調節される。その他の実施形態では、これらの細胞は適切な培地中で培養することは、1つまたは複数のアセチル化タンパク質を含まないイソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドを産生する細胞と比較して、改善されたイソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドの生産を提供し、前記タンパク質は、それらの活性が調節されるように遺伝子操作される。特定の態様では、これらの細胞は、全MVA経路のポリペプチドをコードする異種核酸の1つまたは複数のコピー、および／またはホスホクトラゼをコードする1つまたは複数の異種核酸ポリペプチドをさらに含んでなり得る。本明細書で開示される細胞の態様のいずれにおいても、1つまたは複数の異種核酸が宿主細胞の染色体に組み込まれ得る。その他の態様では、改善されたイソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドの生産は、イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイド比生産性の増大、イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイド力価の増大、イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイド収率の増大、細胞生存率の増大、および／または酢酸生成量の低下の1つまたは複数によって特徴付けられる。

【0259】

本発明の一態様では、1つまたは複数のアセチル化タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸、全MVA経路のポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸、および／またはホスホクトラゼをコードする1つまたは複数の異種核酸ポリペプチド、および／またはDXP経路ポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸、および／またはピロリン酸ポリプレニルシンターゼをコードする1つまたは複数の異種核酸を含んでなる、イソプレノイドおよび／またはイソプレノイド前駆体に向かう炭素流を増大させるために遺伝子操作されている細胞が提供され、前記細胞は、核酸の発現および／またはアセチル化タンパク質の活性が調節されるように遺伝子操作されている。細胞は、IDIポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸をさらに含んでなり得る。さらにポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドは、FPPシンターゼポリペプチドであり得る。1つまたは複数の異種核酸が、構成的プロモーターと作動可能に連結し得て、誘導性プロモーターと作動可能に連結し得て、または誘導性および構成的プロモーターの組み合わせと作動可能に連結し得る。1つまたは複数の異種核酸は、さらに、強力なプロモーター、弱いプロモーター、および／または中程度のプロモーターと、作動可能に連結し得る。1つまたは複数のアセチル化タンパク質をコードする異種核酸の1つまたは複数、全MVA経路のポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸、ホスホクトラゼをコードする1つまたは複数の異種核酸ポリペプチド、DXP経路ポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸、および／またはピロリン酸ポリプレニルシンターゼをコードする1つまたは複数の異種核酸は、宿主細胞のゲノムに組み込まれ得て、または細胞内で安定して発現され得て、前記タンパク質は、それらの活性が調節されるように遺伝子操作される。1つまたは複数の異種核酸が、ベクター上にさらに存在し得る。

【0260】

本明細書で提供されるのは、向上、改善、または増大されたイソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイド生産のために、上に記載されるイソプレノイドおよび／またはイソプレノイド前駆体に向かう炭素流増大のために遺伝子操作されている細胞のいずれかを使用する方法である。本明細書の用法では、「向上された」／「改善された」／「増大された」イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイド生産は、1つまたは複数のアセチル化タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸を含まない細胞と比較した、本明細書に記載される組成物および方法のいずれかによって記載される細胞による、イソプレノイド前駆体の細胞生産性指数（CPI）および／またはイソプレノイド生産の増大、イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイド力価の増大、イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイド質量収率の増大、イソプレノイド前駆体および／またはイ

10

20

30

40

50

ソプレノイド比生産性の増大、細胞生存率の増大、および／または酢酸塩生成量の低下を指し、前記細胞は、核酸の発現および／またはアセチル化タンパク質の活性が調節されるように遺伝子操作されている。イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドの生産は、約5%～約1,000,000倍向上され得る。イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドの生産は、それらの活性が調節されるように遺伝子操作されている1つまたは複数のアセチル化タンパク質の発現がない細胞によるイソプレノイドおよび／またはイソプレノイド前駆体の生産と比較して、約10%～約1,000,000倍（例えば、約1～約500,000倍、約1～約50,000倍、約1～約5,000倍、約1～約1,000倍、約1～約500倍、約5～約100,000倍、約5～約10,000倍、約5～約1,000倍、約5～約500倍、約5～約100倍、約10～約50,000倍、約50～約10,000倍、約100～約5,000倍、約200～約1,000倍、約50～約500倍、または約50～約200倍）向上され得る。

10

【0261】

イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドの生産はまた、天然細胞による、または1つまたは複数のアセチル化タンパク質の発現がなく、イソプレノイドおよび／またはイソプレノイド前駆体の生産に向かう炭素流が増大するように、遺伝子操作されていない細胞による、イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドの生産と比較して、少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1倍数、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍、200倍、500倍、1000倍、2000倍、5000倍、10,000倍、20,000倍、50,000倍、100,000倍、200,000倍、500,000倍、または1,000,000倍のいずれか向上され得て、前記タンパク質は、それらの活性が調節されるように遺伝子操作される。

20

【0262】

組換え細胞を使用してイソプレノイドおよび／またはイソプレノイド前駆物質分子を生産する方法

本明細書でまた提供されるのは、本明細書に記載される様々な酵素経路が遺伝子操作されている、および／または1つまたは複数のアセチル化タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸、全MVA経路のポリペプチド、およびピロリン酸ポリプレニルシンターゼポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を含んでなる組換え微生物（例えば、組換え体細菌、真菌、または藻類細胞）を培養するステップを含んでなる、イソプレノイド前駆体分子および／またはイソプレノイドを生産する方法であり、前記細胞は、核酸の発現および／またはアセチル化タンパク質の活性が調節されるように遺伝子操作されている。特定の実施形態では、組換え細胞は、ホスホクトラーゼポリペプチドをコードする、1つまたは複数の核酸をさらに含んでなる。イソプレノイド前駆体分子および／またはイソプレノイドは、本明細書に記載される細胞のいずれかから、本明細書に記載される方法のいずれかに従って、生産され得る。細胞のいずれでも、グルコースなどであるが、これに限定されるものではない炭水化物から、または酢酸などであるが、これに限定されるものではないその他の炭素源から、イソプレノイド前駆体分子および／またはイソプレノイドを生産する目的で使用され得る。

30

40

【0263】

したがって、本明細書で提供されるのは、(a) イソプレノイドおよび／またはイソプレノイド前駆体に向かう炭素流増大のために遺伝子操作されている細胞を培養するステップと；(b) イソプレノイド前駆体分子および／またはイソプレノイドを生産するステップとを含んでなる、イソプレノイド前駆体分子および／またはイソプレノイドを生産する方法である。その他の態様では、本明細書で提供されるのは、(a) 1つまたは複数のアセチル化タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸を含んでなる細胞（細菌、真菌、または藻類細胞など）をイソプレノイドを生産するのに適切な培地中で培養するステップと、(b) イソプレノイド前駆体分子および／またはイソプレノイドを生産するステップとを

50

【 0 2 6 4 】

【 0 2 6 5 】

本明細書で提供されるのは、イソプレノイドおよび／またはイソプレノイド前駆体分子の生産向上のために、上に記載されるイソプレノイドおよび／またはイソプレノイド前駆体に向かう炭素流が増大するように遺伝子操作されている細胞のいずれかを使用する方法である。本明細書の用法では、「向上された」イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイド生産は、1つまたは複数のアセチル化タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸を含まない細胞と比較した、本明細書に記載される組成物および方法のいずれかによって記載される細胞による、イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイド生産の細胞生産性指数（CPI）増大、イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドの力価増大、イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドの質量収率増大、イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドの比生産性増大、イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイド累積収率増大、イソプレノイド前駆体および／またはイソプレノイドの後期発酵の増大、および細胞生存率の増大、および／または酢酸生成量の低下を指し、前記細胞は、核酸の発現および／またはアセチル化タンパク質の活性が調節されるように遺伝子操作されている。イソプレノイド前駆体分子および／またはイソプレノイドの生産は、1つまたは複数のアセチル化タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸を含まない細胞によるイソプレノイド前駆体分子および／またはイソプレノイドの生産と比較して、約10%～約1,000,000倍（例えば、約1～約500,000倍、約1～約50,000倍、約1～約5,000倍、約1～約1,000倍、約1～約500倍、約1～約100倍、約1～約50倍、約5～約100,000倍、約5～約10,000倍、約5～約1,000倍、約5～約500倍、約5～約100倍、約5～約50倍、約5～約10倍、約10～約100,000倍、約10～約10,000倍、約10～約1,000倍、約10～約500倍、約10～約100倍、約10～約50倍、約10～約10倍、約100～約100,000倍、約100～約10,000倍、約100～約1,000倍、約100～約500倍、約100～約100倍、約100～約50倍、約100～約10倍、約1,000～約100,000倍、約1,000～約10,000倍、約1,000～約1,000倍、約1,000～約500倍、約1,000～約100倍、約1,000～約50倍、約1,000～約10倍、約10,000～約100,000倍、約10,000～約10,000倍、約10,000～約1,000倍、約10,000～約500倍、約10,000～約100倍、約10,000～約50倍、約10,000～約10倍、約100,000～約100,000倍、約100,000～約10,000倍、約100,000～約1,000倍、約100,000～約500倍、約100,000～約100倍、約100,000～約50倍、約100,000～約10倍、約1,000,000～約100,000倍、約1,000,000～約10,000倍、約1,000,000～約1,000倍、約1,000,000～約500倍、約1,000,000～約100倍、約1,000,000～約50倍、約1,000,000～約10倍、約10,000,000～約100,000倍、約10,000,000～約10,000倍、約10,000,000～約1,000倍、約10,000,000～約500倍、約10,000,000～約100倍、約10,000,000～約50倍、約10,000,000～約10倍、約100,000,000～約100,000倍、約100,000,000～約10,000倍、約100,000,000～約1,000倍、約100,000,000～約500倍、約100,000,000～約100倍、約100,000,000～約50倍、約100,000,000～約10倍、約1,000,000,000～約100,000倍、約1,000,000,000～約10,000倍、約1,000,000,000～約1,000倍、約1,000,000,000～約500倍、約1,000,000,000～約100倍、約1,000,000,000～約50倍、約1,000,000,000～約10倍、約10,000,000,000～約100,000倍、約10,000,000,000～約10,000倍、約10,000,000,000～約1,000倍、約10,000,000,000～約500倍、約10,000,000,000～約100倍、約10,000,000,000～約50倍、約10,000,000,000～約10倍、約100,000,000,000～約100,000倍、約100,000,000,000～約10,000倍、約100,000,000,000～約1,000倍、約100,000,000,000～約500倍、約100,000,000,000～約100倍、約100,000,000,000～約50倍、約100,000,000,000～約10倍、約1,000,000,000,000～約100,000倍、約1,000,000,000,000～約10,000倍、約1,000,000,000,000～約1,000倍、約1,000,000,000,000～約500倍、約1,000,000,000,000～約100倍、約1,000,000,000,000～約50倍、約1,000,000,000,000～約10倍、約10,000,000,000,000～約100,000倍、約10,000,000,000,000～約10,000倍、約10,000,000,000,000～約1,000倍、約10,000,000,000,000～約500倍、約10,000,000,000,000～約100倍、約10,000,000,000,000～約50倍、約10,000,000,000,000～約10倍、約100,000,000,000,000～約100,000倍、約100,000,000,000,000～約10,000倍、約100,000,000,000,000～約1,000倍、約100,000,000,000,000～約500倍、約100,000,000,000,000～約100倍、約100,000,000,000,000～約50倍、約100,000,000,000,000～約10倍、約1,000,000,000,000,000～約100,000倍、約1,000,000,000,000,000～約10,000倍、約1,000,000,000,000,000～約1,000倍、約1,000,000,000,000,000～約500倍、約1,000,000,000,000,000～約100倍、約1,000,000,000,000,000～約50倍、約1,000,000,000,000,000～約10倍、約10,000,000,000,000,000～約100,000倍、約10,000,000,000,000,000～約10,000倍、約10,000,000,000,000,000～約1,000倍、約10,000,000,000,000,000～約500倍、約10,000,000,000,000,000～約100倍、約10,000,000,000,000,000～約50倍、約10,000,000,000,000,000～約10倍、約100,000,000,000,000,000～約100,000倍、約100,000,000,000,000,000～約10,000倍、約100,000,000,000,000,000～約1,000倍、約100,000,000,000,000,000～約500倍、約100,000,000,000,000,000～約100倍、約100,000,000,000,000,000～約50倍、約100,000,000,000,000,000～約10倍、約1,000,000,000,000,000,000～約100,000倍、約1,000,000,000,000,000,000～約10,000倍、約1,000,000,000,000,000,000～約1,000倍、約1,000,000,000,000,000,000～約500倍、約1,000,000,000,000,000,000～約100倍、約1,000,000,000,000,000,000～約50倍、約1,000,000,000,000,000,000～約10倍、約10,000,000,000,000,000,000～約100,000倍、約10,000,000,000,000,000,000～約10,000倍、約10,000,000,000,000,000,000～約1,000倍、約10,000,000,000,000,000,000～約500倍、約10,000,000,000,000,000,000～約100倍、約10,000,000,000,000,000,000～約50倍、約10,000,000,000,000,000,000～約10倍、約100,000,000,000,000,000,000～約100,000倍、約100,000,000,000,000,000,000～約10,000倍、約100,000,000,000,000,000,000～約1,000倍、約100,000,000,000,000,000,000～約500倍、約100,000,000,000,000,000,000～約100倍、約100,000,000,000,000,000,000～約50倍、約100,000,000,000,000,000,000～約10倍、約1,000,000,000,000,000,000,000～約100,000倍、約1,000,000,000,000,000,000,000～約10,000倍、約1,000,000,000,000,000,000,000～約1,000倍、約1,000,000,000,000,000,000,000～約500倍、約1,000,000,000,000,000,000,000～約100倍、約1,000,000,000,00

000倍、約5～約1,000倍、約5～約500倍、約5～約100倍、約10～約50,000倍、約50～約10,000倍、約100～約5,000倍、約200～約1,000倍、約50～約500倍、または約50～約200倍)向上され得て、前記細胞は、核酸の発現および/またはアセチル化タンパク質の活性が調節されるように遺伝子操作されている。例示の一実施形態では、イソプレノイド前駆体分子および/またはイソプレノイドの生産は、約5%～約1,000,000倍増大され得る。

【0266】

イソプレノイド前駆体分子および/またはイソプレノイドの生産はまた、1つまたは複数のアセチル化タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸を含まない細胞によるイソプレノイド前駆体分子および/またはイソプレノイドの生産と比較して、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1倍数、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍、200倍、500倍、1000倍、2000倍、5000倍、10,000倍、20,000倍、50,000倍、100,000倍、200,000倍、500,000倍、または1,000,000倍のいずれか向上され得て、前記細胞は、核酸の発現および/またはアセチル化タンパク質の活性が調節されるように遺伝子操作されている。

【0267】

メバロン酸、イソプレン、イソプレノイド、イソプレノイド前駆体、およびアセチルCoA由来産物の生産改善のための追加的な酵素経路調節

本発明のいくつかの態様では、本明細書に記載される方法または組成物のいずれかに記載される組換え細胞は、1つまたは複数のタンパク質をコードする1つまたは複数の核酸をさらに含んでなり、細胞は、核酸の活性および/またはタンパク質の発現が調節されるように修飾されている。細胞代謝中の炭素利用に関与する追加的な遺伝子の調節、またはアセチルCoAの利用可能な細胞内供給に関与するとされるものもまた調節されて、メバロン酸、イソプレン、イソプレノイド前駆体、および/またはイソプレノイドの生産が改善されてもよい。これらのとしては、ホスホフルクトキナーゼが関与する経路の調節、ホスホケトラーゼに関与する経路の調節、ペントースリン酸経路酵の調節素、酢酸生産と酢酸循環とアセチルCoA生産に関与する酵素の調節、エントナー・ドウドロフ経路が関与する経路の調節、ペントースリン酸経路の酸化分岐が関与する経路の調節などが挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0268】

ホスホケトラーゼポリペプチドをコードする核酸

本発明のいくつかの態様では、本明細書に記載される方法または組成物のいずれかに記載される組換え細胞は、ホスホケトラーゼポリペプチドまたはホスホケトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸をさらに含んでなり得る。いくつかの態様では、ホスホケトラーゼポリペプチドは、異種ポリペプチドである。いくつかの態様では、ホスホケトラーゼポリペプチドをコードする異種核酸は、構成的プロモーターと作動可能に連結する。いくつかの態様では、ホスホケトラーゼポリペプチドをコードする異種核酸は、誘導性プロモーターと作動可能に連結する。いくつかの態様では、ホスホケトラーゼポリペプチドをコードする異種核酸は、強力なプロモーターと作動可能に連結する。いくつかの態様では、ホスホケトラーゼポリペプチドをコードする2つ以上の異種核酸(例えば、ホスホケトラーゼポリペプチドをコードする異種核酸の2、3、4つ以上のコピー)が使用される。いくつかの態様では、ホスホケトラーゼポリペプチドをコードする異種核酸は、弱いプロモーターと作動可能に連結する。特定の態様では、細胞は、野生型細胞と比較して、内在性ホスホケトラーゼポリペプチドを過剰発現するように遺伝子操作される。

【0269】

ホスホケトラーゼ酵素は、キシロロース-5-リン酸からグリセルアルデヒド-3-リン酸およびアセチルリン酸への変換、および/またはフルクトース-6-リン酸からエリスロース-4-リン酸およびアセチルリン酸への変換を触媒する。特定の実施形態では、

ホスホケトララーゼ酵素は、キシロースー5ーリン酸からグリセルアルデヒドー3ーリン酸およびアセチルリン酸への変換を触媒できる。その他の実施形態では、ホスホケトララーゼ酵素は、フルクトースー6ーリン酸からエリスロースー4ーリン酸およびアセチルリン酸への変換を触媒できる。したがって、理論により拘束されることなく、本明細書に記載されるホスホケトララーゼの発現は、炭水化物源から生成されるアセチルリン酸量の増大をもたらす得る。このアセチルリン酸はアセチルC o Aに変換され得て、それは次に、MV A経路の酵素機能によって使用されて、メバロン酸、イソプレノイド前駆体分子、イソプレノおよび／またはイソプレノイドが生産され得る。したがって炭水化物基質から生成されるこれらの化合物の量が、増大されてもよい。代案としては、増大をより高い細胞内濃度に反映させることなく、アセチルPおよびA c C o Aの生成が増大され得る。特定の

10

【0270】

例示的なホスホケトララーゼ核酸としては、ホスホケトララーゼポリペプチドの少なくとも1つの活性を有する、ポリペプチド、ポリペプチド断片、ペプチド、または融合ポリペプチドをコードする核酸が挙げられる。例示的なホスホケトララーゼポリペプチドおよび核酸としては、本明細書に記載される起源生物のいずれかからの天然ポリペプチドおよび核酸、ならびに本明細書に記載される起源生物のいずれかに由来する変異ポリペプチドおよび核酸が挙げられる。

【0271】

20

標準法を使用して、ペプチドが、Dーフルクトースー6ーリン酸またはDーキシロースー5ーリン酸をアセチルPに変換する能力を測定することで、ポリペプチドが、ホスホケトララーゼペプチド活性を有するかどうかを判定し得る。次にアセチルPは、分光光度法で検出し得るフェリルアセチルヒドロキサム酸に変換され得る (Meile et al., J. Bact. 183:2929-2936, 2001)。本明細書に記載されるようなホスホケトララーゼペプチド活性を有すると同定された任意のポリペプチドは、本発明で使用するのに適する。

【0272】

その他の態様では、代表的ホスホケトララーゼ核酸としては、例えば、ラクトバチルス・ロイテリー (*Lactobacillus reuteri*)、ビフィドバクテリウム・ロングム (*Bifidobacterium longum*)、フェリモナス・バレアリカ (*Ferrimonas balearica*)、ペドバクター・サルタンス (*Pedobactor saltans*)、ストレプトミセス・グリセウス (*Streptomyces griseus*)、マイコプラズマ・ホミニス (*Mycoplasma hominis*)、および／またはノカルジオプシス・ダッソンビレイ (*Nocardioopsis dassonvillei*) から単離された、ホスホケトララーゼが挙げられる。本明細書で使用され得るホスホケトララーゼ酵素の追加的な例は、参照により本明細書に援用される、米国特許第7,785,858号明細書に記載される。

30

【0273】

エントナー・ドウドロフ経路が関与する経路

40

エントナー・ドウドロフ (ED) 経路は、エンデン・メイヤーホフ・パルナス (EMPー解糖) 経路の代替物である。大腸菌 (*E. coli*) のようないくつかの生物がEDおよびEMP経路の双方を持つ一方で、その他の生物はそのどちらか一方のみを有する。バチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*) がEMP経路のみを有するのに対し、ザイモモナス・モビリス (*Zymomonas mobilis*) はED経路のみを有する (Peekhaus and Conway. 1998. J. Bact. 180:3495-3502; Stulke and Hillen. 2000. Annu. Rev. Microbiol. 54, 849-880; Dawes et al. 1966. Biochem. J. 98:795-803)。

【0274】

50

ホスホグルコン酸デヒドラターゼ (edd) が、6-ホスホ-D-グルコン酸塩から1分子のH₂Oを除去して、2-デヒドロ-3-デオキシ-D-グルコン酸塩6-リン酸を形成するのに対し、2-ケト-3-デオキシグルコン酸6-リン酸アルドラーゼ (eda) は、アルドール切断を触媒する (Egan et al. 1992. J. Bact. 174: 4638-4646)。2つの遺伝子は、オペロン中にある。

【0275】

ホスホケトララーゼ経路に向けられ得る代謝産物はまた、ED経路にも転用され得る。代謝産物が、ED経路に失われるのを回避するために、ホスホグルコン酸デヒドラターゼ遺伝子 (例えば、内在性ホスホグルコン酸デヒドラターゼ遺伝子) および/または2-ケト-3-デオキシグルコン酸6-リン酸アルドラーゼ遺伝子 (例えば、内在性2-ケト-3-デオキシグルコン酸6-リン酸アルドラーゼ遺伝子) 活性が弱力化される。弱力化を達成する一方法は、ホスホグルコン酸デヒドラターゼ (edd) および/または2-ケト-3-デオキシグルコン酸6-リン酸アルドラーゼ (eda) を欠失させることである。これはクロラムフェニコールまたはカナマイシンカセットによって片方または双方の遺伝子を置換し、それに続いてカセットをループアウトすることで達成し得る。これらの酵素機能がなければ、ホスホケトララーゼ酵素を通じてより多くの炭素が流動し、ひいてはメバロン酸、イソプレネン、イソプレノイド前駆体分子、イソプレノイド、および/またはアセチルCoA由来産物の収率が増大する。

【0276】

ホスホグルコン酸デヒドラターゼ (edd) および/または2-ケト-3-デオキシグルコン酸6-リン酸アルドラーゼ (eda) の活性はまた、酵素のその他の分子操作によって低下させ得る。酵素活性の低下は、いかなる操作も実施しなかった場合と比較した、比活性または全活性の任意の量の低下であり得る。場合によっては、酵素活性の低下は、少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%低下される。

【0277】

場合によっては、内在性ホスホグルコン酸デヒドラターゼ遺伝子および/または内在性2-ケト-3-デオキシグルコン酸6-リン酸アルドラーゼ遺伝子の活性の弱力化は、弱力化された内在性ホスホグルコン酸デヒドラターゼ遺伝子および/または内在性酢酸キナーゼ-2-ケト-3-デオキシグルコン酸6-リン酸アルドラーゼ遺伝子発現を有しない細胞と比較して、メバロン酸依存性生合成経路へのより多くの炭素流をもたらす。

【0278】

ペントースリン酸経路の酸化分岐が関与する経路

大腸菌 (E. coli) は、ペントースリン酸経路を使用してヘキソースとペントースを分解し、細胞様々な同化経路のための中間体を提供する。それはまた、NADPHの主な産生者でもある。ペントースリン酸経路は、酸化分岐 (グルコース6-リン酸-1-デヒドロゲナーゼ (zwf)、6-ホスホグルコノラクトナーゼ (pgl) または6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ (gnd) のような酵素がある)、および非酸化分岐 (トランスケトララーゼ (tktA)、トランスアルドラーゼ (talAまたはtalB)、リブローズ-5-リン酸-エピメラーゼおよび (または) リボース-5-リン酸エピメラーゼなどの酵素がある) から構成される (Sprenger. 1995. Arch. Microbiol. 164: 324-330)。

【0279】

ホスホケトララーゼ酵素に向けて炭素を誘導するために、ペントースリン酸経路の非酸化分岐 (トランスケトララーゼ、トランスアルドラーゼ、リブローズ-5-リン酸-エピメラーゼおよび (または) リボース-5-リン酸エピメラーゼのタンパク質の発現および/または活性を調節し (例えば、酵素活性を増大させ)、フルクトース6-リン酸およびキシルロース5-リン酸に向けてより多くの炭素が流動するようにし得て、それによって、メ

10

20

30

40

50

バロン酸、イソプレン、イソプレノイド前駆体分子、イソプレノイド、および／またはアセチルC o A由来産物の最終生成量を増大させる。トランスケトララーゼ、トランスアルドラーゼ、リブロースー5ーリン酸ーエピメラーゼおよび（または）リボースー5ーリン酸エピメラーゼ活性の増大は、いかなる操作も実施しなかった場合と比較した、比活性または全活性の任意の量の増大であり得る。場合によっては、酵素活性は、少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%増大する。いくつかの態様では、トランスケトララーゼ、トランスアルドラーゼ、リブロースー5ーリン酸ーエピメラーゼおよび（または）リボースー5ーリン酸エピメラーゼの活性は、内在性トランスケトララーゼ、トランスアルドラーゼ、リブロースー5ーリン酸ーエピメラーゼ、および（または）リボースー5ーリン酸エピメラーゼの活性を増大させることで、調節される。これは合成構成的高発現性プロモーターによって、内在性トランスケトララーゼ、トランスアルドラーゼ、リブロースー5ーリン酸ーエピメラーゼおよび（または）リボースー5ーリン酸エピメラーゼ遺伝子プロモーターを置換することで達成し得る。トランスケトララーゼ、トランスアルドラーゼ、リブロースー5ーリン酸ーエピメラーゼおよび（または）リボースー5ーリン酸エピメラーゼをコードする遺伝子はまた、適切なプロモーターの後のプラスミド上にクローン化し得る。トランスケトララーゼ、トランスアルドラーゼ、リブロースー5ーリン酸ーエピメラーゼおよび（または）リボースー5ーリン酸エピメラーゼの活性の増大は、トランスケトララーゼ、トランスアルドラーゼ、リブロースー5ーリン酸ーエピメラーゼおよび（または）リボースー5ーリン酸エピメラーゼの発現増大を有しない細胞と比較して、メバロン酸依存性生合成経路へのより多くの炭素流をもたらし得る。

【0280】

ホスホフルクトキナーゼが関与する経路

ホスホフルクトキナーゼは、フルクトースー6ーリン酸のリン酸化を触媒する、解糖の重要な酵素である。大腸菌（*E. coli*）は、*pfkA*および*pfkB*によってコードされる2つのイソ酵素を有する。細胞内のホスホフルクトキナーゼ活性の大部分は、*pfkA*に起因する（K o t l a r z et al. 1975 *Biochim. Biophys. Acta* 381:257-268）。

【0281】

ホスホケトララーゼ酵素に向けて炭素を誘導するために、ホスホフルクトキナーゼ発現を調節して（例えば、酵素活性を低下させて）、フルクトースー6ーリン酸およびキシルロースー5ーリン酸に向けてより多くの炭素が流動するようにし得て、それによってメバロン酸、イソプレン、イソプレノイド前駆体分子、およびイソプレノイド、および／またはアセチルC o A由来産物の最終生産量を増大させる。ホスホフルクトキナーゼ活性の低下は、いかなる操作も実施しなかった場合と比較した、比活性または全活性の任意の量の低下であり得る。場合によっては、酵素活性の低下は、少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%低下される。いくつかの態様では、ホスホフルクトキナーゼの活性は、内在性ホスホフルクトキナーゼの活性を低下させることで調節される。これは合成構成的低発現性プロモーターによって、内在性ホスホフルクトキナーゼ遺伝子プロモーターを置換することで、達成し得る。ホスホフルクトキナーゼの活性の低下は、ホスホフルクトキナーゼの発現低下を有しない細胞と比較して、メバロン酸依存性生合成経路へのより多量の炭素流をもたらし得る。

【0282】

酢酸生産、酢酸循環させる、およびアセチルC o A生産に関与する遺伝子の調節

有用な工業的発酵産物を生産するために、微生物（大腸菌（*E. coli*）および酵母など）が、高細胞密度発酵のための宿主株として広範に使用されている。グルコースは、

相対的に安価で容易に利用可能な炭素およびエネルギー源であることから、宿主細胞の高密度増殖のためならびに異種発現される組換え遺伝子の発現のための増殖培地に、かなりの量のグルコースが添加される。高細胞密度発酵中に起こり得る大きな1つの問題は、酢酸が最も優勢である発酵性酸性副産物の生産であり、それは細胞増殖および生産における限界の主要因になり得る (Han et al., Biotechnol. Bioeng., 39, 663 (1992); Luli et al., Appl. Environ. Microbiol., 56, 1004 (1990))。

【0283】

本明細書で提供される実施形態では、酢酸循環タンパク質、酢酸生産タンパク質、またはアセチルCoA生産関連タンパク質としてはホスホトランスアセチラーゼ (Pta)、酢酸キナーゼ (AckA)、AMP形成アセチル補酵素Aシンセターゼ (Acs)、および酢酸輸送体/酢酸ポンプ/ (actP) が挙げられるが、これに限定されるものではない。本明細書に記載される実施形態のいずれか1つの中では、これらのタンパク質をコードする1つまたは複数の遺伝子に対する変異は、発現を増大または低下/減衰/欠失させ、またはこれらのタンパク質の活性に対する変化は、単独で、または組み合わせのどちらかで起こり得て、メバロン酸、イソプレン、イソプレノイド、イソプレノイド前駆体、および/またはアセチルCoA由来産物の生産をさらに促進する。これらの酢酸循環タンパク質の発現および/または活性に対する変化は、単独で、または(上述されるようなYfiQおよび/またはCobBなどであるが、これに限定されるものではない) 1つまたは複数のアセチル化タンパク質活性の調節との組み合わせで起こりえる。いくつかの実施形態では、アセチルトランスフェラーゼの活性は、1つまたは複数の酢酸循環遺伝子/タンパク質の調節と並んで、アセチルトランスフェラーゼポリペプチドまたはアセチルトランスフェラーゼ遺伝子の発現の欠失または減衰によって調節される。例示的な実施形態では、YfiQの活性は、YfiQポリペプチドまたはyfiQ遺伝子の発現の欠失または減衰によって調節される。その他の実施形態では、デアセチラーゼの活性は、1つまたは複数の酢酸循環遺伝子/タンパク質の調節と並んで、デアセチラーゼポリペプチドまたはデアセチラーゼ遺伝子の発現または活性を増大させることで調節される。例示的な実施形態では、CobBの活性は、CobBポリペプチドまたはcobB遺伝子の発現または活性を増大させることで調節される。

【0284】

好気条件下の微生物におけるグルコース代謝では、クレブス回路(TCA回路)を超える炭素流動は、酢酸/酢酸塩に変換されて、それは究極的に細胞外に排出される (Majewski & Domach, Biotechnol. Bioeng., 35, 732 (1990))。排出された酢酸/酢酸塩は、宿主株の増殖と所望の発酵産物の生産を阻害し得る。

【0285】

ホスホトランスアセチラーゼ (Pta) (Shimizu et al., 1969, Biochim. Biophys. Acta 191: 550-558) は、アセチルCoAとアセチルリン酸の間の可逆的変換を触媒する(本明細書で、同義的にアセチルリン酸、アセチルリン酸、アセチル-P、またはAc-Pと称される) 一方で、酢酸キナーゼ (AckA) (Kakuda, H. et al., 1994, J. Biochem. 111: 916-922) は、アセチルリン酸を利用して酢酸を形成する。これらのタンパク質をコードする遺伝子は、大腸菌 (E. coli) 中でオペロンとして転写され得る。これらは一緒に、ATPの放出と共に、酢酸の異化を触媒する。したがって、当業者は、ホスホトランスアセチラーゼ遺伝子(例えば、内在性ホスホトランスアセチラーゼ遺伝子)および/または酢酸キナーゼ遺伝子(例えば、内在性酢酸キナーゼ遺伝子)の活性を調節することで、利用可能なアセチルCoAの量を増大させ得る。例えば、このような調節は、ホスホトランスアセチラーゼ遺伝子の発現を増大させることで達成され得る。このような調節はまた、酢酸キナーゼ遺伝子の発現を増大させることで達成され得る。特定の実施形態では、調節は、ホスホトランスアセチラーゼおよび酢酸キナーゼ遺伝子の双方の発現を改変

することで達成され得る。調節はまた、ホスホトランスアセチラーゼ遺伝子および／または酢酸キナーゼ遺伝子の発現を低下、減衰、または欠失させることで得られ得る。減衰を達成する一方法は、ホスホトランスアセチラーゼ (p t a) および／または酢酸キナーゼ (a c k A) 遺伝子を欠失させることである。これはクロラムフェニコールカセットによって片方または双方の遺伝子を置換し、それに続いてカセットをループアウトすることで達成され得る。理論により拘束されることなく、これらの遺伝子を欠失させることは、より多くの炭素をメバロン酸経路に転用し、酢酸の生産から離すことで、メバロン酸、イソプレノイドまたはイソプレノイドの収率を増大させ得る。

【0286】

代案としては、理論により拘束されることなく、a c k A の発現または活性を増大させることは、アセチルC o A を合成するのに使用される酢酸の生産を増大させ得る。

10

【0287】

代案としては、理論により拘束されることなく、p t a の発現または活性を増大させることは、アセチルC o A の生産を増大させ得る。

【0288】

さらに、p t a および／またはa c k A 遺伝子の発現の調節は、(上述されるようなY f i Q および／またはC o b B などであるが、これに限定されるものではない) 1 つまたは複数のアセチル化タンパク質の活性の調節との組み合わせで実施され得る。いくつかの実施形態では、アセチルトランスフェラーゼの活性は、アセチルトランスフェラーゼポリペプチドまたはアセチルトランスフェラーゼ遺伝子の発現を欠失または減衰させることで、調節される。例示的な実施形態では、Y f i Q の活性は、Y f i Q ポリペプチドまたはy f i Q 遺伝子の発現の欠失または減衰によって調節される。その他の実施形態では、デアセチラーゼの活性は、デアセチラーゼポリペプチドまたはデアセチラーゼ遺伝子の発現または活性を増大させることで調節される。例示的な実施形態では、C o b B の活性は、C o b B ポリペプチドまたはc o b B 遺伝子の発現または活性を増大させることで調節される。

20

【0289】

微生物における酢酸生産および酢酸循環に関与する別のタンパク質は、AMP 形成アセチル補酵素A シンセターゼ (A c s) であり、これは、酢酸から、中央代謝のキーストーン分子である高エネルギー中間体アセチルC o A への変換に関与する遍在性酵素である (C e r e z o e t a l. , 2011, M o l e c. M i c r o b. , 82 (5) : 1110-28)。理論に束縛されることなく、A c s の発現を増大させるように遺伝子操作される細胞は、より大量のアセチルC o A を産生することが予期され得る。追加的な、A c s は、アセチルトランスフェラーゼおよびデアセチラーゼの基質である。単なる例として、C o b B のデアセチラーゼの活性は、生体外においてA c s 上で実証されている (Z h a o e t a l. , 2004, J. M o l. B i o l. , 337 : 731-41)。理論に束縛されることなく、A c s のアセチル化はその酵素的不活性化をもたらし得るので、A c s アセチル化の量を低下させるように遺伝子操作された細胞は、より大量のアセチルC o A を産生することが予期され得る。さらに、A c s 遺伝子の発現の調節は、(上述されるようなY f i Q および／またはC o b B などであるが、これに限定されるものではない) 1 つまたは複数のアセチル化タンパク質の活性の調節との組み合わせで実施し得る。いくつかの実施形態では、アセチルトランスフェラーゼの活性は、アセチルトランスフェラーゼポリペプチドまたはアセチルトランスフェラーゼ遺伝子の発現を欠失または減衰させることで、調節される。例示的な実施形態では、Y f i Q の活性は、Y f i Q ポリペプチドまたはy f i Q 遺伝子の発現の欠失または減衰によって調節される。その他の実施形態では、デアセチラーゼの活性は、デアセチラーゼポリペプチドまたはデアセチラーゼ遺伝子の発現または活性を増大させることで調節される。例示的な実施形態では、C o b B の活性は、C o b B ポリペプチドまたはc o b B 遺伝子の発現または活性を増大させることで調節される。

30

40

【0290】

50

微生物における酢酸生産および酢酸取り扱いに關与する別のタンパク質は、酢酸輸送体／酢酸ポンプ（a c t P）である。a c t P活性は、低下または減衰させて、膜を越える酢酸輸送を最小化させ得る。理論に束縛されることなく、酢酸生産が膜を越える輸送に連動すれば、これは、プロトン勾配の脱共役のために、エネルギー損失をもたらし得ると考えられる。いくつかの態様では、a c t Pの活性低下またはa c t Pの欠如を使用して、メバロン酸、イソプレン、イソプレノイド前駆体、およびイソプレノイドの生産が改善され得る。染色体への組み込みまたはプラスミドなどの染色体外ビヒクルを使用して、修飾a c t P遺伝子が導入されてもよい。なおも別の態様では、a c t Pを発現する細胞（例えば、様々な大腸菌（E. c o l i）株などの微生物）のゲノムからa c t Pが欠失して、メバロン酸および／またはイソプレンの生産が改善されてもよい。別の態様では、a c t Pポリペプチドをコードする異種核酸は、内在性にa c t Pを発現しない細胞内で発現され得る。さらに、a c t P遺伝子の発現の調節は、（上述されるようなY f i Qおよび／またはC o b Bなどであるが、これに限定されるものではない）1つまたは複数のアセチル化タンパク質の活性の調節との組み合わせで実施し得る。いくつかの実施形態では、アセチルトランスフェラーゼの活性は、アセチルトランスフェラーゼポリペプチドまたはアセチルトランスフェラーゼ遺伝子の発現を欠失または減衰させることで、調節される。例示的な実施形態では、Y f i Qの活性は、Y f i Qポリペプチドまたはy f i Q遺伝子の発現の欠失または減衰によって調節される。その他の実施形態では、デアセチラーゼの活性は、デアセチラーゼポリペプチドまたはデアセチラーゼ遺伝子の発現または活性を増大させることで調節される。例示的な実施形態では、C o b Bの活性は、C o b Bポリペプチドまたはc o b B遺伝子の発現または活性を増大させることで調節される。

【0291】

いくつかの態様では、a c t P、a c k A、および／またはp t aの欠失または減衰は、a c t P、a c k A、および／またはp t aを発現する微生物と比較して、包括的に、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%のいずれか、これらの百分率の間の任意の価などのより高いイソプレン収率をもたらす。その他の態様では、a c t P、a c k A、またはp t aの欠失は、a c t P、a c k A、および／またはp t aを発現する微生物と比較して、これらの百分率の間の任意の価を含めて、包括的に約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%のいずれかのより高い瞬間イソプレン収率をもたらす。その他の態様では、a c t P、a c k A、および／またはp t aの欠失は、a c t P、a c k A、および／またはp t aを発現する微生物と比較して、これらの百分率の間の任意の価を含めて、包括的に約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%のいずれかのより高いイソプレンの細胞生産性指数をもたらす。その他の態様では、a c t P、a c k A、および／またはp t aの欠失は、a c t P、a c k A、および／またはp t aを発現する微生物と比較して、これらの百分率の間の任意の価を含めて、包括的に約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%のいずれかのより高いイソプレンの容積生産性をもたらす。その他の態様では、a c t P、a c k A、および／またはp t aの欠失は、a c t P、a c k A、および／またはp t aを発現する微生物と比較して、これらの百分率の間の任意の価を含めて、包括的に約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%のいずれかのより高いイソプレンのピーク比生産性をもたらす。いくつかの態様では、a c t P、a c k A、および／またはp t aの欠失は、a c t P、a c k A、および／またはp t aを発現する微生物と比較して、より長時間維持されるピーク比生産性をもたらす。

【0292】

いくつかの態様では、組換え微生物は、減衰した内在性ホストランスアセチラーゼ遺伝子および／または内在性酢酸キナーゼ遺伝子発現を有しない微生物と比較して、低下した量の酢酸を産生する。酢酸の産生量の低下は、当業者に公知の日常的アッセイによって測定され得る。酢酸の量は、分子操作が実施されない場合と比較して、少なくとも約1%

、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%低下する。

【0293】

act P、ack A、および／またはptaの活性はまた、酵素のその他の分子操作によって低下され得る。酵素活性の低下は、いかなる操作も実施しなかった場合と比較した、比活性または全活性の任意の量の低下であり得る。場合によっては、酵素活性の低下は、少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%低下される。

10

【0294】

場合によっては、内在性ホスホトランスアセチラーゼ遺伝子および／または内在性酢酸キナーゼ遺伝子の活性の減衰は、内在性ホスホトランスアセチラーゼ遺伝子および／または内在性酢酸キナーゼ遺伝子発現の減衰を有しない微生物と比較して、メバロン酸依存性生合成経路に向かうより多くの炭素流をもたらす。

【0295】

いくつかの実施形態では、AMP形成アセチル補酵素Aシンセターゼ(Acs)、ホスホトランスアセチラーゼ(pta)および／または酢酸キナーゼ(ack A)の活性が増大され得る。これらの酵素活性の増大は、いかなる操作も実施しなかった場合と比較した、比活性または全活性の任意の量の増大であり得る。場合によっては、酵素活性は、少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%増大する。

20

【0296】

クエン酸シンターゼ経路

クエン酸シンターゼは、オキサロ酢酸とアセチルCoAの縮合を触媒して、トリカルボン酸(TCA)回路の代謝産物である、クエン酸を形成する(Ner, S. et al. 1983. Biochemistry, 22:5243-5249; Bhayana, V. and Duckworth, H. 1984. Biochemistry 23:2900-2905)。大腸菌(E. coli)内では、gltaによってコードされるこの酵素は、二量体サブユニットの三量体のように挙動する。六量体形態は、酵素が、NADHによってアロステリックに調節され得るようにする。この酵素は、幅広く試験されている(Wiegand, G., and Remington, S. 1986. Annual Rev. Biophysics Biophys. Chem. 15:97-117; Duckworth et al. 1987. Biochem Soc Symp. 54:83-92; Stockell, D. et al. 2003. J. Biol. Chem. 278:35435-43; Maurus, R. et al. 2003. Biochemistry. 42:5555-5565)。NADHによるアロステリックな阻害を回避するために、バチルス・サブチリス(Bacillus subtilis) NADH非感受性クエン酸シンターゼによる置換またはその添加が考察された(Underwood et al. 2002. Appl. Environ. Microbiol. 68:1071-1081; Sanchez et al. 2005. Met. Eng. 7:229-239)。

30

40

【0297】

どちらも基質としてアセチルCoAを有するために、クエン酸シンターゼによって触媒される反応は、メバロン酸経路の最初のステップを触媒するチオラーゼと直接競合する(Hedl et al. 2002. J. Bact. 184:2116-2122)。したがって、当業者は、クエン酸シンターゼ発現を調節して(例えば、酵素活性を低下させる

50

）、より多くの炭素をメバロン酸経路に流動させて、それによってメバロン酸、イソプレ
ン、およびイソプレノイドの最終生成量を増大させる。クエン酸シンターゼ活性の低下は
、いかなる操作も実施しなかった場合と比較した、比活性または全活性の任意の量の低下
であり得る。場合によっては、酵素活性の低下は、少なくとも約1%、2%、3%、4%
、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、
40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、
90%、95%、96%、97%、98%、または99%低下される。いくつかの態様で
は、クエン酸シンターゼの活性は、内在性クエン酸シンターゼ遺伝子の活性を低下させる
ことで調節される。これは、NADH非感受性クエン酸シンターゼをコードする導入遺伝
子による、内在性クエン酸シンターゼ遺伝子の染色体置換によって、またはバチルス・サ
ブチリス (*Bacillus subtilis*) に由来する、NADH非感受性クエン
酸シンターゼをコードする導入遺伝子を使用することで、達成され得る。クエン酸シン
ターゼの活性はまた、合成構成的低発現性プロモーターによって内在性クエン酸シンター
ゼ遺伝子プロモーターを置換することで、調節され得る（例えば、低下させる）。クエン
酸シンターゼの活性の低下は、クエン酸シンターゼの発現低下を有しない微生物と比較し
て、メバロン酸依存性生合成経路へのより多量の炭素流をもたらし得る。

10

【0298】

乳酸デヒドロゲナーゼが関与する経路

大腸菌 (*E. coli*) 内では、D乳酸は、酵素乳酸デヒドロゲナーゼ (*ldhA*) を
通じて、ピルビン酸から生成される (Bunch, P. et al. 1997. *Micr*
obiol. 143:187-195)。乳酸の生成はNADHの酸化を伴い、したがっ
て酸素が制限されており、全ての還元当量に対応し得ない場合に、乳酸が生成する。した
がって、乳酸の生成は、炭素消費の原因になり得る。したがって、メバロン酸生成（およ
び所望ならば、イソプレン、イソプレノイド前駆体、およびイソプレノイド生成）への炭
素流動を改善するために、当業者は、酵素の活性を低下させることなどによって、乳酸デ
ヒドロゲナーゼの活性を調節し得る。

20

【0299】

したがって、一態様では、乳酸デヒドロゲナーゼの活性は、内在性乳酸デヒドロゲナ
ーゼ遺伝子の活性の減衰によって調節され得る。このような減衰は、内在性乳酸デヒドロ
ゲナーゼ遺伝子の欠失によって達成され得る。当業者に知られている乳酸デヒドロゲナ
ーゼ遺伝子の活性を減衰させるその他の方法もまた、使用してもよい。

30

【0300】

乳酸デヒドロゲナーゼが関与する経路を操作することで、組換え微生物は、内在性乳酸
デヒドロゲナーゼ遺伝子発現の減衰を有しない微生物と比較して、低下した量の乳酸を産
生する。乳酸の産生量の低下は、当業者に公知の日常的アッセイによって測定され得る。
乳酸の量は、分子操作が実施されない場合と比較して、少なくとも約1%、2%、3%、
4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35
%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85
%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%低下する。

40

【0301】

乳酸デヒドロゲナーゼの活性はまた、酵素のその他の分子遺伝子操作によって低下され
得る。酵素活性の低下は、いかなる操作も実施しなかった場合と比較した、比活性または
全活性の任意の量の低下であり得る。場合によっては、酵素活性の低下は、少なくとも約
1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、2
5%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、7
5%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%低下さ
れる。

【0302】

したがって、場合によっては、内在性乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の活性の減衰は、内
在性乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子発現の減衰を有しない微生物と比較して、メバロン酸依

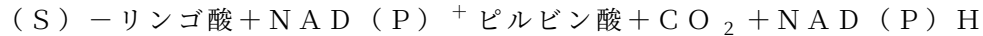
50

存性生合成経路へのより多くの炭素流をもたらす。

【0303】

リンゴ酸酵素が関与する経路

リンゴ酸酵素（大腸菌（*E. coli*）内、*sfcA*および*maeB*遺伝子によってコードされる）は、以下の式によって（ NAD^+ または NADP^+ を使用して）、リンゴ酸塩からピルビン酸への変換を触媒するアナプレロティック酵素である。



【0304】

したがって、この酵素の2つの基質は、（*S*）-リンゴ酸および NAD(P)^+ である一方で、その3つの生成物は、ピルビン酸、 CO_2 、および NADPH である。

10

【0305】

NADP 依存性リンゴ酸酵素（*MaeB*）の発現（*Iwikura, M. et al. 1979. J. Biochem. 85:1355-1365*）は、1）炭素をTCA回路から、アセチルCoAの直接前駆体であるピルビン酸（それ自体がメバロン酸経路の直接前駆体である）に戻すこと、そして2） HMG-CoA 還元酵素反応で使用され得る追加的な NADPH を生成することによって、メバロン酸、イソプレン、イソプレノイド前駆体およびイソプレノイド収率の増大を助け得る（*Oh, MK et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:13175-13183; Bologna, F. et al. (2007) J. Bact. 189:5937-5946*）。

【0306】

20

したがって、リンゴ酸酵素の活性および／または発現の増大などの調節によって、メバロン酸、イソプレン、イソプレノイド前駆体、およびイソプレノイドの下流生産のためのより多くの出発基質（ピルビン酸またはアセチルCoA）が獲得され得る。 NADP 依存性リンゴ酸酵素遺伝子は、内在性遺伝子であり得る。これを達成するための非限定的な一方法は、内在性 NADP 依存性リンゴ酸酵素遺伝子プロモーターを合成構成的発現プロモーターで置換することである。酵素活性を増大させる別の非限定的方法は、 NADP 依存性リンゴ酸酵素ポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を使用する。当業者は、容易に利用可能な分子生物学的技術を使用して、発酵または培養中に*maeB* RNAの発現をモニターし得る。

【0307】

30

したがって、いくつかの実施形態では、組換え微生物は、 NADP 依存性リンゴ酸酵素遺伝子発現の増大を有しない微生物と比較して、増大した量のピルビン酸を産生する。いくつかの態様では、 NADP 依存性リンゴ酸酵素遺伝子の活性増大は、 NADP 依存性リンゴ酸酵素遺伝子発現の増大を有しない微生物と比較して、メバロン酸依存性生合成経路に向かうより多くの炭素流をもたらす。

【0308】

ピルビン酸の産生量の増大は、当業者に公知の日常的アッセイによって測定され得る。ピルビン酸の量は、分子操作が実施されない場合と比較して、少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%であり得る。

40

【0309】

リンゴ酸酵素の活性はまた、酵素のその他の分子操作によって増大され得る。酵素活性の増大は、いかなる操作も実施しなかった場合と比較した、比活性または全活性の任意の量の増大であり得る。場合によっては、酵素活性は、少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%である。

