

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2011-510611

(P2011-510611A)

(43) 公表日 平成23年4月7日(2011.4.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21 Z N A	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 5
C 1 2 P 7/06 (2006.01)	C 1 2 P 7/06	4 H O 1 3
C 1 2 P 7/16 (2006.01)	C 1 2 P 7/16	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 101 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2009-549282 (P2009-549282)	(71) 出願人	500445295
(86) (22) 出願日	平成20年2月8日 (2008.2.8)		ザ レジェンツ オブ ザ ユニヴァース
(85) 翻訳文提出日	平成21年10月2日 (2009.10.2)		ティ オブ カリフォルニア
(86) 国際出願番号	PCT/US2008/053514		アメリカ合衆国 9 4 6 0 7 - 5 2 0 0
(87) 国際公開番号	W02008/098227		カリフォルニア州 オークランド フラン
(87) 国際公開日	平成20年8月14日 (2008.8.14)		クリン ストリート 1 1 1 1 トゥエル
			フス フロア
		(74) 代理人	100091096
			弁理士 平木 祐輔
		(74) 代理人	100096183
			弁理士 石井 貞次
		(74) 代理人	100118773
			弁理士 藤田 節
		(74) 代理人	100122389
			弁理士 新井 栄一
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組換え微生物によるバイオ燃料の生成

(57) 【要約】

バイオ燃料の生成に有用な代謝的に改変した微生物が提供される。さらに具体的に言えば、適切な基質からイソブタノール、1-ブタノール、1-プロパノール、2-メチル-1-ブタノール、3-メチル-1-ブタノールおよび2-フェニルエタノールを含む高級アルコール類を生成する方法が提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下から成る群より選択されるアルコールを生成する組換え微生物であって、該アルコールは2-ケト酸を含む代謝生成物から生成される、前記組換え微生物。

(a) 1-プロパノール；

(b) イソブタノールであって、ブドウ糖1グラム当たりイソブタノール約0.12～約0.41グラムの収量を有する；

(c) 1-ブタノール；

(d) 2-メチル1-ブタノール；

(e) 3-メチル1-ブタノール；および

(f) 2-フェニルエタノール。

10

【請求項 2】

培養約112時間でエタノール約240 mg/L未満を生成する、請求項1に記載の組換え微生物。

【請求項 3】

類似した条件下で培養したとき、前記微生物のアルコール生成プロファイルが、ATCCアクセッション番号_____または_____（それぞれSA237またはCRS-BuOH23）である微生物のアルコール生成プロファイルと実質的に同一である、請求項 1 または 2 に記載の組換え微生物。

【請求項 4】

イソブタノールの収量がブドウ糖1グラム当たりイソブタノール約0.33～約0.36グラムである、請求項 1 に記載の組換え微生物。

20

【請求項 5】

培養約16～約64時間でイソブタノールの収量がブドウ糖1グラム当たりイソブタノール0.36～0.40グラムである、請求項 1 に記載の組換え微生物。

【請求項 6】

ブドウ糖1グラム当たりのエタノールの収量が約0.0037 g/g未満である、請求項 4 または 5 に記載の組換え微生物。

【請求項 7】

前記微生物が、コリネバクテリウム属、ラクトバチルス属、ラクトコッカス属、サルモネラ属、エンテロバクター属、エンテロコッカス属、エルウィニア属、パンテア属、モルガネラ属、ペクトバクテリウム属、プロテウス属、セラチア属、シゲラ属、クレブシエラ属、シトロバクター属、サッカロマイセス属、デッケラ属、クリベロマイセス属およびピキア属より選択される、請求項 1 に記載の組換え微生物。

30

【請求項 8】

生物内でのアミノ酸生成のための生合成経路がアルコール生成のために改変される、請求項 1 に記載の組換え微生物。

【請求項 9】

2-ケト酸が、2-ケト酪酸、2-ケトイソ吉草酸、2-ケト吉草酸、2-ケト3-メチルバレレート、2-ケト4-メチル-ペンタノエートおよびフェニルピルビン酸から成る群より選択される、請求項 1 に記載の組換え微生物。

40

【請求項 10】

前記微生物が親の微生物と比較して低下したエタノール生成能を有する、請求項 1 に記載の組換え微生物。

【請求項 11】

前記微生物がアセチル-coAからエタノールへの変換の低下または阻害を有する、請求項 1 または 10 に記載の組換え微生物。

【請求項 12】

前記組換え微生物がエタノールデヒドロゲナーゼの低下を有し、それによってエタノール生成能が低下した、請求項 1 または 10 に記載の組換え微生物。

50

【請求項 1 3】

前記微生物が大腸菌に由来する、請求項 1 2 に記