【0310】

ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体が関与する経路

50

ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体は、ピルビン酸からアセチルC o Aへの脱炭酸を触媒し、遺伝子a c e E、a c e F、およびl p d Aによってコードされるタンパク質から構成される。これらの遺伝子の転写は、いくつかの調節因子によって調節される。したがって、当業者は、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の活性を調節することで、アセチルC o Aを増大させ得る。変化は、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の活性および／または発現の増大（例えば、持続的発現）であり得る。これは、例えば、P L. 6 (a a t t c a t a t a a a a a c a t a c a g a t a a c c a t c t g c g g t g a t a a a t t a t c t c t g g c g g t g t t g a c a t a a a t a c c a c t g g c g g t g a t a c t g a g c a c a t c a g c a g g a c g c a c t g a c c a c c a t g a a g g t g (配列番号13)、λプロモーター、Genbank NC_001416)のような強力な構成的プロモーターを、オペロンの前に配置させる、または1つまたは複数の合成構成的発現プロモーターを使用するなどの異なる方法によって、達成され得る。

10

【0311】

したがって、一態様では、ピルビン酸デヒドロゲナーゼの活性は、(a)ピルビン酸デヒドロゲナーゼ(E1)、(b)ジヒドロリポイルトランスアセチラーゼ、および(c)ジヒドロリポイルデヒドロゲナーゼからなるピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の1つまたは複数の遺伝子の活性を増大させることで、調節される。ピルビン酸デヒドロゲナーゼの活性増大のために、これらの遺伝子の任意の1、2または3つを操作し得るものと理解される。別の態様では、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の活性は、内在性ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体リプレッサーの活性の弱力化によって調節し得て、詳細は下述される。内在性ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体リプレッサー遺伝子の活性は、内在性ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体リプレッサー遺伝子の欠失によって弱力化し得る。

20

【0312】

場合によっては、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の1つまたは複数の遺伝子は、内在性遺伝子である。ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の活性を増大させる別の方法は、微生物に、(a)ピルビン酸デヒドロゲナーゼ(E1)、(b)ジヒドロリポイルトランスアセチラーゼ、および(c)ジヒドロリポイルデヒドロゲナーゼからなる群からの1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種核酸を導入することである。

【0313】

これらの方法のいずれかを使用することで、ピルビン酸デヒドロゲナーゼの活性が調節されていない微生物と比較して、組換え微生物は、増大した量のアセチルC o Aを生じ得る。ピルビン酸デヒドロゲナーゼの活性を調節することは、ピルビン酸デヒドロゲナーゼの発現調節を有しない微生物と比較して、メバロン酸依存性生合成経路へのより多くの炭素流をもたらし得る。

30

【0314】

代表的変異の組み合わせ

本明細書に記載される酵素および／または酵素経路のいずれについても、本明細書に記載される酵素および／または酵素経路の任意の組み合わせ(2、3、4、5、6個以上)を調節する分子操作が、明示的に検討される。ものと理解される。

40

【0315】

一実施形態では、単なる例示として、組み合わせの列举を容易にするために、クエン酸シンターゼ(g l t A)はAと称され、ホスホトランスアセチラーゼ(p t a B)はBと称され、酢酸キナーゼ(a c k A)はCと称され、乳酸デヒドロゲナーゼ(l d h A)はDと称され、リンゴ酸酵素(s f c Aまたはm a e B)はEと称され、ピルビン酸デカルボキシラーゼ(a c e E、a c e F、および／またはl p d A)はFと称され、6-ホスホグルコノラクトナーゼ(y b h E)はGと称され、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ(p p l)はHと称され、アセチルトランスフェラーゼ(Y f i Qなど)はIと称され、デアセチラーゼ(などのC o b B)はJと称される。上で考察されるように、ピルビン酸デカルボキシラーゼ活性を増大させるために、ピルビン酸デカルボキシラーゼ複

50

合体の a c e E、a c e F、および／または l p d A 酵素を単独で、3 酵素の内 2 つを、または 3 酵素の内 3 つを使用し得る。したがって、この例示的实施形態では、酵素 A～J の任意の 2 つの組み合わせのために使用され得る非限定的組み合わせは、A B、A C、A D、A E、A F、A G、A H、A I、A J、B C、B D、B E、B F、B G、B H、B I、B J、C D、C E、C F、C G、C H、C I、C J、D E、D F、D G、D H、D I、D J、E F、E G、E H、E I、E J、G H、G I、G J、H I、H J、および I J である。任意の 3 つの酵素 A～J の組み合わせでは、使用され得る非限定的組み合わせは、A B C、A B D、A B E、A B F、A B G、A B H、A B I、A B J、B C D、B C E、B C F、B C G、B C H、B C I、B C J、C D E、C D F、C D G、C D H、C D I、C D J、D E F、D E G、D E H、D E I、D E J、A C D、A C E、A C F、A C G、A C H、A C I、A C J、A D E、A D F、A D G、A D H、A D I、A D J、A E F、A E G、A E H、A E I、A E J、B D E、B D F、B D G、B D H、B D I、B D J、B E F、B E G、B E H、B E I、B E J、C E F、C E G、C E H、C E I、C E J、C F G、C F H、C F I、C F J、C G H、C G I、および C G J である。任意の 4 つの酵素 A～J の組み合わせでは、使用され得る非限定的組み合わせは、A B C D、A B C E、A B C F、A B C G、A B C H、A B C I、A B C J、A B D E、A B D F、A B D G、A B D H、A B D I、A B D J、A B E F、A B E G、A B E H、A B E I、A B E J、B C D E、B C D F、B C D G、B C D H、B C D I、B C D J、C D E F、C D E G、C D E H、C D E I、C D E J、A C D E、A C D F、A C D G、A C D H、A C D I、A C D J、A C E F、A C E G、A C E H、A C E I、A C E J、B C E F、B D E F、B G E F、B H E F、B I E F、B J E F、および A D E F である。任意の 5 つの酵素 A～J の組み合わせでは、使用され得る非限定的組み合わせは、A B C D E、A B C D F、A B C D G、A B C D H、A B C D I、A B C D J、A B D E F、A B D E G、A B D E H、A B D E I、A B D E J、B C D E F、B C D E G、B C D E H、B C D E I、B C D E J、A C D E F、A C D E G、A C D E H、A C D E I、A C D E J、A B C E F、A B C E G、A B C E H、A B C E I、および A B C E J である。任意の 6 つの酵素 A～J の組み合わせでは、使用され得る非限定的組み合わせは、A B C D E F、A B C D E G、A B C D E H、A B C D E I、A B C D E J、B C D E F G、B C D E F H、B C D E F I、B C D E F J、C D E F G H、C D E F G I、および C D E F G J である。任意の 7 つの酵素 A～J の組み合わせでは、使用され得る非限定的組み合わせは、A B C D E F G、A B C D E F H、A B C D E F I、A B C D E F J、B C D E F G H、B C D E F G I、および B C D E F G J である。任意の 8 つの酵素 A～J の組み合わせでは、使用され得る非限定的組み合わせは、A B C D E F G H、A B C D E F G I、および A B C D E F G J である。任意の 9 つの酵素 A～J の組み合わせでは、使用され得る非限定的組み合わせは、A B C D E F G H I および A B C D E F G H J である。別の態様では、全ての 10 個の酵素の組み合わせ A B C D E F G H I J が使用される。

【0316】

その他の実施形態では、メバロン酸、イソプレネン、イソプレノイド、イソプレノイド前駆体、および／またはアセチル C o A 由来産物の生産の改善／向上／増大をもたらすのに使用するために、本明細書に記載される変異体のいずれもが組み合わせられて組換え細胞内で発現され得る。

【0317】

したがって、本明細書に記載されるような組換え微生物は、(a) クエン酸シンターゼ、(b) ホスホトランスアセチラーゼおよび／または酢酸キナーゼ、(c) 乳酸デヒドロゲナーゼ、(d) リンゴ酸酵素、(e) ピルビン酸デカルボキシラーゼ複合体、(f) アセチルトランスフェラーゼ (Y f i Q など)、および (g) デアセチラーゼ (C o b B など) からなる群からの 1 つまたは複数の酵素の活性を調節することで、組換え微生物中の代謝炭素流がメバロン酸生産に向けられるトリカルボン酸 (T C A) 回路活性条件下で培養されない微生物と比較して増大された、メバロン酸生産の増大を達成し得る。

【0318】

生成増大のためのその他の制御因子および要素

その他の分子操作を使用して、メバロン酸生成に向かう炭素流を増大させ得る。一方法は、メバロン酸経路に供給する経路に対する負の制御因子の効果を削減し、低下させまたは排除することである。例えば、場合によっては、遺伝子 *aceEF-lpdA* はオペロン中にあり、4番目の遺伝子は *pdhR* 上流にある。*PdhR* は、そのオペロンの転写の負の制御因子である。ピルビン酸不在下では、それはその標的プロモーターに結合して、転写を抑制する。それはまた、*ndh* および *cyoABCD* を同様に調節する (Ogasawara, H. et al. 2007. J. Bact. 189: 5534-5541)。一態様では、*pdhR* 制御因子の欠失は、ピルビン酸の供給を改善し得て、したがって、メバロン酸、イソプレン、イソプレノイド前駆体、およびイソプレノイドの生成を改善する。

10

【0319】

その他の態様では、*PGL* 低下または *PGL* 欠損がある微生物 (様々な大腸菌 (*E. coli*) 株など) への6-ホスホグルコノラクトナーゼ (*PGL*) の導入を使用して、アセチル *CoA* 由来産物、メバロン酸、イソプレン、イソプレノイド前駆体、およびイソプレノイドの生産が改善され得る。*PGL* は、染色体への組み込みまたはプラスミドなどの染色体外ビヒクルを使用して、導入されてもよい。なおも別の態様では、*PGL* を発現する細胞 (例えば、様々な大腸菌 (*E. coli*) 株などの微生物) のゲノムから *PGL* が欠失して、メバロン酸および/またはイソプレンの生産が改善されてもよい。別の態様では、*PGL* ポリペプチドをコードする異種核酸は、内在性に *PGL* を発現しない細胞内で発現され得る。いくつかの態様では、*PGL* の欠失は、*PGL* を発現する微生物と比較して、包括的に、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%のいずれか、これらの百分率の間の任意の値などのより高いイソプレン収率をもたらす。その他の態様では、*PGL* の欠失は、*PGL* を発現する微生物と比較して、これらの百分率の間の任意の値を含めて、包括的に、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%のいずれかのより高い瞬間イソプレン収率をもたらす。その他の態様では、*PGL* の欠失は、*PGL* を発現する微生物と比較して、これらの百分率の間の任意の値を含めて、包括的に、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%のいずれかのより高いイソプレンの細胞生産性指数をもたらす。その他の態様では、*PGL* の欠失は、*PGL* を発現する微生物と比較して、これらの百分率の間の任意の値を含めて、包括的に、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%のいずれかのより高いイソプレンの容積生産性をもたらす。その他の態様では、*PGL* の欠失は、*PGL* を発現する微生物と比較して、これらの百分率の間の任意の値を含めて、包括的に、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%のいずれかのより高いイソプレンのピーク比生産性をもたらす。いくつかの態様では、*PGL* の欠失は、*PGL* を発現する微生物と比較して、より長時間にわたるピーク比生産性の維持をもたらす。

20

30

【0320】

別の態様では、本明細書で開示される細胞のいずれかで、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (大腸菌 (*E. coli*) 中の *ppc*) 遺伝子発現の調節を使用して、メバロン酸、イソプレン、イソプレノイド前駆体分子、イソプレノイド、および/またはアセチル *CoA* 由来産物の生産が改善され得る。一態様では、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼの遺伝子発現は、野性型細胞と比較して *ppc* 遺伝子発現低下をもたらす別のプロモーターで、*ppc* 遺伝子のプロモーター配列を置換することで低下され得る。いくつかの態様では、*ppc* 遺伝子発現は、野性型細胞と比較して、これらの百分率の間の任意の値を含めて、包括的に、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%のいずれかで低下され得る。いくつかの態様では、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼの発現低下は、野性型レベルでホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼを発現する微生物と比較して、包括的に、約10%、

40

50

20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%のいずれか、これらの百分率の間の任意の値などのより高いイソプレン収率をもたらす。その他の態様では、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼの発現低下は、野性型レベルでホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼを発現する微生物と比較して、これらの百分率の間の任意の値を含めて、包括的に、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%のいずれかのより高い瞬間イソプレン収率をもたらす。その他の態様では、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼの発現低下は、野性型レベルでホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼを発現する微生物と比較して、これらの百分率の間の任意の値を含めて、包括的に、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%のいずれかのより高いイソプレンの細胞生産性指数をもたらす。その他の態様では、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼの発現低下は、野性型レベルでホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼを発現する微生物と比較して、これらの百分率の間の任意の値を含めて、包括的に、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%のいずれかのより高いイソプレンの容積生産性をもたらす。その他の態様では、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼの発現低下は、野性型レベルでホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼを発現する微生物と比較して、これらの百分率の間の任意の値を含めて、包括的に、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%のいずれかのより高いイソプレンのピーク比生産性をもたらす。いくつかの態様では、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼの発現低下は、野性型レベルでホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼを発現する微生物と比較して、より長時間維持されるピーク比生産性をもたらす。

【0321】

別の態様では、本明細書で開示される細胞のいずれかで、マグネシウム欠乏時*R s s B* 活性インヒビター（大腸菌（*E. coli*）の*i r a M*）遺伝子発現の調節を使用して、メバロン酸、イソプレン、イソプレノイド前駆体分子、イソプレノイド、および／またはアセチルC o A由来産物の生産が改善され得る。一態様では、*i r a M*遺伝子発現は、野性型細胞と比較して*i r a M*遺伝子発現増大をもたらす別のプロモーターで、*i r a M*遺伝子のプロモーター配列を置換することで増大され得る。いくつかの態様では、*i r a M*遺伝子発現は、野性型細胞と比較して、これらの百分率の間の任意の値を含めて、包括的に、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%のいずれかで増大され得る。いくつかの態様では、*i r a M*遺伝子発現の増大は、野性型レベルで*i r a M*遺伝子が発現する微生物と比較して、包括的に、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%のいずれか、これらの百分率の間の任意の値などのより高いイソプレン収率をもたらす。その他の態様では、*i r a M*遺伝子発現の増大は、野性型レベルで*i r a M*遺伝子が発現する微生物と比較して、これらの百分率の間の任意の値を含めて、包括的に、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%のいずれか、より高い瞬間イソプレン収率をもたらす。その他の態様では、*i r a M*遺伝子発現の増大は、野性型レベルで*i r a M*遺伝子が発現する微生物と比較して、これらの百分率の間の任意の値を含めて、包括的に、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%のいずれか、より高いイソプレンの細胞生産性指数をもたらす。その他の態様では、*i r a M*遺伝子発現の増大は、野性型レベルで*i r a M*遺伝子が発現する微生物と比較して、これらの百分率の間の任意の値を含めて、包括的に、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%のいずれか、より高いイソプレンの容積生産性をもたらす。その他の態様では、*i r a M*遺伝子発現の増大は、野性型レベルで*i r a M*遺伝子が発現する微生物と比較して、これらの百分率の間の任意の値を含めて、包括的に、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%のいずれか、より高いイソプレンのピーク比生産性をもたらす。いくつかの態様では、*i r a M*

遺伝子発現の増大は、野性型レベルで *iraM* 遺伝子を発現する微生物と比較して、より長時間維持されるピーク比生産性をもたらす。

【0322】

別の態様では、本明細書で開示される細胞のいずれかで、多剤排出ポンプ *acrAB-TolC* の *acrA* 成分（大腸菌（*E. coli*）の *acrA* 遺伝子）遺伝子発現の調節を使用して、メバロン酸、イソプレン、イソプレノイド前駆体分子、イソプレノイド、および／またはアセチル CoA 由来産物の生産が改善され得る。一態様では、*acrA* 遺伝子発現は、野性型細胞と比較して *acrA* 遺伝子発現低下をもたらす別のプロモーターで、*acrA* 遺伝子のプロモーター配列を置換することで低下され得る。いくつかの態様では、*acrA* 遺伝子発現は、野性型細胞と比較して、これらの百分率の間の任意の値を含めて、包括的に、約 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または 100% のいずれかで低下され得る。別の態様では、*acrA* の発現は、それがもはや機能性 *acrA* タンパク質を産生しないようにする、細胞ゲノム内の *acrA* 遺伝子の欠失などによって、完全に消滅させ得る。いくつかの態様では、*acrA* 遺伝子発現の欠失または低下は、野性型レベルで *acrA* 遺伝子を発現する微生物と比較して、包括的に、約 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または 100% のいずれか、これらの百分率の間の任意の値などのより高いイソプレン収率をもたらす。別の態様では、*acrA* 遺伝子発現の欠失または低下は、野性型レベルで *acrA* 遺伝子を発現する微生物と比較して、これらの百分率の間の任意の値を含めて、包括的に、約 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または 100% のいずれか、より高い瞬間イソプレン収率をもたらす。別の態様では、*acrA* 遺伝子発現の欠失または低下は、野性型レベルで *acrA* 遺伝子を発現する微生物と比較して、これらの百分率の間の任意の値を含めて、包括的に、約 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または 100% のいずれか、より高いイソプレンの細胞生産性指数をもたらす。別の態様では、*acrA* 遺伝子発現の欠失または低下は、野性型レベルで *acrA* 遺伝子を発現する微生物と比較して、これらの百分率の間の任意の値を含めて、包括的に、約 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または 100% のいずれか、より高いイソプレンの容積生産性をもたらす。別の態様では、*acrA* 遺伝子発現の欠失または低下は、野性型レベルで *acrA* 遺伝子を発現する微生物と比較して、これらの百分率の間の任意の値を含めて、包括的に、約 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または 100% のいずれか、より高いイソプレンのピーク比生産性をもたらす。いくつかの態様では、*acrA* 遺伝子の発現欠失または低下は、野性型レベルで *acrA* 遺伝子を発現する微生物と比較して、より長時間維持されるピーク比生産性をもたらす。

【0323】

別の態様では、本明細書で開示される細胞のいずれかで、FNR DNA 結合転写調節因子（FNR）遺伝子発現の調節を使用して、メバロン酸、イソプレン、イソプレノイド前駆体分子、イソプレノイド、および／またはアセチル CoA 由来産物の生産が改善され得る。一態様では、FNR 遺伝子発現は、野性型細胞と比較して FNR 発現増大をもたらす別のプロモーターで、FNR をコードする遺伝子のプロモーター配列を置換することで増大され得る。その他の態様では、FNR をコードする異種核酸が、FNR を内在性に発現しない細胞で発現され得る。いくつかの態様では、FNR 発現は、野性型細胞または内在性に FNR を発現しない細胞と比較して、これらの百分率の間の任意の値を含めて、包括的に、約 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または 100% のいずれかで増大され得る。いくつかの態様では、FNR 発現増大は、野性型細胞または内在性に FNR を発現しない細胞と比較して、包括的に、約 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または 100% のいずれか、これらの百分率の間の任意の値などのより高いイソプレン収率をもたらす。その他の態様では、FNR 発現の増大は、野性型細胞または内在性に FNR を発現しない細胞と

比較してと比較して、これらの百分率の間の任意の値を含めて、包括的に、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%のいずれかのより高い瞬間イソプレン収率をもたらす。その他の態様では、FNR発現の増大は、野性型細胞または内在性にFNRを発現しない細胞と比較して、これらの百分率の間の任意の値を含めて、包括的に、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%のいずれかのより高いイソプレンの細胞生産性指数をもたらす。その他の態様では、FNR発現の増大は、野性型細胞または内在性にFNRを発現しない細胞と比較して、これらの百分率の間の任意の値を含めて、包括的に、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%のいずれかのより高いイソプレンの容積生産性をもたらす。その他の態様では、FNR発現の増大は、野性型細胞または内在性にFNRを発現しない細胞と比較して、これらの百分率の間の任意の値を含めて、包括的に、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%のいずれかのより高いイソプレンのピーク比生産性をもたらす。いくつかの態様では、FNR発現の増大は、野性型細胞または内在性にFNRを発現しない細胞と比較して、より長時間維持されるピーク比生産性をもたらす。

10

【0324】

例示的な宿主細胞

1つまたは複数の遺伝子の異種発現のために使用され得て、生産される核酸の発現および／またはアセチル化タンパク質の活性が調節されるように遺伝子操作され得る、任意の微生物またはそれらの子孫（例えば、組換え宿主細胞）が、メバロン酸、イソプレン、イソプレノイド前駆体分子、イソプレノイド、および／またはアセチルCoA由来産物の生産増大のために、本明細書に記載されるように使用され得る。

20

【0325】

グラム陽性またはグラム陰性細菌をはじめとする細菌細胞を使用して、上述の核酸のいずれかを発現させ得る。具体的には、核酸は、*P. シトレア* (*P. citrea*)、*B. サブチリス* (*B. subtilis*)、*B. リケニフォルミス* (*B. licheniformis*)、*B. レンタス* (*B. lentus*)、*B. プレビス* (*B. brevis*)、*B. ステアロサーモフィルス* (*B. stearothermophilus*)、*B. アルカロフィルス* (*B. alkalophilus*)、*B. アミロリケファシエンス* (*B. amyloliquefaciens*)、*B. クラウシイ* (*B. clausii*)、*B. ハロデュランス* (*B. halodurans*)、*B. メガテリウム* (*B. megaterium*)、*B. コアギュランス* (*B. coagulans*)、*B. サーキュランス* (*B. circulans*)、*B. ロータス* (*B. lautus*)、*B. チューリングエンシス* (*B. thuringiensis*)、*S. アルバス* (*S. albus*)、*S. リビダンス* (*S. lividans*)、*S. コエリカラー* (*S. coelicolor*)、*S. グリセウス* (*S. griseus*)、シュードモナス属 (*Pseudomonas*) 種、および *P. アルカリゲネス* (*P. alcaligenes*) 細胞のいずれか1つで発現され得る。いくつかの態様では、宿主細胞は、*ラクトバチルス・デルブレッキイ・ラクチス* (*Lactobacillus lactis*) または *ラクトバチルス・プランタラム* (*Lactobacillus plantarum*) などの *ラクトバチルス* 属 (*Lactobacillus*) 種であり得る。

30

40

【0326】

本発明の組成物および方法で宿主細胞として使用し得る、多数のタイプの嫌気性細胞がある。本発明の一態様では、本明細書に記載される組成物また方法のいずれかに記載される細胞は、偏性嫌気性細胞およびその子孫である。偏性嫌気性菌は、典型的に、酸素が存在する条件では、たとえ増殖したとしても、十分に増殖しない。少量の酸素は存在してもよいものと理解され、すなわち、低レベルの酸素に対して偏性嫌気性菌が有する、いくらかの耐性レベルがある。一態様では、メバロン酸、イソプレン、イソプレノイド前駆体分子、イソプレノイド、および／またはアセチルCoA由来産物を産生するように遺伝子操

50

作された偏性嫌気性菌が、本明細書に記載される方法および／または組成物のいずれかのための宿主細胞の役割を果たし得て、実質的酸素非含有条件下で培養され、その中では存在する酸素量は、嫌気性菌の増殖、維持、および／または発酵に有害でない。

【0327】

本発明の別の態様では、本明細書に記載される組成物また方法のいずれかで記載されおよび／または使用される宿主細胞は、通性嫌気性細胞およびその子孫である。通性嫌気性菌は、酸素が存在すれば、好気性呼吸（例えば、TCA回路の利用）によって細胞ATPを産生し得る。しかし通性嫌気性菌は、酸素不在下でもまた増殖し得る。これは、より多量の酸素の存在下で死滅し、または不十分に増殖する、偏性嫌気性菌とは対照的である。したがって一態様では、通性嫌気性菌が、本明細書で提供される組成物および／または方法のいずれかのための宿主細胞の役割を果たし得て、メバロン酸、イソプレン、イソプレノイド前駆体分子、イソプレノイド、および／またはアセチルCoA由来産物を産生するように遺伝子操作され得る。通性嫌気性宿主細胞は、存在する酸素量が嫌気性菌の増殖、維持、および／または発酵に有害でない、実質的に酸素非含有の条件下で増殖し得て、または代案としてはより多量の酸素の存在下で増殖し得る。

【0328】

宿主細胞はさらに、糸状菌細胞およびその子孫であり得る。（例えば、Berka & Barnett, *Biotechnology Advances*, (1989), 7 (2): 127-154を参照されたい）。いくつかの態様では、糸状菌細胞は、トリコデルマ・ロンギブラキアツム (*Trichoderma longibrachiatum*)、T. ビリデ (*T. viride*)、T. コニングイ (*T. koningii*)、T. ハルジアヌム (*T. harzianum*)、ペニシリウム属 (*Penicillium*) 種、フミコラ・インソレンス (*Humicola insolens*)、H. ラスギノース (*H. lanuginosa*)、H. グリセア (*H. grisea*)、クリソスポリウム属 (*Chrysosporium*) 種、C. ルクノウェンス (*C. lucknowense*)、グリオクラジウム属 (*Gliocladium*) 種、A. オリゼ (*A. oryzae*)、A. ニガー (*A. niger*)、ショウユコウジカビ (*A. sojae*)、A. ジャポニカス (*A. japonicus*)、A. ニデュランス (*A. nidulans*)、またはA. アワモリ (*A. awamori*) などのアスペルギルス属 (*Aspergillus*) 種、F. ロゼウム (*F. roseum*)、F. グラミヌム (*F. gramineum*)、F. セレアリス (*F. cerealis*)、F. オキシスポラム (*F. oxysporum*)、またはF. ベネナツム (*F. venenatum*) などのフザリウム属 (*Fusarium*) 種、N. クラッサ (*N. crassa*) などのニューロスポラ属 (*Neurospora*) 種、ヒポクレア属 (*Hypocrea*) 種、M. ミーヘイ (*M. miehei*) などのケカビ属 (*Mucor*) 種、クモノスカビ属 (*Rhizopus*) 種またはエメリセラ属 (*Emericella*) 種のいずれかであり得る。いくつかの態様では、真菌は、A. ニデュランス (*A. nidulans*)、A. アワモリ (*A. awamori*)、A. オリゼ (*A. oryzae*)、A. アクレアトウス (*A. aculeatus*)、A. ニガー (*A. niger*)、A. ジャポニカス (*A. japonicus*)、T. リーゼイ (*T. reesei*)、T. ビリデ (*T. viride*)、F. オキシスポラム (*F. oxysporum*)、またはF. ソラニ (*F. solani*) である。特定の実施形態では、本明細書において利用するためのプラスミドまたはプラスミド構成要素としては、米国特許出願公開第2011/0045563号明細書に記載されるものが挙げられる。

【0329】

宿主細胞はまた、サッカロミセス属 (*Saccharomyces*) 種、シゾサッカロミセス属 (*Schizosaccharomyces*) 種、ピチア属 (*Pichia*) 種、またはカンジダ属 (*Candida*) 種などの酵母であり得る。いくつかの態様では、サッカロミセス属 (*Saccharomyces*) 種は、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) である（例えば、Romanos

et al., Yeast, (1992), 8(6): 423-488を参照されたい)。特定の実施形態では、本明細書で利用するためのプラスミドまたはプラスミド構成要素としては、米国特許第7,659,097号明細書、および米国特許出願公開第2011/0045563号明細書に記載されるものが挙げられる。

【0330】

宿主細胞は、さらに、緑藻類、紅藻類、灰色藻類、クロララクニオン藻類、ユーグレナ藻類、クロミスタ、または渦鞭毛藻類などの藻類種であり得る。(例えば、Saunders & Warmbrodt, "Gene Expression in Algae and Fungi, Including Yeast," (1993), National Agricultural Library, Beltsville, MDを参照されたい)。特定の実施形態では、本明細書において利用するためのプラスミドまたはプラスミド構成要素としては、米国特許出願公開第2011/0045563号明細書に記載されるものが挙げられる。いくつかの態様では、宿主細胞は、形態学に基づいて、以下の群のいずれかに分類されるラン藻などのラン藻である：クロロコックム目(Chlorococcales)、プレウロカプサ目(Pleurocapsales)、ユレモ目(Oscillatoriales)、ネンジュモ目(Nostocales)、またはスティゴネマ目(Stigonematales)(例えば、Lindberg et al., Metab. Eng., (2010) 12(1): 70-79を参照されたい)。特定の実施形態では、本明細書で利用するためのプラスミドまたはプラスミド構成要素としては、米国特許出願公開第2010/0297749号明細書；米国特許出願公開第2009/0282545号明細書、および国際公開第2011/034863号パンフレットに記載されるものが挙げられる。

【0331】

核酸の発現および／またはアセチル化タンパク質の活性が調節されるように遺伝子操作されている、1つまたは複数のアセチル化タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸を含んでなる大腸菌(E. coli)宿主細胞を使用して、本明細書に記載される上流MVA経路ポリペプチドのいずれかなどの1つまたは複数の上流MVA経路ポリペプチドが発現され得る。いくつかの態様では、本明細書に記載される組成物および方法において、大腸菌(E. coli)宿主細胞を使用して、1つまたは複数のmvaEおよびmvaSポリペプチドが発現され得る。一態様では、宿主細胞は、上流MVA経路ポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸を発現する、メバロン酸を産生する能力がある大腸菌(Escherichia coli)(大腸菌(E. coli)株の組換え細胞、またはそれらの子孫である。大腸菌(E. coli)宿主細胞(本明細書に記載されるように遺伝子操作されている細胞など)は、上流MVA経路ポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種性に発現した核酸が欠損して、1つまたは複数のアセチル化タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸を含まない同一細胞を上回る量、ピーク力価、および細胞生産性で、メバロン酸を産生し得て、前記細胞は、核酸の発現および／またはアセチル化タンパク質の活性が調節されるように遺伝子操作されている。さらに、大腸菌(E. coli)内で上流MVA経路ポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種性に発現した核酸は、染色体コピーであり得る(例えば、大腸菌(E. coli)染色体に組み込まれる)。別の態様では、大腸菌(E. coli)内でmvaEおよびmvaSポリペプチドをコードする1つまたは複数の異種性に発現した核酸は、染色体のコピーであり得る(例えば、大腸菌(E. coli)染色体に組み込まれる)。その他の態様では、大腸菌(E. coli)細胞は培養中にある。

【0332】

代表的ベクター

当業者は、発現ベクターが、特定の宿主株について遺伝子発現を最適化する特定構成要素を含有するように、デザインされることを認識するであろう。このような最適化構成要素としては、複製起点、プロモーター、およびエンハンサーが挙げられるが、これに限定されるものではない。本明細書で言及されるベクターおよび構成要素は、例示的な目的の

ために記載され、本発明の範囲を狭めることは意図されない。

【0333】

本明細書に記載される組成物および方法のいずれかにおいて、適切なベクターを使用し得る。例えば、適切なベクターを使用して、嫌気性菌内で、MV A経路ポリペプチド、イソプレニンターゼ、および／またはピロリン酸ポリプレニルシンターゼをコードする遺伝子の1つまたは複数のコピーの発現を最適化し得る。いくつかの態様では、ベクターは選択マーカーを含有する。選択可能なマーカーの例としては、抗生物質耐性核酸（例えば、カナマイシン、アンピシリン、カルベニシリン、ゲンタマイシン、ハイグロマイシン、フレオマイシン、プレオマイシン、ネオマイシン、またはクロラムフェニコール）および／または宿主細胞に対する栄養上の利点などの代謝上の利点をもたらす核酸が挙げられるが、これに限定されるものではない。いくつかの態様では、上流MV A経路ポリペプチド、イソプレニンターゼ、ピロリン酸ポリプレニルシンターゼ、および／または1つまたは複数のMV A経路ポリペプチド核酸の1つまたは複数のコピーが、選択マーカーなしに宿主細胞ゲノム内に組み込まれる。

10

【0334】

本明細書で特徴付けられるまたは本開示の実施例で使用されるベクターのいずれか1つが、使用され得る。

【0335】

代表的形質転換方法

上流MV A経路ポリペプチド、イソプレニンターゼ、下流MV A経路ポリペプチド、および／またはホスホクエーラーゼ1つまたは複数のコピーをコードする核酸が、適切な技術を使用して微生物に挿入され得る。さらに、形質転換、電気穿孔、核マイクロインジェクション、形質導入、形質移入（例えば、リポフェクション媒介またはDEAE-デキストリン媒介形質移入または組換えファージウイルスを使用した形質移入）、リン酸カルシウムDNA沈殿によるインキュベーション、DNA被覆マイクロプロジェクトイルでの高速衝撃、およびプロトプラスト融合などの、宿主細胞にDNAコンストラクトまたはベクターを導入するための標準的な技術を使用して、イソプレニンターゼ、IDI、DXP経路、および／またはポリプレニルピロリン酸シンターゼ核酸またはそれらを含有するベクターを、宿主細胞（例えば、本明細書に記載される植物細胞、真菌細胞、酵母細胞、または細菌細胞）中に挿入し得る。一般的形質転換技術は、当該技術分野で公知である（例えば、Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel et al. (eds.) Chapter 9, 1987; Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor, 1989; and Campbell et al., Curr. Genet. 16: 53-56, 1989を参照されたい)。導入された核酸は、染色体DNAに組み込まれ、または染色体外自己複製配列として維持され得る。形質転換体は、当該技術分野で公知の任意の方法によって選択し得る。形質転換体を選択する適切な方法は、その開示が参照により本明細書に援用される、国際公開第2009/076676号パンフレット、米国特許出願公開第12/335,071号明細書（米国特許公開第2009/0203102号明細書）、国際公開第2010/003007号パンフレット、米国特許公開第2010/0048964号明細書、国際公開第2009/132220号パンフレット、および米国特許出願公開第2010/0003716号明細書に記載される。

20

30

40

【0336】

例示的な細胞培養液

本明細書の用法では、「最少培地」または「最少培地」という用語は、常時ではないが、通常、1つまたは複数のアミノ酸（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個以上のアミノ酸）の存在がない、細胞増殖に可能な最少栄養素を含有する増殖培地を指す。最少培地は、典型的に、（1）微生物（例えば、細菌、藻類、真菌細胞）増殖のための炭素源；（2）微生物（例えば、細菌、藻類、真菌細胞）種および培養条件の間で変

50

動し得る、様々な塩類；および（３）水を含む。下でより詳細に考察されるように、炭素源は、グルコースのような単糖類から、酵母抽出物などのその他のバイオマスのより複雑な加水分解物まで、顕著に変動し得る。塩類は、概してマグネシウム、窒素、リン、およびイオウなどの不可欠な構成要素を提供し、細胞がタンパク質と核酸を合成できるようにする。最少培地はまた、抗生物質などの選択的作用因子で補足して、特定のプラスミドの維持などについて選択し得る。例えば、微生物が、アンピシリンまたはテトラサイクリンなどの特定の抗生物質に耐性を示す場合、耐性を欠く細胞が増殖するのを妨ぐために、その抗生物質を培地に添加し得る。培地は、必要に応じてその他の化合物で補足して、特定のアミノ酸などの所望の生理学的または生化学的特性について選択し得る。

【0337】

任意の最少培地調合物を使用して、宿主細胞を培養し得る。例示的な最少培地調合物としては、例えば、M9最少培地およびTM3最少培地が挙げられる。１リットルのM9最少培地あたり、以下を含む：（１）200mLの無菌M9塩（１リットルあたり、64gの $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、15gの KH_2PO_4 、2.5gの NaCl 、および5.0gの NH_4Cl ）；（２）2mLの1M MgSO_4 （無菌）；（３）20mLの20%（w/v）グルコース（またはその他の炭素源）；および（４）100μLの1M CaCl_2 （無菌）。１リットルのTM3最少培地あたり、以下を含む：（１）13.6gの K_2HPO_4 ；（２）13.6gの KH_2PO_4 ；（３）2gの $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；（４）2gのクエン酸一水和物；（５）0.3gのクエン酸第二鉄アンモニウム；（６）3.2gの $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ；（７）0.2gの酵母抽出物；および（８）1mLの1000×微量成分溶液；pHは約6.8に調節され、溶液は濾過滅菌される。１リットルの1000×微量成分あたり、以下を含む：（１）40gのクエン酸一水和物；（２）30gの $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ；（３）10gの NaCl ；（４）1gの $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；（５）1gの $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ；（６）1gの $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ；（７）100mgの $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ；（８）100mgの H_3BO_3 ；および（９）100mgの $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ；pHは約3.0に調節される。

【0338】

追加的な例示的な最少培地は、以下を含む：（１）リン酸カリウム K_2HPO_4 、（２）硫酸マグネシウム $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、（３）クエン酸一水和物 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、（４）クエン酸第二鉄アンモニウム $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_3$ 、（５）酵母抽出物（bio-springerからの）、（６）1000×修正微量金属溶液、（７）硫酸50% w/v、（８）foamblast 882（Emerald Performance Materials）、および（９）マクロ塩類溶液3.36mL。全ての構成要素を脱イオン H_2O に共に添加して溶解し、次に加熱滅菌する。室温への冷却に続いて、pHを水酸化アンモニウム（28%）で7.0に調節して、所定容積にする。滅菌およびpH調節後、ビタミン溶液およびスペクチノマイシンを添加する。

【0339】

宿主細胞は、任意の炭素源を使用して培養し得る。「炭素源」という用語は、宿主細胞または生物によって代謝されることができる、１つまたは複数の炭素含有する化合物を指す。例えば、宿主細胞を培養するのに使用される細胞培地としては、宿主細胞の生存率維持または増殖に適した任意の炭素源が挙げられる。いくつかの態様では、炭素源は、炭水化物（単糖、二糖類、オリゴ糖、または多糖類など）、または転化糖（例えば、酵素処理スクロースシロップ）である。

【0340】

いくつかの態様では、炭素源は、酵母抽出物、または酵母抽出物の１つまたは複数の構成要素を含む。いくつかの態様では、酵母抽出物の濃度は、0.1%（w/v）、0.09%（w/v）、0.08%（w/v）、0.07%（w/v）、0.06%（w/v）、0.05%（w/v）、0.04%（w/v）、0.03%（w/v）、0.02%（w/v）、または0.01%（w/v）の酵母抽出物である。いくつかの態様では、炭素源は、酵母抽出物（またはその１つまたは複数の構成要素）と、グルコースなどの別の炭

10

20

30

40

50

素源との双方を含む。

【0341】

例示的な単糖類としては、グルコースおよびフルクトースが挙げられ；例示的なオリゴ糖としては、乳糖およびスクロースが挙げられ；および例示的な多糖類としては、デンプンおよびセルロースが挙げられる。例示的な炭水化物としては、C6糖（例えば、フルクトース、マンノース、ガラクトース、またはグルコース）およびC5糖（例えば、キシロースまたはアラビノース）が挙げられる。

【0342】

例示的な細胞培養条件

本発明の組換え細胞の維持および増殖に適した材料および方法は、例えば、実施例セクションで後述される。細胞（例えば、細菌、真菌、藻類）培養の維持および増殖に適したその他の材料および方法もまた、技術分野で周知である。例示的な技術は、国際公開第2009/076676号パンフレット、米国特許出願公開第2009/0203102号明細書、国際公開第2010/003007号パンフレット、米国特許出願公開第2010/0048964号明細書、国際公開第2009/132220号パンフレット、米国特許出願公開第2010/0003716号明細書、Manual of Methods for General Bacteriology Gerhardt et al., (編), 米国微生物学会 (American Society for Microbiology), Washington, D. C. (1994)、またはBrock in Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology, 第2版 (1989) Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA. にある。

【0343】

標準的細胞培養条件を使用して、細胞を培養し得る（例えば、国際公開第2004/033646号パンフレットと、その中で引用される参考文献を参照されたい）。いくつかの態様では、細胞は、適切な温度、ガス混合物、およびpH（約20℃～約37℃、約6%～約84%CO₂、およびpH約5～約9など）で、増殖され維持される。いくつかの態様では、細胞は、適切な細胞培地中で35℃で増殖される。いくつかの態様では、発酵のためのpH範囲は、約pH5.0～約pH9.0（約pH6.0～約pH8.0または約6.5～約7.0など）である。細胞は、宿主細胞の要件に基づいて、好気性、無酸素性、または嫌気性条件下で増殖し得る。さらに、より特異的な細胞培養条件を使用して、細胞を培養し得る。例えば、いくつかの実施形態では、細胞（例えば、大腸菌（E. coli）細胞などの細菌細胞、真菌細胞、藻類細胞）は、低コピー数から中程度コピー数プラスミド中で、強力なプロモーターの制御下にある、1つまたは複数の異種核酸を発現し、34℃で培養される。

【0344】

使用し得る標準的培養条件と、バッチ、流加、または連続発酵などの発酵様式は、国際公開第2009/076676号パンフレット、米国特許出願第12/335,071号明細書（米国特許出願公開第2009/0203102号明細書）、国際公開第2010/003007号パンフレット、米国特許出願公開第2010/0048964号明細書、国際公開第2009/132220号パンフレット、米国特許出願公開第2010/0003716号明細書に記載される。バッチおよび流加発酵は一般的で、当該技術分野で周知であり、例は、Brock, Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology, 第2版 (1989) Sinauer Associates, Inc. にある。

【0345】

いくつかの態様では、細胞は、グルコース制限条件下で培養される。「グルコース制限条件」とは、添加されるグルコースの量が、細胞によって消費されるグルコース量の約105%以下（約100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、または10%など）であることを意味する。特定の態様では、培地に添加される

グルコースの量は、特定期間中に細胞によって消費されるグルコースの量と、ほぼ同じである。いくつかの態様では、細胞増殖速度は、細胞培地中のグルコースの量が支持し得る速度で、細胞が増殖するように、グルコースの添加量を制限することで制御される。いくつかの態様では、グルコースは、細胞の培養時間中に蓄積されない。様々な態様において、細胞は、グルコース制限条件下で、約1、2、3、5、10、15、20、25、30、35、40、50、60、または70時間以上培養される。様々な態様において、細胞は、細胞が培養される総時間の5、10、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、95、または100%以上にわたって、グルコース制限条件下で培養される。いかなる特定の理論による拘束も意図されないが、グルコース制限条件は、細胞のより良好な制御を可能にすると考えられる。

10

【0346】

いくつかの態様では、細胞（細菌、真菌、または藻類細胞など）は、バッチ培養中で増殖される。細胞（細菌、真菌、または藻類細胞など）はまた、流加培養または連続培養中で増殖させ得る。さらに、細胞（細菌、真菌、または藻類細胞など）は、上述の最少培地のいずれかをはじめとするが、これに限定されるものではない最少培地中で培養し得る。最少培地は、1.0% (w/v) 以下のグルコースまたは任意のその他の六炭糖で、さらに補足し得る。具体的には、最少培地は、1% (w/v)、0.9% (w/v)、0.8% (w/v)、0.7% (w/v)、0.6% (w/v)、0.5% (w/v)、0.4% (w/v)、0.3% (w/v)、0.2% (w/v)、または0.1% (w/v) のグルコースで補足し得る。さらに、最少培地は、0.1% (w/v) 以下の酵母抽出物で補足し得る。具体的には、最少培地は、0.1% (w/v)、0.09% (w/v)、0.08% (w/v)、0.07% (w/v)、0.06% (w/v)、0.05% (w/v)、0.04% (w/v)、0.03% (w/v)、0.02% (w/v)、または0.01% (w/v) のグルコースで補足し得る。代案としては、最少培地に、1% (w/v)、0.9% (w/v)、0.8% (w/v)、0.7% (w/v)、0.6% (w/v)、0.5% (w/v)、0.4% (w/v)、0.3% (w/v)、0.2% (w/v)、または0.1% (w/v) グルコースおよびwith 0.1% (w/v)、0.09% (w/v)、0.08% (w/v)、0.07% (w/v)、0.06% (w/v)、0.05% (w/v)、0.04% (w/v)、0.03% (w/v)、0.02% (w/v)、または0.01% (w/v) の酵母抽出物を添加し得る。

20

30

【0347】

例示的な精製法

いくつかの態様では、本明細書に記載される方法のいずれかは、生産された化合物を回収するステップをさらに含む。いくつかの態様では、本明細書に記載される方法のいずれかは、イソプレンを回収するステップをさらに含む。いくつかの態様では、イソプレンは、吸収ストリッピングによって回収される（例えばその開示が参照により本明細書に援用される、米国特許出願公開第2011/0178261A1号明細書を参照されたい）。いくつかの態様では、本明細書に記載される方法のいずれかは、イソプレノイドを回収するステップをさらに含む。いくつかの態様では、本明細書に記載される方法のいずれかは、テルペノイドまたはカロテノイドを回収するステップをさらに含む。

40

【0348】

適切な精製法は、その開示が参照により本明細書に援用される、米国特許出願公開第2010/0196977A1号明細書に、より詳細に記載される。

【0349】

代表的生体外タンパク質アセチル化および脱アセチル化アッセイ

代表的アセチル化アッセイは、緩衝液およびアセチルCoAの存在下で実施される。例えばアッセイは、200 μ MのcAMP存在下および不在下で、20 mM緩衝液、100 mMのNaCl、100 μ MアセチルCoA、20 μ MのUSP中で実施され得る。反応は、20 μ MのMt-PaTAを添加することで開始され得て、22 $^{\circ}$ Cで10分間インキュベートして、SDSローディング色素中で沸騰させることでクエンチされる。代表的緩

50

衝液は、次のように提供される：酢酸ナトリウム（pH 4.0～5.0）、MES（pH 6.0）、HEPES（pH 7.0）、Tris（pH 7.5～8.0）、BisTris Propane（pH 9.0）、およびグリシン（pH 10.0）。反応は、SDS-PAGEおよび抗-AcLys抗体ウエスタンブロット法（Cell Signaling Technology）と並行して分析され得て、化学発光（Lumina BioSciences）によって定量的に検出される。

【0350】

脱アセチル化アッセイは、200 μMのcAMP存在下および不在下で、20 mMのTris-HCl、pH 7.5、100 mMのNaCl、1 mM β-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD⁺）、20 μM自己アセチル化Mt-PatA H173K変異体中で、22 °Cで実施され得る。反応物は、5 μM Rv1151cを添加することで開始され、SDSローディング色素中で沸騰させることで様々な時点で停止され得る。サンプルは、抗-AcLys抗体を用いたSDS-PAGEおよびウエスタンブロット法を使用して、SDS-PAGEおよびウエスタンブロット法を使用して、並行して分析され得る。

10

【0351】

本明細書に記載される方法は、細菌、真菌細胞、および藻類細胞内の全てのタンパク質のアセチル化および脱アセチル化をモニタリングするために使用される。

【0352】

本発明は、例証として提供され制限を意図するものではない、以下の実施例を参照してさらに理解される得る。

20

【実施例】

【0353】

実施例1：標準およびアセチル化調節性株の構築

本実施例は、標準株、ならびに細胞内タンパク質アセチル化調節に関与する遺伝子に変異を含有する株の構築を記載する。

【0354】

I. 標準株の構築

マイコプラズマ・ホミニス（*Mycoplasma hominis*）（株ATCC 23114）からのホスホケトラゼ（PKL）酵素のDNA配列（配列番号28）は、大腸菌（*E. coli*）内における発現のためにコドン最適化され（配列番号29）、Life Technologiesによって合成された。GENEARTシームレスクローニングおよび構築キット（Life Technologies）を使用して、製造業者のプロトコルに従って、M. ホミニス（*M. hominis*）ホスホケトラゼがプラスミドpEWL1421（pTrcウラジロハコヤナギ（*P. alba*）ispS（MEA変異体）-E. ガリナラム（*E. gallinarum*）ホスホケトラゼ）にサブクローニングされ、プラスミドpMCS826（図13）が得られた。使用されたプライマーは、ホスホケトラゼではMCS534（cgctaactgcataaaggaggtaaaaaaac）（配列番号32）およびMCS535（gctggagaccgttttaaaccttttaactagactttta）（配列番号33）、プラスミドpEWL1421ではMCS536（taaagtctagtttaagttttaaacgggtctccagc）（配列番号34）およびMCS537（gttttttttaacctccttttatgcagtttagcg）（配列番号35）（図14）であった。プラスミドpMCS826上のispSおよびホスホケトラゼ読み取り枠間のDNAの配列は、プライマーMCS488（ttagcgttcaaacggcagaatcgg）（配列番号36）およびMCS562（ccgttttgaaacgctaagaGATACGCGTAACCCCAAGGACGGTAATAatgattagcaaaatctatgatgataaaaagtattctgg）（配列番号37）を使用して、PCRによって改変された。標準技術を使用して、得られたPCR産物を精製し自己ライゲートさせて、プラスミドpMCS1019を形成した（図15）。

30

40

50

【0355】

DNAカセットは、PCRによって二段階処理で作成された。FRT-gb2-CM-FRTテンプレート (Genebridges) からのプライマーMCS504およびMCS516を使用して、約1.8kbの生成物がPCRによって増幅された。次にこのPCR産物は、プライマーMCS516およびMCS545を使用した、PCRによる増幅の第2のラウンドのためのテンプレートとして使用された。このPCR産物は、Genebridges Red/ET Recombination Quick and Easy大腸菌 (E. coli) 遺伝子欠失キットを使用して、製造業者の指示に従って、MD891株 (BL21 wt, pgl+ t PL. 2-mKKDyI::FRT, Gil. 2 gltA yhfSFRTPyddVIs pA yhfS thiFRTtruncIspA pgl ML, FRT-PL. 2-2 cis-RBS10000-MVK (burtonii) clone A + t ackA::FRT) 染色体に組み込まれた。以下、Gil. 2 gltA yhfSFRTPyddVIs pA yhfS thiFRTtruncIspAおよびCTOは同義的に使用され、pglMLおよびpgl-は同義的に使用される。得られた株は、MCS1015 (MD891+ackA::Cm_pL. 2_pta) と称される。MCS1015株の配列解析は、ホスホトランスアセチラーゼ (pta) 遺伝子上流のクロラムフェニコール抗生物質マーカーおよびpL. 2プロモーターの挿入を明らかにした。製造業者の指示に従って、クロラムフェニコール抗生物質マーカーがFLP発現によってMCS1015株から除去され、MCS1016 (MD891+FRT::ackA::FRT_pL. 2_pta) 株が作成された。MCS1016株は、プラスミドpMCS1019 (配列番号30) およびpMCM1225 (配列番号27) で形質転換されて、同質遺伝子型株MCS1227 (pMCS1019 (pTrc_IspS_RBS3_PKL16 [M. ホミニス (M. hominis)])、pMCM1225) およびMCS1316 (pMCS1019 (pTrc_IspS_RBS3_PKL16 [M. ホミニス (M. hominis)])、pMCM1225) が作成された。使用されたプライマーの配列は、表1-1に示される。

【0356】

【表3】

表 1-1:プライマー配列

MCS504	tgttttttacctccttgcagtgcgctcgtgatgtgctcagtatcaccgccagtggtatttac gtcaacaccgccagagataatttatcaccgcagatggttatcttaatacgactcactataggg ctc	配列番号 38
MCS516	gactcaagatatttcttccatcatgcaaaaaaaaaatttgcagtgcatgatgtaatacaattaac cctcactaaagggcg	配列番号 39
MCS545	gctggtcagaccgacgctggttccggtagggatcagcataataacgggacatgtttttta cctccttgcagtg	配列番号 40

【0357】

II. アセチル化染色体変異株の構築

yfiQおよびcobBの欠失のためのコンストラクトは、KeioライブラリーからのクローンコロニーPCRによって増幅された (Baba et al., Molecular Systems Biology 2 Article number: 2006.0008 doi:10.1038/msb4100050)。yfiQ欠失コンストラクトは、プライマーMCM1038およびMCM1039を使用してJW2568 (プレート21、G12) から増幅された。cobB欠失コンストラクトは、プライマーMCM1033およびMCM1035を使用してJW1106 (プレート21、A2) から増幅された。製造業者のプロトコルに従って、以下の条件で、50μL反応 (Agile

nt Hercula se IIキット；カタログ600679）を実施した：y f i Qでは、95℃、20分間；（95℃、20秒間；55℃、20秒間；72℃、1.5分間）×30；72℃、3分間；4℃保持およびc o b Bでは、95℃、20分間；（95℃、20秒間；55℃、20秒間；72℃、1.25分間）×30；72℃、3分間；4℃保持。PCR産物は、製造業者のプロトコル（Q i a g e n Q I A q u i c k PCR精製キット、カタログ28104）に従って精製され、30μL EB中に溶出された。プライマー配列は、表1-2に示される。

【0358】

【表4】

表1-2:プライマー配列

10

MCM1033	aggctgcctcgctcatctctt	配列番号 41
MCM1035	cagaatatcgccactctggg	配列番号 42
MCM1038	acacgctatctggcaggaaa	配列番号 43
MCM1039	tttgacaacatcacagtgc	配列番号 44

【0359】

y f i Qおよびc o b Bにおける構成的プロモーター挿入のためのコンストラクトは、二段階PCR処理によって作成された。K a n R__g i l . 6と称されるコンストラクトは、F R T-P G K-g b 2-ne o-F R Tテンプレート（Genebridges）からのプライマーM C S 5 8 0およびM C S 5 8 4を使用して、PCRによって増幅された。PCR産物は、Q I A q u i c k PCR精製キット（Q i a g e n）を使用して精製され、さらなるPCRにおいてテンプレートとして使用された（反応あたり10ng）。F R T-k a n-F R T-g i l . 6-Y f i Qコンストラクトは、プライマーM C M 1 0 4 2およびM C M 1 0 4 3を使用して増幅された。F R T-k a n-F R T-g i l . 6-C o b Bコンストラクトは、プライマーM C M 1 0 4 6およびM C M 1 0 4 8を使用して増幅された。製造業者のプロトコルに従って、以下の条件で、50μL反応（A g i l e n t Hercula se IIキット；カタログ600679）を実施した：95℃、20分間；（95℃、20秒間；55℃、20秒間；72℃、1.25分間）×30；72℃、3分間；4℃保持PCR産物は、製造業者のプロトコル（Q i a g e n Q I A q u i c k PCR精製キット、カタログ28104）に従って精製され、30μL EB中に溶出された。プライマー配列は、表1-3に示される。

20

30

【0360】

【表 5】

表 1-3:プライマー配列

MCS580	aattaaccctcactaaagggcggc	配列番号 45
MCS584	atattccaccagctatttggtagtgaataaaagtgggtgaattatttgct	配列番号 46
	caggatgtggcattgtcaagggctaatacgactcactatagggctc	
MCM1042	gaggaag	配列番号 47
	tcacagcagaacagtagaaagcggtttaaatacattcggtcacttct	
MCM1043	gcgggagaccggttaattaaccctcactaaagggcggc	配列番号 48
	cgcgccaattaccgctatcgatttggcgtagtagtgcttcagtc	
MCM1046	ctcgctgactcatatattccaccagctatttggtagtg	配列番号 49
	gcgggaggaatgcgtggcgcgccctctacatctaaccgattaaa	
MCM1048	caacagaggttgctaattaaccctcactaaagggcggc	配列番号 50
	gcgcaggcggcgtttatttttacgaaaacgacttaaccgatgacc	
	cgacgcgacagcatatattccaccagctatttggtagtg	

10

【0361】

コンストラクトはDW853株内に導入され、それはpRedET-carbを保有するMD891株である。標準分子生物学手順を使用して、pRED/ETプラスミド（GeneBridges）をMD891に電気穿孔し、引き続いて50μg/mLの濃度でカルペニシリンを含有する固体LB培地プレート上で形質転換体を30℃で増殖させることで、DW853が生成された。pRedET-carbを含有する細胞は、LB+carb50中で30℃で一晩培養され、次に新鮮LB+carb50中で1:100に希釈され、30℃で2時間で培養された。130μLの10%アラビノースが添加されて、細胞は37℃でおよそ2時間培養された。細胞は、培養物の半分の容積の冷d d H₂Oで3回洗浄して、培養物の10分の1の容積に再懸濁することで、電気穿孔のために調製された。100μLの細胞懸濁液が、2mm電気穿孔キュベット内で3μLのDNAと組み合わされて、25uFD、200Ω、2.5kVで電気穿孔され、500μLのLBで即座にクエンチされた。細胞は回収されて37℃で3時間振盪され、次に形質転換体が、LB/kan10プレート上で37℃で一晩選択された。形質転換体は、再度画線塗抹されて、次に液体LB/kan10中で培養され、30%グリセロール中で冷凍された。株の説明は、表1-4に示される。

20

30

【0362】

【表 6】

表 1-4:株の説明

株	遺伝子型
MCM2721	MD891 + YfiQ::FRT-kan-FRT
MCM2736	MD891 + CobB::FRT-kan-FRT
MCM2740	MD891 + FRT-kan-FRT-gil.6-YfiQ
MCM2742	MD891 + FRT-kan-FRT-gil.6-CobB (BL21 ATG)

40

【0363】

III. PL. 2-pt aの形質導入

FRT-cmR-FRT-PL. 2-pt a遺伝子座は、形質導入によってMCS10

50

15株からMCM2721株内に移動され、ackAの欠失が維持された。MG1655のP1溶解産物を使用して、MCS1015の溶解産物が作成された。この溶解産物の100μLが、10mMのMgCl₂および5mMのCaCl₂の培養物の半分の容積に再懸濁された100μLのMCM2721の一晩培養物と混合された。反応物は、30℃でなおも30分間培養されて、次に100μLの1Mクエン酸ナトリウムでクエンチされた。500μLのLBが添加されて、LB/cmp5プレート上で37℃で一晩選択する前に、培養物は37℃1時間で振盪された。単一コロニーは、LB/kan10cmp10上に再度画線塗抹された。コロニーは培養されて、MCM2725(MD891 + FRT-kan-FRT::yfiQ FRT-cmp-FRT::PL2-pta)として冷凍された。

10

【0364】

IV. ループアウト

上記株からの抗生物質マーカーは、FLPリコンビナーゼの一過性発現によって除去された。プラスミドpCp20(www.cgsc.biology.yale.edu/Website.php?ID=64621)を参照されたい)が電気穿孔されて、LB/carb50上で30℃で形質転換体を選択された。形質転換体コロニーは、LB/carb50ブロス中で30℃で濁るまで培養され、次に37℃で数時間培養された。次に培養物はLBプレート上に画線塗抹されて、37℃で一晩培養された。単一コロニーは、LB、LB/carb50、LB/kan10、およびLB/cmp5(MCM2725ループアウト用)上にパッチに植えられた。各抗生物質に対して感受性のコロニーについてLBからの画線塗抹が培養されて、30%グリセロール中で冷凍された。ループアウト株は、表1-5に示される。

20

【0365】

【表7】

表1-5:ループアウト株

親株 (マーカー)	ループアウト株
MCM2721 (kan)	MCM2722
MCM2736 (kan)	MCM2754
MCM2740 (kan)	MCM2760
MCM2742 (kan)	MCM2764

30

【0366】

V. イソプレレン産生細胞

プラスミドpMCS1019およびpMCM1225は、上記宿主に同時電気穿孔されて、イソプレレン産生細胞が作成された。形質転換体はLB/carb50spec50上で選択されて、単一コロニーは液体LB/carb50spec50中で培養され、30%グリセロール中で冷凍された。イソプレレン産生細胞は、表1-6に示される。

40

【0367】

【表 8】

表 1-6: イソプレレン産生細胞

宿主	イソプレレン産生細胞	選択温度 (摂氏)
MCM2722	MCM2728	37
MCM2725	MCM2732	37
MCM2754	MCM2771	30
MCM2760	MCM2773	30
MCM2764	MCM2775	30

10

【0368】

実施例 2：増殖速度およびイソプレレン比生産性のための小規模アッセイにおける y f i Q 欠失の評価

本実施例は、y f i Q 遺伝子の欠失を保有する株において、イソプレレン生産および増殖速度を測定した。

【0369】

I. 材料と方法

L B 培地、酵母抽出物および M g S O₄ 非含有 T M 3 培地、10%酵母抽出物、1 M の M g S O₄、50%グルコース、200 mM の I P T G、50 mg/mL スペクチノマイシン、50 mg/mL カルベニシリン、アルミホイルシール、48 ウェル滅菌 5 mL ブロック、B r e a t h e E a s i e r シールメンブレン、アルミホイルシール、96 ウェルマイクロタイタープレート、96 ウェルガラスブロックは、Z i n s s e r A n a l y t i c から購入された。A g i l e n t 6890 G C には 5973 N 質量分光計が装着された。

20

【0370】

T M 培地 (M g S O₄ および酵母抽出物非含有)、1%グルコース、8 mM の M g S O₄、0.02%酵母抽出物、および適切な抗生物質を組み合わせることで、補足 T M 3 培地を調製した。一晚培養物を補足 T M 3 培地中に 0.2 光学濃度 (O D) で接種することで、48 ウェル滅菌ブロック内で 2 mL の 1 日培養を開始した。ブロックを B r e a t h e E a s i e r メンブレンで密封し、600 rpm および 34°C で、2 時間培養した。2 時間の増殖後、マイクロタイタープレート内で O D が 600 nm で測定され、細胞は 200 μM の I P T G によって誘導された。O D 読み取りは I P T G 誘導後に 4 時間にわたり毎時実施されて、増殖速度が判定された。O D 測定は、S p e c t r a M a x P l u s 190 (M o l e c u l a r D e v i c e s) を使用して、T M 3 培地中で適切に希釈して、600 nm でマイクロタイタープレート内で実施された。

30

【0371】

I P T G 誘導の 2、3、および 4 時間後に、100 μL のイソプレレンサンプルが 96 ウェルガラスブロック内に収集された。ガラスブロックはアルミホイルで密封されて、T h e r m o M i x e r 上で 450 rpm で振盪しながら 34°C で 30 分間培養された。30 分間後、ブロックを水浴中で 2 分間 70°C に維持し、G C / M S 内でイソプレレンヘッドスペース測定を実施して、比生産性を判定した。

40

【0372】

I I. 結果

図 1 A は、y f i Q 欠失細胞と対比して、4 時間にわたる対照野性型 y f i Q 細胞の増殖 (O D 600) を示す一方で、図 1 B は、一晚増殖 (O D 600) を示す。図 2 は、y f i Q 欠失細胞と対比して、4 時間にわたる対照野性型 y f i Q 細胞のイソプレレン比生産性を示す。

【0373】

50

実施例 3：メバロン酸経路およびイソプレニンシンターゼ発現株内のイソプレニン生産に対する y f i Q 遺伝子欠失の影響

本実施例は、メバロン酸経路およびイソプレニンシンターゼからの導入遺伝子を発現する、15 L 規模の流加培養中で培養された改変大腸菌（*E. coli*）宿主（BL 21 由来産生宿主 MD 8 9 1）を使用して、イソプレニン生産評価するために実施された。この実験の宿主株はどちらも、酢酸キナーゼ（AckA）ポリペプチドをコードする遺伝子に欠失を保有して、*M. hominis*（*M. hominis*）ホスホケトラゼを発現する。さらに、どちらもホスホトランスアセチラーゼ（pta）を過剰発現する。

【0374】

これらのイソプレニン産生細胞には、同一処理が実施された。ここでは対照細胞 MCS 1227 の能力計量が、y f i Q リジンアセチルトランスフェラーゼが欠失した実験的細胞（細胞の詳細は表 3-1 に提供される）のものと比較される。関連能力計量は、グルコース上の累積イソプレニン収率、イソプレニンの容積生産性、および C P I である。

【0375】

【表 9】

表 3-1:本実施例で使用された細胞

細胞名称	宿主	上流経路 プラスミド	イソプレニンシンターゼ / ホスホケトラゼプラスミド
MCS1227 (対照)	CTO pgl- PL.2-2cis-R BS 10000- bKKDyl, ackA::FRT_ pL.2_pta	IPTG誘導性P _{trc} 発現 <i>E. ガリナーラム</i> (<i>E.gallinarum</i>) mvaE, mvaS (pMCM1225 Spec 50)	IPTG誘導性 (pTrc_IspS_RBS3_PKL16 [<i>M.</i> ホミニス(<i>M.hominis</i>))] (pMCS1019, Carb 50)
MCM2732 (実験的 - YfiQ 欠 失)	MD891 + FRT-kan-FR T::YfiQ FRT-cmp-F RT::PL.2-pt a	IPTG 誘導性 P _{trc} 発現 <i>E. ガリナーラム</i> (<i>E.gallinarum</i>) mvaE, mvaS (pMCM1225 Spec 50)	IPTG誘導性 (pTrc_IspS_RBS3_PKL16 [<i>M.</i> ホミニス(<i>M.hominis</i>))] (pMCS1019, Carb 50)

【0376】

I. 材料と方法

培地レシピ（発酵培地 1 リットルあたり）：7.5 g の K_2HPO_4 、2 g の $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、2 g のクエン酸一水和物、0.3 g のクエン酸第二鉄アンモニウム、0.5 g の酵母抽出物、1.6 mL の 50% 硫酸、1 mL の $1000\times$ 修正微量元素溶液。全ての成分を合わせて DiH_2O に溶解した。この溶液を加熱滅菌した（123℃で20分間）。水酸化アンモニウム（28%）によって pH を 7.0 に調節し、所定容積にした。滅菌および pH 調節後に、10 g のグルコース、8 mL のビタミン溶液、および抗生物質を添加した。

【0377】

1000×修正微量元素溶液（1 リットルあたり）：

40 g のクエン酸 $\cdot H_2O$ 、30 g の $MnSO_4 \cdot H_2O$ 、10 g の $NaCl$ 、1 g の $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、1 g の $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 、1 g の $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 、100 mg の $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 、100 mg の H_3BO_3 、100 mg の $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 。各成分を DiH_2O に 1 つずつ溶解して、 $HCl/NaOH$ で pH を 3.0 に調節し、次に溶液を所定容積にして、0.22 ミクロンフィルターで濾過滅菌した。

【0378】

ビタミン溶液（１リットルあたり）：１．０ｇの塩酸チアミン、１．０ｇのＤ－（＋）－ビオチン、１．０ｇのニコチン酸、４．０ｇの塩酸ピリドキシン。各成分をＤｉ　Ｈ２　Ｏに１つずつ溶解して、ＨＣｌ／ＮａＯＨでｐＨを３．０に調節し、次に溶液を所定容積にして、０．２２ミクロンフィルターで濾過滅菌した。

【０３７９】

マクロ塩溶液（１リットルあたり）：２９６ｇのＭｇＳＯ４＊７Ｈ２Ｏ、２９６ｇのクエン酸一水和物、４９．６ｇのクエン酸第二鉄アンモニウム。全ての成分を水に溶解して所定容積にし、０．２２ミクロンフィルターによって濾過滅菌した。

【０３８０】

供給液（１キログラムあたり）：０．５９０ｋｇのグルコース、０．３９３ｋｇのＤｉ　Ｈ２　Ｏ、７．４ｇのＫ２ＨＰＯ４、および８．９ｇの１００％Ｆｏａｍｂｌａｓｔ８８２。全ての成分を混ぜ合わせて、高圧蒸気滅菌した。供給液の高圧蒸気滅菌後、クリーンベンチ内で栄養素補給剤を供給ボトルに入れる。供給物への滅菌後添加物は（供給液１キログラムあたり）、５．５４ｍＬのマクロ塩溶液、６．５５ｍＬのビタミン溶液、０．８２ｍＬの１０００×修正微量金属溶液である。１００μＭのＩＰＴＧ標的：供給物１キログラムあたり１．８７ｍＬの無菌１０ｍｇ／ｍＬ溶液を添加する。

【０３８１】

この実験は、所望の発酵ｐＨ（７．０）および温度（３４℃）における、グルコースからのイソブレン生産をモニターするために実施した。各実験を開始するために、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）産生株の適切な冷凍バイアルを解凍して、トリプトン酵母抽出物（ＬＢ）培地と適切な抗生物質とを含有するフラスコに接種した。５５０ｎｍ（ＯＤ５５０）における測定で、種菌がほぼ１．０の光学濃度に増殖した後に、５００ｍＬを使用して１５Ｌバイオリアクターに接種し、初期タンク容積を５Ｌにした。

【０３８２】

バイオリアクター背圧を０．７バールゲージに維持し、生産生物に酸素を提供するのに使用される入口ガスは、入口ガスを既知の濃度（７．３～８．３容積％の酸素）に希釈する、工場内設備によって提供される。

【０３８３】

バッチ添加される培地には、グルコースが９．７ｇ／Ｌでバッチ添加された。誘導は、イソプロピルーβ－Ｄ－１－チオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）を添加することで達成される。細胞のＯＤ５５０が６になったら、ＩＰＴＧの無菌溶液を含有するシリンジを添加して、ＩＰＴＧ濃度を１００μＭにした。ｐＨ上昇によってシグナルされるように、ひとたびグルコースが培養物によって消費されたら、グルコース供給液を１０ｇ／分以下の速度で供給して代謝要求を満たした。溶存酸素制限が確立された後、固定時点において、温度を３４℃から３７℃に１時間かけて上昇させた。グルコース上の最大累積イソブレン質量収率を判定するのに十分長い時間、典型的に、合計６４時間の経過発酵時間（ＥＦＴ）にわたり、発酵を実行した。表３－２は、処理条件を示す。

【０３８４】

【表１０】

表 3-2:工程条件

使用された株	バッチ [IPTG] (μM)	およそEFT8時間目の ボーラス添加後の標的 [IPTG] (μM)	供給ボトル内の標的 [IPTG] (μM)
MCS922	1.4	100	100
MCM2732	1.4	100	100

【0385】

発生気体中のイソプレン、酸素、窒素、および二酸化炭素レベルは、Hiden HPR20 (Hiden Analytical) 質量分光計によって独立して判定された。

【0386】

発酵プロセス中の溶存酸素は、Hamilton Companyによって提供される光学センサー付きの清潔な滅菌適性プローブによって測定される。

【0387】

発酵槽プロセス中のクエン酸、グルコース、酢酸、およびメバロン酸濃度は、4時間間隔で収集されるプロセスサンプル中で、HPLC分析によって判定された。プロセスサンプル中の濃度は、既知濃度の標準物質を使用してあらかじめ作成された検量線に対する、屈折率応答の比較によって判定された。

【0388】

HPLC情報は、次のとおり：装置：Waters Alliance 2695；カラム：BioRad-Aminex HPLC-87H Ion Exclusion Column 300mm×7.8mm カタログ番号125-0140カラム温度：50℃；ガードカラム：BioRad-Microguard Cation Hrefill 30mm×4.6mmカタログ番号125-0129ランニング緩衝液：0.01N H₂SO₄；ランニング緩衝液流速：0.6mL/分；近似ランニング圧力：約1100～1200psi；注入容積：20マイクロリットル；検出器：屈折率（Knaue K-2301；）実行時間：26分間。

【0389】

II. 結果

イソプレン生産性計量（および値が取得された場合はEFT）は、表3-3に示される。

【0390】

【表11】

表3-3:イソプレン生産性

株名称	グルコース上のイソブレン累積% 収率 (g/g %)	最大 総イソブレン 収率時間 における 総イソブレン 容積生産性 (g/L/hr)	最大光学 濃度 (A550)	最大 総イソブレン 収率時間 におけるCPI (全g イソブレン/ 全gDCW)	ピーク比生 産性 (mg イソブレン /L/hr/OD)	グルコース 上のイソブ レンの ピーク瞬間 収率 (g/g %)	イソブレン力 価 (グラム イソブレン/ リットル単位 のタンク プロセスの 平均容積)
MCS 1227	18.61 (60時間)	2.00 (60時間)	113.9 (32時間)	3.03 (60時間)	37.2 (28時間)	22.6 (40.4時間)	120.1 (60時間)
MCM 2732	19.64 (60時間)	2.34 (60時間)	99.6 (24時間)	3.53 (60時間)	47.0 (28時間)	23.8 (48時間)	140.3 (60時間)

【0391】

経時的にそれぞれ15Lの発酵中で測定された酢酸のプロセス濃度は、図3に示される。yfiQ (MCM2732) が欠失した実験的細胞は、yfiQについて野性型である対照細胞よりも低い酢酸のプロセス濃度で終了した。酢酸のプロセス濃度は、HPLCによって評価された。

【0392】

それぞれ15Lの発酵中で経時的に測定されたグルコース比取り込み速度は、図4に示される。yfiQ欠失を保有する実験的細胞 (MCM2732) は、yfiQについて野性型である対照細胞よりも高いグルコース比取り込み速度を一貫して示す。より低い酢酸のプロセス濃度は、おそらくより高いグルコース比取り込み速度の駆動機構であり、それは

次により高い容積生産性を駆動する（図5に示される）。平滑化グルコース比取り込み速度は、次式を使用して計算された：

グルコース比取り込み速度（ g/L/hr/OD ）＝毎時グラムグルコース摂取勾配（8時間にわたる平均化）／ブロス容積×OD

【0393】

それぞれ15Lの発酵中で経時的に得られた容積生産性は、図5に示される。y f i Q欠失（MCM2732）を保有する実験的細胞は、y f i Qについて野性型である対照細胞よりも高いグルコース上のイソプレレン容積生産性で終了する。64時間の時点が使用されて、上記表3-3に値が代入された。容積生産性は、次式を使用して計算された：

容積生産性（ g/L/hr ）＝ $[\Sigma (\text{I s p E R} (t) / 1000 * 68.117)] / [t - t_0]$ 、式中、総和は、 $t_0 \sim t$ に由来し、I s p E Rはイソプレレン放出速度である。タンク所要時間は、計算に含まれない。

【0394】

それぞれ15Lの発酵中で経時的に得られたグルコース上のイソプレレン累積収率は、図6に示される。y f i Q欠失（MCM2732）を保有する実験的細胞は、y f i Qについて野性型である対照細胞よりも高いグルコース上のイソプレレン累積収率で終了する。MCM2732でより低いブロス酢酸は、より低い炭素の損失を表すが、効率向上は、酢酸炭素損失の再捕捉によって説明される得るものを上回る。64時間の時点が使用されて、上記表3-3に値が代入された。全収率は、次式を使用して計算された：

グルコース上の%重量収率＝イソプレレン合計（ t ）／ $[(\text{供給重量}(0) - \text{供給重量}(t) + 83.5) * 0.59]$ 、

式中、0.59はグルコース供給液中のグルコースの重量%であり、83.5は $t = 0$ で発酵槽内にバッチ添加された供給物のグラム数である。各供給物は、その重量%が独立して測定された。

【0395】

各15Lの発酵中で経時的に得られた細胞性能指数（C P I）は、図7に示される。y f i Q欠失を保有する実験的細胞（MCM2732）は、y f i Qについて野性型である対照細胞よりも高い細胞性能指数で終了する。64時間の時点が使用されて、上記表3-3に値が代入された。C P Iは、次式を使用して計算された：

C P I＝総グラムイソプレレン／総グラム乾燥細胞重量

【0396】

各15Lの発酵中で経時的に得られた平滑化イソプレレン比生産性は、図8に示される。y f i Q欠失を保有する実験的細胞（MCM2732）は、y f i Qについて野性型である対照細胞よりも高いピーク比生産性を示す。これは、おそらくより高いグルコース比取り込み速度によって駆動される。64時間の時点が使用されて、上記表3-3に値が代入された。平滑化イソプレレン比生産性は、次式を使用して計算された：

比生産性（ mg/L/hr/OD ）＝ $\text{I s p E R} * 68.117 \text{ g/mol/OD}$ 。I s p E Rは、（ mmol/L/hr ）単位のイソプレレン放出速度である。OD＝光学濃度＝550nmにおける吸光度×水中希釈係数。

平滑化比生産性（ mg/L/hr/OD ）＝イソプレレン毎時生成ミリグラム（8時間間隔で平均化した）の勾配／ブロス容積×OD。

【0397】

これらのアッセイの結果は、y f i Q欠失が、イソプレレン産生過程においてブロス中に酢酸を蓄積しない株（MCM2732）をもたらすことを示唆する（図3）。MCM2732は、発酵稼働全体を通じて、一貫して低い酢酸ブロス濃度を保つ。おそらく、そして理論に束縛されることなく、これはy f i Qをコードする遺伝子が欠失しており、アセチルC o Aシンセターゼのアセチル化に低下がもたらされるためである。低下したアセチルC o Aシンセターゼのアセチル化は活性を保ち、酢酸をブロスから自由に取り込むことができる。対照的に、対照細胞MCS1227は約6g/Lの酢酸を蓄積し、これはa c k A欠失を保有するイソプレレン産生細胞に起こることの典型例である。おそらく、そして理

10

20

30

40

50

論に束縛されることなく、これは、酢酸がひとたび細胞から出ると、このポリペプチドをコードする遺伝子が欠失しているために、それが酢酸キナーゼに再度取り込まれ得ないという事実のためである。結論として、y f i Q 欠失 (MCM2732 染色 (stain)) は、より高いグルコース比取り込み速度をもたらした (図4)、それは次にイソプレレン能力に対していくつかの有益な効果を有する (図5)。

【0398】

実施例4：酢酸と共に培養された細胞内の増殖速度およびイソプレレン生産に対する y f i Q 欠失の効果

実施例は、細胞が酢酸存在下で培養された際における、細胞増殖速度およびイソプレレン生産に対する y f i Q の欠失効果を探索する。

10

【0399】

I. 材料と方法

LB 培地、酵母抽出物および MgSO₄ 非含有 TM3 培地、10% 酵母抽出物、1M の MgSO₄、50% グルコース、200mM の IPTG、50mg/mL スペクチノマイシン、50mg/mL カルベニシリン、10% 硫酸、および 100mM の Tris、100mM の NaCl、pH7.6 緩衝液は、社内で製された。アルミホイルシール、48 ウェル滅菌 5mL ブロック、Breathe Easier シールメンブレン、96 ウェルマイクロタイタープレートは、VWR から購入された。96 ウェルガラスブロックは、Zinsser Analytical から購入された。酢酸ナトリウムは、Sigma から購入された。Agilent 6890 GC には 5973 N 質量分光計が装着された。実施例で使用されたイソプレレン産生細胞の概要は、表4-1にある。

20

【0400】

【表12】

表 4-1: イソプレレン産生細胞の概要

株 名称	遺伝子型
MCM2732	MD891 + FRT-kan-FRT::YfiQ FRT-cmp-FRT::PL2-pta pMCS1019 pMCM1225
MCS1316	MD891 + FRT::PL2-pta pMCS1019 pMCM1225

30

【0401】

一晚培養物は、10mL プラスチック試験管内で、適切な抗生物質を添加して、3mL の LB 培地中のグリセロール培養原液から直接調製された。一晚培養物は、30℃、220rpm で培養された。

【0402】

補足 TM3 培地は、TM 培地、(MgSO₄ および酵母抽出物非含有) 1% グルコースまたは様々な濃度の酢酸ナトリウム、8mM の MgSO₄、0.02% 酵母抽出物および妥当な抗生物質を組み合わせることで調製された。一晚培養物を補足 TM3 培地中に 0.2 光学濃度 (OD) で接種することで、48 ウェル滅菌ブロック内で 2mL の 1 日培養物を調整した。ブロックを Breathe Easier メンブレンで密封し、600rpm および 34℃ で、2 時間培養した。2 時間の増殖後、マイクロタイタープレート内で OD が 600nm で測定され、細胞は 200μM の IPTG によって誘導された。OD 読み取りおよびイソプレレン比生産性サンプルは、誘導の 2~6 時間後から採取された。OD 測定は、SpectraMax Plus 190 (Molecular Devices) を使用して、TM3 培地中で適切に希釈して、600nm でマイクロタイタープレート内で実施された。

40

【0403】

IPTG 誘導の 4 時間後、1 時間毎に、100μl のイソプレレンサンプルが 96 ウェル

50

ガラスブロック内に収集された。ガラスブロックはアルミホイルで密封されて、ThermoMixer上で450rpmで振盪しながら34℃で30分間培養された。30分後、ブロックを70℃水浴上に2分間保ち、GC/MS内でイソプレンヘッドスペース測定を実施した。

【0404】

II. 結果

唯一の炭素源として様々な濃度の酢酸上で培養された野性型およびΔyfiQイソプレン産生細胞増殖速度が、図9に示される一方で、イソプレン比生産性は、図10に示される。対照的に、この条件セットで、唯一の炭素源としてグルコースを使用して培養された野性型およびΔyfiQイソプレン産生細胞増殖速度は、図11に示される一方で、イソ
10 プレン比生産性は、図12に示される。

【0405】

実施例5：細胞内のイソプレノイド生産に対するyfiQ遺伝子欠失の影響

本実施例は、メバロン酸経路およびピロリン酸ファルネシル (FPP) シンターゼ (例えば、大腸菌 (E. coli) のためにコドン最適化されたファルネセンシンターゼ (配列番号26) または大腸菌 (E. coli) のためにコドン最適化されたアモルファジエンシンターゼ (配列番号25)) ; ピロリン酸ゲラニルシンターゼ ; またはゲラニルゲラニルピロリン酸シンターゼからの導入遺伝子を発現する、15L規模の流加培養中で培養された改変大腸菌 (E. coli) 細胞を使用して、イソプレノイド生産を評価するために実施される。この実験中の細胞株は、酢酸キナーゼ (AckA) ポリペプチドをコード
20 する遺伝子に欠失を保有して、M. hominis (M. hominis) ホスホクトラゼを発現する。さらに、どちらもホスホトランスアセチラーゼ (pta) を過剰発現する。

【0406】

これらのイソプレノイド産生細胞には、同一処理が実施された。対照細胞の能力計量は、yfiQリジンアセチルトランスフェラーゼが欠失しているまたはcobBデアセチラーゼの発現が増大している実験的細胞と比較される。関連能力計量は、上グルコースの累積イソプレノイド収率、イソプレノイド容積生産性、および細胞性能指数である。

【0407】

I. イソプレノイド産生細胞の構築

標準技術を使用して、ピロリン酸ファルネシル (FPP) シンターゼ (例えば、大腸菌 (E. coli) のためにコドン最適化されたファルネセンシンターゼ (配列番号26) または大腸菌 (E. coli) のためにコドン最適化されたアモルファジエンシンターゼ (配列番号25)) ; ピロリン酸ゲラニルシンターゼ ; またはゲラニルゲラニルピロリン酸シンターゼ遺伝子が、pMCS1019またはpEWL1421のどちらかに、ispSの代わりにクローン化される。得られたプラスミドは、pMCM1225と共に宿主株に同時形質転換される。宿主株の部分的一覧は、表5に記載される。
30

【0408】

【表 1 3】

表 5:宿主株の概要

宿主株	遺伝子型
MCM2721	MD891 + YfiQ::FRT-kan-FRT
MCM2722	MCM2721 kan ループアウトあり
MCM2736	MD891 + CobB::FRT-kan-FRT
MCM2740	MD891 + FRT-kan-FRT-gil.6-YfiQ
MCM2742	MD891 + FRT-kan-FRT-gil.6-CobB (BL21 ATG)
MCM2754	MCM2736 kan ループアウトあり
MCM2760	MCM2740 kan ループアウトあり
MCM2764	MCM2742 kan ループアウトあり
MCM2801	CTO pgl- FRT-PL.2-2cis-RBS10000-MVK(burtonii) yfiQ::FRT-kan-FRT クローン A
MCM2804	CTO pgl- FRT-PL.2-2cis-RBS10000-MVK(burtonii) yfiQ::FRT クローン 1
MCM3083	CTO pgl- FRT-PL.2-2cis-RBS10000-MVK(burtonii) yfiQ::FRT pta::FRT-kanR-FRT クローン A
MCM3139	CTO pgl- FRT-PL.2-2cis-RBS10000-MVK(burtonii) yfiQ::FRT pta::FRT-kanR-FRT クローン A FRT-cmp5-FRT::gil.6-ac
MD1243	CTO pgl- FRT-PL.2-2cis-RBS10000-MVK(burtonii) yfiQ::FRT pta::FRT クローン A, FRT::gil.6-ac, i actP::ML
DW1242	CTO pgl- FRT-PL.2-2cis-RBS10000-MVK(burtonii) yfiQ::FRT pta::FRT クローン A, FRT::gil.6-ac, i gil.6ackA
MD1280	CTO pgl- FRT-PL.2-2cis-RBS10000-MVK(burtonii) pta::FRT クローン A, FRT::Gil.6-ac, i yfiQ::Gil.2-rpe_tktA_rpiA_talB ML
MD1281	CTO pgl- FRT-PL.2-2cis-RBS10000-MVK(burtonii) pta::FRT クローン A, FRT::Gil.6-ac, i pfkA_tag T ML, i yfiQ::Gil.2-rpe_tktA_rpiA_talB ML
MD1282	CTO pgl- FRT-PL.2-2cis-RBS10000-MVK(burtonii) pta::FRT クローン A, FRT::Gil.6-ac, i pfkA_tag I ML, i yfiQ::Gil.2-rpe_tktA_rpiA_talB ML
MD1283	CTO pgl- FRT-PL.2-2cis-RBS10000-MVK(burtonii) pta::FRT クローン A, FRT::Gil.6-ac, i pfkA_tag R ML, i yfiQ::Gil.2-rpe_tktA_rpiA_talB ML

【0409】

I I. 材料と方法

培地レシピ（発酵培地 1 リットルあたり）：7.5 g の K_2HPO_4 、2 g の $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、2 g のクエン酸一水和物、0.3 g のクエン酸第二鉄アンモニウム、0.5 g の酵母抽出物、1.6 mL の 50% 硫酸、1 mL の 1000× 修正微量金属溶液。全ての成分を合わせて DiH_2O に溶解する。この溶液を加熱滅菌する（123℃で20分間）。水酸化アンモニウム（28%）によって pH を 7.0 に調節し、所定容積にする

。滅菌およびpH調節後に、10gのグルコース、8mLのビタミン溶液、および抗生物質を添加する。

【0410】

1000×修正微量元素溶液（1リットルあたり）：40gのクエン酸・H₂O、30gのMnSO₄・H₂O、10gのNaCl、1gのFeSO₄・7H₂O、1gのCoCl₂・6H₂O、1gのZnSO₄・7H₂O、100mgのCuSO₄・5H₂O、100mgのH₃BO₃、100mgのNaMoO₄・2H₂O。各成分をD₂Oに1つずつ溶解して、HCl/NaOHでpHを3.0に調節し、次に溶液を所定容積にして、0.22ミクロンフィルターで濾過滅菌する。

【0411】

ビタミン溶液（1リットルあたり）：1.0gの塩酸チアミン、1.0gのD-（+）-ビオチン、1.0gのニコチン酸、4.0gの塩酸ピリドキシン。各成分をD₂Oに1つずつ溶解して、HCl/NaOHでpHを3.0に調節し、次に溶液を所定容積にして、0.22ミクロンフィルターで濾過滅菌する。

【0412】

マクロ塩溶液（1リットルあたり）：296gのMgSO₄・7H₂O、296gのクエン酸一水和物、49.6gのクエン酸第二鉄アンモニウム。全ての成分を水に溶解して所定容積にし、0.22ミクロンフィルターによって濾過滅菌する。

【0413】

供給液（1キログラムあたり）：0.590kgのグルコース、0.393kgのD₂H₂O、7.4gのK₂HPO₄、および8.9gの100%Foamblast 882。全ての成分を共に混合し、高圧蒸気滅菌する。供給液の高圧蒸気滅菌後、クリーンベンチ内で栄養素補給剤を供給ボトルに入れる。供給物への滅菌後添加物は（供給液1キログラムあたり）、5.54mLのマクロ塩溶液、6.55mLのビタミン溶液、0.82mLの1000×修正微量元素溶液である。100μMのIPTG標的：供給物1キログラムあたり1.87mLの無菌10mg/mL溶液を添加する。

【0414】

この実験は、所望の発酵pH（7.0）および温度（34℃）における、グルコースからのイソプレノイド生産をモニターするために実施される。各実験を開始するために、適切な大腸菌（E. coli）イソプレノイド産生細胞の冷凍バイアルを解凍し、トリプトン酵母抽出物（LB）培地および適切な抗生物質と共に、フラスコに接種する。550nm（OD₅₅₀）における測定で、ほぼ1.0の光学濃度に増殖した後に、500mLを使用して15Lバイオリアクターに接種し、初期タンク容積を5Lにする。

【0415】

バイオリアクター背圧を0.7バールゲージに維持し、細部に酸素を提供するのに使用される入口ガスは、入口ガスを既知の濃度（7.3～8.3容積%の酸素）に希釈する、工場内設備によって提供される。

【0416】

バッチ添加される培地には、グルコースが9.7g/Lでバッチ添加される。誘導は、イソプロピルーβ-D-1-チオガラクトピラノシド（IPTG）を添加することで達成される。細胞のOD₅₅₀が6になったら、IPTGの無菌溶液を含有するシリンジを添加して、IPTG濃度を100μMにする。pH上昇によってシグナルされるように、ひとたびグルコースが培養物によって消費されたら、グルコース供給液を10g/分以下の速度で供給して代謝要求を満たす。溶存酸素制限が確立された後、固定時点において、温度を34℃から37℃に1時間かけて上昇させる。グルコース上の最大累積イソプレノイド質量収率を判定するのに十分長い時間、典型的に、合計64時間の経過発酵時間（EFT）にわたり、発酵を実行する。

【0417】

発生気体中のイソプレノイド、酸素、窒素、および二酸化炭素レベルは、Hiden HPR20（Hiden Analytical）質量分光計によって独立して判定され

10

20

30

40

50

る。発酵プロセス中の溶存酸素は、Hamilton Companyによって提供される光学センサー付きの清潔な滅菌適性プローブによって測定される。発酵槽プロセス中のクエン酸、グルコース、酢酸、およびメバロン酸濃度は、4時間間隔で収集されるプロセスサンプル中で、HPLC分析によって判定される。プロセスサンプル中の濃度は、既知濃度の標準物質を使用してあらかじめ作成された検量線に対する、屈折率応答の比較によって判定される。

【0418】

HPLC情報は、次のとおり：装置：Waters Alliance 2695；カラム：BioRad-Aminex HPLC-87H Ion Exclusion Column 300mm×7.8mm カタログ番号125-0140カラム温度：50℃；ガードカラム：BioRad-Microguard Cation Hrefill 30mm×4.6mmカタログ番号125-0129ランニング緩衝液：0.01N H₂SO₄；ランニング緩衝液流速：0.6mL/分；近似ランニング圧力：約1100～1200psi；注入容積：20マイクロリットル；検出器：屈折率（Knaue r K-2301；）実行時間：26分間。

【0419】

実施例6：酢酸循環株の構築

本実施例は、酢酸循環、酢酸生産、およびアセチルCoA生産の調節に関与する遺伝子に追加的な変異を含有する株の構築を記載する。この実施例は、ホスホトランスアセチラーゼ（pta）の欠失およびyfiQ遺伝子の欠失を保有する、株の構築を記載する。

【0420】

I. CMP400の構築

GeneBridgesプロトコルを使用して、クロラムフェニコール耐性標識された構成的gil.6プロモーターが、acs遺伝子の前に挿入された。FRT-gb2-cm-FRTカセットは、プライマーacsAUpKD3およびacsADnGI1.6pKD3Rを使用して、GeneBridgesによって提供されるプラスミドからPCR増幅された。得られたPCR産物FRT-cmp-FRT::gil.6-acsisは、GeneBridgesプロトコルに従ってpRedETプラスミドを保有するHMB株に変換され、組換え体はLBcmp5プレート上で37℃で選択された。HMB遺伝子型：BL21重量、pgl+tPL.2-mKKDyI::FRT。コロニーはcmpRおよびcarbSであることが確認され、次にCMP400として冷凍された。

【0421】

【表14】

表6-1:プライマー配列

acsAUpKD3	tcacgacagtaaccgcacctacactgtcatgacattgctcgcccctatgtgtaacaaa taaccacactgcccattggtccatgaatatcctcc	配列番号59
acsADnGI1.6pKD3R	caacggctgcgatgttggcaggaatgggtgtgttgaatttggtcatatataaattcc tcctgctattttagtgaataaaagtgggtgaattatttgcgcaggatgtggcattgtca agggcgtgtaggctggagctgcttcg	配列番号60

【0422】

II. MD803の構築

4.429kbのPCRフラグメントPta::Kanは、プライマーCMP534およびCMP535を使用して、Keioコレクションから増幅された。このPCR産物のおよそ300ngが使用されて、宿主株CMP1141（HMB Gil.2gl tA yhfSFRTPy d d V I s p A y h f S t h i F R T t r u n c I s p A p g l M L (p g l (-)) + p R e d E T A m p) に組み込まれた。形質転換体は、LA+Kan10プレート上で37℃で選択された。変異体は、その後、同一のセットプ

ライマーによって確認された。得られた株は、MD803 (CMP1141 + i p t a : : K a n) と命名された。

【0423】

【表15】

表 6-2:プライマー配列

CMP534	ackACF	gtgcaaattcacaactcagegg	配列番号 61
CMP535	PtaCR	caccaacgtatcgggcattgc	配列番号62

【0424】

III. MCM3151の構築

MCM2065株 (BL21、ΔpglPL. 2mKKDyl、GI1. 2gl t A、y h f S F R T P y d d V I s p A y h f S、t h i F R T t r u n c I s p A、b M V K) は、標準法を使用して、MCM2722 (実施例1) のP1溶解産物で形質導入されたy f i Q : : k a n R被形質導入体が、LB kan10プレート上で37℃で一晩選択された。被形質導入体は再度画線塗抹され、PCRによって確認された。この株は、LB kan10中で培養されて、MCM2801として冷凍された。kanRマーカーは、プラスミドpCP20の形質転換によってループアウトされ (www. c g s c . b i o l o g y . y a l e . e d u / S i t e . p h p ? I D = 6 4 6 2 1 を参照されたい) 、LB carb50上で30℃で一晩選択され、液体LB carb50中における37℃で見かけ上濁るまでの単一コロニーの継代培養がそれに続いた。培養物は抗生物質非含有LB上に画線塗抹されて、37℃で一晩培養された。単一コロニーは、抗生物質含有および非含有プレートにパッチに植えられて、carbS、kanSコロニーが同定された。PCRを使用して、野生型ackA遺伝子座と未標識のΔy f i Q遺伝子座の存在が確認された。このコロニーは、LB中で37℃で培養されて、MCM2804として冷凍された。MD803からのP1溶解産物を使用して、MCM2804がp t a : : F R T - k a n - F R Tで形質導入され、被形質導入体は、LB kan10プレート上で37℃で一晩選択された。コロニーは、LB kan10上に再度画線塗抹され、液体ブロス中で培養されて、MCM3803と同様に冷凍された。P1溶解産物はMCS1388上で培養され、CMP400のサブクローンを使用して、MCM3803がF R T - c m p - F R T : : g i . 6 - a c sで形質導入された。被形質導入体は、LB cmp5プレート上で37℃で一晩選択された。コロニーはLB cmp5上に画線塗抹されて一晩培養され、次に得られた単一コロニーを使用して、液体培養が接種された。この培養物は、MCM3139として冷凍された。プラスミドpMCM1225およびpMCS1019は、MCM3139に同時電気穿孔されて、形質転換体は、37℃で一晩培養されたLB carb50 spec50プレート上で選択された。単一コロニーは、液体LB carb50 spec50中で37℃で培養され、MCM3151として冷凍された。

【0425】

10

20

30

【表 1 6】

表 6-3:細胞の説明

MCM #	遺伝子型	親
MCM2801	CTO pgl- FRT-PL.2-2cis-RBS10000-MVK(burtonii) yfiQ::FRT-kan-FRT クローン A	MCM2065
MCM2804	CTO pgl- FRT-PL.2-2cis-RBS10000-MVK(burtonii) yfiQ::FRT クローン 1	MCM2801
MCM3083	CTO pgl- FRT-PL.2-2cis-RBS10000-MVK(burtonii) yfiQ::FRT pta::FRT-kanR-FRT クローン A	MCM2804
MCM3139	CTO pgl- FRT-PL.2-2cis-RBS10000-MVK(burtonii) yfiQ::FRT pta::FRT-kanR-FRT クローン A FRT-cmp5-FRT::gil.6-ac	MCM3083
MCM3151	CTO pgl- FRT-PL.2-2cis-RBS10000-MVK(burtonii) yfiQ::FRT pta::FRT-kanR-FRT クローン A FRT-cmp5-FRT::gil.6-ac + pMCS1019 + pMCM1225	MCM3139

10

【0 4 2 6】

I V. イソプレレン産生細胞MD1206 (M. ホミニス (M. h o m i n i s) ホスホケトラーゼ) およびMD1207 (E. g a l ホスホケトラーゼ) の構築

20

MCM3139は、接種されて一晩培養された。培養物は希釈されて、OD0.8~1.0に培養され、次に洗浄されて、プラスミドpCP20で電気穿孔された(www.cgs.cbiology.yale.edu/Site.php?ID=64621を参照されたい)。培養物は、30℃で1時間回復された。形質転換体はLA+Carb50プレート上で選択されて、30℃で一晩培養された。得られたCmRマーカー非含有株は、MD1205 (CTO pgl-FRT-PL.2-2cis-RBS10000-MVK(burtonii) yfiQ::FRT pta::FRT clone A, FRT::gil.6-ac)と命名された。MD1205は、pMCM1225およびpMCS1019で同時形質転換されてMD1206が生成し、またはpMCM1225およびpEWL1421で同時形質転換されて、MD1207が生成された。形質転換体は、LA+Spec50+Carb50プレート上で選択された。

30

【0 4 2 7】

【表 1 7】

表 6-4:細胞の説明

MCM3139	CTO pgl- FRT-PL.2-2cis-RBS10000-MVK(burtonii) yfiQ::FRT pta::FRT-kanR-FRT クローン A FRT-cmp5-FRT::gil.6-ac
MD1205	CTO pgl- FRT-PL.2-2cis-RBS10000-MVK(burtonii) yfiQ::FRT pta::FRT クローン A, FRT::gil.6-ac
MD1206	CTO pgl- FRT-PL.2-2cis-RBS10000-MVK(burtonii) yfiQ::FRT pta::FRT クローン A, FRT::gil.6-ac + pMCM1225 + pMCS1019
MD1207	CTO pgl- FRT-PL.2-2cis-RBS10000-MVK(burtonii) yfiQ::FRT pta::FRT クローン A, FRT::gil.6-ac + pMCM1225 + pEWL1421

40

【0 4 2 8】

実施例 7 : 実施例 6 株のイソプレレン収率に対する効果

本実施例は、ホスホトランスアセチラーゼ (pta) の欠失および y f i Q 遺伝子の欠失を保有する細胞内で、イソプレレン生産測定する。細胞の詳細は、表 7-1 に提供される。

【0 4 2 9】

50

y f i Qの欠失および a c s 構成的活性型がある M C M 2 7 3 2 株は、酢酸再取り込みおよびイソプレン生産の改善を示した。改善された酢酸再取り込みは、a c k A 除去株に関連する酢酸蓄積を顕著に低下させ、ならびにイソプレン比生産性を増大させて、生存度を改善させ、稼働の生産的部分を延長し、それはイソプレン力価を増大させた。本実施例は、p t a を欠失させ、それによってホスホケトラゼ流動 (A c P からイソプレンへ) を増大させることで、酢酸再取り込み向上させる、M C M 3 1 5 1、M D 1 2 0 6、および M D 1 2 0 7 を使用する (図 2 8)。

【 0 4 3 0 】

【表 1 8】

表 7-1: 実施例で使用された細胞

	宿主	上流経路 プラスミド	イソプレンシンターゼ / ホスホケトラゼプラスミド
MD1207	CTO pgl bLP GII.6acsA pta-	IPTG誘導性Ptrc発現 <i>E. ガリナーラム</i> (<i>E.gallinarum</i>) mvaE, mvaS (pMCM1225 Spec 50)	IPTG誘導性 (pTrc IspS <i>E. gal</i> PKL) (Carb 50)
MD1206	CTO pgl bLP GII.6acsA pta-	IPTG誘導性Ptrc発現 <i>E. ガリナーラム</i> (<i>E.gallinarum</i>) mvaE, mvaS (pMCM1225 Spec 50)	IPTG誘導性 (pTrc IspS <i>M.ホミニス</i> (<i>M.hominis</i>) PKL) (Carb 50)
MCM3151	CTO pgl bLP GII.6acsA:: Chlor pta::Kan	IPTG誘導性Ptrc発現 <i>E. ガリナーラム</i> (<i>E.gallinarum</i>) mvaE, mvaS (pMCM1225 Spec 50)	IPTG誘導性 (pTrc IspS <i>M.ホミニス</i> (<i>M.hominis</i>) PKL) (Carb 50)
MCM2732 (対照細胞)	MD891 + FRT-kan- FRT::yfiQ FRT-cmp- FRT::PL.2- pta	IPTG誘導性Ptrc発現 <i>E. ガリナーラム</i> (<i>E.gallinarum</i>) mvaE, mvaS (pMCM1225 Spec 50)	IPTG誘導性 (pTrc_IspS_RBS3_PKL16 [<i>M.ホミニス</i> (<i>M.hominis</i>)]) (pMCS1019, Carb 50)

【 0 4 3 1 】

I. 材料と方法

培地レシピ (発酵培地 1 リットルあたり) : 7. 5 g の K_2HPO_4 、2 g の $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、2 g のクエン酸一水和物、0. 3 g のクエン酸第二鉄アンモニウム、0. 5 g の酵母抽出物、1. 6 mL の 50 % 硫酸、1 mL の 1000 × 修正微量金属溶液。全
 40
 での成分を合わせて DiH_2O に溶解した。この溶液を加熱滅菌した (123 °C で 20 分間)。水酸化アンモニウム (28 %) によって pH を 7. 0 に調節し、所定容積にした。滅菌および pH 調節後に、10 g のグルコース、8 mL のビタミン溶液、および抗生物質を添加した。

【 0 4 3 2 】

1000 × 修正微量金属溶液 (1 リットルあたり) : 40 g のクエン酸 $\cdot H_2O$ 、30 g の $MnSO_4 \cdot H_2O$ 、10 g の $NaCl$ 、1 g の $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、1 g の $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 、1 g の $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 、100 mg の $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 、100 mg の H_3BO_3 、100 mg の $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 。各成分を DiH_2O に
 50
 1 つずつ溶解して、 $HCl/NaOH$ で pH を 3. 0 に調節し、次に溶液を所定容積にし

て、0.22ミクロンフィルターで濾過滅菌した。

【0433】

ビタミン溶液（1リットルあたり）：1.0gの塩酸チアミン、1.0gのD-（+）-ビオチン、1.0gのニコチン酸、4.0gの塩酸ピリドキシン。各成分をD_iH₂Oに1つずつ溶解して、HCl/NaOHでpHを3.0に調節し、次に溶液を所定容積にして、0.22ミクロンフィルターで濾過滅菌した。

【0434】

マクロ塩溶液（1リットルあたり）：296gのMgSO₄・7H₂O、296gのクエン酸一水和物、49.6gのクエン酸第二鉄アンモニウム。全ての成分を水に溶解して所定容積にし、0.22ミクロンフィルターによって濾過滅菌した。

【0435】

供給液（1キログラムあたり）：0.590kgのグルコース、0.393kgのD_iH₂O、7.4gのK₂HPO₄、および8.9gの100%Foamblast 882。全ての成分を混ぜ合わせて、高圧蒸気滅菌した。供給液の高圧蒸気滅菌後、クリーンベンチ内で栄養素補給剤を供給ボトルに入れる。供給物への滅菌後添加物は（供給液1キログラムあたり）、5.54mlのマクロ塩溶液、6.55mlのビタミン溶液、0.82mlの1000×修正微量金属溶液である。100μMのIPTG標的：供給物1キログラムあたり1.87mlの無菌10mg/ml溶液を添加する。

【0436】

この実験は、所望の発酵pH（7.0）および温度（34℃）における、グルコースからのイソブレン生産をモニターするために実施された。各実験を開始するために、適切な大腸菌（E. coli）イソブレン産生細胞の冷凍バイアルを解凍し、トリプトン酵母抽出物（LB）培地および適切な抗生物質と共に、フラスコに接種した。550nm（OD₅₅₀）における測定で、種菌がほぼ1.0の光学濃度に増殖した後に、500mLを使用して15Lバイオリアクターに接種し、初期タンク容積を5Lにした。

【0437】

バイオリアクター背圧を0.7バールゲージに維持し、細部に酸素を提供するのに使用される入口ガスは、入口ガスを既知の濃度（7.3～8.3容積%の酸素）に希釈する、工場内設備によって提供された。

【0438】

バッチ添加される培地には、グルコースが9.7g/Lでバッチ添加された。誘導は、イソプロピルーβ-D-1-チオガラクトピラノシド（IPTG）を添加することで達成される。細胞のOD₅₅₀が6になったら、IPTGの無菌溶液を含有するシリンジを添加して、IPTG濃度を100μMにした。pH上昇によってシグナルされるように、ひとたびグルコースが培養物によって消費されたら、グルコース供給液を10g/分以下の速度で供給して代謝要求を満たした。溶存酸素制限が確立された後、固定時点において、温度を34℃から37℃に1時間かけて上昇させた。グルコース上の最大累積イソブレン質量収率を判定するのに十分長い時間、典型的に、合計64時間の経過発酵時間（EFT）にわたり、発酵を実行した。表7-2は、処理条件を示す。

【0439】

【表19】

表7-2 工程条件

使用された株	バッチ [IPTG] (μM)	およそ EFT6~8 時間目のボーラス 添加後の標的 [IPTG] (μM)	供給ボトル内の標的 [IPTG] (μM)
MCS922	1.4	100	100
MCM2732	1.4	100	100

【0440】

発生気体中のイソプレン、酸素、窒素、および二酸化炭素レベルは、Hiden HPR20 (Hiden Analytical) 質量分光計によって独立して判定された。

【0441】

発酵プロセス中の溶存酸素は、Hamilton Companyによって提供される光学センサー付きの清潔な滅菌適性プローブによって測定される。

【0442】

発酵槽プロセス中のクエン酸、グルコース、酢酸、およびメバロン酸濃度は、4時間間隔で収集されるプロセスサンプル中で、HPLC分析によって判定された。プロセスサンプル中の濃度は、既知濃度の標準物質を使用してあらかじめ作成された検量線に対する、屈折率応答の比較によって判定された。

10

【0443】

HPLC情報は、次のとおり：装置：Waters Alliance 2695；カラム：BioRad-Aminex HPLC-87H Ion Exclusion Column 300mm×7.8mm カタログ番号125-0140カラム温度：50℃；ガードカラム：BioRad-Microguard Cation Hrefill 30mm×4.6mmカタログ番号125-0129ランニング緩衝液：0.01N H₂SO₄；ランニング緩衝液流速：0.6mL/分；近似ランニング圧力：約1100～1200psi；注入容積：20マイクロリットル；検出器：屈折率 (Knauer K-2301；) 実行時間：26分間

【0444】

20

II. 結果

イソプレン生産性計量（および値が取得された場合はEFT）は、表7-3に示される。

【0445】

実験株のptaが欠失しなくても酢酸濃度は低く保たれたので、acs過剰発現は、yfiQ欠失と相まって、（ホスホケトラーゼ経路からの）アセチルリン酸をアセチルCoA（およびイソプレンを生産するメバロン酸経路に）に送るのに十分であったと思われる。

【0446】

MD1207株は、他の新規株と同程度には機能しなかった。この株は、典型的にM. hominis（M. hominis）ホスホケトラーゼと比較して、より高い発現レベルを示すE. gallinarum（E. gallinarum）ホスホケトラーゼを発現するので、これは興味深い。誘導後の遅滞の増大は、より緩慢な増殖速度、およびより長いDO%限界到達時間をもたらし、それによって稼働のピーク生産性および高収率相が短縮された。

30

【0447】

【表 20】

表 7-3:イソプレン生産性

株 名称	グルコース 上のイソプ レン累積% 収率 (g/g %)	最大 総イソプレン 収率時間 における総 イソプレン 容積生産性 (g/L/hr)	最大 光学 濃度 (A550)	最大 総イソプレン 収率時間 におけるCPI (全g イソプレン / 全gDCW)	ピーク比生 産性 (mg イソプレン /L/hr/OD)	グルコース 上のイソプ レンの ピーク 瞬間収率 (g/g %)	イソプレン 力価 (グラム イソプレン / リットル 単位の タンク ブrossの 平均容積)
MD1207	19.40 (60 時間)	2.04 (60時間)	106.7 (32時間)	3.36 (60時間)	43.1 (32時間)	24.5 (52.4時 間)	122.5 (60時間)
MD1206	20.45 (60 時間)	2.55 (60時間)	93.9 (28時間)	3.27 (60時間)	53.4 (28時間)	24.0 (48時間)	153.1 (60時間)
MCM3151	19.24 (60 時間)	2.37 (60時間)	96.6 (36時間)	2.73 (60時間)	50.1 (28時間)	22.8 (40時間)	142.3 (60時間)
MCM2732	19.64 (60 時間)	2.34 (60時間)	99.6 (24時間)	3.53 (60時間)	47.0 (28時間)	23.8 (48時間)	140.3 (60時間)

10

【0448】

20

経時的にそれぞれ15 Lの発酵中で測定された酢酸のブross濃度は、図16に示される。対照および実験の全例で、酢酸のブross濃度は非常に低かった。実験株は、発酵終了時に、わずかにより低い酢酸濃度を有した。

【0449】

それぞれ15 Lの発酵中で経時的に得られたグルコース上のイソプレン累積収率は、図17に示される。ptaが欠失した実験的細胞(MD1206)は、ptaを過剰発現する対照細胞(MCM2732)よりも、グルコース上でより高いイソプレンの累積収率で終了する。60時間の時点が使用されて、上記表7-3に値が代入された。全収率は、次式を使用して計算された：

グルコース上の%重量収率 = イソプレン合計 (t) / [(供給重量 (0) - 供給重量 (t) + 83.5) * 0.59]、

30

式中、0.59はグルコース供給液中のグルコースの重量%であり、83.5はt=0で発酵槽内にバッチ添加された供給物のグラム数である。各供給物は、その重量%が独立して測定された。

【0450】

経時的にそれぞれ15 Lの発酵中で得られたグルコース上のイソプレンの収率（以前の40時間にわたる）は、図18に示される。ptaが欠失した実験的細胞that is for (MD1206)は、ptaを過剰発現する対照細胞(MCM2732)よりも、グルコース上でより高いイソプレンのピーク「40時間」収率で終了する。「40時間」収率は、次式を使用して計算された：

40

グルコース上の%重量収率 = 全イソプレン (t_{initial} - t₄₀) / [(供給重量 (t_{initial} - t₄₀) * 0.59)]、

式中、0.59はグルコース供給液中のグルコースの重量%である。各供給物は、その重量%が独立して測定された。

【0451】

実施例8：追加的な酢酸循環株の構築

本実施例は、酢酸生産、酢酸循環、およびアセチルCoA生産に関与する遺伝子に変異を含有する、追加的な株の構築を記載する。ackA遺伝子は、過剰発現されて酢酸のアセチルCoAへの変換を駆動した。別の株では、actPが欠失し、膜を越える酢酸輸送が最小化された。理論に束縛されることなく、酢酸生産が膜を越える輸送に連動すれば、

50

これは、プロトン勾配の脱共役のために、エネルギー損失をもたらし得ると考えられる。

【0452】

標準分子生物学的技術を使用して、ackAの過剰発現のためのコンストラクトが構築された（配列番号109）。簡単に述べると、シームレスクローニングおよびアセンブリによって、ackAの隣接領域が、対立遺伝子交換カセット中の異種プロモーター（GI 1.2）に融合された（Life Technologies）。actP欠失コンストラクトはまた、同種の隣接領域を対立遺伝子交換カセットに融合させることで生成された（配列番号110）。ackAおよびactPベクター（図19）が単離され、次にMD1205に形質転換されて、それぞれDW1242およびMD1243が生成された。テトラサイクリン耐性について陽性組み込み体を選択されて、未標識欠失株は、5%スクロース上の継代によって同定された。最終的な変異株は、PCRおよび配列決定によって確認された。pMCM1225およびpEWL1421のDW1242への同時形質転換はDW1245を生成し、MD1243への同時形質転換はMD1245を生成した。

【0453】

【表21】

表 8-1:プライマー配列

プライマー名称	配列	配列番号
TS For	tectaattttgttgacactctatcattg	配列番号 63
TS Rev	ccatctgttgagaaataaaagaaaatgcc	配列番号 64
actP Up For	tttatttcaacaagatgggcaggctatcgcatgccatcgtaac	配列番号 65
actP Up Rev	ggagagattacatgatgctgtacctatcgagga	配列番号 66
actP Down For	aagcatcatgtaatctctcccttccccggtcgctga	配列番号 67
actP Down Rev	agtgtcaacaaaaattaggacgtaaccaccatttactgtctgtgga	配列番号 68
actP Test For	ctggcgtagtcgagaagctgcttga	配列番号 69
actP Test Rev	gcatagcggaacatgaatttagagt	配列番号 70
ackA Up For	tttatttcaacaagatggcgagtcagcatagtcacatctgttact	配列番号 71
ackA Up GI Rev	cgggtgatttgttagtggtgaattatttgcacaggtatggcatngtcaagg gcgaatttgacgactcaatgaatatgtact	配列番号 72
ackA Down GI For	accactaaacaaatcaaccgcgttccccggaggtaacctaaaggaggtaa aaaaacatgtcgagtaagtttagtactggttctga	配列番号 73
ackA Down Rev	agtgtcaacaaaaattaggagtaccatgaccagaccttcagc	配列番号 74
ackA Up PL Rev	atcaccgccagtggatttngtcaacaccgccagagataatttatcaccg cagatggttatctgaatttgacgactcaatgaatatgtact	配列番号 75
ackA Down PL For	taaataccactggcggtgatactgagcacatcagcaggacgactgcaaa ggaggtaaaaaaacatgtcgagtaagtttagtactggttctga	配列番号 76
ackA EX Test For	tgcaggcgacggtaacgttcagcat	配列番号 77
ackA EX Test Rev	gtggaagatgatcgccggatcgata	配列番号 78
R6K TS Rev	agtgtcaacaaaaattaggactgtcagccgttaagtgttctgtgt	配列番号 79
actP R6K For	ggtggttacgcagttcaacctgtgatagtagtga	配列番号 80
actP R6K Rev	ggttgaactgcgtaaccaccatttactgtctgtgga	配列番号 81

【0454】

【表 2 2】

表 8-2:株説明

株	説明
MD1243	CTO pgl- FRT-PL.2-2cis-RBS10000-MVK(burtonii) yfiQ::FRT pta::FRT クローンA, FRT::gil.6-ac, i actP::ML
MD1245	CTO pgl- FRT-PL.2-2cis-RBS10000-MVK(burtonii) yfiQ::FRT pta::FRT クローンA, FRT::gil.6-ac, i actP::ML + pMCM1225 + pEWL1421
DW1242	CTO pgl- FRT-PL.2-2cis-RBS10000-MVK(burtonii) yfiQ::FRT pta::FRT クローンA, FRT::gil.6-ac, i gil.6ackA
DW1245	CTO pgl- FRT-PL.2-2cis-RBS10000-MVK(burtonii) yfiQ::FRT pta::FRT クローンA, FRT::gil.6-ac, i gil.6ackA + pMCM1225 + pEWL1421

10

【0 4 5 5】

実施例 9：イソプレレン収率および増殖速度に対する実施例 8 株の効果

本実施例は、y f i Q 遺伝子の欠失および a c t P 欠失または a c k A 過剰発現のどちらかを保有する細胞内で、イソプレレン生産および増殖速度測定した。

【0 4 5 6】

I. 材料と方法

L B 培地、酵母抽出物および M g S O₄ 非含有 T M 3 培地、1 0 % 酵母抽出物、1 M の M g S O₄、5 0 % グルコース、2 0 0 m M の I P T G、5 0 m g / m L スペクチノマイシン、5 0 m g / m L カルベニシリン、アルミホイルシール、4 8 ウェル滅菌 5 m L ブロック、B r e a t h e E a s i e r シールメンブレン、アルミホイルシール、9 6 ウェルマイクロタイタープレート、9 6 ウェルガラスブロックは、Z i n s s e r A n a l y t i c から購入された A g i l e n t 6 8 9 0 G C には 5 9 7 3 N 質量分光計が装着された。

20

【0 4 5 7】

T M 培地 (M g S O₄ および酵母抽出物非含有)、1 % グルコース、8 m M の M g S O₄、0 . 0 2 % 酵母抽出物、および適切な抗生物質を組み合わせることで、補足 T M 3 培地を調製した。一晚培養物を補足 T M 3 培地中に 0 . 2 光学濃度 (O D) で接種することで、4 8 ウェル滅菌ブロック内で 2 m L の 1 日培養を開始した。ブロックを B r e a t h e E a s i e r メンブレンで密封し、6 0 0 r p m および 3 4 °C で、2 時間培養した。2 時間の増殖後、マイクロタイタープレート内で O D が 6 0 0 n m で測定され、細胞は 2 0 0 μ M の I P T G によって誘導された。O D 読み取りは I P T G 誘導後に 4 時間にわたり毎時実施されて、増殖速度が判定された。O D 測定は、S p e c t r a M a x P l u s 1 9 0 (M o l e c u l a r D e v i c e s) を使用して、T M 3 培地中で適切に希釈して、6 0 0 n m でマイクロタイタープレート内で実施された。

30

【0 4 5 8】

I P T G 誘導の 2、3、および 4 時間後に、1 0 0 μ L のイソプレレンサンプルが 9 6 ウェルガラスブロック内に収集された。ガラスブロックはアルミホイルで密封されて、T h e r m o M i x e r 上で 4 5 0 r p m で振盪しながら 3 4 °C で 3 0 分間培養された。3 0 分間後、ブロックを水浴中で 2 分間 7 0 °C に維持し、G C / M S 内でイソプレレンヘッドスペース測定を実施して、比生産性を判定した。

40

【0 4 5 9】

I I. 結果

a c t P 欠失 (M D 1 2 4 5) および a c k A 過剰発現 (D W 1 2 4 5) 細胞は、どちらも対照細胞と比較して、より高い二酸化炭素放出速度 (C E R) を示し、改善された呼吸速度を示す (図 2 0 A ~ D)。どちらの細胞も対照と比較して、改善されたイソプレレン力価および比生産性を示し、a c t P 細胞は、イソプレレン収率の改善を示した (図 2 1 A ~ D)。これらの結果は、酢酸生産および／または酢酸循環周辺の改善を示し、イソプレレン生産のいくつかの異なるパラメータに対する有益な効果を有する。理論により拘束され

50

ることなく、解糖およびホスホケトラゼを通じて流動を最適化することで、この効果を達成することが可能である。

【0460】

実施例10：ペントースリン酸経路調節株の構築

本実施例は、ペントースリン酸経路（PPP）の調節に関与する遺伝子の変異を含有する株の構築を記載する。

【0461】

理論により拘束されることなく、ホスホケトラゼ発現宿主における炭素流の均衡に重要なペントースリン酸経路の4つの遺伝子は、*tktA*、*talB*、*rpe*、および *rp i A* であると考えられる。X5Pに向かう循環炭素を最大化することは、解糖、ペントースリン酸経路、およびホスホケトラゼを介する流動間の配分を最適化し得る。以下に記載されるコンストラクトは、染色体中の *yfiQ* 遺伝子座に、全ての4つの非酸化的ペントースリン酸遺伝子を組み込んで、過剰発現するようにデザインされた。このコンストラクトは、PPPを介した炭素の経路指示を改善する単なる一試行に相当し、これは、このコンストラクトの精密化は、より多くのプロモーター、ターミネーターの追加、遺伝子再配置などによって、ホスホケトラゼを介した流動平衡を保つための最適発現レベルを判定するのを助ける可能性が非常に高い。

10

【0462】

*PfkA*を調節することで、上で論じたPPPの4つの遺伝子の他に、ペントースリン酸経路の調節が達成され得る。理論により拘束されることなく、*PfkA*は、主要な侵入点を制御して解糖中のノードを調節すると考えられ、ホスホケトラゼ（PKL）が適切に機能するためには、ホスホフルクトキナーゼの活性が低下されなくてはならない可能性が高い。これは、利用可能フルクトース-6-リン酸（F6P）を増大させ、別のホスホケトラゼ基質であるキシロース-5-リン酸（X5P）に向かう、ペントースリン酸を介する炭素流を駆動する。

20

【0463】

I. *tktA*、*talB*、*rpe*、および *rp i A* 変異株の構築

PPP遺伝子は最適化されて、*gBlocks*二本鎖の遺伝子断片としてIDTから注文された。全ての4つの遺伝子は、*pCR2.1*ベクター（*Life Technologies*）にTOPOクローン化され、引き続くクローニングに先だって配列決定された。初期ベクターは、*G11.2*または *G11.6*プロモーターおよび相同組換えのための側面に位置する部位を用いて、シームレスアセンブリー（*Life Technologies*）によって構築された。単一オペロン中に全ての4つのPPP遺伝子がある最終的なベクターもまた、シームレスクローニング（*Life Technologies*）によって構築された（図22）（配列番号111）。このプラスミドは、対立遺伝子交換のためにMD1205に形質転換されて、株はテトラサイクリン耐性によって単離された。非依存性株は、5%スクロース耐性によって選択され、適切なゲノム遺伝子座の挿入の存在は、PCRによって確認された。この細胞は、MD1280として冷凍された。MD1280は、*pMCM1225*および *pEWL1421*で同時形質移入されて、MD1284が生成された。

30

40

【0464】

【表 2 3】

表 10-1:プライマー配列

プライマー名称	配列	配列番号
yfiQ DOWN For	tttatttctcaacaagatggggccgattaacatcatccagacgat	配列番号 82
yfiQ DOWN G11.6 Rev	cgggttgatttggttagtggtgaattatttgcgcaggatgtggcattgt caagggctcttgcccaacgcgaggaatcatgagta	配列番号 83
yfiQ DOWN G11.2 Rev	cgggttgatttggttagtggtgaattatttgcgcaggatgtggcatcgt caagggctcttgcccaacgcgaggaatcatgagta	配列番号 84
yfiQ UP GI For	accactaaacaaatcaaccgcgtttcccgaggtaacctaagga ggtaaaaaaacaccggctctccgcagaagtgaccga	配列番号 85
yfiQ UP Rev	actatcaacaggttgaactgcgccgttcgatatgctggctgaacga	配列番号 86
yfiQ Test For	gcatcacgcagctcctggcggaaca	配列番号 87
yfiQ Test Rev	gctgaacgtgaattgagcagtcgct	配列番号 88
rpe R6K For	tacacacataaggaggttcccaatgaaacagtatctgatcgacct agca	配列番号 89
rpe R6K Rev	tattcgaatgtatgctagtggacgtcaatcattactcgtggctcactt tcgccagtca	配列番号 90
tkf R6K For	cactagcatacattcgaataaggaggaataactatgtcatctcgtaa ggaaactggcgaa	配列番号 91
tkf R6K Rev	tatctccttcttgagccgattatcattacagcagctctttggctttcgc gaca	配列番号 92
rpi R6K For	atcggtcaagaaggagatatacatatgacgcaggacgaactga aaaaagcgggt	配列番号 93
rpi R6K Rev	tattcctccttcaggacctttcattatttaacgatcgtttgacgccatc	配列番号 94
tal R6K For	aaggctcctgaaggaggaataaaccatgaccgataaactgaccag cctgcgt	配列番号 95
tal R6K Rev	gaccgggtcattacagcaggtcgccgatcattttctcca	配列番号 96
R6K Plasmid For	cctgctgtaataaccgggtctccgcagaagtgaccgaatga	配列番号 97
R6K Plasmid Rev	ggaacctccttatgtgtgtaaacctttagggtacctccgggaaacg cgggtga	配列番号 98

【 0 4 6 5 】

10

20

30

40

【表 2 4】

表 10-2:株説明

株	説明
MD1280	CTO pgl- FRT-PL.2-2cis-RBS10000-MVK(burtonii) pta::FRT クローン A, FRT::Gil.6-acs, i yfiQ::Gil.2-rpe_tktA_rpiA_talB ML
MD1281	CTO pgl- FRT-PL.2-2cis-RBS10000-MVK(burtonii) pta::FRT クローン A, FRT::Gil.6-acs, i pfkA_tag T ML, i yfiQ::Gil.2-rpe_tktA_rpiA_talB ML
MD1282	CTO pgl- FRT-PL.2-2cis-RBS10000-MVK(burtonii) pta::FRT クローン A, FRT::Gil.6-acs, i pfkA_tag I ML, i yfiQ::Gil.2-rpe_tktA_rpiA_talB ML
MD1283	CTO pgl- FRT-PL.2-2cis-RBS10000-MVK(burtonii) pta::FRT クローン A, FRT::Gil.6-acs, i pfkA_tag R ML, i yfiQ::Gil.2-rpe_tktA_rpiA_talB ML
MD1284	CTO pgl- FRT-PL.2-2cis-RBS10000-MVK(burtonii) pta::FRT クローン A, FRT::Gil.6-acs, i yfiQ::Gil.2-rpe_tktA_rpiA_talB ML+ pMCM1225 + pEWL1421
MD1285	CTO pgl- FRT-PL.2-2cis-RBS10000-MVK(burtonii) pta::FRT クローン A, FRT::Gil.6-acs, i pfkA_tag T ML, i yfiQ::Gil.2-rpe_tktA_rpiA_talB ML + pMCM1225 + pEWL1421
MD1286	CTO pgl- FRT-PL.2-2cis-RBS10000-MVK(burtonii) pta::FRT クローン A, FRT::Gil.6-acs, i pfkA_tag I ML, i yfiQ::Gil.2-rpe_tktA_rpiA_talB ML+ pMCM1225 + pEWL1421
MD1287	CTO pgl- FRT-PL.2-2cis-RBS10000-MVK(burtonii) pta::FRT クローン A, FRT::Gil.6-acs, i pfkA_tag R ML, i yfiQ::Gil.2-rpe_tktA_rpiA_talB ML + pMCM1225 + pEWL1421

10

20

【0 4 6 6】

I I. p f k A 変異株の構築

部分的機能性タンパク質分解タグが生成され、p f k A が下方制御された。WT B L 2 1 バックグラウンドで Gene Bridges リコンビニアリングを使用して（製造業者の推奨プロトコルに従って）、t m R N A 中の最後のアミノ酸位置から 3 番目のランダム変異が、P f k A の C 末端に融合された（図 2 3）。次に変異体は、増殖プロファイラー中で T M 3 グルコース中の増殖についてスクリーニングされた。（図 2 4）。最後の位置から 3 番目にイソロイシン（I）がある変異体は、天然アミノ酸ロイシン（L）と非常に類似する可能性が高い。したがってこれは、「WT」タグの高タンパク質分解速度のために、最も緩慢に増殖した。アルギニン（R）がある変異体はより軽微な効果を示し、スレオニン（T）は障害性が最も少なかった。これらの 3 つの変異株が選択され、R 6 K 対立遺伝子交換方法を使用して、MD 1 2 0 5 または MD 1 2 8 0 内に移動された。簡単に述べると、下に列挙されるプライマーから生成される P C R 断片は、シームレスクローニング反応（Life Technologies）において t e t - s a c（TS）および R 6 K 断片と共に使用されて、対立遺伝子交換のためのプラスミドが得られる（配列番号 1 1 2）。次にこれらのプラスミドは、テトラサイクリン耐性について選択することで、MD 1 2 0 5 または MD 1 2 8 0 内に導入され、次に引き続く 5 % スクロース含有培地上への播種によって、逆選択された。p f k A に個別タンパク質分解タグの変異を保有する株は、P C R および配列決定によって同定された。p M C M 1 2 2 5 および p E W L 1 4 2 1 は、標準分子生物学的技術を使用して各細胞に形質移入された。株の詳細については、表 1 0 - 2 を参照されたい。

30

40

【0 4 6 7】

【表 2 5】

表 10-3:プライマー配列

プライマー名称	配列	配列番号
pfkA tmRNA XAA For	tgaagcgctccgttcaaaggcgactggctagactgcgcgaaaaactgtat gctgctaacgatgaaaattatgctnnngctgcataaaattaaccctcactaa agggcg	配列番号 99
pfkA tmRNA Rev	gcttctgtcatcggtttcaggctaaaggaatctgccttttccgaaatcataat acgactcactatagggtc	配列番号 100
pfkA UP For	tttatttctcaacaagatgggttatcggcggtgacggttcctacat	配列番号 101
pfkA UP Rev	agcataattttcatcgttagcagcatagctttttcgcgcagctagccagtc gcct	配列番号 102
pfkA DOWN R For	ctaacgatgaaaattatgctcgcgctgcataatgatttcggaaaaaggcag attcct	配列番号 103
pfkA DOWN I For	ctaacgatgaaaattatgctattgctgcataatgatttcggaaaaaggcaga ttcct	配列番号 104
pfkA DOWN T For	ctaacgatgaaaattatgctacggctgcataatgatttcggaaaaaggcag attcct	配列番号 105
pfkA DOWN Rev	actatcaacaggttgaactgcggtgcggagtatccggcagacgt	配列番号 106
pfkA Test For	ctgacatgatcaaccgtggcggtga	配列番号 107
pfkA Test Rev	gatcgttccagtcagtgatctgct	配列番号 108

10

20

【0 4 6 8】

実施例 11：イソプレレン収率に対するペントースリン酸経路調節の効果

I. 材料と方法

L B 培地、酵母抽出物および $MgSO_4$ 非含有 TM3 培地、10% 酵母抽出物、1 M の $MgSO_4$ 、50% グルコース、200 mM の IPTG、50 mg/mL スペクチノマイシン、50 mg/mL カルベニシリン、アルミホイルシール、48 ウェル滅菌 5 mL ブロック、Breathe Easier シールメンブレン、アルミホイルシール、96 ウェルマイクロタイタープレート、96 ウェルガラスブロックは、Zinsser Analytic から購入された Agilent 6890 GC には 5973 N 質量分光計が装着された。

30

【0 4 6 9】

TM 培地 ($MgSO_4$ および酵母抽出物非含有)、1% グルコース、8 mM の $MgSO_4$ 、0.02% 酵母抽出物、および適切な抗生物質を組み合わせることで、補足 TM3 培地を調製した。一晚培養物を補足 TM3 培地中に 0.2 光学濃度 (OD) で接種することで、48 ウェル滅菌ブロック内で 2 mL の 1 日培養を開始した。ブロックを Breathe Easier メンブレンで密封し、600 rpm および 34°C で、2 時間培養した。2 時間の増殖後、マイクロタイタープレート内で OD が 600 nm で測定され、細胞は 200 μM の IPTG によって誘導された。OD 読み取りは IPTG 誘導後に 4 時間にわたり毎時実施されて、増殖速度が判定された。OD 測定は、SpectraMax Plus 190 (Molecular Devices) を使用して、TM3 培地中で適切に希釈して、600 nm でマイクロタイタープレート内で実施された。

40

【0 4 7 0】

IPTG 誘導の 2、3、および 4 時間後に、100 μL のイソプレレンサンプルが 96 ウェルガラスブロック内に収集された。ガラスブロックはアルミホイルで密封されて、Th

50

ermomixer上で450rpmで振盪しながら34℃で30分間培養された。30分間後、ブロックを水浴中で2分間70℃に維持し、GC/MS内でイソプレンヘッドスペース測定を実施して、比生産性を判定した。

【0471】

II. 結果

ペントースリン酸経路の上方制御とpfkAの下方制御の双方がある細胞は、流加条件下でアッセイされた。ペントースリン酸経路の上方制御のみがある細胞(MD1284)は、対照MD1207細胞と比較して良好に機能した(図25A~Dおよび26A~D)。PPP上方制御細胞は、対照よりも改善された増殖を示し、さらにより迅速な瞬間イソプレン/CO₂生産およびより高い収率を示した。したがって4つの非酸化的遺伝子の組み合わせを使用したペントースリン酸経路の上方制御は、イソプレン生産に有益である。これは、PKL(キシロロース-5-リン酸)のために利用可能な基質の増大に、または経路を通過する全体的流動に利益をもたらし得るペントースリン酸の中間体(グリセルアルデヒド-3-リン酸またはセドヘプツロース-7-リン酸など)のより効果的な均衡に、起因し得る。タンパク質分解タグによるpfkAの下方制御がある全ての細胞は、発育不良であり、性能が対照細胞に及ばなかった(図27A~B)。これはおそらく、実施例10における増殖に対する幅広い効果にもかかわらず、全ての3つのタグに対する高すぎる分解速度のためであった。pfkAタグの追加的な変異は、増殖速度を改善させる可能性が高い一方で、解糖およびホスホケトラーゼ間の適切な流動配分をなおも駆動する。

【0472】

実施例12: サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*) 標準およびアセチル化調節株の構築

本実施例は、標準株、および細胞内タンパク質アセチル化調節に関与する遺伝子の変異を含有する株の構築を記載する。本実施例はまた、メバロン酸経路およびイソプレンシンターゼを発現するサッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*) 株内におけるイソプレン生産に対する、アセチルトランスフェラーゼ遺伝子欠失の効果の測定を記載する。

【0473】

I. サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*) におけるP. トレムロイデス(*P. tremuloides*) イソプレンシンターゼおよびホスホケトラーゼ経路の発現のためのコンストラクトを用いた標準株の構築

サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*) コドン最適化P. トレムロイデス(*P. tremuloides*) イソプレンシンターゼおよびE. ガリナラム(*E. gallinarum*) ホスホケトラーゼ遺伝子は、DNA2.0によって合成された。分子生物学的技術を使用して、遺伝子がPCR増幅され、サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*) 2micronプラスミドまたは染色体への挿入に適するコンストラクトにクローン化された。次にコンストラクトは、以下の構造を有する: 上流相同性-プロモーター-遺伝子-ターミネーター-マーカー-下流相同性)。酵母細胞は形質転換されて、形質転換体を選択された。いくつかのコロニーが選択されて、YPD培地(10g/Lの酵母抽出物、20g/Lのバクトペプトン、20g/Lのグルコース)に接種され培養される。DNAは培養物から単離されて、精製される。コンストラクトは、誤り耐性DNAポリメラーゼを用いてPCR増幅され、配列決定されて、DNA配列が修正されたことが確認される。さらに、いくつかの株では、1つまたは複数のMVA経路ポリペプチドが、同様に酵母宿主細胞で発現される。

【0474】

II. サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*) アセチルトランスフェラーゼ遺伝子の欠失を含有する標準株の構築

サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*) アセチルトランスフェラーゼの欠失もまた含有する、上述されるような株が、を標準分子

生物学プロトコル使用して生成される。

【0475】

III. サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 組換え株におけるイソプレンの生産

上に記載されるイソプレシンターゼ形質転換体の15および36時間培養物の1mlが、ヘッドスペースバイアルに移される。バイアルは密封されて、30℃で5時間培養される。ヘッドスペースガスが測定されて、イソブレンは上に記載される方法によって同定される。

【0476】

実施例13：ペントースリン酸経路 (PPP) または酢酸循環調節のどちらかに関与する遺伝子の変異をさらに含有するサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) アセチル化調節株の構築

本実施例は、ペントースリン酸経路 (PPP) または酢酸循環の調節に関与する遺伝子の変異をさらに含有する、実施例12からの酵母株の構築を記載する。本実施例はまた、イソブレン生産に対するこれらの変異体の効果の測定も記載する。

【0477】

I. 1つまたは複数のサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) PPP遺伝子の過剰発現、または酢酸循環遺伝子の発現または過剰発現を含有する標準株の構築

上記実施例12作成される株 (変異アセチル化タンパク質、イソブレンシンターゼ、ホスホケトラゼおよびMVA経路ポリペプチドを含有する) は、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) PPP遺伝子の変異を含有する株を生成するようにさらに操作される。これらは、標準分子生物学プロトコルを使用して生成される。ホスホケトラゼ発現宿主における炭素流均衡に関与する、酵母ペントースリン酸経路内のKL1、TAL1、RPE1、およびRKI1遺伝子が、酵母中の発現について最適化される。遺伝子は、標準分子生物学的技術を使用してクローン化されアセンブルされて、PPP経路の4つの活性の異なる量を発現する。これらのプラスミドは酵母細胞に変換されて、株が単離され冷凍される。独立した株は、PCRによって確認される。代案としては、またはそれに加えて、上記の実施例12で生成される株は、酢酸循環遺伝子の変異を含有するようにさらに操作される。コンストラクトの1つのセットは、大腸菌 (*E. coli*) ホストトランスアセチラーゼ (サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) のためにコドン最適化されてDNA2.0によって合成された) を発現し、さらに別のシリーズは、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) アセチルCoAシンターゼの過剰発現ありまたはなしで、大腸菌 (*E. coli*) 酢酸キナーゼ (サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) のためにコドン最適化されてDNA2.0によって合成された) を発現する。酢酸キナーゼおよびアセチルCoAシンターゼのためのさらなる遺伝子が、導入される。

【0478】

II. サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 組換え株におけるイソプレンの生産

上に記載されるイソプレシンターゼ形質転換体の15および36時間培養物の1mlが、ヘッドスペースバイアルに移される。バイアルは密封されて、30℃で5時間培養される。ヘッドスペースガスが測定されて、イソブレンは上に記載される方法によって同定される。

【0479】

実施例14：トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) 標準およびアセチル化調節株の構築

本実施例は、標準株、およびトリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) における細胞内タンパク質アセチル化調節に関与する遺伝子の変異を含有する

10

20

30

40

50

株の構築を記載する。本実施例はまた、メバロン酸経路およびイソプレニンターゼを発現するトリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) 株内におけるイソプレニン生産に対する、アセチルトランスフェラーゼ遺伝子欠失の効果の測定を記載する。

【0480】

I. イソプレニンターゼ、MVA経路、およびPKLを発現するトリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) 株の構築

トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) コドン最適化ウラジロハコヤナギ (*P. alba*) または *P. tremuloides* イソプレニンターゼ、*E. gallinarum* PKLおよび *E. gallinarum* *mvaE* および *mvaS* are をコードする遺伝子は、DNA 2.0. によって合成された。標準分子生物学的技術を使用して、ソホロース誘導性プロモーターの制御下にある *pTrex3g* などのベクターに、遺伝子がクローン化される。*pyr2* トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) プロトプラストは、上記コンストラクトの混合物で形質転換され、形質転換体は、ウリジン (*uridine*) が添加された *amdS* 選択プレート上で選択される。安定した形質転換体は、グルコース-ソホロース炭素源を含有する培地中で培養され、免疫ブロットによって、*IspS*、PKL、およびMVA経路タンパク質の発現についてスクリーニングされる。全てのタンパク質を発現する株は、イソプレニン生産についてスクリーニングされる。胞子の製精およびさらなる操作のために、イソプレニン生産株が選択される。

【0481】

II. トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) アセチルトランスフェラーゼ遺伝子の欠失を含有する株の構築

標準分子生物学プロトコルを使用して、トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) アセチルトランスフェラーゼの欠失を含有するイソプレニン産生株が生成された。簡単に述べると、*hph* 遺伝子側面に位置する *loxP* を含有するカセットが、標的アセチルトランスフェラーゼ遺伝子の内部または側面に位置する、2~4 kb の染色体DNAに挿入される。このカセットは *T. reesei* プロトプラストに形質転換されて、フォーゲルプレート上でハイグロマイシン耐性形質転換体を選択される。安定した形質転換体は、カセット挿入のためにPCRによってスクリーニングされて、標的遺伝子座の中断が確認され、引き続いて胞子が精製される。得られた株は、イソプレニンを産生し、アセチルトランスフェラーゼ遺伝子が欠失していることが確認される。

【0482】

III. *Pta* を通じた酢酸循環のための株の構築

トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) コドン最適化大腸菌 (*E. coli*) *pta* をコードする遺伝子は、DNA 2.0 によって合成される。標準分子生物学的技術を使用して、遺伝子は、*hph* 標識テロメアベクター上の *cbh1* からなどのソホロース誘導性プロモーターの制御下でクローン化される。このDNAを使用して、リジンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子欠失ありまたはなしのイソプレニン産生トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) のプロトプラストが変換される。形質転換体は、ハイグロマイシンを含有するフォーゲルプレート上で選択される。

【0483】

IV. *T. reesei* *Acs1* を通じた酢酸循環株の構築

トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) コドン最適化大腸菌 (*E. coli*) *ackA* をコードする遺伝子は、DNA 2.0 によって合成される。標準分子生物学的技術を使用して、遺伝子は、*hph* 標識テロメアベクター上の *cbh1* からなどのソホロース誘導性プロモーターの制御下でクローン化される。ソホロース誘導

性プロモーターからのT. リーゼイ (*T. reesei*) *acs1* 遺伝子の第2のカセット発現が、ベクターにクローン化される。このDNAを使用して、リジンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子欠失ありまたはなしのイソプレレン産生トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) のプロトプラストが変換される。形質転換体は、ハイグロマイシンを含有するフォーゲルプレート上で選択される。

【0484】

V. トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) の組換え株のイソプレレンの生産

表11に示される株の培養物は、グルコース-ソホロースによって誘導され、15および36時間目に、各培養物から1mLがヘッドスペースバイアルに移される。バイアルは密封されて、32℃で5時間培養される。ヘッドスペースガスが測定されて、イソプレレンは上に記載される方法によって同定される。ブ罗斯は清澄化され、MVAはHPLCによって同定される。

【0485】

【表26】

表 11: 酢酸再循環のためのアセチルトランスフェラーゼ欠失ありおよびなしの *T. リーゼイ* (*T. reesei*) 株の関連遺伝子型

<i>E. ガリナーラム</i> (<i>E. gallinarum</i>) <i>mvaE</i> および <i>mvaS</i>	ウラジロハ コヤナギ (<i>P. alba</i>) <i>ispS</i>	<i>E. ガリナーラム</i> (<i>E. gallinarum</i>) PKL	<i>T. リーゼイ</i> (<i>T. reesei</i>) リジン アセ チルトランス フェラーゼ	大腸菌 (<i>E. coli</i>) <i>pta</i>	大腸菌 (<i>E. coli</i>) <i>ackA</i>	<i>T. リーゼイ</i> (<i>T. reesei</i>) <i>acs1</i>
+	+	+	+	-	-	重量
+	+	+	-	-	-	重量
+	+	+	+	+	-	重量
+	+	+	-	+	-	重量
+	+	+	+	-	+	過剰発現
+	+	+	-	-	+	過剰発現

【0486】

配列

L. グレイー (L. grayi) m v a E

【化 1】

atggttaaagacattgtaataattgatgccctccgtactcccatcggttaagtaccgcggtcagctctcaaagatgacggcgggtggaattggga
 accgcagttacaaaggctctgttcgagaagaacgaccaggtcaaaagaccatgtagaacaagtcatttttgcaacgttttacaggcaggga
 acggccagaatcccggccgtcagatcgcccttaattctggcctgtccgcagagataccggcttcgactattaaccagggtgtgtgttctggc
 ctgaaagcaataagcatggcgcgccaacagatcctactcgagaagcgggaagtaatagtacaggaggtatcgaatccatgacgaatgc
 gccgagtattacatattataataaagaagaagacacccctcacaagcctgttctctacgatgaccttcgatggctgacggacgcgtttagcgg
 aaagattatgggttaacagccgaaaatgttgcgaacagtacggcgatcacgtgaggccagggacgcctttgcgtatggatgcagatg
 aaagcagcaaaaggcccaagaacaggggcattttgcagctgaaatactgcctcttgaataggggacgaagttattactaggacgagggg
 gtgcgtaagagaccacctcgaaaaattaagtctgcttcggaccatttttaagaagatggtactgttacagcgggcaacgcctcaacgatc
 aatgatggcgctcagccgtgatcattgcatcaaaaggagtttctgagacaaaccagattccctaccttgcgatcgtacatgatattacagag
 ataggcattgatccatcaataatgggcattgctcccgtgagtgcatcaataaactgatcgtacgtaccaaattagcatggaagaaatcgat
 ctctttgaaattaatgaggcatttgcagcatcctcgggtgtagttcaaaaagatgaagcattcccgatgaaaagatcaatattggcggttccg
 gtattgcactaggccatcctcttggcgccacaggagcgcgcatgttaaccacctagcgcaccagttgaaactacacacggacgctatgg
 tattgcctccctgtgcatfaggcggtggccttggcctagcaatattaatagaagtgcctcagggaagatcagccgggttaaaaaattttatcaattgg
 cccgtgaggaccgtctggctagacttcaggagcaagccgtgatcagccagctacaaaacatgtactggcagaaatgacacttctgaag
 atattgccgacaatctgatcgaatacaaatatctgaaatggaaatccctcttgggtgtggttgaatctgagggtcaatgataagattatacc
 atccactagcaactgaggaaccgagtgtaatcgctgcctgtaataatgggtgcaaaaatggcaaacacctggcggttttcagtcagaatt
 aaaagatggtttctgcgtgggcaaatgtacttatgaacgtcaaaagaaccgcacatcagacacgagcaaaagcgga
 attttctggtccgcagcgcagtcacatccatcgattgtgaaacgagggtgggggtctaaaagagatagtagtgcgtacgttcgatgatccg
 acgttctgtctattgatctgatagttgatactaaagacgcaatggcgctaacatcattaacaccattctcgagggtgtagccgggttctgag
 ggaaatccttaccgaagaaattctgttctctatttatctaatcagcaaccgaatcaattgtgaccgccagctgtcgcataccttacgaagcact
 gagtaaaaaagggtgatgtaaacgaatcgctgaaaaagtgctgctgcatcctaatttcccagttagatccttatcgagctgcaaccaca
 acaaaaggattatgaatggtattgagccgtcgtttggcctcaggaaatgacacacggcggtcgcggcagccgcacatgcgtatgcttc
 acgcgatcagcactatcggggcttaagccagtgagcaggttcagaaaggcggttacacggggagatcagctaccacttgcactcggca
 gcgttggcggtgcaattgaggcttgcctaaagcgaaggcggttcgaaatcatggggatcacagaggcggaaggagctggcagaagtc
 acagctgcggtagggctggcgcaaacctggcggttaagagcgcttggtagtgaaaggaatacagcaaggtcacatgtcgtccaggct
 cgctcttgcattatcggtagggtgctacaggcaagggtgaaatcctggccgaaaaattacagggtctctgatgaatcaggcggaacgc
 tcagaccatactcgcagagatcagatcgcaaaaagttgaattgtga 配列番号 1

10

20

L. グレイー (L. grayi) m v a S

【化 2】

atgaccatgaacgttggaaatcgataaaatgtcattcttgttccaccttactttgtggacatgactgatctggcagtagcacgggatgtcgatec
 caataagtttctgattggtattggccaggaccagatggcagttaatccgaaaacgcaggatattgtgacatttgcacaaatgctgcaaaaa
 catactgtcagctgaggaccttgataaaattgatgtgcatagtcggcaccgagagtggaatcgatgaatcacaagcaggtgccgtatgtc
 ttcacagggttgcctggtatccagaagtttgcctcctcttgaatcaaaagagcctgttatgggggtaccgcggctttacagttcgtgtaaac
 cacattaggaaatcatcctgaatcaaaaggttctttagttgcatcagatcgcgaaataggcctggcttctggaggtgaaccaacgcgaaggt
 gcaggcgctgtggtatgctcgtcactgaacctgaatcattgctttcaacgacgatagcctcgcgttacacaagatatctatgacttct
 ggcgaccagttggacatgactatcctatggtcgacgggctcttagtacagagacctacatccagtcatttcagaccgtatggcaggaatac
 acaaaacggctgcagcatgcaactggcagactttgctgcccttagctttcatatccgtatactaaaatgggcaaaaaggcgctgcttgaatc
 ctgaaaggcgaaatcagaggaggctcagaaccgtatactagcaaaatagaaaagagtatagcctactccagaaaaggcggttaacctgtata
 ccggtagcctgtatctaggaacttatttacttctgaaaatgcagaagaccttaaaagctgtgatttaafaggcctcttttctacgggtccggtg
 ctgttgcggagttttctcaggaaggctgtgtgaggactatcaggaacagctacttaaaacaaaacatgccgaacagctggcccatagaaag
 caactgacaatcgaggagtaggaacgatgttctccgatcgttggacgtggacaagacgccgaatacgaagacacattagcttatagca
 ttctgcagtcggaaacaccgtacgtgagtagcaggagttga 配列番号 2

40

E. フェシウム (E. faecium) m v a E

【化 3】

atgaaagaaagtgggtatgattgatgcggctcgcacaccattgggaaatacagaggtagtcttagtccttttacagcgggtggagctggggac
 actggtcacgaaagggctgctggataaaacaaagcttaagaaagacaagatagaccaagtatattcggcaatgtgcttcaggcaggaaa
 cggacaaaacgttgcaagacaaatagccctgaacagtggttaccagttgacgtgccggcgatgactattaacgaagtttgcgggtccgga
 atgaaagcgggtgattttagcccgccagttaatacagtttagggggaggcagagttggtcattgcaggggttacggagtaaatgtcacaagcac
 ccatgctgaaaccttaccagtcagagaccaacgaatacggagagccgatatcatcaatgttaatgacgggctgacggatgcgtttccaat
 gctcacatgggtcttactgccgaaaagggtggcgaccagttttcagtgctgcgcgaggaacaagaccgggtacgcattgtccagccaattga
 aagcagcgcacgcgggtgaaagccgggtgttctcagaagagattattccggtaagattagcgacgaggatgtcttgagtgaagacgagg
 cagtaagagggaacagcactttggaaaaactgggcaccttgcggacgggtgtttctgaagaggcagcgttaccgctggcaatgcttcacc
 gctgaatgacggcgctagtgtcgtgattcttgcataaaaagaatacgcggaaaaacaataatctgccttacctggcgacgataaaggagggtg
 cggaaagtgggtatcgcattcttcatcatgggtattgccccataaaaggccattcaaaagttaacagatcgggtcgggcatgaacctgtccacga
 ttgatctgttcgaaattaatgaagcattcggcgcatctagcattgttcttcaagagctgcaattggacgaagaaaaagtgaatatctatggc
 ggggcgatagcttttagccatccaatcggcgcaagcggagcccgatactgacaaccttagcatacggcctcctgcgtgagcaaaagcg
 ttatggtattgcgtcattatgtatcggcggtgggtcttggctcgtgctgttagaagctaataatggagcagaccacaaagacgttcagaag
 aaaaagttttaccagcttaccctccgagcggagatcgcagcttatcgagaagaacgttctgactcaagaaacggcacttatttccagga
 gcagacgttgccgaagaactgtccgacacatgattgagaatcaggtctccgaagtggaaattccaatgggaattgcacaaaatttccagat
 taatggcaagaaaaaatggattcttatggcgactgaagaaccttcagtaatacggcgacatcgaacggcgccaaaatctgcgggaacatt
 tgcgcggaaacgcctcagcggcttatgcgcggcgagattgtctgttgcaaatcagaatatcaagccgtgataaatgccgtgaatcatc
 gcaaaagaagaaactgattctttgcgcaaacgagtcgtaccgagttattgtaaacgcgggggagggtgttcaggatatttctacgcgggagttta
 tgggtctttttcacgcgtatttatcaatcgaattctgtgtggacgtcaaggacgcaatgggggcaaacatgatcaactctattctcgaagcgtt
 gcaataaactgcgtgaatgggtcccgggaagaggaaatactgttctccatctgtcaaaattcgtacggagtccttggcatctgcatgttc
 gagattccttttgaagacttgggtgtaacaaagaaattgggtgaacagatcgccaagaaaattcaacaggcagggggaatatgctaagcttga
 cccttaccgcgcggcaaccataacaaggggattatgaacgggtatcgaagccgtcgttgcgcaacgggaaacgacacacgggctgtttc
 cgtcttattacgcatacgcggccgtaattggctgtaccaagggttaacggattggcagatcaaggcgataaactggttggtaaattaac
 agtcccactggctgtggcgactgtcgggtgcgcgtcgaacataffacaaaagccaaagcttccctgccatgctggtatattgattccgcaa
 aagaactggcccaagtatcgcggcggttaggtttagcacagaatctgcggcggttacgtgcattagtacagaaggcattcagaaggac
 acatgggcttgaagcacgttcttttagcgatttcgatagtgccatcgggtgaggagatagagcaagtcgcgaaaaaactgcgtgaagctga
 aaaaatgaatcagcaaacggcaatacagattttagaaaaaatcgcgagaatga 配列番号 3

10

20

E. フェシウム (E. f a e c i u m) m v a S

【化 4】

atgaaaatcgggtattgaccgtctgtccttttcacccgaatttgatttggacatgactgagctggcagaatcacgcggggatgatccagcta
 aatatcatattggaatcggacaagatcagatggcagtgaaatcgcgcaaacgaggacatcataacactgggtgcaaacgctgcgagtaaga
 tctgtacagagaaagaccgcgagttgattgatatggaatcgttggcacggaaatcaggaattgaccactccaaagcaagcggcgtgattatt
 caccatctccttaaaattcagtcgttcgccgttcttcgaggtaaaagaagcttgcattatggcggaaactgctgccctgcacatggcgaaggag
 tatgtcaaaaatcatccggagcgtgaaggtcttgtaattgcgtcagacatcgcgcgttatggtttggccagcggaggagaagtactcaagg
 cgtggggggccgtagccatgatgattacacaaaacccccgattcttgcattgaagacgatagtgtttttctcacagaggatatctatgattct
 ggcggcctgattactccgagttccctgtagtggacgggcccccttcaaaactaacgtatatagagagtttgcagaaagtgtgaaaccggcaca
 aggaattgtccggaagagggtggaagattatcaagctattgtttcacataccctatacgaagatgggtaagaaagcgctccagagtgttt
 tagacaaaaccgatgaagataaccaggagcgttaattggctagatatgaggagtctattcgtatagccggagaattgtaacctgtacaca
 ggcagcttgatcttggcttacaagcttgggaaaaactctaaaagttaacaaccgggagatcgatcgccctctttctatggcagtggtg
 cgggtgccgagttcttaccgggtatttagaagaaaattaccaagagtacgttctgctcaagccatcaagaaatgctggatagccggactc
 ggattacggctgatgaatcagagaccatctttcagagactctgccagaacatggtgaatgcgccgaatatacagcgcacgtccccctttcta
 taaccaagattgagaacgacattcgttattataaaatctga 配列番号 4

30

40

E. ガリナーラム (E. g a l l i n a r u m) m v a E

【化 5】

atggaagaagtggtaattatagatgcacgtcggactccgattggtaatatcacgggtcgttgaagaagttttcagcgggtggcgtggggac
ggccgtggctaaagacatgttcgaacgaaccagaaaatcaagaggagatcgcgagggtcataattgtaattgtcttcaggcaggaaa
tggccagaaccccgcgcgcaagttgctctcaatcagggtgtccgttgacattcccgcttacaattaacagggttgggtctgtgttg
aaagctatcttgatgggcatggacaatccaactcggcaagcgcaagtagtctggcaggcggcattgaatcaatgacaaatgcgcca
agcctgtccactataacaaggcggaggatagctatagtgctccagtgctgagcatgacactggatggtctgacagacgcattttctagtaa
acctatgggattaacagcggaaaacgtcgcacagcgtacgggtatctcccgtagggcgcaagatcaatcgcataatctcagatgaaa
gcagcaaaagcgagcgcagaaaacaaatcgcgaaggaaattgtgccactggcggtgaaactaaaaccatcacagctgacgaagggat
cagatcccaaaacacgatggagaactggcaagtcctcaaacctgttttaaaaccgatggcactgtaaccgcagggaatgctagcaccatt
aatgacggggccgccctgtgtctgtctgtagcaaaacttactgcgaactaatgacataccgtaccttgcaaatcaagaaattgttgaa
gttggaaatcgatccggagattatgggcattctccgataaaagcgatacaaacattgttcaaaaatcaaaaagttagcctcgaagatattgga
gtttttgaaataatgaagcctttccgcaagtagcatagtggtgaaatctgagttgggattagatccggctaaagtaaccgttatgggggtg
gtatatcccttaggtcatgcaattggggcaaccggcgctcgcctggccacttactggtgtatcaaatgcaggagatacaagcacgttatgga
ttgcgagcctgtgctgtgtgtgtgacttgactggcaatgcttttagaacgtccaactattgagaaggctaaaccgacagacaaaaagtct
atgaattgtcaccagctgaacggttgcaagagctggaaaatcaacagaaaatcagttctgaaactaaacagcagttatctcagatgatgctg
ccgaggacactgcaaaccatttgatagaaaatcaaatatcagagattgaactcccaatggcgctcgggtgaacctgaaggttgatggaa
agcctatgttgccaatggcgacggaagagccgtccgtcgcggccatgtctaattggtccaaaatggcggcgaaattcacactcag
tcgaaagaacggctgctcagagggtcagattgtttcagcgcgaagaatccgaatgaatcgaacagagaatagctgagaaccaagctttga
tttcgaacgtgcccgaacagtcctatcctccattgtgaaaagagaggagggtctccgccgacttgcacttctcatttctccgattctcag
caggagctcgcggaccagtcacattttatcagtggaacttttttagatgtgaaagacgcgatggggggcaaatatcataaatgcaatactg
agggcgctgcagccctgttcgcgaatgttcccaatgaggaaattcttttctattctcgaacttggtctacggagagcttagtcacggct
gtttgtgaagtcctatttagtcacttagcaagagaggtggtgcaacgggtggccagaaaattgtgcaggcgctcgtcttcgaaagacag
accataaccgcgcagtacccacaacaaagggaattatgaacgggtgtagagctgttatgcttgcacaggcaacgacacgcgcgcagtct
cagccgcttgcattgatacgcagcgcgcaccggtagctatcagggtctgactaactggacgattgagtcggatcgctgttagggcgaga
taacactgccgctggccatcgtacagttggaggcgctaccaaaagtgttgcacaaagctcaagcggcactggagattagtgatgttcactt
tctcaagagcttgacgcttagcggcgctcagtaggtttagtaaaaaatctcgcggccctgcgcgactggttccgaaaggatataaaaaagg
gcacatgtccatgaagcccggtctctcgaatcgcggctggtgctgaaaaagccgagatcgagcagggtcggcaaaagtgcggcgaga
accggccaatgaatcagcagcaggcgctccgtttcttggcgagatccgcgaacaatga 配列番号 5

10

20

E. ガリナーラム (E. galinarum) mva S

【化 6】

atgaacgtcggcattgacaaaattaatttttctgtccaccgtattatctggatatggctgacctggccacgcacgcgaagtggaccgaaac
aaatttacaattggaattggacaggatcagatggctgtgagcaaaaagacgcagatctgtaacattcgcggctagtccgcgaaggaaa
ttttagaacctgaggacttgaagctatagacatggttatagttgtaccgaatcgggcattgacgagagcaaacatccggcgtgtttac
atcgtttgttggcgtacaaccttctgctgcagttttgaaattaaagaagcctgttacggggcaaccgcaggcattcagtttccaagactca
tatacaagcgaacccggagagcaaggtcctggttaattgcaagcgtatagctcggtaggttctcggtcagggtggagagcccacacaagg
cgcaggggcgagttgctatgcttctcagcggcaaatccagaatcctgaccttcgaaaacgacaatctgatgttaacgcaggatatttatgacttc
tgagaccacttggacgcttaccctatggtagatggccaccttccaatcaagcttatattgacagttttaagaaggtctggcaagcacattg
cgaacgcaatcaagcttctatatccgactatgccgctattgatttcatattccgtatacaaaaatgggtaagaaagccctgctcgtgttttgc
agatgaagtggaaactgaacagggaacgcgttatggcacggtatgaagagctatcgtatattcacgccggatcggaacttgatacgggat
cattgtacctggggctgatatccttattgaaaacagttctcactgctggcgggcgaccggataggattgttagttatggagtgccgtgt
cagcgaatttttctccggctgtttatgtggcaggctatgaaaatcaattgaacaaagaggcgcataccagctcctggatcagcgtcagaagc
ttccatcgaagagtagtaggcgatttttacagattccttagaaattgatcaggatgcagcgttctcggatgacctgcatattccatccgcgag
ataaaaaacacgattcgtactataaggagagctga 配列番号 6

30

40

E. カセリフラブス (E. casseliflavus) mva E

【化 7】

atggaagaagtgtcatcattgacgcactgcgtactccaataggaaagtaccacgggttcgctgaaagattacacagctgttgaactggggac
 agtagcagcaaaaggcgttgctggcacgaaatcagcaagcaaaagaacacatagcgaagtattattggcaacgtcctgcagccggaa
 gtgggcagaatccaggccgacaagtcagtttacagtcaggattgtctctgatatccccgctagcacgatcaatgaagtgtgtggctcgggt
 atgaaagcgattctgatgggtatggagcaaatcagctgaacaaagcctctgtggtcttaacaggcgggaattgaaagcatgaccaacgcgc
 cgctgtttagtattacaacaaggctgaggatcaatattcggcgccggtagcacaatgatgcacgatggtctaacagatgctttcagttccaa
 accaatgggcttaaccgcagagaccgtcgtgagagatatggaattacgcgtaagggaacaagatgaatttgcttatcactctcaaatgaagg
 cggccaaagcccaggcggcgaaaaagtgtgatcaggaaattgtacccctgacggaaaaatccggaacgggttctccaggacgaaggcatc
 agagccgcgacaacagtcgagaagctagctgagcttaaaacgggtgttcaaaaaagacggaaacagttacagcgggtaacgcctctacgat
 aaatgatggcgtgctatggtatattagcatcaaaatcttattgcgaagaacaccagattccttatctggcgttataaaggagatcgttgag
 gtgggttttccccgaaataatgggtatttccccattaaaggctatagacaccctgtgaaaaatcaagcactgaccatagaggatatagga
 atatttgagattaatgaagcctttgctgcgagttcgattgtgtgagaacgcgagttggcctggaccccaaaaaagttaatcgtatggcgt
 ggtatatcactcggccacgcaattggggcgacgggagctcgcattgcgacgaccgttgcttatcagctgaaagataccaggagcgtac
 ggtatagcttcttatgcgttggtgggggtcttgattggcgatgcttctgaaaaacccatcgccactgcctcacaactaattttgatgagg
 aatctgcttccgaaaaaactgagaagaagaagttttatgcgctagctcctaacgaacgcttagcgttttggaagcccaaggcgtattaccg
 ctgctgaaccctggtctccaggagatgaccttaacaaagagacagccaatcacttaategaaaaccaaatcagcgaagttgaaattcctt
 tagcgctgggcctgaacttacagtgatgggaaagcgtataatgttctctggccacggaggaaccgtcgttatcgtcgtatgctgaat
 ggccgcaaaatggctggtctattacaacaacagtcaggagaggtgttacggggtcagattgtctcatggacgtacaggaccagaa
 gcaattattagcgaagttgaatccgagcaagctaccattttcgggtggcaaatgaacataccgctctatcgtgaaaaggaggagggtct
 gcgtagagtcattggcaggaaatttcagtcggccgaaagtacttagccacggcgatgtatcaattgacctgatgtagatgtaaggatgc
 aatgggtgctaataatcatcaatagatcctagaaggtgttcgggaattgttagaaaatggtcccagaagaagaatcctgttctcaattctc
 caatctcgcgacagaaaagtcgtgtaacggcgacgtgctcagttccgtttgataaattgtccaaaactgggaattgtcgacaagttagctgta
 aaatagtcacgcggcgacttctgaagatagatccatacagagctgccacacacaataaagggtattatgaatggcgttgaaagcgttaatc
 tagccaccggtaatgacaccggtgcgtgctggctgcacccaggttacgcggcgacgaatgggaggaatgcaagggttacctcttggga
 cgattatcgaagatcggctgatagctctatcacattacctttggctattgcgacagtggggggtgccacaaaaatcttgccaaaagcacag
 gccgcctggcgtaactggcggttagacggcgctcggaaactggccagcctggcgggcgagtggtgggattagttcaaaatttggcgctttac
 gagcactagtgcgagggcattcagcaagggcacatgagtagcaagctagatccctggccattagcgtaggtgcgaaagggtactgaa
 atagagcaactagctgcgaagctgagggcagcgacgcaaatgaatcaggagcaggtcgttaaatttctgaccgaaataagaaattaa
 配列番号 7

10

20

E. カセリフラブス (E. c a s s e l i f l a v u s) m v a S

【化 8】

atgaacgttggaaattgataaaatcaatttttctggtccgccctatttctcattgatattggtggtatcgcctcatgcaagagaagttgaccccaacaag
 ttactataggaataggccaagatcagatggcagtaaaacagaaaacgcaagatatcgtaacgttcgcgatgcacgccgcgaaggatattc
 tgaactaagggaagatttacaggccatagatatgtaaatgtgggactgagcttggatcgacgagagcaaggcaagtgtctgtctgattgcat
 cggcttttaggtattcagccttttgcgcgtcctttgaaattaaggaggtcatgctatggggccactgccggccttcagtttgcaaaagctcatgt
 gcaggctaattccccagagcaaggtcctggtgtagcttccgatatgacgctacggactggcatccggaggagaaccgactcaagggtg
 aggtgctgtggcaattgttattccgctgatccagctatcttcagttgaaaaatgataatctcatgttgacccaagatatatacgatttttggcg
 cccggtcgggcatcaatctctatggttagcggccatctgtctaatccgctctatagacagctttaaacaagcttggaagcatttgcga
 gaaaaaccaacggactgctaagattatgctgcattgtctgtccatattccgtacacgaaaatgggtaagaaagctctgttagcgtttttgcg
 gaggaagatgagacagaacaaaagggttaattggcacgttatgaagaatcaattgtatacagtcgtcggactggaaatctgtatactggctc
 actctatctgggctgatttcttactggagaatagtagcagtttacaggcgaacgatcgataggtctgttttagctatggttcagggggcgttg
 cggaattttttagtgcccttgggtaccgggttacgagaacaatttagcgcaagctgccatcaagctcttctgacgaccggcaaaaactg
 actatcgacagtagtaagccatgtttatgaaccattgatattgatcaggaccagtcatttgaggatgacttactgtactccatcagagaga
 tcaaaaacactattcgtactataacgaggagaatgaattaa 配列番号 8

40

E. ガリナーラム (E. g a l l i n a r u m) E G 2 (m v a E)

【化 9】

MEEVVIIDARRTPIGKYHGSLLKKFSAVALGTAVAKDMFERNQKIKEEIAQVHIGNVLQAG
NGQNPARQVALQSGLSVDIPASTINEVCGLKAILMGMEQIQLGKAQVVLAGGIESMT
NAPSLSHYNKAEDTYSVPVSSMTLDGLTDAFSSKPMGLTAENVAQRYGISREAQDQFA
YQSOMKAAKAQAENKFAKEIVPLAGETKTITADEGIRSQTTMEKLASLKPVFKTDTGTVT
AGNASTINDGAALVLLASKTYCETNDIPYLATIKEIVEVGIDPEIMGISPIKAIQTLLQNQK
VSLEDIGVFEINEAFAASSIVVESELGLDPAKVNRYGGGSLGHAIGATGARLATSLVYQ
MQEIQARYGIASLCVGGGLGLAMLLERPTIEKAKPTDKKFYELSPAERLQELNQQKISS
ETKQQLSQMMLAEDTANHNIENQISEIELPMGVGMNLKVDGKAYVVPMAATEEPSVIAA
MSNGAKMAGEIHTQSKERLLRGQIVFSAKNPNEIEQRIAENQALIFERAQSYPSIVKRE
GGLRRIALRHFPADSQQESADQSTFLSVDLFVDVKDAMGANIINAILEGVAALFREWF
NEEILFSILSNLATESLVTAVCEVPFSALSKRGGATVAQKIVQASLFAKTDPYRAVTHNK
GIMNGVEAVMLATGNDTRAVSAACHGYAARTGSYQGLTNWTIESDRLVGEITLPLAIA
TVGGATKVLPKAQAALISDVHSSQELAALAASVGLVQNLAALRALVSEGIQKGHMSM
QARSLAIAVGAEKAEIEQVAEKLQRQNPMPNQQQALRFLGEIREQ 配列番号 9

10

E. ガリナーラム (E. g a l l i n a r u m) E G 2 (m v a S)

【化 10】

MNVGIDKINFFVPPYYLDMVDLAHAREVDPNKFTIGIGQDQMAVSKKTHDIVTFAASA
AKEILEPEDLQAIDMVIVGTESGIDESKASAVVLHRLGVPFARSFEIKEACYGATAGIQ
FAKTHIQANPESKVLVIASDIARYGLRSGGEPTQGAGAVAMLLTANPRILTFENDNLML
TQDIYDFWRPLGHAYPMVDGHLNQQVYIDSFKKVVQAHHCERNQASISDYAAISFHIPYT
KMGKKALLAVFADEVETEQERVMARYEESIVYSRRIGNLYTGSLYLGLISLLENSSHLS
AGDRIGLFSYGSGAVSEFFSGRLVAGYENQLNKEAHTQLLDQRQKLSIEEYEAIFTDSLE
IDQDAAFSDDLPPYSIREIKNTIRYYKES 配列番号 10

20

30

40

50

L. グレイー (L. grayi) (mvaE)

【化11】

MVKDIVIIDALRTPIGKYRGQLSKMTAVELGTAUTKALFEKNDQVKDHVEQVIFGNVL
QAGNGQNPARQIALNSGLSAEIPASTINQVCGSGLKAISMARQQILLGEAEVIVAGGIES
MTNAPSITYYNKEEDTLSPVPTMTFDGLTDAFSGKIMGLTAENVAEQYGVSRQAQDA
FAYGSQMKAQAEQGFIAAEILPLEIGDEVITQDEGVRQETTLEKLSLLRTIFKEDGTV
TAGNASTINDGASAVIIASKEFAETNQIPYLAIVHDITEIGIDPSIMGIAPVSAINKLIDRNQI
SMEEIDLFEINEAFAASSVVVQKELSIPDEKINIGSGIALGHPLGATGARIVTTLAHQK
RTHGRYGIASLCIGGGLGLAILIEVPQEDQPVKKFYQLAREDRLARLQEQAVISPAKHKV
LAEMTLPEADIADNLIENQISEMEIPLGVALNLRVNDKSYTIPLATEEPSVIAACNNGAKM
ANHLGGFQSELKDGFLRGQIVLMNVKEPATIEHTITAEKAAIFRAAAQSHPSIVKRGGGL
KEIVVRTFDDDDPTFLSIDLIVDTKDAMGANIINTILEGVAGFLREILTEEILFSILSNYATESI
VTASCRIPYEALSKKGDGKRIAEKVAAASKFAQLDPYRAATHNKGIMNGIEAVVLASG
NDTRAVAAAAHAYASRDQHYRGLSQWQVAEGALHGEISLPLALGSGVGAIEVLPKAK
AAFEIMGITEAKELAEVTAAVGLAQNLALRALVSEGIQQGHMSLQARSLALSVGATG
KEVEILAEKLQGSRMNQANAQTILAEIRSQKVEL 配列番号 11

10

L. グレイー (L. grayi) (mvaS)

【化12】

MTMNVGIDKMSFFVPPYFVDMTDLAVARDVDPNKFLIGIGQDQMAVNPQTQDIVTFAT
NAAKNILSAEDLDKIDMVIVGTESGIDESKASAVVLHRLGLGIQKFARSFEIKEACYGGTA
ALQFAVNHIRNHPESKVLVVASDIKYLGLASGGEPTQGAGAVAMLVSTDPKIIAFNDDS
LALTQDIYDFWRPVGHDPMDGPLSTETIYQSFQTVWQEYTKRSQHALADFAALSFI
PYTKMGKKALLAILEGESEEAQNRILAKYEKSIAYSRKAGNLYTGSYLGLISLLENAED
LKAGDLIGLFSYSGGAVAEFFSGRLVEDYQEQLLTKHAEQLAHRKQLTIEEYETMFSD
RLDVKDAEYEDTLAYSISVRNTVREYRS 配列番号 12

20

E. フェシウム (E. faecium) (mvaE)

【化13】

MKEVVMIDAARTPIGKYRGSLSPFTAVELGTLVTKGLLDKTKLKKDKIDQVIFGNVLQA
GNGQNVARQIALNSGLPVDVPAMTINEVCGSGMKAVILARQLIQLGEAELVIAGGTESM
SQAPMLKPYQSETNEYGEPISSMVNDGLTDAFSNAHMGLTAEKVATQFSVSREEQDRY
ALSSQLKAAHAVEAGVFSEEIIPVKISDEDVLSSEDAVRGNSTLEKLGLTLRTVFSEEGTV
TAGNASPLNDGASVVILASKEYAENNNLPYLATIKEVAEVGIDPSIMGIAPIKAIQKLTD
SGMNLSTIDLFEINEAFAASSIVVSQELQLDEEKVNIYGGAIALGHPIGASGARILTTLAY
GLLREQKRYGIASLCIGGGLGLAVLLEANMEQTHKDVQKKKFYQLTPSERRSQLIEKNV
LTQETALIFQEQLSEELSDHMIENQVSEVEIPMGIAQNFQINGKKKWIPMATEEPSVIAA
ASNGAKICGNICAETPQRLMRGQIVLSGKSEYQAVINAVNHRKEELILCANESYPSIVKR
GGGVQDISTREFMGSFAYLSIDFLVDVKDAMGANMINSILESANKLREWFPEEEILFS
ILSNFATESLASACCEIPFERLGRNKEIGEQIAKKIQQAGEYAKLDPYRAATHNKGIMNGI
EAVVAATGNDTRAVSASIHAYAARNGLYQGLTDWQIKGDKLVGKLTVPPLAVATVGA
SNILPKAKASLAMLIDSAKELAQVIAAVGLAQNLALRALVTEGIQKGHMGLQARSL
AISIGAIGEEIEQVAKKLREAEKMNQQTAIQILEKIREK 配列番号 13

30

40

E. フェシウム (E. faecium) (mvaS)

【化 1 4】

MKIGIDRLSFFIPNLYLDMTELAESRGDDPAKYHIGIGQDQMAVNANEDITLGNAAAS
 KIVTEKDRELIDMVIVGTESGIDHSKASAVIIHLLKIQSFARSFEVKEACYGGTAALHM
 AKEYVKNHPERKVLVIASDIARYGLASGGEVTQGVGAVAMMITQNPRILSIEDDSVFLT
 EDIYDFWRPDYSEFPVVDGPLSNSTYIESFQKVWNRHKELSGRGLEDYQAIAFHIPYTK
 MGKKALQSVLDQTDENQERLMARYEESIRYSRRIGNLYTGSLYLGLTSLLNSKSLQP
 GDRIGLFSYSGAVSEFFTGYLEENYQEYLFAQSHQEMLDSRTRITVDEYETIFSETLPEH
 GECAEYTS DVPFSITKIENDIRYYKI 配列番号 14

E. カセリフラブス (E. casseliflavus) (mvaE)

10

【化 1 5】

MEEVVIIDALRTPIGKYHGSCLKDYTAVELGTVAACKALLARNQQAKEHIAQVIIGNVLQA
 GSGQNPRQVSLQSGLSDDIPASTINEVCGSGMKAILMGMEQIQLNKASVVLTTGGIESM
 TNAPLFSYYNKAEDQYSAPVSTMMHDGLTDAFSSKPMGLTAETVAERYGITRKEQDEF
 AYHSQMKAACAQAACKFDQEIVPLTEKSGTVLQDEGIRAATTVEKLAELKTVFKKDGT
 VTAGNASTINDGAAMVLIASKSYCEEHQIPYLAVIKEIVEVGFAPFIMGISPIKAIDTLLK
 NQALTIEDIGIFEINEAFAASSIVVERELGLDPKKVNRYYGGISLGHAIATGARIATTVA
 YQLKDTQERYGIALSCVGGGLGLAMLENPSATASQTNFDEESASEKTEKKKFYALAP
 NERLAFLEAQGAITAAETLVFQEMTLNKETANHNIENQISEVEIPLGVGLNLQVNGKAY
 NVPLATEEPSVIAAMSNGAKMAGPITTSQERLLRGQIVFMDVQDPEAILAKVESEQATI
 FAVANETYPISVKRGGGLRRVIGRNFSPAESDLATAYVSIDLMDVDVKDAMGANIINSILE
 GVAELFRKWFPEEEILFSILSNLATESLVTATCSVPFDKLSKTGNRQVAGKIVHAADFA
 KIDPYRAATHNKGIMNGVEALILATGNDTRAVSAACHGYAARNGRMQGLTSWTHIEDR
 LIGSITLPLAIATVGGATKILPKAQAALALTGVETASELASLAASVGLVQNLAALRALVS
 EGIQQGHMSMQARSLAISVGAKGTEIEQLAAKLRAATQMNQEQAARKFLTEIRN 配列番号
 15

20

E. カセリフラブス (E. casseliflavus) (mvaS)

【化 1 6】

MNVGIDKINFFVPPYFIDMVDLAHAREVDPNKFITIGIGQDQMAVNKKQTQDIVTFAMHA
 AKDILTKEDLQAIDMVIVGTESGIDESKASAVVLHRLGLIQPFARSFEIKEACYGATAGL
 QFAKAHVQANPQSKVLVVASDIARYGLASGGEPTQGVGAVAMLISADPAILQLENDNL
 MLTQDIYDFWRPVGHQYPMVDGHLNNAVYIDSFKQVWQAHCEKNQRTAKDYAALSF
 HIPYTKMGKKALLAVFAEEDETEQRRLMARYEESIVYSRRTGNLYTGSLYLGLISLEN
 SSSLQANDRIGLFSYSGGAVAEFFSGLLVPGYEKQLAQAAHQALLDDRQKLTIAEYEA
 M FNETIDIDQDQSFEDDLLYSIREIKNTIRYYNEENE 配列番号 16

30

アセトアセチル (Acetoacetyl) - CoA - シンターゼ

【化 1 7】

MTDVRFRIGTGAYVPERIVSNDEVGAPAGVDDDWITRKTGIRQRRWAADDQATSDLA
 TAAGRAALKAAGITPEQLTVIAVATSTPDRPQPPTAAYVQHHLGATGTAAFDVNAVCS
 GTVFALSSVAGTLVYRGGYALVIGADLYSRILNPADRKTIVLFGDGAGAMVLGPTSTG
 TGPIVRRVALHTFGGLTDLIRVPAGGSRQPLDTDGLDAGLQYFAMDGREVRRFVTEHLP
 QLIKGFLHEAGVDAADISHFVPHQANGVMLDEVFGLHLPRATMHRTVETYGNTGAAS
 IPITMDAAVRAGSFRPGELVLLAGFGGGMAASFALIEW 配列番号 17

40

E. ファエカリス (E. faecalis) mvaE

【化 18】

atgaaaacagtagttattattgatgcattacgaacaccaattggaaaatataaaggcagcttaagtcaagtaagtgccgtagacttaggaaca
 catgttacaacacaacttttaaaaagacattccactatttctgaagaaattgatcaagtaaatctttgaaatgtttacaagctggaaatggccaa
 aatcccgacgacaaatagcaataaacagcggtttgtctcatgaaattcccgaatgacggtaaatgaggtctgaggatcaggaatgaagg
 ccgttattttggcgaacaattgattcaattaggagaagcggaagtgttaattgctggcgggattgagaatatgtcccaagcacctaaattaca
 acgttttaattacgaacagaaagctacgatgcgcctttttctatgatgatgatgattaacggatgccttttagtggtcaggcaatgggctt
 aactgctgaaaatgtggccgaaaagtatcatgtaactagagaagagcaagatcaatttctgtacattcacaattaaaagcagctcaagcaca
 agcagaagggtatctcgtgacgaaatagccccattagaagtatcaggaaacgcttggagaaagatgaagggttcgccctaattcagc
 gttgagaagctaggaacgcttaaacagttttaaagaagacggctactgtaacagcagggaatgcatcaaccattaatgatggggcttctgct
 ttgattattgcttcacaagaatatgccgaagcacacggcttcttatttagctattattcagacagatgtggaagtcgggtattgatccagcctata
 tgggaatttcgccgattaaagccattcaaaaactgttagcgcgaatcaacttactacgggaagaaattgatctgtatgaaatcaacgaagcatt
 tgcagcaactcaatcgtggtccaaagagaactggctttaccagaggaaaaggtaacatttatggtggcgggtatttcatttaggtcatgcgatt
 ggtgccacaggtgctcgtttattaacgagttaagttaataaatacaaaaagaaagaaatattgagtggtcttcttatgtatcggcgggtgg
 cttaggactcgtatgctactagagacctcagcaaaaaaaacagccgattttatcaaatgagtcctgaggaaacgcttcttcttctt
 aatgaaggccagatttctgctgatacaaaaaagaatttgaaaatacggcttattctcgcagattgccaatcatatgattgaaatcaaatcag
 tgaacagaagtgccgatggcggttggttacatttaacagtggacgaaactgattatttggtaaccaatggcgacagaagagccctcagttat
 tggcggtttgagtaattggtgcaaaaatagcacaaggatttaaacagtgtaatcaacaacgcttaatgctggacaaaatcgtttttacgatgtt
 gcagatcccagtcattgattgataaactacaagtaagagaagcggaagttttcaacaagcagagtttaagttatccatctatcgttaaacgg
 ggcggcggttaagagatttgcaatatcgtactttgatgaatcattgtatctgctgactttttagtagatgtaaggatgcaatgggggcaaat
 atcgttaacgctatgttggaaggtgtggccgagttgtccgtgaatggttgcggagcaaaaagattttatcagattttaagtaattatgccacg
 gagtcggttggtacgatgaaaacggctattccagtttcacgttaagttaaggggagcaatggccgggaaattgctgaaaaaattgttttagctt
 cacgctatgcttcattagatccctatcgggcagtcacgcatacaaaaggaatcatgaatggcattgaagctgtagttttagctacaggaaatga
 tacacgcgctgttagcgttctgtcatgcttttgcgggtgaagggaaggtcgtaccaaggcttactagttggacgctggatggcgaaacact
 aattggtgaaatttcagttccgcttgccttagccacggttggcggtgccaaaaagtccttaacataatcaagcagctgctgattttagcagt
 gacggatgcaaaaagaactaagtcgagtagtagcggctgttgggttgccaaaaatttagcggcggttacgggccttagtctctgaaggaaatc
 aaaaaggacacatggctctacaagcaggttctttagcgtacggctggagctactgtaagaagttgaggcagtcgctcaacaattaaa
 acgtcaaaaaacgatgaaccaagaccgagccatggctattttaaatgatttaagaaaacaataa 配列番号 18

10

20

E. フェカリス (E. faecalis) mvaS

【化 19】

Atgacaattgggattgataaaattagttttttgtgcccccttattatattgatatgacggcactggctgaagccagaaatgtagacctggaaa
 attcatattgtattgggcaagaccaaatggcgggtaaccaatcagccaagatattgtgacatttgcagccaatggcgagaagcgatctt
 gacaaaagaagataaagaggccattgatatgtgattgtcgggactgagtcagatcgtatgagtcaaaagcgccgcagttgtcttacatc
 gtttaattggggattcaacctttcgtcgtctttcgaatacagggaagcgtttagcggagcaacagcaggcttacgttagctaagaatcacgt
 agccttacatccagataaaaaagtcgtgtagcggcagatattgcaaaaatggtttaaattctggcggtgagcctacacaaggagctg
 gggcggttgcaatgttagttgtagtgaaccgcgcattttgctttaaagaggataatgtgatgctgacgcaagatctatgacttttggcgt
 ccaacaggccaccgtatcctatggtcgtatggtcctttgtcaaacgaaacctacatccaatctttgcccagctctgggatgaacataaaaaa
 cgaaccggcttgattttgcagattatgatgcttttagcgttccatattccttacaaaaaatgggcaaaaagccttattagcaaaaatctccgac
 caaactgaagcagaacaggaaacgaattttagcccgttatgaagaaagtatcgtctatagtcgtcgttaggaaactgtatcgggttcacttt
 atctgggactcatttcccttttagaaaaatgcaacgactttaaccgcaggcaatcaaatgtttattcagttatggttctggtgctgctgaattt
 ttactgggtgaatttagtctggttatcaaaatcatttcaaaaaagaaactcatttagcactgctggataatcgacagaactttctatcgtgaa
 tatgaagccatgtttgcagaaacttttagacacagacattgatcaaacgttagaagatgaattaaaatagattttctgctattaataataccgttc
 gttcttatcgaaactaa 配列番号 19

30

40

E. フェカリス (E. faecalis) (mvaE)

【化 2 0】

MKTVVIIDALRTPIGKYKGSLSQVSAVDLGTHVTTQLLKRHSTISEEIDQVIFGNVLQAG
 NGQNPARIAINSGLSHEIPAMTVNEVCSGSMKAVILAKQLIQLGEAEVLIAGGIENMSQ
 APKLQRFNYETESYDAPFSSMMYDGLTDAFSGQAMGLTAENVAEKYHVTREEQDQFS
 VHSQKAAQAQAEQIFADEIAPLEVSGTLVEKDEGIRPNSSVEKLGTLKTVFKEDGTVT
 AGNASTINDGASALIIASQEYAEAHGLPYLAIIIRDSVEVGIDPAYMGISPIKAIQKLLARN
 QLTTEEIDLYEINEAFAATSIVVQRELALPEEKVNIYGGGSLGHAIGATGARLLTSLSYQ
 LNQKEKKYGVASLCIGGGLGLAMLLERPQQKKNRFRYQMSPEERLASLLNEGQISADT
 KKEFENTALSSQIANHMIENQISETEVPMGVGLHLTVDETDYLVPMATEEPSVIAALSNG
 AKIAQGFKTVNQRLMRGQIVFYDVADPESLIDKLQVREAEVFQQAELSYPISIVKRGGG
 LRDQLQYRTFDESFSVDFLVDVKDAMGANIVNAMLEGVAELFREWFQAEQKILFSILSNY
 ATESVVTMKTAPVSRSLKGSNGREIAEKIVLASRYASLDPYRAVTHNKGIMNGIEAVVL
 ATGNDTRAVSASCHAFVKEGRYQGLTSWTLDEQLIGEISVPLALATVGGATKVLPK
 SQAAADLLAVTDAKELSRVVAAVGLAQNLALRALVSEGIQKGHMLQARSLAMTVG
 ATGKEVEAVAQQLKRQKTMNQDRAMAILNDLRKQ 配列番号 20

10

E. ファエカリス (E. faecalis) (mv a S)

【化 2 1】

MTIGIDKISFFVPPYYIDMTALAEARNVDPGKFHIGIGQDQMAVNPISQDIVTFAANAAE
 AILTKEDKEAIDMVIVGTESIDESKAAAVVLHRLMGIQPFARSFEIKEACYGATAGLQL
 AKNHVALHPDKKVLVVAADIAKYGLNSGGPEPTQGAGAVAMLVASEPRILALKEDNVM
 LTQDIYDFWRPTGHPYPMVDGPLSNETYIQSFAQVWDEHKKRTGLDFADYDALAFHIP
 YTKMGKKALLAKISDQTEAEQERILARYEESIVYSRRVGNLYTGSLYLGLISLLENATTL
 TAGNQIGLFSYSGGAVAEFFTGELVAGYQNHQKETHLALLDNRTLSIAEYEAAMFAET
 LDTDIDQTLDELKYSISAINNTVRSYRN 配列番号 21

20

M E A ウラジロハコヤナギ (P. alba) イソプレニンシンターゼ

【化 2 2】

atggaagctcgtcgttctgcgaactacgaacctaacagctgggactatgattacctgctgctccgacacggacgagtcacgaagtata
 caaagacaaagcgaaaaagctggaagccgaagttcgtcgcgagattaataacgaaaaagcagaatttctgacctgctggaactgattga
 caacgtccagcgcctgggcttgcgttaccgttgcagctgataccgtggtgcgctggatcgcttcttccggcggttcgcatgcggt
 aaccaagacttcctgcacgggtacggcactgtcttccgtctgctgcgtaacacgggtttgaggtttctcaggaagcgttcagcggcttcaaa
 gacaaaacggcaacttcctggagaacctgaaggagatacaagctatcctgagcctgtacgagccagcttctgctctggaaggc
 gaaaacatcctggacgagcgaagggttgcgaatctctcatctgaaagaactgtctgaagaaaagatcggtaaagagctggcagaacag
 gtgaaccatgcactggaactgccactgcacgccgtactcagcgtctggaagcagtatggtctatcagggcctaccgtaaaaaggaggac
 gcgaatcaggttctgctggagctggcaattctgattacaacatgatccagctctgtataccagcgtgatctgcgtgaaacgtcccgttggtg
 cgtcgtgtgggtctggcgacaaaactgcactttgctcgtgaccgcctgattgagagcttctactgggccgtgggtgtagcattcgaaccgca
 atactccgactgccgtaactccgtcgcaaaaatgttttcttctgaaccattatcgacgatatctacgatgtatacggcacctggacgaactgg
 agctgttactgatgcagttgagcgttgggacgtaaacgccatcaacgacctgccgattacatgaaactgtgcttctggtctgtataacac
 tattaacgaaatgcctacgacaacctgaaagataaagggtgagaacatcctgccgtatctgacaaaagcctgggtgacctgtgcaacgctt
 tctgcaagaagccaagtggctgtacaacaatctactccgacctttgacgactacttggcaacgcatggaaatccttctggtcccgtgc
 aactggtgttcgttacttgcgtgctgcagaacattaaaaaggagagatcgaaaacctgcaaaaataccatgacaccatctctgccttc
 ccatacttccgtctgtgcaatgacctggctagcgcgtctcggaattgcgctggtgaaaccgcaaatagcgtttctgttacctgcgcact
 aaaggatctccgaagaactggctaccgaaagcgtgatgaatctgatcgatgaaacctggaaaaagatgaacaaggaaaaactgggtggt
 agcctgttcgcgaaccgttcgtgaaaccggcatcaacctggcacgtcaatctactgcactatcataacggcgacgcgcatacctctcc
 ggatgagctgaccgcgaacgcgttctgtctgtaactactgaaccgattctgccgtttgaacgctaa 配列番号 22

30

40

i s p A

【化 2 3】

tggactttccgcagcaactcgaagcctgcgttaagcaggccaaccaggcgctgagccgtttatcgccccactgccctttcagaacactccc
 gtggcgcgaaccatgcagtatggcgcatattaggtgtaagcgctgcgacctttcctggttatgccaccggcgcataatgtttggcgtagca
 caaacacgctggacgcacccgctgctgccgtagagtgtatccacgcttactcattaattcatgatgattaccggcgatggatgatgacgatc
 tgcgccgcgggtttgccgacctgccatgtgaagtttggcgaagcaaacgcgattctcgtggcgacgctttacaaacgctggcgttctcgatt
 ctaagcgatgccgatatgccggaagtgtcggatcgcgacagaatttcgatgattctgaactggcgagcgccagcggtattgccggaatgt
 gcggtggcagggcactagatttagacgcggaaggcaaacacgtacctctggacgcgcttgagcgattcatcgtcataaaaccggcgcat
 gattcgcgccgccgttcgccttgggtgcatgaagcgccggagataaaggcgctcgtgctctgccagtactcgacaagtacgcagagagcat
 cggccttgccttccaggttcagatgacatcctggatgtgtaggagatactgcaacgttgggaaaacgccaggggtgccgaccagcaact
 ggtaaaagtacctaccctgcacttctgggtcttgagcaagcccggaagaaagcccggtatctgacgacgatgcccggtcagtcgctgaaa
 caactggctgaacagtcactcgatacctcggcactggaagcgctagcggactacatcatccagcgtataataataa 配列番号 23

10

M E A ウラジロハコヤナギ (P . a l b a) イソプレニンターゼ

【化 2 4】

MEARRSANYEPNSWDYDYLLSSDTDESIEVYKDKAKKLEAEVRREINNEKAEFLTLEL
 IDNVQRLGLGYRFESDIRGALDRFVSSGGFDAVTKTSLHGTALSFRLLRQHGFEVSQEAF
 SGFKDQNGNFLENLKEDIKAILSLYEASFLALEGENILDEAKVFAISHLKELSEEKIGKEL
 AEQVNHALELPLHRRTRQRLA VWSIEAYRKKEDANQVLELAILDYNMIQSVYQRDLR
 ETSRWRRVGLATKLHFARDRLIESFYWAVGVAFEPQYSDCRNSVAKMFSFVTIIDDY
 DVYGTLDLELFTDAVERWDVNAINDLPDYMKLCFLALYNTINEIAYDNLKDKGENILP
 YLTKAWADLCNAFLQEAKWLYNKSTPTFDDYFGNAWKSSSGPLQLVFAYFAVVQNIK
 KEEIENLQKYHDTISRPSHIFRLCNDLASASAEIARGETANSVSCYMRKGI SEELATESV
 MNLIDETWKKMNKEKLGGSLFAKPFVETAINLARQSHCTYHNGDAHTSPDELTRKRVL
 SVITEPILPFER 配列番号 24

20

大腸菌 (E . c o l i) のためにコドン最適化されたアモルファジエンシンターゼ

【化 2 5】

ATGAGCCTGACCGAAGAAAAACCGATTTCGTCCGATTGCAAATTTTCCGCCTAGCATT
TGGGGTGATCAGTTTCTGATTTATGAGAAACAGGTTGAACAGGGCGTTGAGCAGAT
TGTTAATGATCTGAAAAAAGAAGTTCGCCAGCTGCTGAAAGAAGCACTGGATATTC
CGATGAAACATGCCAATCTGCTGAAACTGATTGATGAAATTCAGCGTCTGGGTATCC
CGTATCATTTTGAACGTGAAATTGATCATGCCCTGCAGTGCATTTATGAAACCTATG
GTGATAATTGGAATGGTGATCGTAGCAGCCTGTGGTTTTCGTCTGATGCGTAAACAGG
GTTATTATGTTACCTGCGACGTGTTTAACAACCTATAAAGATAAAAACGGTGCCTTTA
AACAGAGCCTGGCAAATGATGTTGAAGGTCTGCTGGAACCTGTATGAAGCAACCAGC
ATGCGTGTTCGGGTGAAATTATTCTGGAAGATGCACTGGGTTTTACCCGTAGCCGT
CTGAGCATGATGACCAAAGATGCATTTAGCACCAATCCGGCACTGTTTACCGAAAT
CCAGCGTGCCTGAAACAGCCGCTGTGGAAACGTCTGCCTCGTATTGAAGCAGCAC
AGTATATTCGGTTTTATCAGCAGCAGGATAGCCATAACAAAACCCCTGCTGAAACTG
GCAAAACTGGAATTTAATCTGCTGCAGAGCCTGCATAAAGAAGAAGTGTAGCCACGT
TTGTAAATGGTGGAAGCCTTCGACATCAAAAAAACGCACCGTGTCTGCGTGATC
GTATTGTTGAATGTTATTTTTGGGGTCTGGGTAGCGGTTTTGAACCGCAGTATAGCC
GTGCACGTGTGTTTTTACCAAAGCAGTTGCAGTTATTACCCTGATCGATGATACCT
ATGACGCATATGGCACCTATGAGGAACTGAAAATCTTTACCGAAGCCGTTGAACGT
TGGAGCATTACCTGTCTGGATACCCTGCCGGAATATATGAAACCGATCTATAAACTG
TTCATGGACACCTATACCGAGATGGAAGAATTTCTGGCAAAAGAAGGTCTGACCGA
CCTGTTTAATTGCGGTAAAGAATTTGTGAAAGAATTCGTGCGTAACCTGATGGTTGA
AGCAAAATGGGCCAATGAAGGTCATATTCCGACCACCGAAGAACATGATCCGGTTG
TGATTATTACCGGTGGTGCAAACCTGCTGACCACCACCTGTTATCTGGGTATGAGCG
ATATTTTCACCAAAGAAAGCGTTGAATGGGCAGTTAGCGCACCGCCTCTGTTTCGTT
ATAGCGGTATTCTGGGTCTGTCGTCTGAACGATCTGATGACCCATAAAGCAGAACAA
GAACGTAAACATAGCAGCAGCAGCCTGGAAAGCTATATGAAAGAATATAACGTGA
ACGAAGAGTATGCACAGACCCTGATTTACAAAGAAGTTGAGGACGTTTGGAAAGAT
ATCAACCGTGAATATCTGACCACGAAAAACATTCCGCGTCCGCTGCTGATGGCAGTT
ATTTATCTGTGTCAGTTCCTGGAAGTTCAGTATGCAGGTAAAGATAACTTTACGCGT
ATGGGCGACGAATATAAACATCTGATTAAAAGCCTGCTGGTGTATCCGATGAGCAT
TTAA 配列番号 25

大腸菌（E. coli）のためにコドン最適化されたファルネセンシンターゼ

10

20

30

【化 2 6】

ATGAGCACCTGCCGATTAGCAGCGTTAGCTTTAGCAGCAGCACCAGTCCGCTGGTT
GTTGATGATAAAGTTAGCACCAAACCGGATGTTATTCGTACACCATGAACTTTAAT
GCAAGCATTGTTGGGTGATCAGTTTCTGACCTATGATGAACCGGAAGATCTGGTGAT
GAAAAAACAGCTGGTTGAAGAAGTGAAGAAGTAAAAAGAGCTGATCACC
ATCAAAGGTAGCAATGAACCGATGCAGCATGTTAACTGATTGAACTGATCGATGC
CGTTCAGCGTCTGGGTATTGCATATCATTTTGAAGAAGAAATCGAAGAAGCCCTGC
AGCATATTCATGTTACCTATGGTGAACAGTGGGTGGATAAAGAAAATCTGCAGAGC
ATTAGCCTGTGGTTTCGTCTGCTGCGTCAGCAGGGTTTTAATGTTAGCAGCGGTGTG
TTTAAAGATTTTATGGACGAGAAAGGCAAATTCAAAGAAAGCCTGTGTAATGATGC
ACAGGGTATTCTGGCACTGTATGAAGCAGCATTTATGCGTGTGGAAGATGAAACCA
TTCTGGATAATGCACTGGAATTTACCAAAGTGCACCTGGATATCATTGCAAAAGATC
CGAGCTGTGATAGCAGCCTGCGTACCCAGATTTCATCAGGCACTGAAACAGCCGCTG
CGTCGTCGTCTGGCACGCATTGAAGCACTGCATTATATGCCGATTTATCAGCAAGAA
ACCAGCCATAATGAAGATCTGCTGAACTGGCAAACTGGATTTTAGCGTTCTGCA
GTCCATGCACAAAAAAGAACTGAGCCATATTTGTAAATGGTGGAAAGATCTGGATC
TGCAGAATAAACTGCCGTATGTTTCGTGATCGTGTGTTGTGGAAGGTTATTTTGGATT
TGAGCATCTATTATGAACCGCAGCATGCACGTACCCGTATGTTTCTGATGAAAACCT
GTATGTGGCTGGTTGTGCTGGATGATACGTTTGATAATTATGGCACCTACGAGGAAC
TGGAATCTTTACCCAGGCAGTTGAACGTTGGAGCATTAGTTGTCTGGATATGCTGC
CGGAATACATGAACTGATTTATCAAGAACTGGTGAACCTGCACGTTGAAATGGAA
GAAAGTCTGGGCAAAGGTGGTAAAAACATTAGCAATAGTCTGTGTCAGGGTCGTTG
GCAGAAAGAACTGGGTAGTCAGATTACCCTGGTTGAAACCAAAATGGCAAAACGTG
GTGTTTCATGCCCAGCCGCTGGAAGAGTATATGAGCGTTAGCATGGTTACCGGCACCT
ATGGTCTGATGATTGCACGTAGCTATGTTGGTTCGTGGTGATATTGTTACCGAAGATA
CCTTTAAATGGGTGAGCAGCTATCCGCCTATTATCAAAGCAAGCTGTGTTATTGTTTC
GCCTGATGGATGATATTGTGAGCCACAAAGAAGAACAAGAACGCGGTCATGTTGCC
AGCAGCATTGAATGTTATAGCAAAGAAAGTGGTGCAAGCGAAGAAGAAGCCTGCG
AATATATCAGCCGTAAAGTGGAAAGATGCCTGGAAAGTTATTAATCGTGAAAGCCTG
CGTCCGACCGCAGTTCCGTTTCCGCTGCTGATGCCTGCAATTAACCTGGCACGTATG
TGTGAAGTTCTGTATAGCGTTAATGATGGTTTTACCCATGCCGAAGGTGATATGAAA
TCCTATATGAAAAGCTTCTTCGTGCATCCGATGGTTGTTTAA 配列番号 26

10

20

30

pMCM1225-pCL-Ptrc-Upper_GcMM_163 (エンテロコッカ
ス・ガリナルム (Enterococcus gallinarum) EG2)

【化 27】

cccgtcttactgtcgggaattcgcgttggccgattcattaatgcagattctgaaatgagctgttgacaattaatcatccggctcgtataatgtgtg
 gaattgtgagcgggataacaatttcacacaggaacagcgccgctgagaaaaagcgaagcggcactgctctttaacaatttatcagacaatct
 gtgtgggcactcgaccggaattatcgattaactttattattaaaaaattaaagaggtatatattaatgtatcgattaaataaggaggataaaccat
 ggaagaagtggtaattatagatgcacgtcggactccgattggtaaatacaccggctgttgaaaggttttcagcgggtggcgctggggacg
 gccgtggcctaaagacatgttcgaacgcaaccagaaaatcaaaaggagatcgccgaggtcataattgtaattgtcttcagggcaggaaat
 ggccagaaccccgcgcggcaagtgtcttcaatcagggtgtccgttgacattcccgttctacaattaacgaggtttgtgggtctggtttga
 aagctatcttgatgggcatggacaatccaactcgcaaacgcgaagtagtgcaggcggcattgaatcaatgacaaatcgccaa
 gcctgtcccactataacaaggcggaggtacgtatagtgtccagtgtcagcagacactggatggctgacagacgcattttctagttaa
 cctatgggattaacagcggaaaacgtcgcacagcgctacggtatctccgtgagggcgaagatcaattcgatatcaatctcagatgaaag
 cagcaaaagcgcaggcagaaaaacaattcgtaaggaaattgtccactggcgggtgaaactaaaccatcacagctgacgaagggatc
 agatcccaaacacgatggagaaactggcaagtctcaaacctgtttttaaaaccgatggcactgtaaccgcagggaatgctagcaccatta
 atgacggggccgccctgtgtgctgtgctagcaaaactfactgcgaaactaatgacataaccgtaccttgcgacaatcaagaaattgttgaag
 ttggaatcgatccggagattatgggcatctccgataaaagcgatacaaacattgtacaaaatcaaaaagttagcctcgaagatattggagt
 ttttgaataaatgaagcctttgccgcaagtagcatagtgttgaaatcgagtgggattagatccggctaaagttaaccgttatgggggtgtgt
 atatccttaggtcatgaattggggcaaccggcgctcgcctggccacttactggtgatcaaatgcaggagatacaagcagcttatgtatt
 gcgagcctgtgcgttgggtggactggactggcaatgcttttagaacgtccaactattgagaaggctaaaccgacagacaaaaagtcta
 tgaattgtcaccagctgaacggttgaagagctggaaaaatcaacagaaaatcagttctgaaactaaacagcagttatctcagatgatgttgc
 cgaggacactgcaaacacattgatagaaaatcaaatatcagagattgaactcccaatgggcgtcgggatgaacctgaaggttgatgggaaa
 gcctatgttggccaatggcgacggagagccgtccgtcatcgcggccatgtctaatgggtgcaaaatggcggcgaaatcacactcagt
 cgaaagaacggctgctcagaggctcagattgttttcagcgcgaagaatccgaatgaaatcgaacagagaatagctgagaaccaagccttgat
 tttcgaacgtgccgaacagctcctatccttcattgtgaaaagagaggggaggtctccgccgacttgcacttctcattttctcggcattctcagc
 aggagctcgcggaccagctccacattttatcagtgacgttttttagatgtgaaagacgcgatgggggcaaatatcataatgaatacttga
 gggcgctcgagccctgtttcgcgaatgttccccaatgaggaaattcttttctattctcgaacttggctacggagagcttagtcacggctg
 tttgtgaagtccatttagtgacttagcaagagaggtgtgtgcaacgggtggccagaaaattgtgcaggcgtcgtcttcgcaaaagacagac
 ccataccgcgcagtgaccacaacaaaggattatgaacgggtgtagaggctgttatgttgcacaggaacgacacgcgcgagctctca
 gccgttgtcatggatagcagcgcgcaccggtagctatcagggtctgactaactggacgattgagtcggatcgctgttagggcgagata
 acactgccgctggccatcgctacagttggaggcgctaccaaaagtgttcccaaaagctcaagcggcactggagattagtgatgttactcttc
 tcaagagcttcgagccttagcggcgctcagtaggttttagtacaataatcgcggccctgcgcgactggtttccgaaggatataaaaaagg
 cacatgtccatgcaagcccgtctctcgcaatcgcgtcgggtgtgtaaaaagccgagatcgagcaggctcgccgaaaagtgcggcagaa
 cccgccaatgaatcagcagcaggcgctccgtttcttggcgagatccgcgaacaatgatctagacgcactaggaggatataccaatgaacg
 tcggcattgacaaaattatttttcttccaccgtattatctggatattggtcgaacctggcccacgcacgcgaagtggaccgaaacaaattac
 aattggaaattggacaggtacagatggctgtgagcaaaaagacgcacgatatcgtaacattcgcggctagtgcggcgaaaggaaatttagaa
 cctgaggacttgcaagctatagacatggtatagttgggtaccgaatcgggcattgacgagagcaaaagcatcccggtcgttttacatcgtttgt
 tggcggtacaacctttcgtcgcagttttgaaattaaagaagcctgttacggggcaaccgcaggcattcagtttccaagactcatataaag
 cgaacccggagagcaaggtcctggttaattgcaagcgatatagtcggatggtcttcggtcagggtggagagcccacacaaggcgaggg
 gcagttgctatgcttctcagggcaaatcccagaatcctgaccttcgaaaacgacaatctgatgttaacgcaggatatttatgacttctggagac
 cacttgggtcacgcttacctatggtatggtccacctttccaatcaagtctatattgacagttttaagaaggcttggcaagcacattgcgaacg
 caatcaagcttctatatccgactatgccgcgattagtttcatattccgtatacaaaaatgggtaagaaagccctgctcgtgttttgcagatga
 agtggaaactgaacagggaacgcgttatggcacggtatgaagagctctatcgtatattcacgccggtacggcaactgtatagcggtatcattgt
 acctggggctgatattccttattgaaaacagttctcactgtcggcgggcgaccggataggattgttttagttatggagtggtcgtgtcagcg
 aatttttctccggtcgttttagtgagcgtatgaaaatcaattgaacaaagaggcgcataccagctcctggatcagcgtcagaagctttccat
 cgaagagtatgaggcgatttttacagattccttagaaattgatcaggatgcagcgttctggatgacctgccatattccatccgcgagataaaa
 aacacgattcgggtactataaggagagctgactgcagctggtaccatattgggaattcgaagcttggggccgaacaaaaactcctcagaag
 aggatctgaatagcggcgtcgaccatcatcatcatcattgatttaaacggtctccagcttggctgttttggcggtatgagagaagattttca
 gcctgatacagattaaatcagaacgcagaagcggtctgataaaacagaatttgcctggcgagtagcgcgggtgtcccacctgacccca

10

20

30

40

【化 2 8】

tgccgaactcagaagtgaacgccgtagcggcgatggtagtggtgggtctccccatgcgagagtaggggaactgccaggcatcaataaa
 acgaaaggctcagtcgaaagactgggcttctgtttatctgtgtgtgtgcggggaacgctctcctgagtaggacaaatccggcgggagcgga
 ttgaacgttgcgaagcaacggccggagggtggcgggagcagcggccgataaactgccaggcatcaaatgaagcagaaggccatc
 ctgacggatggccttttgcgtttctacaaactcttttgtttatcttaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaat
 gcttcaataatctggcgtaatagcgaaggcccgaccgacgccccttcccaacagtgcgcagcctgaatggcgaatggcgctgatg
 cggatcttctcttacgcatctgtgcggatctacaccgcatatgggtgactctcagtaaatctgctctgatccgcatagttaagccagccc
 cgacacccgccaacaccgctgacgagcttagtaaaagccctcgctagatttaatgcggatgttgcgattacttcgccaactattgcgataac
 aagaaaaagccagccttctatgatatactcccaattgtgtaggccttattatgcacgcttaaaaaataaaaaagcagacttgacctgatagttt
 ggctgtgagcaattatgtgcttagtgcataacgcttgagttaaagccgcccgcgaagcggcgtcggctgaacgaattgttagacattatt
 gccgactaccttggtgatctgcctttcacgtatggacaattcttccaactgatctgcgcgagggccaagcgatcttcttctgtccaagat
 aagcctgtctagcttcaagtatgacgggctgatactggcggcagggcgtccattgccagtcggcagcgacatccttggcgcgatttt
 gccgggtactgcgtgtacaaatcggggacaacgtaagcactacattcgtcatcgccagcccagtcggcgggcgagttccatagcggt
 aaggtttcatttagcgccctcaaatagatcctgttcaggaaccggatcaaaagattcctccgccgctggacctaccaaggcaacgctatgtct
 ctgtctttgtcagcaagatagccagatcaatgtcgtcgtggcgtcgaagatacctgcaagaatgtcattgcgctgccattctccaaatt
 gcagttcgcgcttagctggataacgccacgggaatgatgtcgtcgtgcacaacaatgggtacttctacagcggcgagaatctcgtctctcca
 ggggaagccgaagttccaaaaggtcgtgatcaaaagctcggcggtgttcatcaagccttacggcaccgtaaccagcaaatcaatctc
 actgtgtggctcaggccgccatccactgcggagccgtacaaatgtacggcagcaacgtcgggtcagatggcgctcgtatgacgcaac
 tactctgatagttgagtcgatacttcggcgatcacggccttccctcatgatgtttaaacttgttttagggcgactgccctgctcgtaacatcggtg
 ctgtccataacatcaaacatcgaccacggcgtaacgcgcttgcgttggatgccgaggcatagactgtacccccaaaaaacagtc
 aacaagccatgaaaaccgccactgcggcgttaccaccgctgcgttgcgaaggttctggaccagttgcgtgagcgcatacgtacttgca
 ttacagcttacgaaccgaacaggcttatgtccactgggtcgtgccttcatccgtttccacgggtgtgcgtcacccggcaaccttgggcagcag
 cgaagtcgaggcatttctgtcctggctggcggaacgagcgaaggttgcgtctccacgcacgtcagggcattggcgcccttgcgttcttcta
 cggcaaggtgctgtgcagcgtatcgccctggcttcaggagatcggaagacctcggcgctcggcgcttggcggtggtgctgaccccg
 atgaagtgttgcacctcgtgttctggaagcgagcgtcgttgttgcggcagcttctgtatggaacgggcagtcggatcagtgagggtt
 gcaactcggggtcaaggatctggatttcgacacggcagcgtcgtcgggagggcaagggtcccaaggatcgggccttgatgttacc
 cgagagcttggcaccagcctgcgcgagcaggggaatfaattccacgggttctgctgcccgcaaacgggctgttctggtgtgtgtagttt
 ttatcagaatcgagatccggcttcagccggttgcggctgaaagcgctatttctccagaattgccatgatttttcccccaggaggcgtc
 actggctcccgtgtgtcggcagctttgattcgataagcagcgtcgttctcagcgtgtctatgtgtgactgttgagctgtaacaagtgtgtc
 aggtgttaatttcatgttctagttgcttcttttactggttccctgttctattaggtgttacatgctgttcatctgttacattgtcgtatgttcatgtt
 gaacagcttgaatgcacaaaaactcgtaaaagctctgatgtatctatctttttacaccgttttcatctgtgcataatggacagtttcccttata
 tgaacgggtgaacagttgttctacttttgtttagtcttgatgttccactgatagatacaagagccataagaacctcagatccttccgtatttagc
 cagtatgttctctagtggttgcgttgttttgcgtgagccatgagaacgaaccattgagatcatacttatttgcattgcactcaaaaatttgcct
 caaaactggtgagctgaattttgcagttaaagcgtcgttagtggttttcttagtccgttatgtaggtaggaatctgatgtaagtgtgtgtattt
 tgtcaccattcattttatctggttgcctcaaggtcgttgcagatccattgtctatctagttcaacttggaaaatcaacgtatcagtcggcg
 cctcgttatacaaccaccaatttcatattgctgtaagtgtttaaacttacttattggttcaaaacccattggttaagccttttaaacatgtagt
 tattttcaagcattaacatgaactaaattcatcaaggcctaactctatatttgccttgcgtgttcttttgtttagttctttaaataaccactcataat
 cctcatagagtatttgtttcaaaagacttaacatgttccagattatatttgaatttttaactggaaaagataaggcaataatcttctcactaaaa
 actaattctaattttgcgttgagaacttggcagatttgtccactggaaaatctcaaacgctttaaaccaaaaggattcctgatttccacagttctcgt
 catcagctctctggttgccttagctaataacaccataagcatttccctactgatgttcatcatctgagcgtattggtataagtgaacgataccgtc
 cgttcttccctgtagggtttcaatcgtggggttagtagtgcacacagcataaaattagcttgcgttcatgctccgttaagtcatagcgactaa
 tcgctagttcatttgccttggaaaacaactaattcagacatacatcgaattggtctaggtgattttaactataccaattgagatgggctagtc
 atgataattactagcttcttcttgcgttgggtatctgtaaattctgctagaccttgcgtgaaaacttgaattctgctagacctctgtaaa
 ttccgctagaccttgcgttgttttttgtttatattcaagtgttataatftatagaataaagaagaataaaaaagataaaaaagataatgccca
 gccctgtgtataactactactttagtcagttccgcagttatcaaaaaggatgtcgcgaacgctgttgcctctcaaaaacagaccttaaaac
 cctaaaggcttaagtagcaccctcgaagctcgggcaaatcgtgaatattccttttgcctccgaccatcaggcaccctgagtcgtcttcttct
 gtgacattcagttcgtcgcgtcagggctcggcagtgaaatggggtgaaatggcactacagggccttattgattcatgcaaggaaacta
 ccataatacaagaaaagcccgtcacgggcttctcagggcggtttatggcggtctgctatgtgtgctatctgacttttgcgttgcagcagtt
 cctgccctctgattttcagctgaccacttggattatcccggtgacaggtcattcagactggctaatagcaccagtaaggcagcggtatcatc
 aacagctta 配列番号 27

マイコプラズマ・ホミニス (Mycoplasma hominis) ATCC 23114 からのホスホクトラーゼのアミノ酸配列

【化 2 9】

MISKIYDDKKYLEKMDKWFRAANYLGVCQMYLRDNPLLKKPLTSNDIKLYPIGHWGT
 VPGQNFYIYTHLNRVIKKYDLNMFYIEGPGHGGQVMISNSYLDGSYSEIYPEISQDEAGLA
 KMFKRFSFPGGTASHAAPETPGSIHEGGELGYSISHGTGAILDNPDVICAAVVGDEAET
 GPLATSWFSNAFINPVNDGAILPILHLNGGKISNPTLLSRKPKEEIKKYFEGLGWNPIFVE
 WSEDKSNLDMHELMASLDKAIESIKEIQAEARKKPAEEATRPTWPMIVLRTPKGWTG
 PKQWNNEAIEGSFRAHQVPIPVSAFKMEKIADLEKWLKSYKPEELFDENGTTIKEIRDLA
 PEGLRMAVNPNITNGGIDSKPLKLQDWKKYALKIDYPGEIKAQDMAEMAKFAADIMK
 DNPSSFRVFGPDETKSNRMFALFNVTNRQWLEPVSKKYDEWISPAGRIIDSQSEHQCE
 GFLEGYVLTGRHGFFASYEAFLRVVDSMLTQHMWKWIKKASELSWRKTYPSLNIIATSNA
 FQQDHNGYTHQDPGLLGHLADKRPEIIREYLPADTNSLLAVMNKALTERNVINLIVASK
 QPREQFFTVEDAEELLEKGKVVVPWASNISENEEPDIVFASSGVEPNIESLAAISLINQEY
 PHLKIRYVYVLDLLKLSRKIDPRGISDEEFDKVFTKNKPIIFAFHGFEGLLRDIFFTRSNH
 NLIAHGYRENGDITTSFDIRQLSEMDRYHIAKDAAEAVYGKDAKAFMNKLDQKLEYHR
 NYIDEYGYDMPEVVEWKWNINKEN 配列番号 28

10

マイコプラズマ・ホミニス (*Mycoplasma hominis*) ATCC 23114
 からのホスホクトラーゼのコード最適化されたDNA配列

【化 3 0】

atgattagcaaatctatgatgataaaaagtatctggaaaaaatggataaatggttcgcgcagcaaatatctgggtgtttgcagatgtatctg
 cgtgataatccgctgctgaaaaaccgctgaccagcaatgatatacaactgtatccgattggcattggggcaccgttccgggtcagaatttt
 atctatacccatctgaatcgcgtgatcaagaataatgatctgaatatgttctacatcgaaggtcctggtcatggtgtcaggttatgattagtaaat
 agctatctggtatggcagctatagcgaaatttatccgaaattagccaggatgaagcaggtctggccaaaatgtttaaactgttttagctttccgg
 gtggcaccgcaagccatgcagcaccggaaacaccgggttagcattcatgaaggtgtgaactgggtatagcattagccatggcaccgggt
 gcaattctgataaccggatgttatgttgcagcaggtgtgtgtgatggtgaagcagaacccggtccgctggcgaccagctggttttagcaat
 gcctttattaaaccgggttaatatgatggtgcatctctccgattctgcacatgaacgggtgtaaaattagcaatccgacctgctgagccgtaaac
 cgaaagaagaatacaaaaaatactttgaaggcctgggctggaatccgattttgtgaatggtcagaagataagagcaacctggatatgcat
 gaactgatggcaaaaagcctggataaagccattgaaagcatcaaaagaattcaggcagaagcacgtaaaaaacctgcagaagaagcaac
 ccgtccgacctggccgatgttctgctgacccgaaagggttgacaggtccgaaacagtggaataatgaagcaattgaaggtagctttc
 gtgcacatcaggttccgattccggttagcgcttttaaattgaaaagattgccgatcttgagaaatggctgaaaagctacaaaccggaagaa
 ctgtttgatgaaaatggcagcatcataaaagaataccgtgatctggtccggaaggtctgaaacgtatggcagtttaaccgattaccaatggt
 ggtattgatagcaaacctctgaaactgcaggattggaaaaagtacgcactgaaaattgattatccgggtgaaattaaagcacaggatatggc
 cgaaatggccaaattgcagcagatatcatgaaagataaccctagcagctttcgcgtttttggtccgatgaaacaaaagcaatcgtatgttt
 gccctgtttaatgtgaccaatcgtcagtggtggaaccgggttagtaagaaatagcatgaatggattagtcggcaggtcgcattattgattcac
 agctgagcgaacatcagtgtaagggtttctggaagggttatgttctgaccggctgcacatggtttttgcaagctatgaagcatttctgcgtgtt
 ggatagcatgctgaccaacatataaatggatcaaaaaggcaagcgaactgagctggcgtaaaacctatccgagcctgaacattattgca
 accagtaatgcaatttcagcaggatcataatggttatagcatcagatccgggtctgctgggtcatctggcagataaacgtccagaaattatc
 cgtgaatatctgcctgcagataccaatagcctgctggcggttatgaataaagcactgaccgaacgaatgtgattaatctgattgttgcaagca
 aacagcctgcgcaacagtttttaccggtgaagatgcagaggaaactgctggaaaagggttataaagttgtccgtgggcaagcaatattagc
 gaaaatgaagaaccggatattgtgtttgccagcagcgggtgtgaaccgaatatcgaagctctggcagcaattagcctgatcaatcaagaata
 tcctcatctgaaaatccgctatgtgtatgtgctggaatctgtagtgtaaaatcgaatccgctggtattagtgaagagtttg
 ataaagtgtttacaaaaaacaaccgattatctttgcctttcatggctttgagggaactgctgcgcgatatcttttaccgtagcaaccataacct
 gattgcacatggttatcgtgaaaacgggtgatcacaaaccagctttgatattcgtcagctgagtgagatggatcgttatcatattgcaaaagatg
 ctgccgaagccgtgtatggttaaagatgcaaaagcatttatgaacaaactgatcagaaactggaataaccaccgcaactatatcgtatgagtat
 ggctatgatatccgggaagttgtggaatggaaatggaagaacataaaagaaaattaa 配列番号 29

20

30

40

p M C S 1 0 1 9 の配列

【化 3 1】

gtttgacagcttatcatcgactgcacgggtgcaccaatgcttctggcgtcaggcagccatcggaagctgtggtatggctgtgcaggtcgtaaat
 cactgcataatcgtgtcgtcaaggcgcactccggttctggataatgtttttgcgccgacatcataacggttctggcaaatattctgaaatga
 gctgttgacaattaatcctggctcgtataatgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagcggcgtgagaaaaagc
 gaagcggcactgctcttaacaatttatcagacaatctgtgtggcactcgaccggaattatcgattaactttattatataaaataaagaggtat

【化 3 2】

atattaatgtatcgattaataaggaggaataaaccatggaaacgcgtcgttctgcgaactacgaacctaacagctgggactatgattacctg
 ctgtcctccgacacggacgagtcacatcgaaatfataaagacaaagcgaaaaagctggaagccgaagttcgtcgcgagattaataacgaa
 aaagcagaatttctgacctgtctggaactgattgacaacgtccagcgcctgggctgggtaccgttcgagctgatatccgtgggtgcgctg
 gatcgcttcgttctccggcggtctcgtatgcgtaaccaagacttccctgcacgggtacggcactgtcttccgtctgctgcgtcaacacgggt
 ttgaggttctcaggaagcgttcagcggcttcaaagacaaaacggcaacttctggagaacctgaaggaagatatcaaaactatcctgag
 cctgtacgagggcagcttctggtctggaagcgaaaaacatcctggacgagcggaaggttttcgaatctctcatctgaaagaactgtctg
 aagaaaaagatcggtaaagagctggcagaacaggtgaacctgcactggaaactgccactgcacgccgtactcagcgtctggaagcagtat
 ggtctatcgaggcctaccgtaaaaaggaggacgcgaatcaggttctgctgagctggcaattctgattacaacatgatccagctgtgtatc
 cagcgtgatctgcgtgaaacgtcccgttggtggcgtcgtgtgggtctggcgaccaaactgcactttgctcgtgaccgctgattgagagctt
 ctactgggcccgtgggtgtagcattcgaaccgcaatactccgactggcgtactccgtcgaaaaatgtttgtttcgttaaccattatcgacgat
 atctacgatgtatcggcaccctggacgaactggagctgtttactgatgcagttgagcgttgggacgtaaacgccatcaacgacctgccgg
 attacatgaaactgtgttctgtctgtataacactattaacgaaatcgctacgacaacctgaaagataaagggtgagaacatcctgccgta
 tctgaccaaagcctgggctgacctgtgcaacgcttctcgtcaagaagccaaagtggctgtacaacaaatctactccgacctttgacgactactt
 cggcaacgcatggaaatccttcttgcccgtcgaactgggttcgttacttctgctgctgtgcagaacattaaaaagggaagatcgaaa
 acctgcaaaaaatcatgacaccatctctcgtccttccatcttccgtctgtgcaatgacctggctagcgcgtctgcggaaattgcgcgtgg
 tgaaccgcgaatagcgtttctgtttacatgcgcactaaaggatatctccgaagaactggctaccgaaagcgtgatgaatctgatcgaata
 ttggaaaaagatgaacaaggaaaaactgggtgtagcctgttcgcgaaccgttcgtggaaccgcgatcaacctggcagctcaatctca
 ctgcacttatcataacggcgacgcgcatacctctccggtgagctgacctgcaaacgcgttctgtctgtaatactgaaccgattctgccgtt
 gaacgctaaagatacgcgtaaccccaaggacggtaaaatgattagcaaaatctatgatgataaaaagtatctggaaaaaatggataaatggt
 ttcgcgcagcaaatatctgggtgttgcagatgtatctgcgtgataatccgctgctgaaaaaacgctgaccagcaatgatataaaactgtat
 ccgattgtcattggggcaccgttccgggtcagaatttatctataccatctgaatcgcgtgatcaagaatatgatctgaatatgttctacatc
 gaaggctcctggtcatggtgtcaggttatgattagtaatagctatctggatggcagctatagcgaatttatccggaaattagccaggatgaa
 gcaggtctggccaaaatgtttaaacgttttagctttccgggtggcaccgcaagccatgcagcaccggaaacaccgggtagcattcatgaag
 gtggtgaactgggttatagcattagccatggcaccgggtcaattctgataaccggatgttattgtgcagcagttgttggtgatggtgaagc
 agaaaccgggtccgtggcgaccagctggtttagcaatgcctttattaacccgggttaatgatggtgccattctgccgattctgcacatgaacggt
 ggtaaaattagcaatccgacctgctgagccgtaaaccgaaagaagaaatcaaaaaatactttgaaggcctgggctggaatccgattttgtt
 gaatggtcagaagataagagcaacctggatgatcatgaactgatggcaaaaagcctggataaagccattgaaagcatcaaaagaaattcag
 gcagaagcacgtaaaaaacctgcagaagaagcaacccgtccgacctggccgatattgttctgctaccccgaaagggttgacaggtcc
 gaaacagtggataatgaagcaattgaaggtagcttctgtgcacatcaggttccgattccggttagcgctttaaagtgaagattgccga
 tcttgagaatggctgaaaaagctacaacccggaagaactgtttgatgaaaatggcacgatcataaaagaaatccgtgatctggctccggaa
 ggtctgaaacgtatggcagtttaacccgattaccaatgggtgattgatagcaaacctctgaaactgcaggattggaaaaagtacgcactgaa
 aattgattatccgggtgaaattaaagcacaggatatggccgaaatggccaaattgcagcagatatcatgaaagataaccctagcagcttctg
 cgtttttggtccggatgaaacaaaagcaatcgtatgtttgccctgtttaatgtgaccaatcgtcagtggtggaccgggttagtaagaaatac
 gatgaatggattagtcggcgaggtcgcattattgattcacagctgagcgaacatcagtgtagaggtttctggaaagggttatgttctgaccggtc
 gtcatgttttttgcaagctatgaagcatttctgcgtgttggtgtagcatgctgacccaacatatgaaatggatcaaaaaaggcaagcgaact
 gagctggcgtaaaacctatccgagcctgaacattattgaaccagtaatgcatttcagcaggatcataatggttatcgcacaggtatccggg
 tctgctgggtcatctggcagataaacgtccagaaattatccgtgaatatctgcctgcagataccaatagcctgctggcggttatgaataaagc
 actgaccgaacgtaatgtgattaatctgattgttgcaagcaaacgcctcgcgaacggtttttaccgttgaagatgcagaggaaactgctgga
 aaagggttataaagtgttccgtgggcaagcaatattagcgaatgaagaaccggatattgtgttgccagcagcgtgttgtaaccgaaat
 cgaaagtctggcagcaattagcctgatcaatcaagaatactctcatctgaaatccgctatgtgtatgtctggtgatctgctgaagctgcgtagt
 cgtaaaatcgtaccgctgtgtattagtgtgaagagtttgataaagtgtttacaaaaaacaaccgattatctttgcctttcatggctttgaggga
 ctgctgcgcgataattttcttaccgttagcaaccataacctgattgcacatggttatcgtgaaaacgggtgatatcacaaccagctttgatattcgt
 cagctgagtgagatggatcgttatcatattgcaaaagatgctgccgaagccgtgtatgtaaaagatgcaaaagcatttatgaacaaactggat
 cagaaactggaataaccaccgcaactatctgatgagtatggctatgatatgccggaagtgtggaatggaatggaagaacatcaataaag
 aaaattaaagtctagttaaagtftaaacggctccagcttggtgttttgccggatgagagaagattttcagcctgatacagattaaatcagaac
 gcagaagcggcttgataaaacagaatttgccctggcggcagtagcgcggtgtgccacctgaccccatgccgaactcagaagtgaacgc
 cgtagcgccgatggtagtgtgggtctccccatgcgagagtagggaaactgccaggcatcaataaaacgaaaggctcagtcgaaagact

10

20

30

40

【化 3 3】

gggcctttcgttttatctgttgttgcggtgaacgctctcctgagtaggacaaatccgccgggagcggatttgaacgttgcgaagcaacggc
 ccggagggtggcgggcagggacgcccgccataaactgccaggcatcaattaagcagaaggccatcctgacggatggcctttttgcgttc
 tacaacactcttttgttttttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaa
 gagtatgagattcaacatttccgtgtcggccttattccctttttgcggcattttgccttctgtttttgctcaccagaaaacgctgggtgaaagtaa
 aagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggtgttacatcgaactggatcacaacagcggtaagatccttgagagtttcccccgaagaa
 cgttttccaatgatgagcacfttaagttctgtatgtggcgcgggtattatcccggtgttgacgccgggcaagagcaactcggtcgccgcatac
 actattctcagaatgacttgggtgagttactaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgtgccca
 taacctgagtgataaactgcggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagtaaccgctttttgcacaacatgggggat
 catgtaactgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggca
 acaacgttgcgcaaacattaactggcgaactacttactctgacttccggcaacaattaatagactggatggaggcgggataaagtgcagg
 accacttctgcgctcggccttccggctggctgtgttattgtgataaatctggagccgggtgagcgtgggtctcgcggatcattgcagcact
 gggggccagatggtaagccctcccgatcgtatgtatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgtga
 gatagggtccctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagttactcatatatacttttagattgatttaaaactcatttttaatttaaaaggat
 ctagggtgaagatcctttttgataatctcatgacaaaatcccttaacgtgagtttctgtccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaa
 gatcttcttgagatccttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcacaaaaaaaaccaccgctaccagcgggtgttgttgcggatcaagag
 ctaccaactcttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaataactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttca
 agaactctgtagcaccgcctacatacctcgtctgtctaactctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttgg
 actcaagacgatagttaccgggataaggcgcagcgggtcgggctgaacgggggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctta
 caccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcggcacgcttcccgaagggaagagcgggacaggtatccggtaagcggc
 aggggtcggaaacaggagagcgcacgaggggagcttccagggggaaacgcctgtgtatctttatagtcctgtcgggttccgacctctgacttg
 agcgtcgatttttggatgctcgtcaggggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggcctttttacgggttctggccttttctggc
 ctttctcactatgttcttctcgtgtatccctgattctgtggataaccgtattaccgctttgagttagctgataccgctcggcgagccgaa
 cgaccgagcgcagcggagtcagtgcgaggaagcggaaagagcgcctgatgcgggtattttctcttacgcatctgtgcgggtatttcacaccg
 catatgtgtcactctcagtaaatctgctctgatccgcatagtttaagccagtatacactccgctatcgtactggtggtcatggtgcgc
 cccgacaccggccaacaccgctgacgcgccctgacggcgttctgctcccgcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccggg
 agctgcatgtgtcagaggttttcaccgtcatcaccgaaacgcgcgagggcagcagatcaattcgcgcggaagcgaagcggcatgcattt
 acgttgacaccatcgaatggtgcaaaacctttcgcggatggcatgatagcgccgggaagagagtcattcagggtgtgtgaatgtgaaacc
 agtaacgttatagatgtcgcagagtatgccggtgtctcttatcagaccgtttcccgctggtgaaccaggccagccacgtttctgcgaaac
 gcgggaaaaagtggaaagcggcgatggcgagctgaattacattcccaaccgcgtggcacaacaactggcgggcaaacagtcgttgcgtg
 attggcgttgccacctccagctctggccctgcacgcgccgtcgcaaatgtgcggcgattaaatctcgcgccgatcaactgggtgccagcg
 tgggtgtgtcgtatggtagaacgaagcggcgtcgaagcctgtaaaagcggcggtgcacaatcttctcgcgcaacgcgtcagtggtgtgatca
 ttaactatccgctggatgaccaggatgccattgctgtggaagctgctgcactaatgttccggcggtatttcttgatgtctctgaccagacacc
 atcaacagtattattttctccatgaagacggtacgcgactggcggtggagcatctgtcgcattgggtcaccagcaaatcgcgctgttagc
 ggccccattaaagtctgtctcggcgctctgcgtctggtgtggcgtatgataatctcactcgaatcaaatcagccgatagcggaaacggg
 aaggcgactggagtgcattgtccggtttcaacaaaccatgcaaatgctgaatgaggcgatcgttcccactgcgatgtgtgttgcacacgat
 cagatggcgctggggcgaatgcgcgccattaccgagtcggggtgcgcgttggtgcggatctcggtagtgggatacgcacgataccga
 agacagctcatgttatatcccgccgtcaaccaccatcaaacaggattttcgctgctggggcaaacagcgttgaccgcttgcactct
 ctgaggggcaggggtgaaggcgaatcagctgttgcctgctcactggtgaaaagaaaaaccaccctggcgcccaatacgaacccgcc
 tctccccgcggttggcgattcattaatgcagctggcagacaggttcccgactggaaagcgggcatgagcgaacgaatattgtg
 agttagcgcgaattgatctg

10

20

30

配列番号 30

プラスミド pMC S 8 2 6 の DNA 配列

【化 3 4】

gtttgacagcttatcatcgactgcacgggtgcaccaatgcttctggcgtcaggcagccatcggaagctgtggtatggctgtgcaggctgtaaat
cactgcataattcgtgtcgctcaaggcgcactcccgttctggataatgtttttgcccgcacatcataacggttctggcaaatattctgaaatga
gctgttgacaattaatcatccggctcgataatgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagcgccgctgagaaaaagc
gaagcggcactgctctttaacaatttatcagacaatctgtgtgggcactcgaccggaattatcgattaactttattataaaaaataaagaggtat
atattaatgtatcgattaaataaggaggaataaaccatggaaacgcgtcgttctgcgaactacgaacctaacagctgggactatgattacctg
ctgtctccgacacggacgagtcctcgaagtatacaaaagacaagcgaaaaagctggaagccgaagttcgtcgagattaataacgaa
aaagcagaatttctgacctgctggaactgattgacaacgtccagcgccctgggctgggttaccgttctgagctgatatccgtgggtcgctg
gatcgcttctgttctccggcggcttcgatcggttaaccaagacttccctgcacgggtacggcactgtcttccgtctgctgcgtcaacacgggt
ttgaggtttctcagggaagcgttcagcggcttcaagaccaaagcggcaacttctggagaacctgaaggagatatcaagctatcctgag
cctgtacgagccagcttctggtctggaaggcgaaaacatcctggacgagcggaagggttttcgaatctctcatctgaaagaactgtctg
aagaaaagatcggtaaaagctggcagaacaggtgaacctgcactggaactgccactgcacgccgtactcagcgtctggaagcagtat
ggtctatcgaggcctaccgtaaaaaggaggacgcgaatcagggttctgtcgagctggcaattctggattacaacatgatccagctctgtat
cagcgtgatctgcgtgaaacgtcccgttgggtggcgtcgtgtgggtctggcgaccaaactgcactttgctcgtgaccgcctgattgagagctt
ctactgggccgtgggtgtagcattcgaaccgcaatactccgactgccgtaactccgtcgcaaaaatgtttgttctgtaaccattatcgacgat
atctacgatgtatacggcaccctggacgaactggagctgtttactgatgcagttgagcgttgggacgtaaacgccatcaacgacctgccgg

【化 3 5】

attacatgaaactgtgctttctggtctgtataacactattaacgaaatgcctacgacaacctgaaagataaagggtgagaacatcctgccgta
 tctgaccaaagcctgggctgacctgtgcaacgctttctgcaagaagccaaagtggctgtacaacaaatctactccgacctttgacgactactt
 cggcaacgcatggaaatccttcttggcccgtgcaactggtgttcgcttacttcgctgtcgtgcagaacattaaaaaggagagatcgaaa
 acctgcaaaaaatacatgacaccatctctgccttcccatatcttccgctgtgcaatgacctggctagcgcgctgtcgggaaattgcgcgtgg
 tgaaccgcaaatagcgtttctgttacatgctgcaactaaaggatctccgaagaactggctaccgaaagcgtgatgaatctgatcgaata
 ttggaaaaagatgaacaaggaaaaactgggtgtagcctgttcgcgaaaccgttcgtggaaaccgcgatcaacctggcacgtcaatctca
 ctgcacttatcataacggcgacgcgcatacctctccggatgagctgacctgcgaacgcgttctgtctgtaatactgaaccgattctgccgttt
 gaacgctaactgcataaaggaggtaaaaaaacatgattagcaaaatctatgatgataaaaagtatctggaaaaaatggataaatggttcgc
 gcagcaaatlatctgggtgtttgtcagatgtatctgcgtgataatccgctgctgaaaaaacgctgaccagcaatgatatcaactgtatccga
 ttggtcattggggcaccgttccgggtcagaattttatctatacccatctgaatcgctgatcaagaataatgatctgaatatgttctacatcgaa
 gtccgtgctatggtgtcaggttatgattagtaatagctatctggatggcagctatagcgaaatttatccggaaattagccaggatgaagcag
 gtctggccaaaatgtttaaacgttttagctttccgggtgcaccgcaagccatgcagcaccggaaacaccgggtagcattcatgaaggtgtgt
 gaactgggttatagcattagccatggcaccgggtgcaattctggataaccggatgttattgtgcagcagttgttgggtgatggtgaagcagaa
 accggtccgctggcgaccagctgttttagcaatgcttttataaccgggttaatgatggtgccattctgccgattctgcatctgaacggtgta
 aaattagcaatccgacctgctgagccgtaaacgaaagaagaaatcaaaaaatactttgaaggcctgggctggaatccgattttgttgaat
 ggtcagaagataagagcaacctggatatgcatgaactgatggcaaaaagcctggataaagccattgaaagcatcaaaagaaattcaggcgag
 aagcacgtaaaaaacctgcagaagaagcaaccgctccgacctggccgatgattgttctgcgtaccccgaaggttgacaggctccgaaa
 cagtggaaataatgaagcaattgaaggtagctttcgtgcacatcagggtccgattccggttagcgccctttaaagtgaagaaattgccgatcttg
 agaaatggctgaaaagctacaaaccggaagaactgtttgatgaaaatggcacgataaaaagaatccgtgatctgctccggaaggtct
 gaaacgtatggcagttaacccgattaccaatggtggtattgatgcaaacctctgaaactgcaggattggaaaaagtacgactgaaaattg
 attatccgggtgaaattaaagcacaggatattggccgaaatggccaaatttgacgagatattcatgaaagataaccctagcagctttcgcgttt
 ttggtccggatgaaacaaaaagcaatcgatgtttgccccgtttaatgtgaccaatcgtcagtggtggaccgggttagtaagaaatcagatg
 aatggattagtcggcaggctgcattattgattcacagctgagcgaacatcagtgtagaaggtttctggaaggttatgttctgaccggctcgtcat
 ggttttttgcaagctatgaagcatttctgcgtgttggtagatgctgacccaacatatgaaatggatcaaaaaggcgaagcgaactgagct
 ggcgtaaaacctatccgagcctgaacattattgcaaccagtaatgcatttcagcaggatcataatggttatagcatcaggatccgggtctgc
 tgggtcatctggcagataaacgtccagaaattatccgtgaatatctgctgcagataccaatagcctgctggcggttatgaataaagcactga
 ccgaacgtaatgtgattaatctgattgttgcaagcaaacgccctgcgaacagtttttaccgttgaagatgcagaggaaactgctgaaaaagg
 gttataaagtgttccggtgggcaagcaatattagcgaaaaatgaagaaccggatattgtgttggccagcagcggtgttgaaccgaatatcgaaa
 gtctggcagcaattagcctgatcaatcaagaataatctcatctgaaaaatccgctatgtgtatgtgctggatctgctgaagctgcgtatgctgtaa
 aatcgatccgcgtgtgattagtgtgaagagtttgataaagtgtttacaaaaacaaaccgattatctttgcctttcatggtttgagggactgct
 gcgcgataattttcttaccgtagcaaccataacctgattgcacatggttatctgtgaaaacgggtatatacacaaccagctttgatattctcagct
 gagtgaatggatcgttatcatattgaaaagatgctgccgaagccgtgtatggtaaagatgcaaaagcatttatgaacaaactggatcaga
 aactggaataaccaccgcaactatactgatgagtatggctatgatatccgggaagttgtggaatggaaatggaagaacatcaataaagaaaat
 taaagtctagttaaagttaaaccggtctccagcttgctgttttggcggtatgagagaagattttcagcctgatacagattaaatcagaacgcag
 aagcggctctgataaaacagaatttgcctggcgagtagcgcggtgtgtccacctgaccccatgcccgaactcagaagtgaaacgccgta
 gcgccgatggtagtgtgggtctccccatgcgagagtagggaaactgccagccatcaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggc
 ctttcgtttatctgtgtttgtcgtgaacgctctcctgagtaggacaaatccgccgggagcggatttgacgttgcgaagcaacggccggg
 aggggtggcgaggacgcccgcataaactccaggcataaattaagcagaagccatcctgacggatggccttttgcgtttctacaa
 actctttttgttttttctaaatacatcaaatatgtatccgctcatgagacaataacctgataaatgcttcaataatattgaaaaagggaagagta
 tgagtattcaacatttccgtgtcgccttatttcccttttttgcggcattttgcttctgttttgcctacccagaaacgctggtgaaagttaaagat
 gctgaagatcagttgggtgcacgagtgggttacatcgaactggatctcaacagcggtgaagatccttgagagtttgcgcccgaaagacgttt
 ccaatgatgagcacttttaaagtctgtatgtggcggtattatcccggttgacgccgggcaagagcaactcggtcggcgatacactat
 tctcagaatgacttggtgagtactaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgtcgcataacc
 atgagtataacactgcggccaacttacttgcacaacgacggaggaccgaaggagtaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgt
 aactgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccatacacaacgacgagcgtgacaccacgatcctgtagcaatggcaacaa
 cgttgcgcaaaactattaactggcgaaactacttactctagcttccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagtgcaggacca
 ctctgcgctcggcccttccggctgggtgtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactgggg

10

20

30

40

【化 3 6】

ccagatggaagccctcccgatcgtatgtatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaatagacagatcgctgagatag
 gtgcctcactgattaagcattgtaactgtcagaccaagtttactcatatatacttttagattgatttaaaacttcatttttaaaaaggatctagg
 tgaagatcctttttgataatctcatgacaaaatcccttaacgtgagtttctgtccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaaggatct
 tcttgagatccttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcacaaaaaaaaccaccgctaccagcgggtgtttgttccggatcaagagctacc
 aactcttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaatactgtcttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaac
 tctgtagcaccgcctacatacctcgcctctgctaactctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttgactcaa
 gacgatagttaccggataaggcgcagcggctgggctgaacgggggggttcgtgcacacagccagcgttgagcgaacgacctacaccga
 actgagatacctacagcgtgagctatgagaagcggccacgcttcccgaaggagaaaggcggacaggtatccggtaaggcggcaggggtc
 ggaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaacgcctggtatctttatagctctgtcgggttccaccctctgactgagcgtc
 gatttttgtgatgctcgtcaggggggcggagcctatgaaaaacgccagcaacggcgtttttacggttctggccttttgcgttgc
 tcacatgttcttctgcgttatccctgattctgtggataaccgtattaccgctttagtgagctgataccgctcggcgcagccgaacgaccg
 agcgcagcggagtgcgtgagcggaggaagcggagagcgcctgatgggtattttctcttacgcatctgtgcggattttacaccgcatatg
 gtgcactctcagtaacaatctgctctgatccgcagtagttaagccagtatacactccgctatcgtactgactgggtcatggctgcggccga
 caccgccaacaccgctgacgcgcctgacgggctgtctcggcgcacccgcttacagacaagctgtaccgctccgggagctgc
 atgtgtcagaggttttaccgtcatcaccgaaacgcgcgagggcagcagatcaattcgcgcggaaggcgaagcggcatgcatttacgttg
 acaccatcgaaatggtgcaaaaccttctgcggatggtgatagcggccggaagagagtcattcagggtggtgaatgtgaaaccagtaac
 gttatagcatgtcgcagagatgcccgtgtctcttatcagaccgttcccgcgtggtgaaccaggccagccagcttctgcgaaaacgcggg
 aaaaagtggaaaggcgcgatggcggagctgaattacattcccaaccgcgtggcacaacaactggcgggcaaacagtcgttgcgtattggc
 gttgccacctccagctctggcctgcacgcgcctgcgaattgtcgcggcgattaaatcgcgcggatcaactgggtgccagcgtgtgtg
 tctgatggtagaacgaagcggcgtcgaagcctgtaaaaggcgggtgcacaatcttctcgcgaacgcgtcagtggtgctgacattaacta
 tccgctggtgaccaggtaccattgctgtggaagctgcctgactaatgttccggcgttattcttgatgtctctgaccagacacctcaac
 agtattattttctccatgaagacggtagcgcactggcgtggagcatctgtcgcattgggtcaccagcaaatcgcgtgttagcgggccc
 attaagtctgtctcggcgcgtctgcgtctggctggcgtatcactcgaatcaaatcagccgatagcggaacggggaaggcg
 actggagtgcctatgcccgttttcaaaaaccatgcaaatgctgaatgaggggcagcgttccactgcgatgctggttgcacacgatcagatg
 gcgctggggcgaatgcgcgccattaccgagtcgggctgcgcgttggtgcggatctcggtagtggtgatacgacgataccgaagacag
 ctcatgttatatcccggcgtcaaccaccatcaaacaggatttgcctgctggggcaaacagcgtggaccgcttgcgcaactctcagg
 gccagcgggtgaagggaatcagctgttcccgtctcactggtgaaaagaaaaaccaccctggcgcccaatagcgaaccgcctctccc
 cgcgcttggccgattcattaatgcagctggcacgacaggttcccactggaaagcgggcagtgagcgaacgaattaatgtgagttag
 cgcgaattgatctg **配列番号 31**

10

20

M C S 5 3 4

c g c t a a c t g c a t a a a g g a g g t a a a a a a c **配列番号 3 2**

30

M C S 5 3 5

g c t g g a g a c c g t t t a a a c t t t a a c t a g a c t t t a **配列番号 3 3**

o M C S 5 3 6

t a a a g t c t a g t t a a a g t t t a a a c g g t c t c c a g c **配列番号 3 4**

M C S 5 3 7

g t t t t t t t a c c t c c t t t a t g c a g t t a g c g **配列番号 3 5**

M C S 4 8 8

t t a g c g t t c a a a c g g c a g a a t c g g **配列番号 3 6**

M C S 5 6 2

【化 3 7】

40

ccgtttgaacgctaaAGATACGCGTAACCCCAAGGACGGTAAAtgattagcaaaatctatgatgataaaaagta
 tctgg **配列番号 37**

M C S 5 0 4

【化 3 8】

tgttttttacctcttgcagtcgctcgtgctgctcagtcacccgccaagtggtatttacgtcaacaccgccagagataatttatccgcg
 agatggttatcttaatacagactcactatagggctc **配列番号 38**

M C S 5 1 6

【化 3 9】

gactcaagatatttctccatcatgcaaaaaaaaaattgcagtgcatgatgtaatacaattaaccctcactaaagggcg 配列番号
39

M C S 5 4 5

【化 4 0】

gctggtcagaccgacgctggtccggtagggatcagcataataacgggacatGTTTTTTTACCTCCTTTGCAGTG
配列番号 40

M C M 1 0 3 3

10

A G G C T G C C T C G T C A T C T C T T 配列番号 4 1

M C M 1 0 3 5

C A G A A T A T C G C C A C T C T G G G 配列番号 4 2

M C M 1 0 3 8

A C A C G C T A T C T G G C A G G A A A 配列番号 4 3

M C M 1 0 3 9

T T T G A C A A C A T C A C A G T G C A 配列番号 4 4

M C S 5 8 0

a a t t a a c c c t c a c t a a a g g g c g g c 配列番号 4 5

M C S 5 8 4

20

【化 4 1】

atattccaccagctattttagtggaataaaagtggtgaattatttctcaggatgtggcattgtcaagggctaatacgaactcactatagggctc
gaggaag 配列番号 46

M C M 1 0 4 2

【化 4 2】

tcacagcagaacagttagaaagcggttaaaatcattcggtcacttctgcgggagaccggaattaaccctcactaaagggcggc
配列番号 47

M C M 1 0 4 3

30

【化 4 3】

CGCGCCAATTACCGCTATCGATTTTGGTCGCAGTAGTGCTTCCAGTCCTCGCTGACT
CATATATTCCACCAGCTATTTGTTAGTG 配列番号 48

M C M 1 0 4 6

【化 4 4】

gcgggagggaatgcgtggtgcggccttctacatctaaccgattaacaacagaggttgctaattaaccctcactaaagggcggc
配列番号 49

M C M 1 0 4 8

40

【化 4 5】

GCGCAGGCGGCGTTTATTTTTACGAAAACGACTTAACCGATGACCCCGACGCGACA
GCATATATTCCACCAGCTATTTGTTAGTG 配列番号 50

サルモネラ・エンテリカ (Salmonella enterica) アセチルトランス
フェラーゼ gi | 16503810 | emb | CAD05835.1 |

【化 4 6】

MSQQGLEALLRPKSI AVIGASMKPHRAGYLM MRNLLAGGFNGPVL PVT PAWKAVLG V
 MAWPDIASLPFTPD LAILCTNASRNLALLDALGAKGCKTCIILSAPTSQHEELLASARHY
 KMRL LGPNSLGLLAPWQGLNASFSPVPIKQGKLAFISQSA AVSNTILDWAQQREMGFSY
 FIALGDSL DIDVDELLDY LARDSKTSAILLYLEQLSDARRFVSAARSASRNKPILVIKSGR
 SPAAQRLLNTSAGMDPAWDAAIQRAGLLRVQDTHELFSAVETLSHMRPLHGDR LMIIS
 NGAAPAALALDELWSRNGKLATLSEETCLQLRQTLP AHIDIANPLDLCDDASSEHYVKT
 LDILLASQDFDALMVIHSPSAAAPGTESAHALIETIKRHPRGKFVTLT TNWCGEFSSQEA
 RRLFSEAGLP TYRTPEGTITAFMHMVEYRRNQKQLRETPALPSNLTSNTAEAHNLLQRA
 IAEGATSLDTHEVQPILHAYGLHTLPTWIASDSAEAVHIAEQIGYPVALKL RSPDIPHKSE
 VQGVMLYLRTASEVQQAANAIFDRVKMAWPQARIHGLLVQSMANRAGA QELRVVVE
 HDPVFGPLIMLGEGGV EWRPEEQAVVALPPLNMNLARYLVIQGIKQRKIRARSALRPLD
 IVGLSOLLVQVSNLIVDCPEIQRLDIHPLLASASEFTALDVTLDIAPFDGD NESRLAVRPY
 PHQLEEWVEMKNGDRCLFRPILPEDEPQLRQFIAQVTKEDLYRYFSEINEFTHEDLAN
 MTQIDYDREMAFVAVRRMDNAEEILGVTRAISDPDNVDAEF AVLVRSDLKGLGLGRRL
 MEKLIAYTRDHGLKRLNGITMPNNRGMVALARKLGFQVDIQLDEGIVGLTLNLAKCDE
 S 配列番号 51

10

ロドシュードモナス・パルストリス (*Rhodopseudomonas palustris*) GCN5 ファミリー N-アセチルトランスフェラーゼ

【化 4 7】

MSTYRLSTLLSPGAVAVVGASPRPASLGRAVL TNLREAGFKGQIGVVNPRYPEIGGFKT
 VGSLAELSFVPDLIVITAPPRSVAKVVAEAGELGVAGAIISSEMGRGKGSYAEANRAA
 RKSGIRLIGNCLGIMIPGVNLNASFAAHMPRRGNLALISQSGAIAAGMVDWA AVKEIG
 FSGIVSIGDQLD VDIADMLDFYAADLDTRAILLYIEAVTDARKFMSAARAAARVKPVVV
 VKSGRMAHGAKAAATHTGAFAGADAVYEA AFRRAGMLRVYDLRELFDCAETLGRVS
 APRGKRVAILTNGGGIGILAVDRLVELGGEPATLSADLHKKLDAILPTSWSGFNPIDITG
 DADAERYSATLSMLLADPDNDAILVMNVQTAVASPRDIAREVIRVVGEERVRRTLFKP
 VFAVWVGAE EAVTHAFDAASIPNYPTEDDAVRSIMNMVRYREAVQLL TEVPPSLPKDF
 DPDTETARAIVEKALREGRTWLDPLEISGLFAAYQIPMIPTLAATNAEEAVSWASSFLSQ
 GVTVVVKVLSRDIPHKSDIGGVVLNLT SVEAVRVAVNEIMARA AKLRPNARLEGVMVQ
 PMILRPKARELTIGIADDPTFGPVIAFGQGGTGVELIDDRSLALPPLDLPLAESLIARTRVS
 KLLCAYRDVPEVKRSAVALTLVKLSQMAADLPEIRELDVNPLLADESGVVAIDARVVV
 RPPERKFAGLGNSHFAVKPYPTEWERHLTVKDGWRV LARPIRPDDEPAIHEFLKHVTPE
 DLRLRFFAAMKEFSHAFIARLSQIDYARAMAFVAFDEITGEMLGVVRIHSDSIYESGEYA
 ILLRSDLKGKGLGWALMKLIIEYARSEGLHYVCGQVLRENTAMLRMC RD LGFETKTD A
 SEPDILNVRLPLTEEAARAAGSA 配列番号 52

20

30

ストレプトミセス・リビダンス (*Streptomyces lividans*) タンパク質アセチルトランスフェラーゼ EFD66247

【化 4 8】

MSYASRTLGPMTSSDRHEYP AHWEADVLRDGGTARVRPITVDDAERLVSFYEQVSD
ESKYRFFAPYPRLSAKDVHRFTHHDFVDRVGLAATIGGEFIATVRYDRIGAGGTPATA
PADEAEVAFLVQDAHQGRGVASALLEHIAAVARERGIIRFAAEVLPANNKMIKVFMDA
GYTQKRSFEDGVVRLEFDLEPTDRSLAVQYAREHRAEARSVQRLLQPGSVAVVGAGRT
PGGVGRSILGNIRDAGYTGRLYAVNRAFPEDMKELDGVPACRSVGDIDGPVDLAVVTV
PAEHVPDVVTACGEHGVQGLVVISAGYADSGPEGRRERQALVRHARTYGMRIIGPNAF
GIINTSPDVRLNASLAPEMPRAGRIGLFAQSGAIGIALLSRLHRRGGGVGTGTGVSTFVSS
GNRADVSGNDVLQYWYDDPQTDVALMYLESIGNPRKFTRLARRTAAAKPLVVVQGAR
HGGVAPQGHAVRATRLPHATVSALLRQAGVIRVDTITDLVDAGLLARQPLPAGPRVAI
LGNSLGLLLTYDACLSEGLRPQPPLDLTTAASADDFAALARALADDTCDVAVVTAIP
TLGEGAAGDAVARGGPALGGGRGPHQARPRGPRGAGRPGGGPVRGGEHGS PDGSGHR
GHHRPGG 配列番号 53

10

マイコバクテリウム・ツベルクローシス (*Mycobacterium tuberculosis*) アセチルトランスフェラーゼ gi | 15608138 | ref | NP_215513.1 |

【化 4 9】

MDGIAELTGARVEDLAGMDVFQGCCPAEGLVSLAASVQPLRAAAGQVLLRQGEPAVSFL
LISSGSAEVSHVGDDGVAIIARALPGMIVGEIALLRDSPRSATVTTIEPLTGWTGGRGAFA
TMVHIPGVGERLLRTARQRLAAFVSPIPVRLADGTQLMLRPVLPGDRERTVHGHQFSG
ETLYRRFMSARVPSALMHYLSEVDYVDHFVWVTDGSDPVADARFVRDETDPVVAEI
AFTVADAYQGRGIGSFLIGALSVAARVDGVERFAARMLSDNVPMRTIMDRYGAVWQR
EDVGVITTMIDVPGPGELSLGREMVDQINRVARQVIEAVG 配列番号 54

20

マイコバクテリウム・スメグマチス (*Mycobacterium smegmatis*) アセチルトランスフェラーゼ gi | 118468187 | ref | YP_889697.1 |

【化 5 0】

MAELTEVRAADLA ALEFFTGCRPSALEPLATQLRPLKAEPGQVLIRQGDPAITFMLIESG
RVQVSHAVADGPPIVLDIEPGLIIEIALLRDAPRTATVVAEPVIGWVGDRDAFDITLHL
PGMFDRLVRIARQRLAAFITPIPVQVRTGEWFYLRPVLPGDVERTLN GPVEFSSETLYRR
FQSVRKPTRALLEYLFEVDYADHFVWVMTEGALGPVIADARFVREGHNATMAEVAFT
VGDDYQGRGIGSFLMGALIVSANYGVQRFNARVLTNDMAMRKIMDRLGAVWVRED
LGVMTEVDVPPVDTVPFEPELIDQIRDATR KVIRAVSQ 配列番号 55

30

サルモネラ・エンテリカ (*Salmonella enterica*) NAD依存性デアセチラーゼ gi | 16764576 | ref | NP_460191.1 |

【化 5 1】

MQSRRFHRLSRFRKNKRLLRERLRQRIFFRDRVPEMMENPRVLVLTGAGISAESGIRTF
RAADGLWEEHRVEDVATPEGFARNPGLVQTFYNARRQQLQOPEIQPNAAHLALAKLEE
ALGDRFLLVTQNIDNLHERAGNRNIIHMHGELLKVRCSQSGQILEWNGDVMPEDKCHC
CQFPAPLRPHVWVFGEMPLGMDEIYMALSMADIFIAIGTSGHVYP AAGFVHEAKLHGA
HTVELNLEPSQVGSEFEEKHYGPASQVVPEFVDKFLKGL 配列番号 56

40

ロドシュードモナス・パルストリス (*Rhodopseudomonas palustris*) NAD依存性デアセチラーゼ gi | 499471434 | ref | WP_011158074.1 |

【化 5 2】

MIAPSLSSGVEQLGDMIAHASSIVPFTGAGISTESGIPDFRSPGGLWSRNQPIPFDEFVARQ
 DARDEAWRRRFAMEQTFAKARPARGHRALASLYKAGKVPAITQNIDNLHQVSGFAEH
 DVVELHGNTTYARCIGCGKRHELDWVREWFRTGHAPHCTACDEPVKTATVSFGQSM
 PSDAMRRATELAQHCDLFIAIGSSLVWPAAGFPMLAKECGAKLVIINREPTEQDEIADL
 VIRHDIGETLGPVGN 配列番号 57

マイコバクテリウム・ツベルクローシス (*Mycobacterium tuberculosis*) NAD 依存性タンパク質デアシラーゼ gi | 614103494 | sp | P
 9 W G G 3 . 1 | N P D _ M Y C T U

10

【化 5 3】

MRVAVLSGAGISAESGVPTFRDDKNGLWARFDPYELSSTQGWLRNPERVWGWYLWR
 HYLVANVEPNDDGHRAIAAWQDHAIEVSVITQNVDDLHERAGSGAVHHLHGSLFEFRCA
 RCGVPYTDALPEMPEPAIEVEPPVCDGGLIRPDIVWFGEPLPEEPWRSASEATGSADV
 MVVVGTSIAIVYPAAGLPDLALARGTAVIEVNPEPTPLSGSATISIRESASQALPGLLERLP
 ALLK 配列番号 58

a c s A U p p K D 3

【化 5 4】

tcacgacagtaaccgcacctacactgtcatgacattgtctgccctatgtgtaacaaataaccacactgcccatgtccatgatatactctcc
 配列番号 59

20

a c s A D n G I 1 . 6 p K D 3 R

【化 5 5】

caacggctctgcgatgttgccaggaatgggtgtgttgtaattggctcatatataattcctcctgctattgttagtgaataaaagtgggtgaattat
 ttgctcaggatgtggcattgtcaaggcgctgtaggctggagctgcttcg 配列番号 60

C M P 5 3 4

g t g c a a a t t c a c a a c t c a g c g g 配列番号 6 1

C M P 5 3 5

30

c a c c a a c g t a t c g g g c a t t g c 配列番号 6 2

T S F o r

t c c t a a t t t t t g t t g a c a c t c t a t c a t t g 配列番号 6 3

T S R e v

c c a t c t t g t t g a g a a a t a a a a g a a a a t g c c a 配列番号 6 4

a c t P U p F o r

t t t a t t t c t c a a c a a g a t g g g c a g g c t a t c g c g a t g c c a t
 c g t a a c 配列番号 6 5

a c t P U p R e v

g g a g a g a t t a c a t g a t g c t t g t a c c t c a t g c a g g a 配列番号 40
 6 6

a c t P D o w n F o r

a a g c a t c a t g t a a t c t c t c c c c t t c c c c g g t c g c c t g a 配
 列番号 6 7

a c t P D o w n R e v

a g t g t c a a c a a a a a t t a g g a c g t a a c c a c c a t t t a c t g t c
 t g t g g a 配列番号 6 8

a c t P T e s t F o r

c t g g c g t a g t c g a g a a g c t g c t t g a 配列番号 6 9

a c t P T e s t R e v

50

g c a t a g c g g a a c a t g a a t t t a g a g t 配列番号 7 0

a c k A U p F o r

t t t a t t t c t c a a c a a g a t g g c g g a t c g a g c a t a g t c a t c a

t c t t g t a c t 配列番号 7 1

a c k A U p G I R e v

c g g t t g a t t t g t t t a g t g g t t g a a t t a t t t g c t c a g g a t g

t g g c a t n g t c a a g g g c g a a t t t g a c g a c t c a a t g a a t a t g

t a c t 配列番号 7 2

a c k A D o w n G I F o r

a c c a c t a a a c a a a t c a a c c g c g t t t c c c g g a g g t a a c c t a

a a g g a g g t a a a a a a c a t g t c g a g t a a g t t a g t a c t g g t t

c t g a 配列番号 7 3

a c k A D o w n R e v

a g t g t c a a c a a a a a t t a g g a g t a c c c a t g a c c a g a c c t t c

c a g c 配列番号 7 4

a c k A U p P L R e v

【化 5 6】

atcacgccagtggtatttangtcaacaccgccagagataatttatcaccgcagatggftatctgaatttgacgactcaatgaatatgtact

配列番号 75

a c k A D o w n P L F o r

【化 5 7】

taaataccactggcggtgatactgagcacatcagcaggacgcactgcaaaggaggtaaaaaacatgtcgagtaagtagtactggttctg

a 配列番号 76

a c k A E X T e s t F o r

t g c a g g c g a c g g t a a c g t t c a g c a t 配列番号 7 7

a c k A E X T e s t R e v

g t g g a a g a t g a t c g c c g g a t c g a t a 配列番号 7 8

R 6 K T S R e v

a g t g t c a a c a a a a a t t a g g a c t g t c a g c c g t t a a g t g t t c

c t g t g t 配列番号 7 9

a c t P R 6 K F o r

g g t g g t t a c g c a g t t c a a c c t g t t g a t a g t a c g t a 配列番号 8 0

a c t P R 6 K R e v

g g t t g a a c t g c g t a a c c a c c a t t t a c t g t c t g t g g a 配列番号 8 1

y f i Q D O W N F o r

T T T A T T T C T C A A C A A G A T G G G G C C G A T T A A C A T C A T C C A G 40

A C G A T 配列番号 8 2

y f i Q D O W N G I 1. 6 R e v

【化 5 8】

CGGTTGATTTGTTTAGTGGTTGAATTATTTGCTCAGGATGTGGCATTGTCAAGGGCT

CTTGCCCAACGCGAGGAATCATGAGTA 配列番号 83

y f i Q D O W N G I 1. 2 R e v

【化 5 9】

CGGTTGATTTGTTTAGTGGTTGAATTATTTGCTCAGGATGTGGCATCGTCAAGGGCT
CTTGCCCAACGCGAGGAATCATGAGTA 配列番号 84

y f i Q U P G I F o r

【化 6 0】

ACCACTAAACAAATCAACCGCGTTTCCCGGAGGTAACCTAAAGGAGGTAAAAAAC
ACCGGTCTCCCGCAGAAGTGACCGA 配列番号 85

y f i Q U P R e v

10

ACTATCAACAGGTTGAAC T G C G C C G T T C G A T A G C T G G C T G
A A C G A 配列番号 8 6

y f i Q T e s t F o r

G C A T C A C G C A G C T C C T G G C G G A A C A 配列番号 8 7

y f i Q T e s t R e v

G C T G A A C G T G A A T T G A G C A G T C G C T 配列番号 8 8

r p e R 6 K F o r

【化 6 1】

TACACACATAAGGAGGTTCCCAATGAAACAGTATCTGATCGCACCTAGCA 配列番号
89

20

r p e R 6 K R e v

【化 6 2】

TATTCGAATGTATGCTAGTGGACGTCAATCATTACTCGTGGCTCACTTTCGCCAGTT
CA 配列番号 90

t k t R 6 K F o r

【化 6 3】

CACTAGCATACATTTCGAATAAGGAGGAATACTATGTCATCTCGTAAGGAACTGGCG
AA 配列番号 91

30

t k t R 6 K R e v

【化 6 4】

TATCTCCTTCTTGAGCCGATTATCATTACAGCAGCTCTTTGGCTTTCGCGACA
配列番号 92

r p i R 6 K F o r

【化 6 5】

ATCGGCTCAAGAAGGAGATATACATATGACGCAGGACGAACTGAAAAAAGCGGT
配列番号 93

40

r p i R 6 K R e v

【化 6 6】

TATTCCTCCTTCAGGACCTTTCATTATTTAACGATCGTTTTGACGCCATC 配列番号
94

t a l R 6 K F o r

【化 6 7】

AAGGTCCTGAAGGAGGAATAAACCATGACCGATAAACTGACCAGCCTGCGT
配列番号 95

t a l R 6 K R e v

G A C C G G T T C A T T A C A G C A G G T C G C C G A T C A T T T T C T C C A

配列番号 9 6

R 6 K P l a s m i d F o r

C C T G C T G T A A T G A A C C G G T C T C C C G C A G A A G T G A C C G A A T

G A 配列番号 9 7

10

R 6 K P l a s m i d R e v

【化 6 8】

GGAACCTCCTTATGTGTGTAAACCTTTAGGTTACCTCCGGGAAACGCGGTTGA
配列番号 98

p f K A t m R N A X A A F o r

【化 6 9】

TGAAGCGTCCGTTCAAAGGCGACTGGCTAGACTGCGCGAAAAAACTGTATGCTGCT
AACGATGAAAATTATGCTNNNGCTGCATAAAATTAACCCTCACTAAAGGGCG 配列
番号 99

20

p f k A t m R N A R e v

【化 7 0】

GCTTCTGTCATCGGTTTCAGGCTAAAGGAATCTGCCTTTTTCCGAAATCATAATACG
ACTCACTATAGGGCTC 配列番号 100

p f k A U P F o r

T T T A T T T C T C A A C A A G A T G G G T T A T C G G C G G T G A C G G T T C

C T A C A T 配列番号 1 0 1

p f k A U P R e v

30

【化 7 1】

AGCATAATTTTCATCGTTAGCAGCATACAGTTTTTTCGCGCAGTCTAGCCAGTCGCC
T 配列番号 102

p f k A D O W N R F o r

【化 7 2】

CTAACGATGAAAATTATGCTCGCGCTGCATAATGATTTTCGGAAAAAGGCAGATTCC
T 配列番号 103

p f k A D O W N I F o r

40

【化 7 3】

CTAACGATGAAAATTATGCTATTGCTGCATAATGATTTTCGGAAAAAGGCAGATTCC
配列番号 104

p f k A D O W N T F o r

【化 7 4】

CTAACGATGAAAATTATGCTACGGCTGCATAATGATTTTCGGAAAAAGGCAGATTCC
T 配列番号 105

p f k A D O W N R e v

50

ACTATCAACAGGTTGAAC TGC GGTGC GGAGTTATCCGGCA
GACGT 配列番号106

pfkATestFor

CTGACATGATCAACCGTGGCGGTA 配列番号107

pfkATestRev

GATCGTTCCAGTCA TGGATCTGCT 配列番号108

ackA過剰発現プラスミド

【化75】

cggatcgagcatagtcacatcttgtactgattagacaaaataagacgttgcgcgttggtcattccattgttgactcctgtatcactctactacg
gtgaaaaaaaagaaggctgagtatgccttctttatgcgtaatcaggggtcaattacaaatcatcaaggaaagtttatccagttgttgaag
gcgcgcttaagcgtgtcagctaatacctggtaatcaggcttgccttcaacgggtgccaacacctgtccagactcctgcaatttaccgcgaact
tcataaaaccagttgaggatagcagggggaatggcggttacagaacgcttcccagccaccacaatccctgcatgggtaacttaaggcg
aacagcgagtggaactgccggcccaagctgaccgccagggcaatctgccagcagagagtaatacggcgatcggcggcataaaa
cggatcgcataacgcgtcatcttgataacgcgatttcgacaaagaccggggcaaggcgttttccagcggccacgtctttgagtaatgctgt

【化 7 6】

ccccggcgaacaagctaaaaaattaacagaacgattatccggcggttgacatgcttcacctaacttcacataaaagattcaaaaattgtg
caaattcacaactcagcgggacaaacgttcaaaacattttgtcttcatacccactatcaggtatccttttagcagcctgaaggcctaagtagtac
atattcattgagtcgtcaaatccgaccttgacnagccacatcctgagcaataatfcaaccactaaacaaatcaaccgcgtttccggaggtg
acctaaaggaggtaaaaaacatgtcagtaagtttagtactggttctgaactgcggtagttcttactgaaatttgccatcatcgatgcagtaa
atggtgaagagtagctttctggtttagccgaatgtttccacctgcctgaagcacgtatcaaatggaaaatggacggcaataaacagggaagcg
gcttttaggtgcagggccgctcacagcgaagcgctcaactttatcgttaatactattctggcacaaaaaccagaactgtctgcgcagctgact
gctatcggtcaccgtatcgtacacggcggcgaaaaagtataccagctccgtagtgtcgtatgagtcgttattcagggtatcaaatgacagct
tcttttgaccgctgcacaacccggctcacctgatcgggtatcgaagaagctctgaaatctttccacagctgaaagacaaaaacgttctgtgta
tttgacaccgcgttccaccagactatccgggaagagcttaccctctacgcccgtccttacaacctgtacaagagcagcgcatccgtcgttac
ggcgcgcacggcaccagccacttctatgaacccagggaagcggcaaaaatgctgaacaaaccggtagaagaactgaacatcatcacctg
ccacctgggcaacgggtggttccgtttctgctatccgaacggtaaatgcgttgacacctctatggcgctgaccccgtggaggtctggtca
tggttaccagttcaacctgttgatagtagtactaaagctctcatgtttcacgtactaaagctctcatgtttaacgtactaaagctctcatgtttaacga
actaaacctcatggttaacgtactaaagctctcatgtttaacgtactaaagctctcatgtttaacgtactaaagctctcatgtttaacga
aataataatcagcaacttaaatagcctctaaagggttttaagtttataagaaaaaaagaataataaaggcttttaagcttttaaggtttacgggtg
tggacaacaagccagggtgatgaacgcactgagaagcccttagagcctctcaagcaattttcagtgacacaggaacacttaacggctgac
agtcctaattttgttgacactctatcattgatagagttattttaccactccctatcagtgatagagaaaaagtgaatgaatagttcgacaagaatc
gcattggtaattacgttactcgtatccatggggattggccttatcatgccagctcttccaacgttattacgtgaattattgtctcggagatattc
ctaaccactttggcgtattgcttgcactttatgcgttaatgcaggttatcttctccttggcgttgaaaaatgtctgaccgatttgctggcgccc
agtgtgtgtgtgtcattaatagggcgtcgtggttacttattgtggttttcaaggtcgtttggatgctgtatttagggcgtttgttctcagg
gatcacaggagctactggggctgtcgcggcatcggtcattgccgataccacctcagcttctcaacgcgtgaagtgttctggttggttaggg
gcaagttttggcgttggttaataagcggggcctattattgtgtgttttcaggagagatttcaccgcatagtcctttttatcgtcgttggtgta
atattgtcactttcctgtgtgtattgtttgttccgtgaaacaaaaatcacagtgataatacagataccgaagtaggggttgagacgcaatc
aatcgggtatacatcattttatttaaacgatgccattttgttgattattttttcagcgaattgataggccaaattcccgaacgggtgtgggt
gctatttaccgaaaatcgttttgatggaaatagcatgatgttggtgcttttcatagcgggtcttggtcttttactcagtttccaagcccttgttg
cagggaagaatagccactaaatggggcgaaaaaacggcagctactgtcgaatttattgcagatagtagtgcaattgaccttttagcgtttatatct
gaagggttggttagatttccctgttttaattttatgtgtgtgtggatcgtttacctgcattacagggagtgatgtctatccaaacaaagagtc
atgagcaagggtgctttacagggtattattgtgagccttaccatgaacccgggtgttattggcccattactgtttactgtttattataatcattcacta
ccaatttgggatggctggttattgtttagcgttttactgtattattatcctgctatcgtatgaccttcatgttaacccctcaagctcaggg
gagtaaacaggagacaagtgttattttcgtcaccaaatgatgttattccgcgaatataatgacctcttggatcttaacattttccctat
catttttccgtcttattttgtcattttttccagaaaaatcgcgtcattcagctatgtctaatccaacacgtgtctctcggcttatccctgacaccg
cccggcgacagcccgcattgggacgattctatcaattcagccgcggagtctagttttatattgcagaatgcgagattgctgtttattatacaa
tataagttttcatttttcaaaaaagggggtatttattgtgggttaggtgaagaattgtctgtgtgtcggcgttctttatgatttaaccatcagt
ctgccgggtgttcaggccgctgaggatataataacaaaaagcatacaaaagaaacgtacggcgtctctcatattacagccatgatatgct
gcagatccctaacaacagcagcaaaacgaaaaatacgaagtgcctcaattcgaatcaaacgattaaaaatattgagctgtcaaaaggacttg
atgtgtccgacagctggcgctgcaaaacgctgacggaacagtagcagaatacaacggctatcacgttgtgtttgctcttgcgggaagccc
gaaagacgctgatgacacatcaatctacatgttttatcaaaagggtcggcgacaactcaatcgaagctggaaaaacgcggcgctgtcttta
aagacagcgataagttcgacgcaacgatccgatcctgaaagatcagacgcaagaatgggtccggttctgcaacctttacatctgacggaaa
aatccgtttattctacactgactattccggttaaacattacggcaacaaagcctgacaacagcgcaggtaaatgtgtcaaaatctgatgacac
actcaaaatcaacggagtggagatcacaaaacgattttgacggagacggaaaaacatatacagaacgttcagcagtttatcgatgaaggc
aattatacatccggcgacaaccatacgtgagagacctcactacgttgaaagacaaaaggccataaataccttattcgaagccaacacgg
gaacagaaaaacggataccaaggcggaagaatctttatttaacaaagcgtactacggcgcgacgaacttctccgtaaaagaaagccaga
agcttcagcagagcgctaaaaaacgcgatgctgagttagcgaacggcgccctcggatcatagagtttaataatgattacacattgaaaaaa
gtaatgaagccgctgatcacttcaaacacggtaactgatgaaatcgaagcgcgaatgttttcaaaatgaacggcaaatgtgactgttctact
gattcacgcgggttcaaaaatgacgatcgtgttatttaactcaaacgataattacatgcttggttatgtatcaaaactttaaaccggcccttacaag
ccgctgaacaaaacaggcgttgtgtcgaatgggtcttgatcaaacgatgtgacattcacttacttctacttgcagtgccgcaagccaa
aggcaacaatgtgttatcacaagctacatgacaaacagaggcttcttcaggataaaaaaggcaacatttgcccgaagcttcttaatacaat
caaaaggcaataaaacatccgtgttcaaaaacagcatcctggagcaaggacagctgacagtcactaataacagcaaaaagaaaaatgccg
atacttcattggcattttcttttttttcaacaagatgg

10

20

30

40

配列番号 109

a c t P 欠失 プラス ミ ド

【化 77】

taatctctccccctccccggctgcctgaccggggaactctctctccagcatgcatcaccttttcccaaatattaaacaaataaactcatta
 aaaaatgagcgatttttgacagtcgtagaaaatgataatgcagagaatagccttttcttctgttaattataaggatattttatgtgtacaatgg
 ttaaataatatgttttccctcttggccagattaacgataaccactctgtcacaaagccatcacatacaaaaacaaaatcagataattacaga
 aaacatcataaaagcacgttaattgacaataaagccctctcttttcaagatggatgatcatgaaaaagttagagcttgattcagaaaatga
 aaagaatttatgatagtttaccatcaggaaaaatcacgaaggaaacggacaggaaaatacataaacattttatagatatagctttatatgcaaat
 aataaatgtgacgatagaattacgagaagagttacctaagtaaagaaaagggaagtatccattaagggtgtatattattataaataatgtcgcca
 tccataataactatcgaaattccacagacagtaaatggtggttacgcagttcaacctgttgatagtagctactaagctctcatgtttcacgtac
 taagctctcatgtttaacgtactaagctctcatgtttaacgaactaaacctcatggctaacgtactaagctctcatggctaacgtactaagctct
 catgtttcacgtactaagctctcatgtttgaacaataaaattaataataaacagcaactaaatagcctctaagggttttaagttfataagaaaaaa
 agaataataaaggcttttaagcttttaaggtttaacgggttggtgacaaagccagggtatgaacgcactgagaaagcccttagagcctctca
 aagcaattttcagtgacacaggaaacacttaacggctgacagtcctaattttgtgacactctatcattgataagatttttaccactccctatca
 gtgatagagaaaagtgaaatgaatagttcgacaaagatcgcatgtgtaattacgttactcgtatgcatgggattggccttatcatgccagct
 tgccaacgttattacgtgaattattgcttcggaagatcgcctaaccatttggcgtattgcttgcactttatgcgttaatgcagggttatcttgc
 ctfggcttggaataatgtctgaccgatttggctggcgccagtgctgttggctcattaataggcgcatcgtggattacttattgctggcttttc
 aagtgcgcttggatgctgtatttaggccgtttgctttcaggatcacaggagctactggggctgctgcggcatcgggtcattgccgataccac
 ctgactctcaacgcgtgaagtgttcggttggttaggggcaagtttgggcttgggttaatagcggggcctattattggtgttttgacaggag
 agatttcaccgcatagtcctttttatcgtcgttgctaaatattgctacttccctgtgttatgttttggttccgtgaaacaaaaatacacgtg
 ataatacagataccgaagtaggggttgagacgcaatcgaattcggatatacatcactttatttaaagcgtgcccattttgtgattattttttca
 gcgcaattgataggccaaattcccgaacgggtggtggtgctattaccgaaaatcgtttggatggaatagcatgatgtgtggttttcattagc
 gggcttggcttttacactcagatttccaaagccttggcagggaagaatagccactaaatggggcgaaaaaacggcagtagctcgaatt
 tattgcagatagtagtgcatttgccttttagcgtttatctgaagggttggttagatttccctgttttaattttattggctggtggtgggacgctttac
 ctgcattacagggaagtgtatctatccaaacaaagatcatgagcaagggtccttacagggaattattggtgagccttaccatgcaaccgggtg
 ttattggccattactgtttactgttattataatcattcactaccaatttgggagtgctggttattggttattggtttagcgttttactgtattattatcct
 gctatcgtatgaccttcatgttaacccctcaagctcaggggagtaaacaggagacaaagtcttagttatttcgtcaccaaatgatgtattccgc
 gaaatataatgacctcttggatcttaacattttccctatcattttccgcttcttattgtcattttttccagaaaaatcgcgtcattcgactcatgt
 ctaatecaacacgtgtctctcggcttatccctgacaccgcccggcagacggccgatgggacgattctatcaattcagccggcgagtgctag
 ttttatattgcagaatgcgagattgctggtttattataacaatataagttttcattattttcaaaaagggggattattgtgggttaggtaagaaattg
 tctgttctgtcggcgttccctttatgagtttaaccatcagctcgtccgggtgttcaggccgctgaggatatacaataacaaaaagcatacaaaag
 aaacgtacggcgctctcatattacacgcatgatgtgctgcagatccctaaacagcagcaaaacgaaaaataccaagtgcctcaattcgat
 caatcaacgattaaaaatattgagctgcaaaaggactgtatgttcgacagctggccgctgcaaaacgctgacggaacagttagcagaat
 acaacggctatcacgttgtgttcttgcgggaagcccgaaagacgctgatgacacatcaatctacatgtttatcaaaaaggctcggcgaca
 actcaatcgacagctggaacacgcggggcgtgtttaaagacagcgataagttcagcgcaacgatccgatctgaaagatcagacgc
 aagaatggtccggttctgcaacctttacatctgacggaaaaatccgtttattctacactgactattccggtaaacattacggcaacaaagcct
 gacaacagcgcaggttaattgtgtcaaaatctgatgacacactcaaaatcaacggagtggaagatcacaaaacgatttttgacggagacgg
 aaaaacatacagaacgttcagcagttatcgtatgaaggcaattatacatccgccgacaaccatacgtgagagaccctcactacgttgag
 acaaaggccataaataccttgaattcgaagccaacacgggaacagaaaacggataccaaggcgaagaatcttatttaacaaaagcgtacta
 cggcgggcgccacgaacttctccgtaaaagaaagccagaagcttcagcagagcgttaaaaaacgcgatgctgagtttagcgaacggcgcc
 ctggttatcataggttaataatgattacacattgaaaaagtaattgaagccgctgatcacttcaaacacggtaactgatgaaatcagcgc
 gcgaatgtttcaaaatgaacggcaaatgggtactgttactgattcacgcggttcaaaaatgacgatcgtatgtattaaactcaaacgatattta
 catgcttgggttatgtatcaaaactcttaaccggcccttaacagccgctgaacaaaacagggttctgtgctgcaaatgggtcttgatccaaacgat
 gtgacattcacttactctacttcgagtgccgcaaggcaaaaggcaacaatgtgttatcaaaagctacatgacaaacagaggcttcttcgag
 gataaaaaggcaacatttggcccaagcttcttaataacatcaaaaggcaataaaacatccgttgtaaaaacagcatcctggagcaaggac
 agctgacagtcactaataacagcaaaaagaaaatgccgatacttatttgcattttcttttttctcaacaagatgggcaggctatcgcgatg
 ccatcgtaaccacaattgccggtgagtcggttaacgggtttagggcctgataagacgcgacagcgtcgcacaggcattgattgccgg
 atgcggcggtataacgccttatccggcctacattcggcaagggttaccggagcggttaaccttctccataaggggagcgggaattaaaacaatc
 cctacattacctctggagaatctgtgatgaatgtacgatttatcagcggatagaagacaatgcgcatttcaggggaggttagtcgaaaaacggc
 aacggttggccaccatcgtgctgattattatgctggcagtttatatcggcttattttactgacgccttcgcggcggtggtgggaccccg
 ctgaatccgaacaccagcgtcacacgggtattccgattggttggagtgattgtgatctccttggctcaccgggtatctacatctggcggg
 cgaacggcgaattcgaccgtcttaataacgaagtctgcatgaggtacaagcatcatg

10

20

30

40

配列番号 110

ペントースリン酸経路上方制御プラスミド

【化 7 8】

ggccgattaacatcatccagacgattaacgccggggccattcataatattctgtgtaaccattcaaacataatgtctgacatcttacggttacg
gataagatgataacggcgtgtagcgataattatcgtgctgatgcaggtaaacatcgttcaggctggcaccgctataaagtacgctatcgtcgat
gataaagcccttaaagtgcagaaacaccaagggttcacgggtattgattggaacgccataaacgggaacatctacggcggattttcctgcg
ccatgcggcagtagcagtcagcgttagtgtagatgccgcagcgccaatgcgtccacgttgtgcacgatgccagtcgaccagcaccgca
catccagttccggacgctgccttttagcttcataaacgcgttcagaatgcctttgccaccgtcctctgttcgagatacagggcgacaatgca
aatgcgctgcttcgcgctggctatttttccagcagcgtctcccgggaagtcggcgggagcgtaaaagaaatcgacatcatcaactgattgag
aaatcttgggtagtgggcaagggtgttgatgtttattacgcttaattttgacaacatcacagtcatttcttctgttcattgaagggtcctct
gtgcaatgcagacgacataagcgggcaataaacaccagtcgccgattaagtgtgcaacattccagtagcttactcatgattcctcgcgttg

【化 7 9】

ggcaagagcccttgacnatgccacatcctgagcaataattcaaccactaacaacacaccgctttccggaggtaacctaaaggtttac
 acacataaggagggttcccaatgaaacagtatctgacgcacctagcatcctgtctgcagacttcgccgctctggcgaggacaccgctaaa
 gcactggcgggcgggcgatgtagttcatttcgacgtgatggataatcactacgtaccgaacctgactatcgcccgatggtactgaaatc
 tctcgtaactacggcatcaccgcgccgatcgatgttcacctgatggtaaacgggtgacgtatcgccggatttcgccggcggtggtg
 catccattatcacttccacccctgaagcttccgaacacgttgaccgacccctgcagctgattaagaaaacggctgtaaggctggtctggtg
 tcaaccagctacggcgtgtcttctggtattgttatggataagctggacgtaatcctgctgatgagcgtcaaccgggttcggtggtca
 gagcttcattccgcagacctggacaaactgcgcgaagtgcgtcgtcgtatcgatgaatctggcttcgatatccgctggagggtggtggtg
 gcgtgaaagttaacaacatcggcgagatcgccgcggcagggtgcggacatgttcgtcgcagggttctgcaatcttcgatcagccggactataa
 aaaaagtgttgacgaaatgcgttctgaactggcgaaagtggagccacgagtaagtattgacgtccactagcatatcgaataaggaggat
 actatgtcatctcgtaaaggaaactggcgaaatgccatccgtgctctgtctatggacggcgagaaagccaaatctgtcacccctggcgacc
 gatgggcatggcgacatcgccgaagtactgtggcgacgttctgaaacataaccggcagaaccgcttgggtgacgtgatcgtttc
 gtgctgagcaacggccacggtagcatgctgatttattccctgctgcacctgactggttacgacctggcgatggaagagctgaagaacttgc
 ccagctgcactccaaaacccgggtcacccagaagtgggctataccggcggtgctgagactaccaccgggtccactgggcccagggtc
 gccaacgctgtgggtatggcgattgagagaagaccctggcagcccagttcaaccgtccgggtcacgatatcgttgaccactatactacg
 cctttatgggtgacggctgcatgatggaagtattagccacgaagtgtgctctggtggtgcactctgaaactgggtaaactgatcgcattcta
 cgacgacaatggcattagcatcgacggccacgtggaagtgtggttcaccgacgacactgcgatgcttgcgaagcttacggttgcacgtg
 attcgtgacattgatggtcacgacgcagcgtctatcaaacgtgcggttgaagaggcagctccgtaaccgataagccttctgctgatgtg
 caaacgattatcggttccggcagcccgaacaaagccggcaccacgacagccatggcgccctctggcgatggcgaatcgtctga
 cccgtgagcaactgggttggaaatcgcgcgttcgaaatcccatctgaaatttatgctcagtgggacgcaaaggaaaggcggtcaagcaa
 aggaatctgcatggaacgaaaaatttgcgttattgctaaggcgtacccgcaggaaagcagctgaatttaccgctgatatgaaagggtgaaatg
 ccgtctgattttgacggcgaagcgaaaggaattattgcgaaactgcaggcaaacccggcaaaaatcgctcccgtaaaagcgtcccagaac
 gcgatcgaggcattcggcccgtgctgcccgaattcctgggtggttctgcccacctggcgccctagcaacctgacctgtggtctggttcca
 aagcaattaatgaagatgctgccgtaactacatccactacggcgccgcgaatttggatgaccgcaatcgctaaccgtatcagcctgcat
 ggcggttttctgccgtacaccagcaccttctgatgttcgtagaatacgcagtaacgcggttcgcatggccgactgatgaaacagcgcca
 ggtgatggtatatactcacgacagcatcggctggtggaagacgggtccgacccaccagccggttgaacaagtgcgagcctgcgcgtaac
 tccaaacatgtccacgtggcgctccgtgcgaccaggttgaagcgctgtcgttggaatatggcggtggaacgccaggacggtccgaccg
 cactgatcctgtcccgtcagaatctgggtcagcaggagcgtaccgaggagcagctggcaaacatcgacgtggcggttacgttctgaaag
 attgcgtggccagccggaactgatttcatcgcaaccggctctgaagtcgagctggcagtcgcagcgtatgagaaactgaccgcggaag
 gtgttaaagcgctgttgcagcatgccgagcaccgacgattcgacaaacaggatgcagcatatcgcgagagcgttctgctaaagctgt
 tactgctcgtgcgggttgaggtggtatcgcgactactggtataaatatgtaggtctgaacggtgcgattgttggtatgacgaccttcggt
 gaatccgctcctgcggaactgctgttcgaagaattcggcttcaccgtagacaacgttgcgcgaaaaccaagagctgctgtaataatac
 ggctcaagaaggagatatacatatgacgcaggacgaactgaaaaaagcggttggttggcgaccctgcagtatgtgcaaccgggtactat
 tgttggtgttgaccggctccaccggcccccatttattgatgcgtggcgaccatgaagggtcagatcgaaggtgctgtgtctagctctg
 acgcgtctactgaaaaactgaagtccttggcatccacgtgttcgatctgaacgaagttgactcttggcatctatgttgacggcgagac
 gaaattaacggtcacatgcagatgatcaaggcggtggcgccctgacccgcgagaaaatcatcgcatccgttgcaaaaaattcatct
 gtatcgctgacgcgtctaaacaggttagacattctgggtaaattcccttgcagttgaagtatccctatggcccgtccgctggcccgtc
 agctggtaaaagctgggtggtcgtcctgaatatcgccagggcggttactgataacggcaatgtgatcctggacgtgcacggtatgaaatc
 ctggacccgattgcaatggaaaacgcgataacgcgattccggcggttgaacggtggcgctgttcgcgaatcgcggtgcggacgttgca
 ctgatcggttaccgggatggcgtaaaaacgatcgttaataatgaaaggctcctgaaggaggataaaacatgaccgataaactgaccagc
 ctgcgtcagtagaccaccgtagtgcggataccggtgacatcgctgcgatgaaactgtatcaaccgcaggatgcaaccactaaccgtccc
 tgattctgaacggcgacagatcccggaaatcgttaaactgatcgatgacgcagttgcatgggcaaaacaacagagcaatgatcgcccc
 aacagattgtagacgtaccgataaactggccgtaaacatcgccctggagattctgaaactggttccgggtcgtatcagcactgaagttgat
 gctcgtctgagctatgacacgggaagcgagcattgccaaagctaaactgctgatcaactgtacaacgacgggtatcagcaacgaccgt
 attctgattaaactggcttctacctggcaggggcattcgcggcgcaacagctggagaaagaaaggcatcaactgcaacctgacctgctgtt
 ctcttttgcagggccgctgcgtgaagccgggtgttttctgatctctcttctggtggcggtattctggaattgtacaaagccaacagg
 ataaaaaggagctccggctgaagatccgggtgtgtgagcgtttccgaaattaccagtactacaagaacatggttacgaaaccgtt
 gttatgggtgcctctttctgaacatcggtgaaatcctggaactggcaggctgcgaccgcctgacctgcgccgacctgctgaaagaact

10

20

30

40

【化 8 0】

ggcggagtctgaagggtgccatcgaacgtaaacgtcctacaccgggtgaagtgaagcacgccggcacgcattaccgaatctgagttcct
 gtggcaacacaaccaggatccgatggcagtcgataaactggctgaagggtatccgcaaatcgaatcgaccaggagaaactggagaaaa
 tgatcggcgacctgctgtaatgaaccggctccccgagaagtgaaccgaatgattttaaacgctttctaactgttctgctgtgatgctaccaga
 tgttgctgttttctgccagatagcgtgttttaagcgggttaaatgctcgctaaccctgctgccgccccggatcgccggccatatctaaca
 gtgcgatggctacccggcagtagacaatattggccttcagcctgggcttcacgcaggcgataggcagaaaagccgggaaagatcgacggaa
 atgacgggaagattatccagatagcggacttttacgaaacatcttgccagcttccggccagggtaccatcgagcatgataaacagcgggtggctt
 accggcaggtggtgtgaagatcacttcccgttgctatcagcatagaggcgggaaagaccaccattggctgataaacgggtttgtacca
 gatccagcaaatcctgcgagggttcggtacgcgaccattgaaacgcaacgggtatcaggcaaaatcagcaatcagacgcccgggtattact
 gggcttcattggctcggtgtcgaacatcagcaaacgaagcgaacttttgcctgtgctggggtaattgtcgaacagagacataatttctctggc
 aaaagacagcgttgccagcgacgaacgcgattaccgcgggcaagaaaaggacgtgttgcgcgcgaatcgcgcgcgtaactgg
 agaacagcgttttcggtcataagagagcgtcgaaaaaacgccattgtcgcagaggagaaaacggggcacagatcgccccggtaagat
 taaagagattcgttcagccagctatcgaacggcgagttcaacctgttgatagtagtactaagctctcatgtttcacgtactaagctctcatgtt
 taacgtactaagctctcatgtttaacgaactaaacctcatggctaactactaagctctcatgttaacgtactaagctctcatgtttcacgtac
 taagctctcatgtttgaacaataaaattaataataatcagcaacttaaatagcctctaagggttttaagtttataagaaaaaaagaatatataagg
 cttttaagcttttaagggttaacgggttggaacaacagccagggtatgaacgcactgagaagcccttagagcctctcaagcaattttcagt
 gacacaggaacacttaacggctgacagtcctaattttgttgacactctatcatgtatagagttatttaccactccctatcagtgatagagaaaa
 gtgaaatgaatagttcgacaaagatcgcatgttgtaattacgttactcgtatgccatggggattggccttatcatgccagtttggcaacgttatta
 cgtgaattattgtcttgggaagatcgcctaaccactttggcgctattgttgcactttatgcgttaatgcagggttatcttctccttggcttggaaa
 aatgtctgaccgatttggcgccgccagtgctgttggctcattaataggcgcatcgcgttgattactattgctggcttttcaagtgcgctttgg
 atgctgtatttagggcgtttgttgcagggatcacaggagctactgggctgtcgcggcatcggtcattgccgataccacctcagcttctcaac
 gcgtgaagtggttcgggttgtaggggcaagtttggcctgttgaatagcgggctattattggtggtttgcaggagagatttcaccgcat
 agtccctttttatcgtcgttgcgttaaatattgtcacttcttgggttatgttttggcttcgtgaaacaaaaatacacgtgataatacagatacc
 gaagtaggggttgagacgaatcgaatcgggtatatacactttattttaaacgatgccattttgttgattattttttcagcgaattgatagg
 ccaattcccgcgaacgggtgtgggtgctatttaccgaaaatcgttttgatggaatagcatgatggttgcttttcattagcgggtcttggctttta
 cactcagttatccaagcctttgttgcaggagaatagccactaaatggggcgaaaaaacggcagttactgctcgaattattgcagatagtag
 tgcatttgccttttagcgtttatctgaaggttggttagatttccctgttttaattttattgctggtggtggatcgctttacctgcattacaggga
 gtgatgtctatccaaacaaagatcagcaaggtgctttacagggattattggtgagccttaccatgcaaccgggtgttattggccattac
 tgtttactgttattataatcattcactaccaatttgggatgctggttggattattggtttagcgttttactgtattattatcctgctatcgatgacct
 tcatgttaaccctcaagctcaggggagtaaacaggagacaagtgttagttatttgcaccaaagtgttattccgcgaataataatgacc
 ctcttggatcttaacatttttccctatcattttccgtctcatttgcatttttccagaaaaatcgcgtcattcgactcatgtctaatacaacagct
 gtctctcggcttatccctgacaccgcccgcgacagcccgcacgttgacgattctatcaattcagccgggagctctagttttatattgcagaa
 tgcgagatgctggtttattataacaataaagtttctatttttcaaaaagggggatttattgtgggttagtaagaaattgtctgttctgtcgc
 cgttctctttatgagtttaacctcagctgtccgggtgttcaggccgtgaggatataaatacaaaaaagcatacaaaagaaacgtacggcgt
 ctctcatattacacgccatgatgtcgcagatccctaacagcagcaaaacgaaaaataccaagtgcctcaattcgaatcaaacgattaa
 aaatattgagctgcgaaaggacttgatgtgtccgacagctggccgtgcgaaacgctgacggaacagtagcagaatacaacggctatcac
 gttgtgttctcttgcgggaagcccgaagacgctgatgacacatcaatctacatgttttatcaaaaaggctcggcgacaactcaatcgacagc
 tggaaaaacgcgggcccgtgtcttttaagacagcgataagttcgacgccaacgatccgatcctgaaagatcagacgcaagaatggctccggt
 tctgcaacctttacatctgacggaaaaatcgtttattctacactgactattccggtaaacattacggcaaaacaaagcctgacaacagcgag
 gtaaatgtgtcaaaatctgatgacacactcaaaatcaacggagtggaagatcacaaaacgattttgacggagacggaaaaacatatcaga
 acgttcagcagttatcgatgaaggcaattataatccgccgacaaccatacgtgagagaccctcactacgttgaagacaaaaggccataaa
 taccttgtattcgaaggcaacacgggaacagaaaacggataccaaggcggaagaatctttttaacaaaagcgtactacggcgccggcacg
 aactcttccgtaaaagaaagccagaaagcttcagcagagcgctaaaaaacgcgatgctgagttagcgaacggcgccctcgggtatcatagagt
 taaataatgattacacattgaaaaaagtaataagccgctgatcacttcaaacacggtaactgatgaaatcgagcgcgcgaatgttttcaaat
 gaacggcaaatgtgactgttctactgattcacgcggttcaaaaatgacgatcgatggtattaactcaaacgatatttcatgcttgggttatgatac
 aaacttttaacggcccttacaagccgctgaacaaaacaggcgtgtgctgcaaatgggtcttgatccaaacgatgtgacattcacttactct
 cacttcgcagtgccgcaagccaaaggcaacaatgtggttatcacaagctacatgacaaacagaggcttctcaggagataaaaaggcaacat
 ttggcccaagcttcttaatacaatcaaaaggcaataaaacatccgttgcaaaaacagcatcctggagcaaggacagctgacagtaactaa
 taacagcaaaaagaaaatgccgatacttcattggcattttcttttatttctcaacaagatgg 配列番号 111

10

20

30

40

p f k A t m R N A 対立遺伝子交換ベクター

【化 8 1】

gttatcggcggtagcggttcctacatgggtgcaatgcgtctgaccgaaatgggcttccgtgcatcggcctgccgggcactatcgacaacg
acatcaaaggcactgactacactatcggttcttcaactgcgtgagcaccgttgtagaagcgatcaccgtctgcgtgacacctcttcttca
ccagcgtatttccgtggtaggaagtgatgggccgttattgtggcgatctgacgttggtgcggccattgccggtaggtggaattcgttggtt
ccggaagtgaattcagccgtgaagacctggtaaagaaatcaaagcgggtatcgcgaaaggtaaaaaacacgcgatcgtggcgattacc
gaacatatgtgtgatgtgacgaactggcgcatctcatcgagaaagaaaccggtcgtgaaaccgcgcaactgtgctggggccacatccagc
gcggtaggttctccggtagccttacgaccgtattctggcttccgtatgggcgttacgctatcgatctgctgctggcagggttacggcggtcgtt
cgtaggtatccagaacgaacagctggttcaccacgacatcatcgacgctatcgaaaacatgaagcgtccgttcaaaggcgactggctaga

【化 8 2】

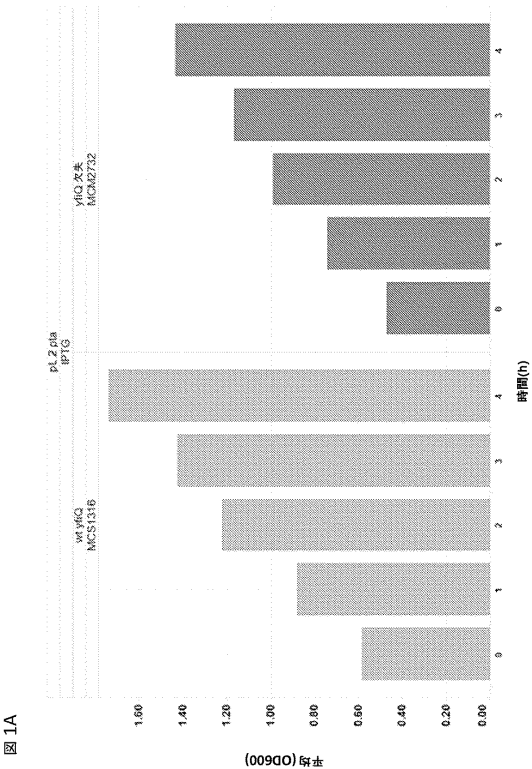
ctgcgcgaaaaaactgtatgctgtaacgatgaaaattatgctnnngctgcataatgatttcggaaaaaggcagattccttagcctgaaacc
 gatgacagaagcaaaaatgcctgatgcgttcgcttatcagccctacgtgaattctgcaatttattgaattacaaatttttaggtcggataag
 gcgttcgcgccgcatccggcgcgataaagcgcactttgtcagcaatatgaggcggatttctccgcttttaattctcaacataataccgc
 aagttagccaatcttttttattctttaatgtttggttaacctcttgccacgctttgctcatcacacaacataagagagtcgggcgatgaac
 aagtggggcgtagggftaacattttgctggcggaaccagcggttatggcaaaggatattcagcttctaacgtttcatatgatccaacgcgcg
 aattgtacgaacagfacaacaaggcattcagcgcctactggaaacagcaaacgtggcgataacgtggtgatccgtcagtcaccacgggtggtc
 aggcaaacagcgacgtcggtaatacaacgggtattgaagctgatgttgacgctggctctggcctatgacgtggacgcaattgcggaacgc
 gggcgggattgataaagagtggatcaaacgtctgccggataactccgcaccgcagttcaacctgttgatagtagtactaagctctcatgtttc
 acgtactaagctctcatgtttaacgtactaagctctcatgtttaacgaactaaacctcatggctaacgtactaagctctcatgtttaacgtacta
 agctctcatgtttcagctactaagctctcatgtttgaacaataaataafataaatcagcaacttaataagcctctaaggttttaagttttataaga
 aaaaaagaatataaagcgttttaagcgttttaaggtttaacgggtgtggacaacaaggcagggtatgaacgcactgagaagcccttagagc
 ctctcaaaagcaattttagtgacacaggaacacttaacgggtgacagtcctaattttgttgacactctatcattgatagagttattttaccactcc
 ctatcagtgatagagaaaaagtgaatgaatagttcgacaagatcgcaattgtaattacgttactcgatgccatggggattggccttatcatgc
 cagcttggcaacgttattacgtgaatttattgcttcggagatacgttaaccactttggcgattgcttgactttatgcgttaatgcaggttacc
 ttgtccttggcgttggaaaaatgtctgaccgatttggcggcgccagtgctgtgttgatcattatagcgcacgcgtggattacttattgctg
 gcttttcaagtgcgctttggtatgctgtatttaggccgtttgctttcagggaatcagaggagctactggggctgctgcggcgcacgcgttcattgcccga
 taccacctcagcttcaacgcgtgaagtgttcgggttggtagggcgaaagtgttggttttaagcggggcctattattggtggttttg
 caggagagatttaccgcataagtcctttttatcgtcgttgctgtaataatgtgacttctctgtgtgtatgttttggtccgtgaaacaaaaata
 cacgtgataatacagataccgaagtgggtgagacgcgaatgaattcggtatatacacttattttaaagcagtccttattgtgattattt
 attttcagcgcaattgataggcaaaattcccgaacgggtgtgggtgctatttaccgaaaatcgtttggatggaatagcatgatgttggtgctttt
 cattagcgggtctgttctttacactcagttatccaagcctttgtggcaggaagaatagccactaaatggggcgaaaaaacggcagttactgc
 tcgaatttattgcagatagtagtgcatttgcctttttagcgtttatctgaaggttggtagatttccctgttttaattttattggctgtgtgtgggac
 gctttacctgcattacagggagtgatgtctatccaacaagagtcatgagcaaggtgctttacagggtattattgtgagccttaccatgcaaa
 ccgggtgtattggccattactgtttactgttattataatcattcactaccaatttgggatggctggatttgattattggttttagcgtttactgtatt
 attatcctgctatcgatgaccttcatgttaacccctcaagctcaggggagtaaacaggagacaagtgcctagtatttctgtcaccaaatgatgtt
 attccgcgaataataatgacctcttggatcttaacattttccctatcattttccgtcttcatgttatttccagaaaaatcgcgtcattcga
 ctatgtctaatccaacacgtgtctcggcttatccctgacaccgcccgcgacagccgcacgttgacgattctatcaattcagccgcgg
 agtctagttttatattgcagaatgcgagattgctggtttattataacaatataagttttcattattttcaaaaagggggatttattgtgggttttaggtaa
 gaaattgtctgtgtgctgccgcttctttatgagtttaaccatcagctctgccgggtgttcaggccgctgaggatataataacaaaaagcat
 acaagaacgtacggcgtctctcatattacacgccatgatgtgctgagatccctaacagcagcaaaacgaaaaatacaagtgctccta
 attcgatcaatacaacgattaaaaatattgagctgcaaaaggacttgatgtgtccgacagctggccgctgcaaaacgctgacggaacagtag
 cagaatacaacggctatcacgttgtgttgcgttgcgggaagcccgaagacgctgatgacacatcaatctacatgttttatcaaaaggctc
 gcgacaactcaatcgacagctggaaaaacgcggcgctgtctttaaagacagcgataagttcgacgccaacgatccgacgtctgaaagatc
 agacgcaagaatgggtccggttctgcaacctttacatctgacggaaaaatccgtttattctactgactattccggtaaacattacggcaaca
 aagcctgacaacagcgcaggtaaatgtgtcaaaatctgatgacacactcaaaatcaacggagtggaagatcacaacacgattttgacgga
 gacggaaaaacatcagaacgttcagcagtttatcgtgaaggcaattatacatccgccgacaaccatacgtgagagacctcactacgt
 tgaagacaaaggccataaataccttgtattcgaagccaacacgggaacagaaaacggataccaaggcggaagaatctttatttaacaaagcg
 tactacggcgccggcgcacgaacttctccgtaaaagaaagccagaagcttcagcagagcgctaaaaaacgcgatgctgagtttagcgaacgg
 cgccctcggtatcatagagttaaataatgattacacattgaaaaagtaataagccgctgatcattcaaacacggtaactgatgaaatcga
 gcgcgcgaatgtttcaaaatgaacggcaaatggtactgttctactgattcacgcggttcaaaaatgacgatcgatggtattaactcaaacgat
 attfacatgcttgggttatgtatcaaacctttaaccggcccttacaagccgctgaacaaaacaggcgcttgtgctgcaaatgggtcttgatccaaa
 cgatgtgacattcacttactctcacttgcagtgccgcaagccaaaggcaacaatgtggttatcacaagctacatgacaacagaggcttctt
 cgaggataaaaaggcaacatttggcccaagcttcttaatacaatcaaaaggcaataaaacatccgttgtaaaaacagcatcctggagcaa
 ggacagctgacagtcactaataacagcaaaaagaaaatgccgatacttcatgttgcattttctttatttctcaacaagatgg 配列番号
 112

P L. 6 構成的プロモーター—λプロモーター、G e n B a n k N C _ 0 0 1 4 1 6

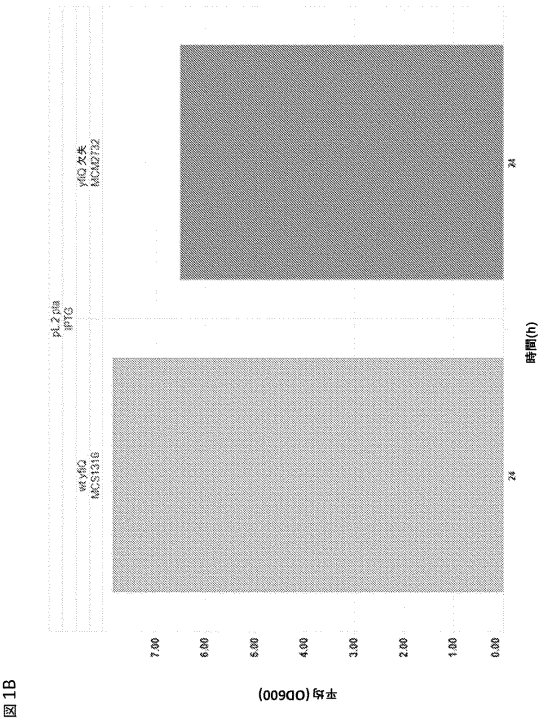
【化 8 3】

aattcatataaaaaacatacagataaacatctgcgggtgataaattatctctggcggtgttgacataaataccactggcggtgatactgagcaca
 tcagcaggacgcactgaccacatgaagggtg 配列番号 113

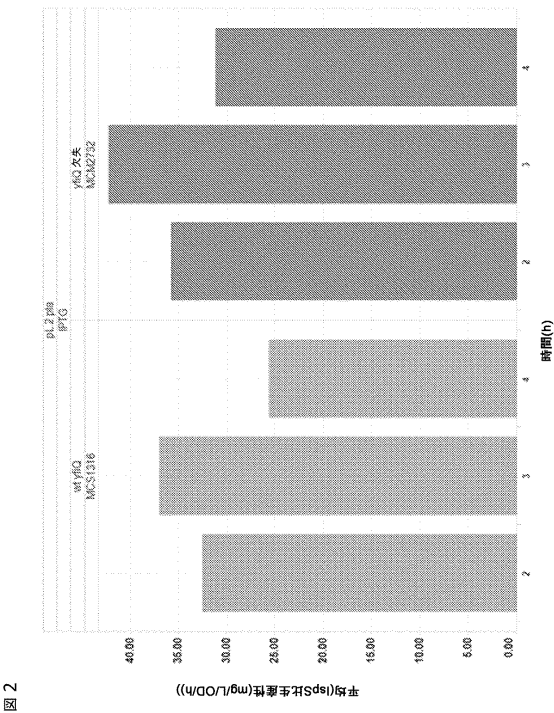
【図 1 A】



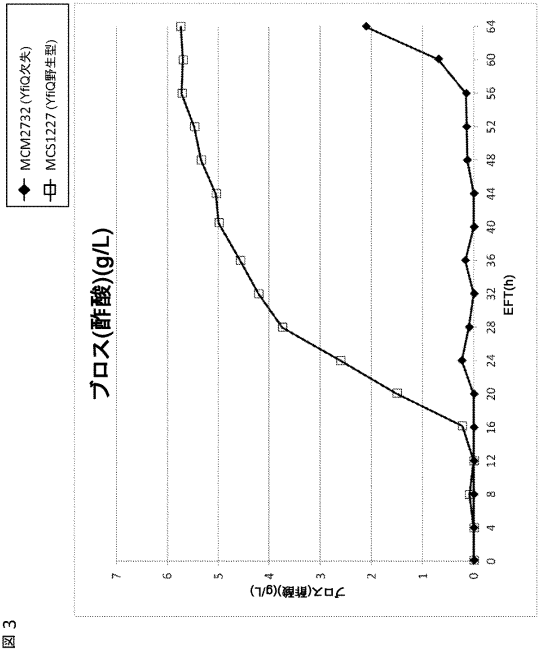
【図 1 B】



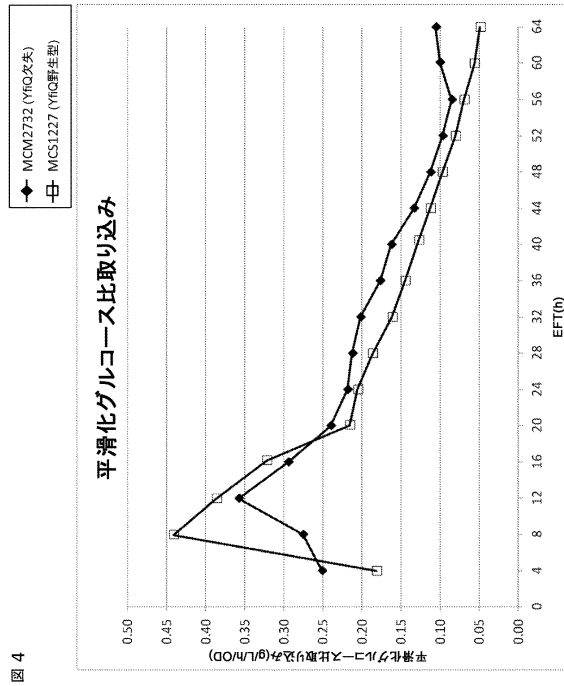
【図 2】



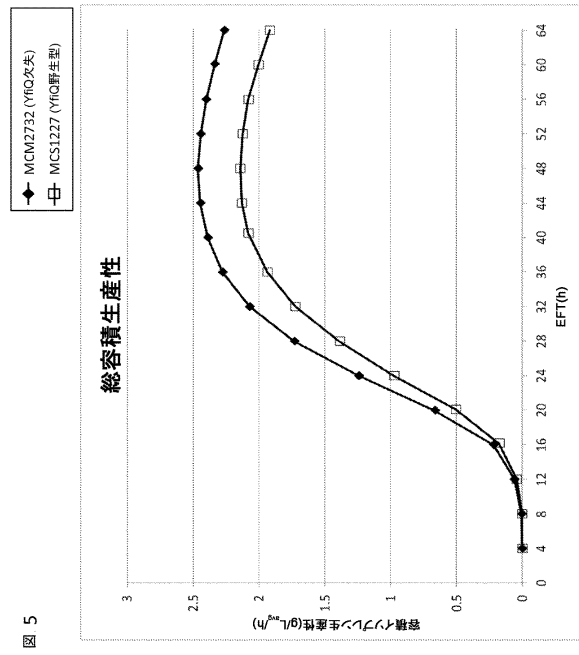
【図 3】



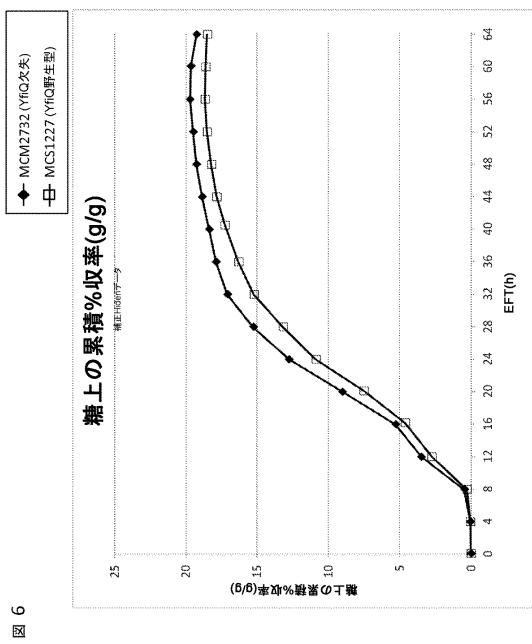
【図 4】



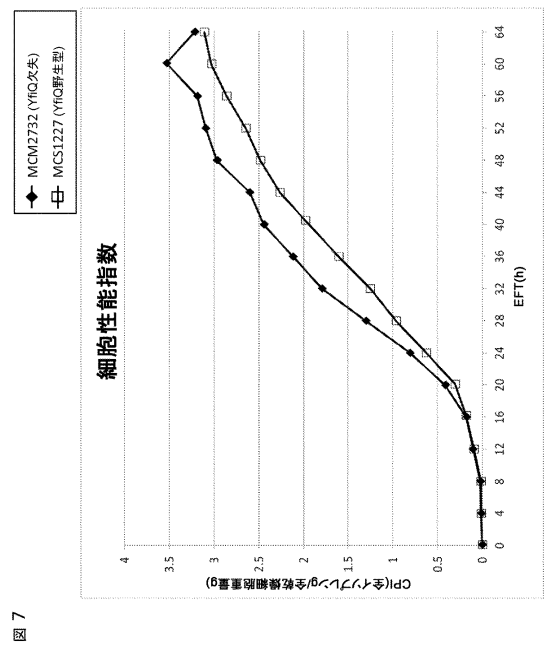
【図 5】



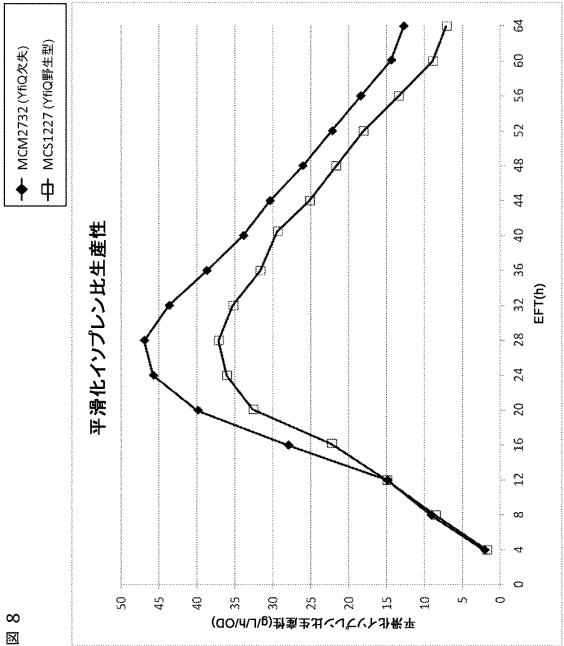
【図 6】



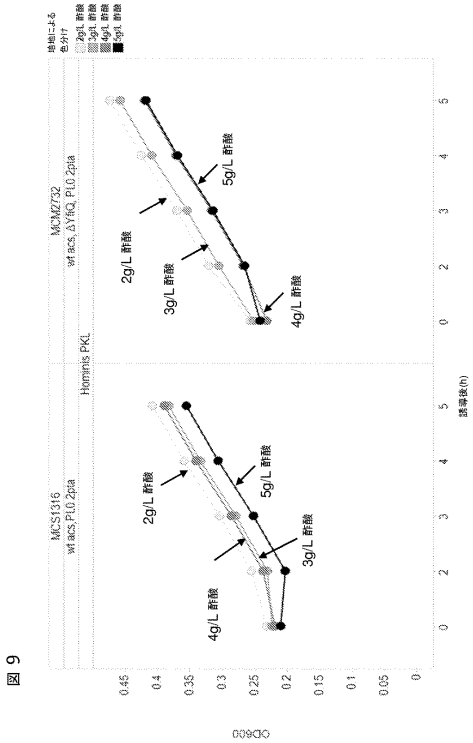
【図 7】



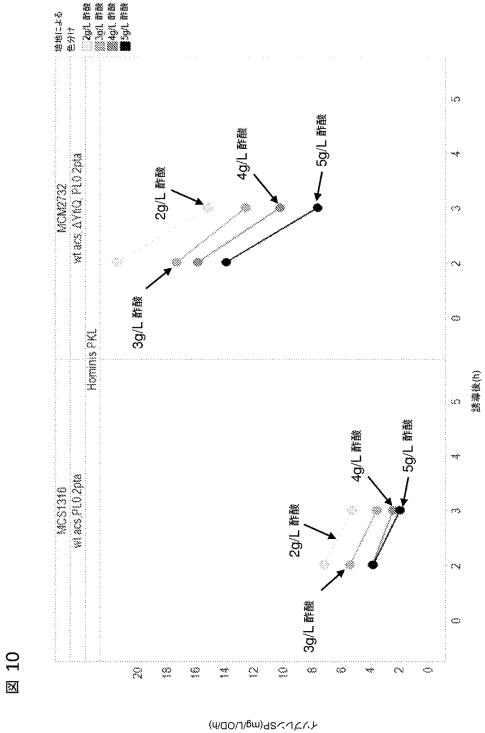
【図 8】



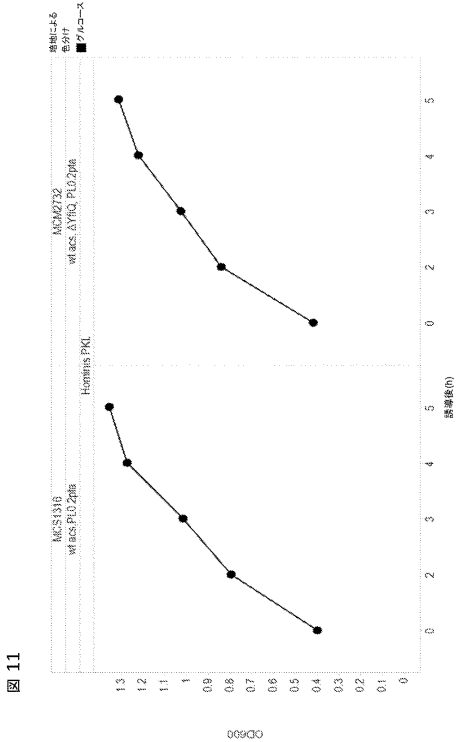
【図 9】



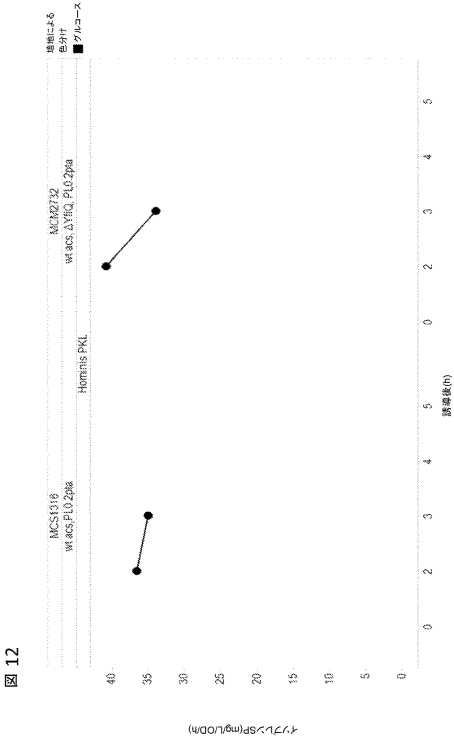
【図 10】



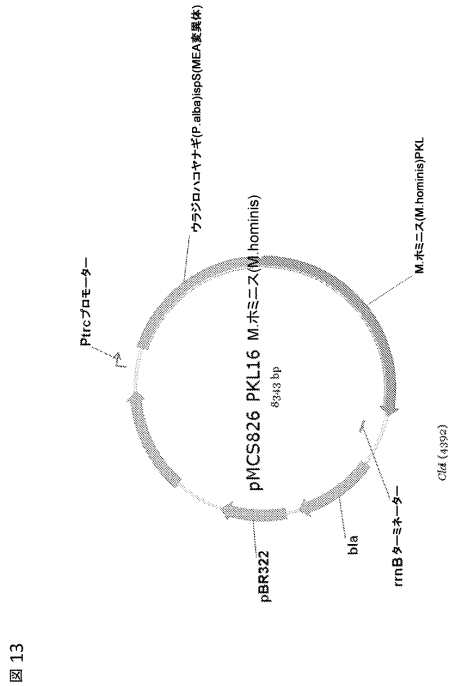
【図 11】



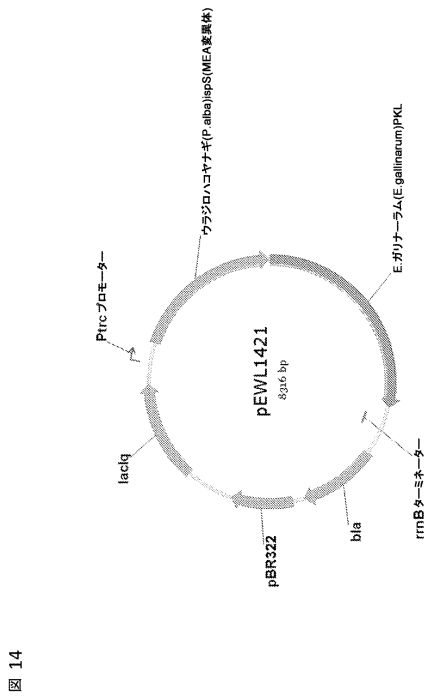
【図 1 2】



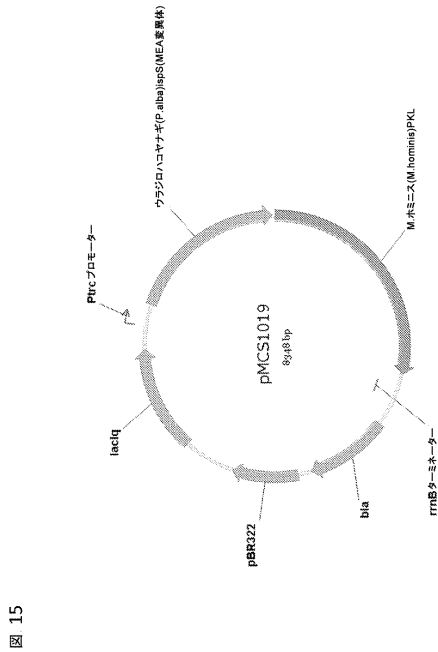
【図 1 3】



【図 1 4】



【図 1 5】



【図 16】

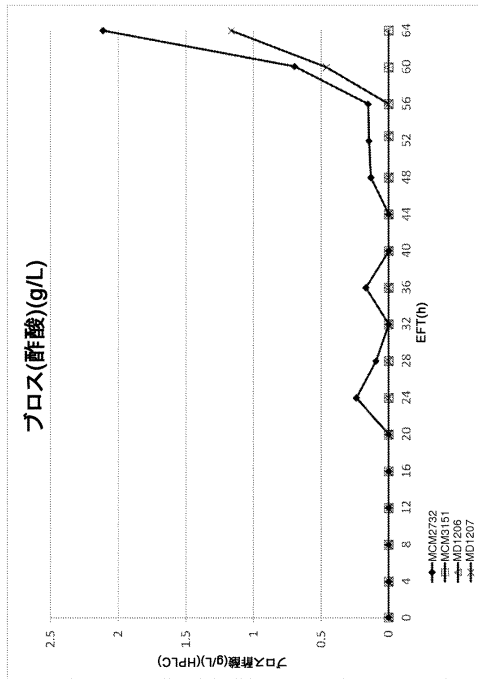


図 16

【図 17】

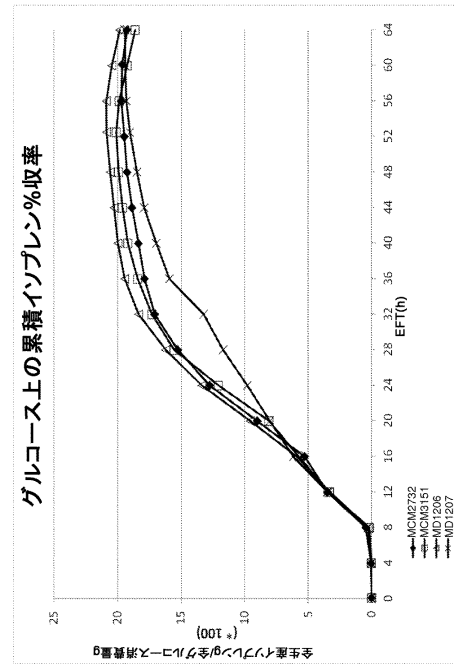


図 17

【図 18】

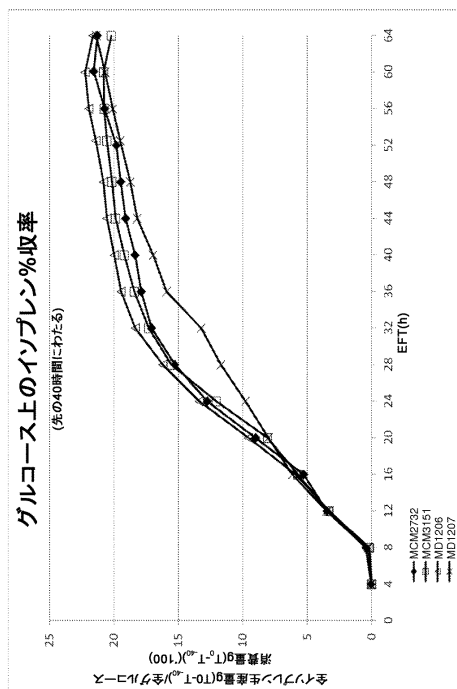


図 18

【図 19】

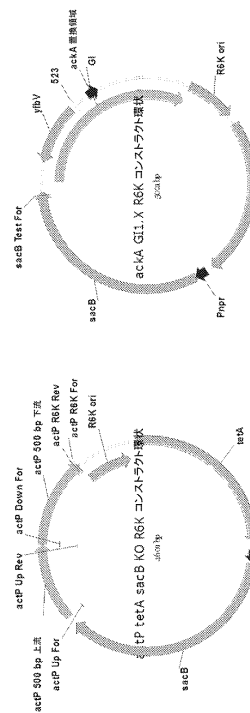
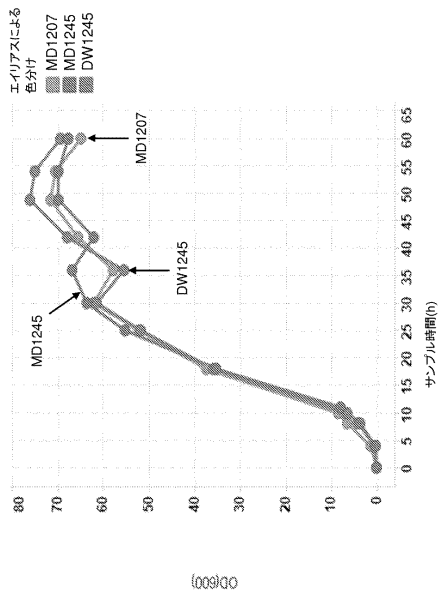


図 19

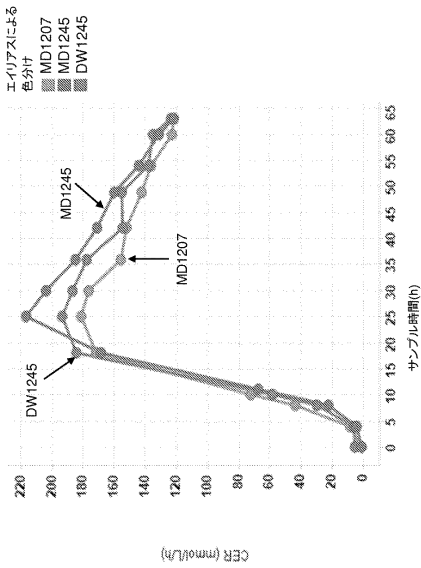
【図 2 0 A】

図 20A



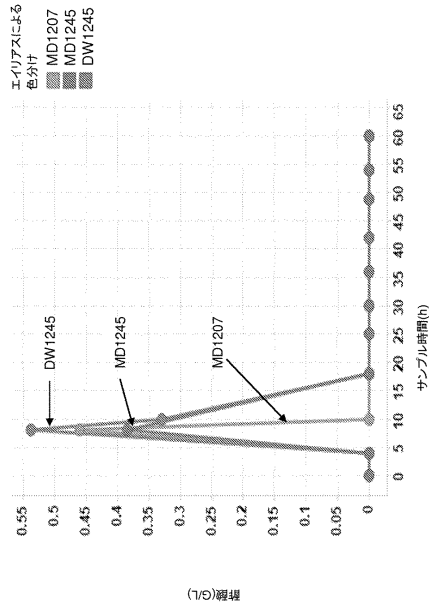
【図 2 0 B】

図 20B



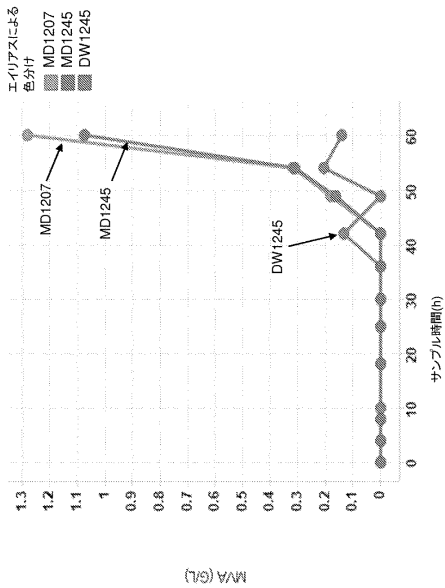
【図 2 0 C】

図 20C



【図 2 0 D】

図 20D



【図 2 1 A】

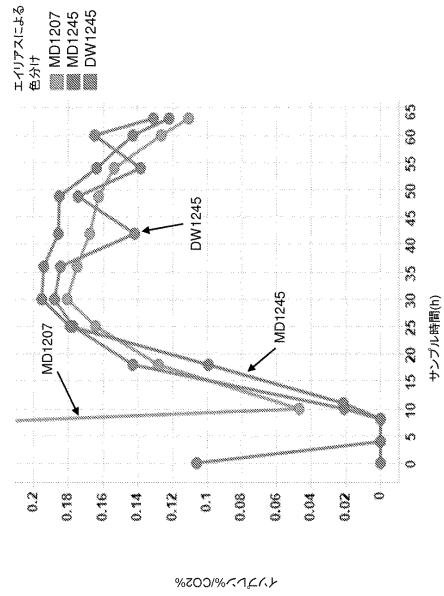


図 21A

【図 2 1 B】

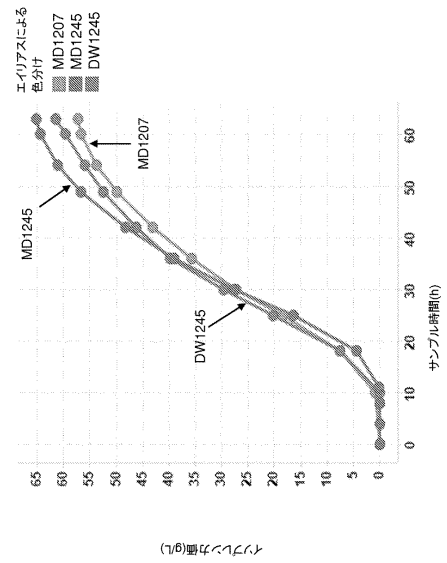


図 21B

【図 2 1 C】

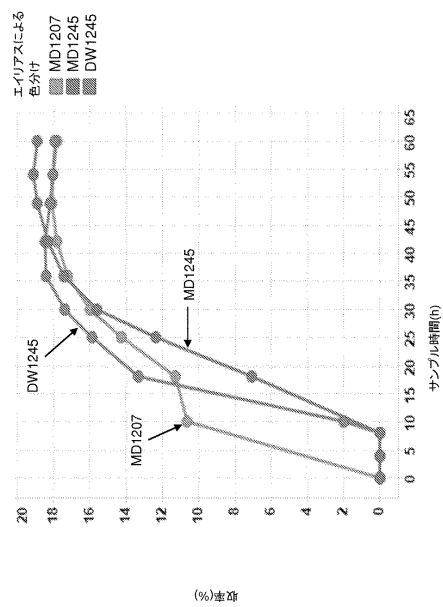


図 21C

【図 2 1 D】

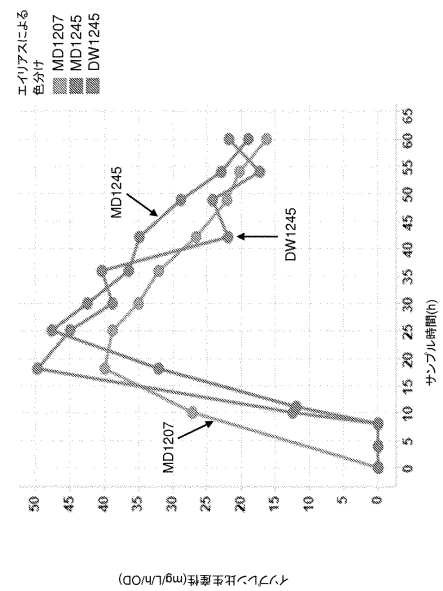
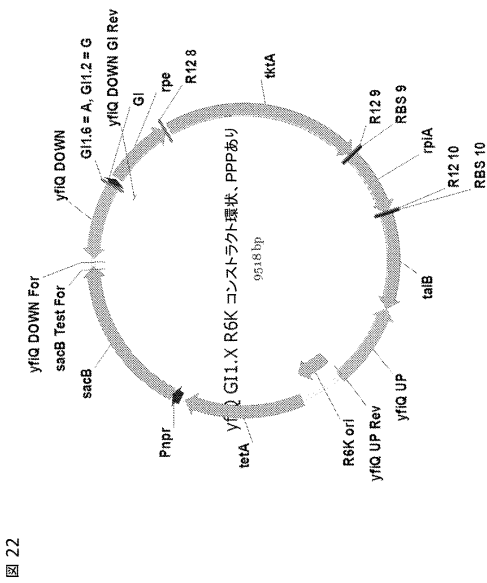
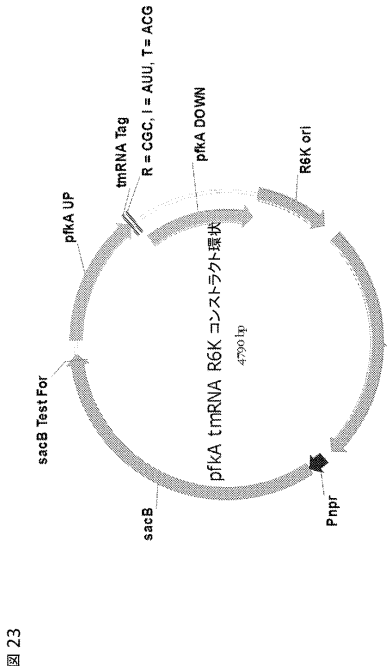


図 21D

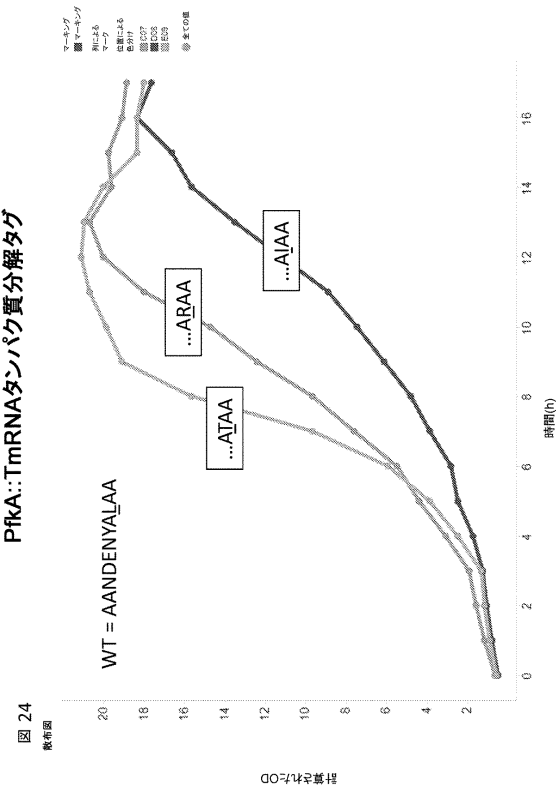
【図 2 2】



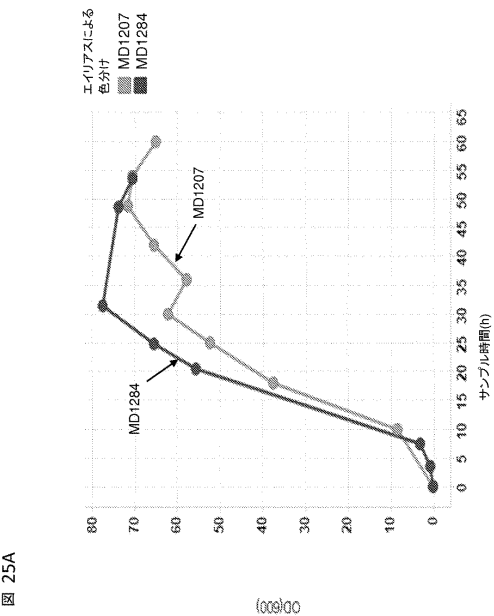
【図 2 3】



【図 2 4】

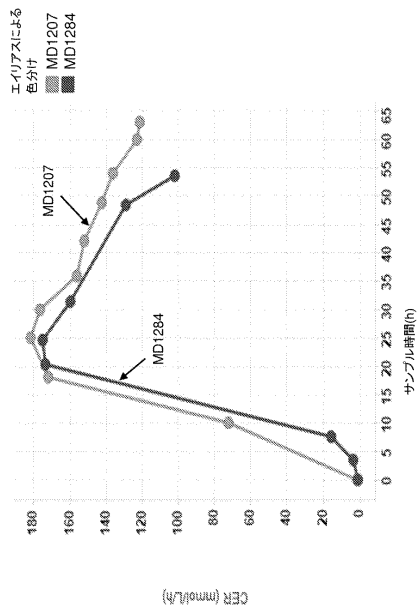


【図 2 5 A】



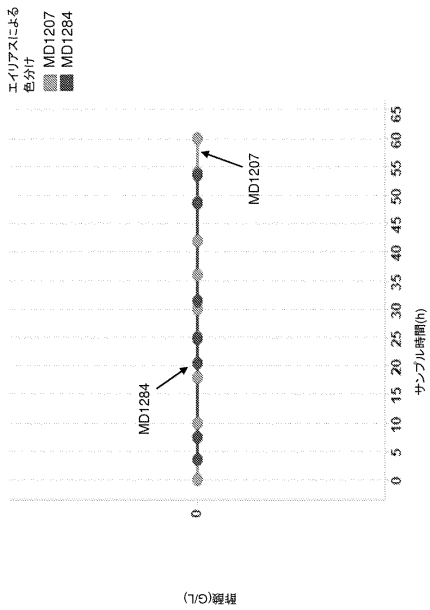
【図 2 5 B】

図 25B



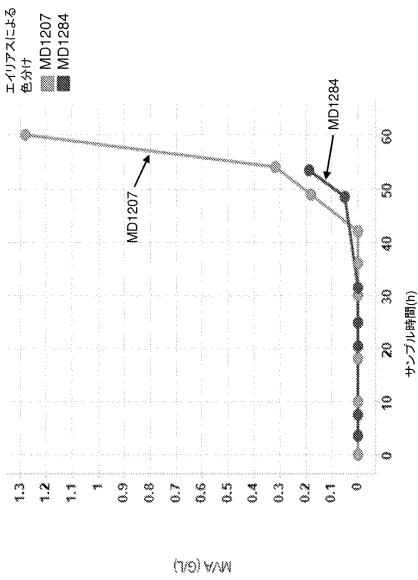
【図 2 5 C】

図 25C



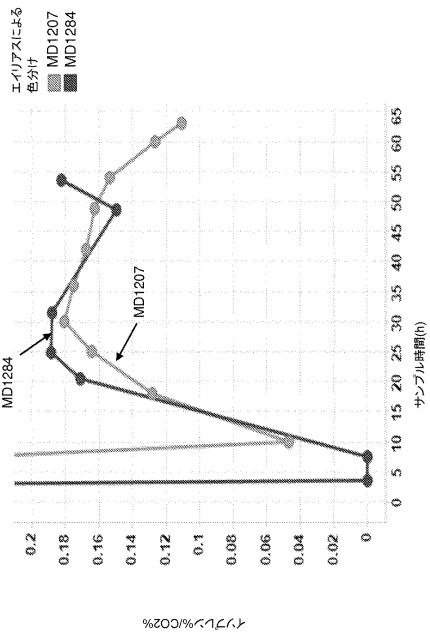
【図 2 5 D】

図 25D

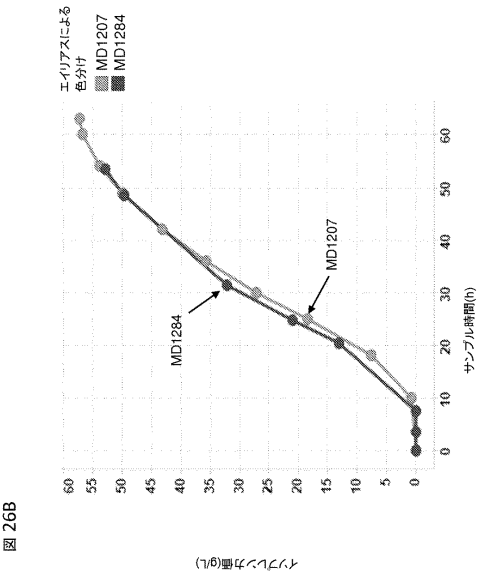


【図 2 6 A】

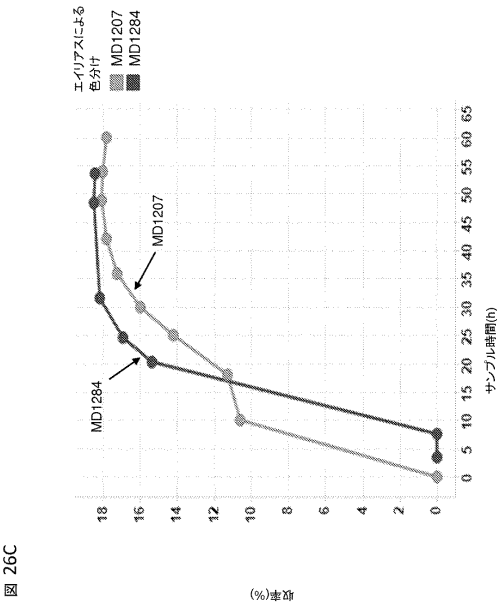
図 26A



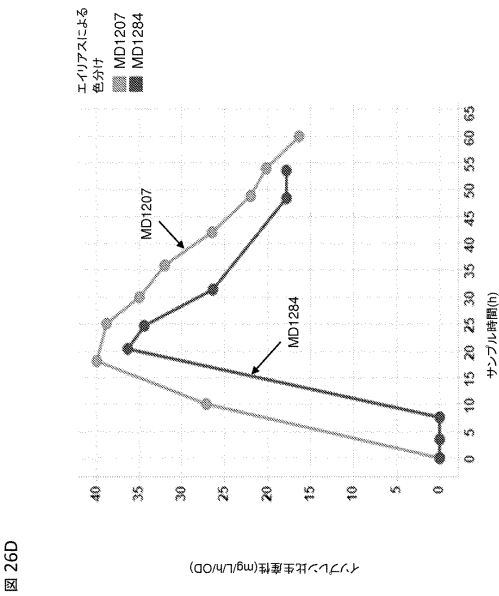
【図 2 6 B】



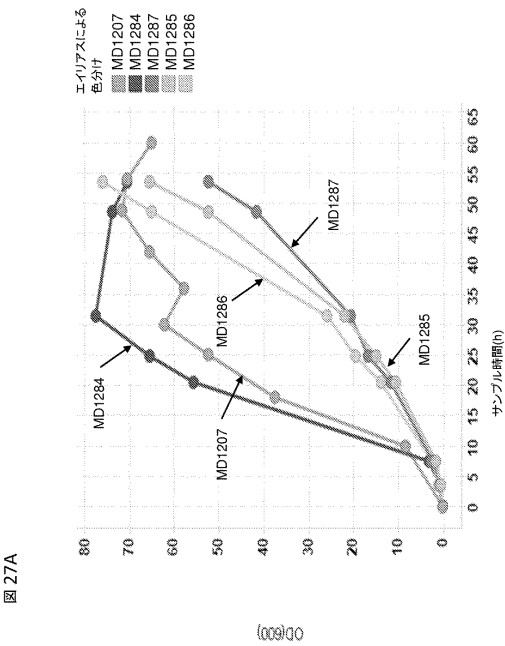
【図 2 6 C】



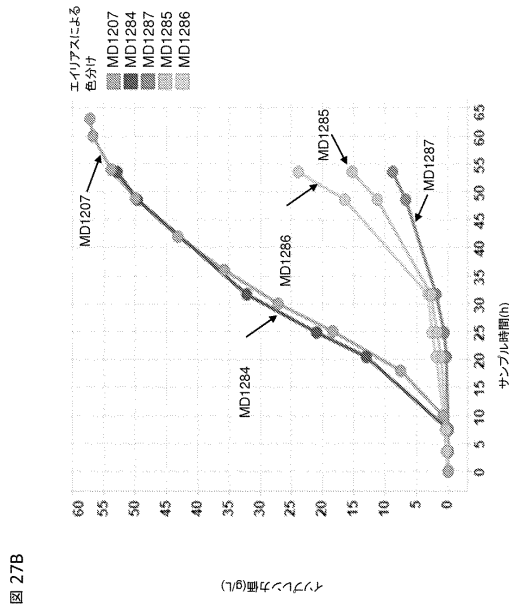
【図 2 6 D】



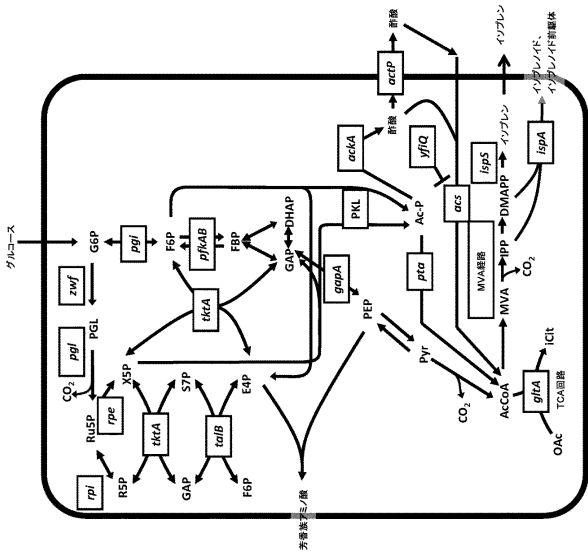
【図 2 7 A】



【図 27 B】



【図 28】



【配列表】

0006744819000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 15/54 (2006.01) C 1 2 N 15/54

(74)代理人 100123892

弁理士 内藤 忠雄

(72)発明者 セルバン、マルグリッテ・アー

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 4 3 0 4-1 0 1 3、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 9 2 5 ダニスコ・ユーエス・インク

(72)発明者 ミラー、マイケル・シー

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 4 3 0 4-1 0 1 3、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 9 2 5 ダニスコ・ユーエス・インク

(72)発明者 ウェルス、デレク・エイチ

アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 4 3 0 4-1 0 1 3、パロ・アルト、ページ・ミル・ロード 9 2 5 ダニスコ・ユーエス・インク

(72)発明者 ウォルフェ、アラン・ジェイ

アメリカ合衆国、イリノイ州 6 0 0 8 9、バッファロー・グローブ、ツイスト・オーク・ライン 1 0 2 0

(72)発明者 ダシカ、マッドフーカー・エス

アメリカ合衆国、メリーランド州 2 1 0 4 3、エリコット・シティ、チャールズ・クロッシング 5 9 6 7

審査官 西 賢二

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 3 / 0 6 6 5 6 8 (WO, A 1)

国際公開第 2 0 1 3 / 0 2 0 1 1 8 (WO, A 1)

米国特許出願公開第 2 0 0 9 / 0 0 5 3 7 9 7 (US, A 1)

国際公開第 2 0 1 3 / 1 6 6 3 2 0 (WO, A 1)

国際公開第 2 0 1 4 / 0 1 5 2 1 0 (WO, A 2)

Castano-Cerezo, S. et al., "cAMP-CRP co-ordinates the expression of the protein acetylation pathway with central metabolism in Escherichia coli", Mol. Microbiol., 2 0 1 1 年, Vol. 82, pp. 1110-1128

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8

C 1 2 P 1 / 0 0 - 4 1 / 0 0

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (STN)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

P u b M e d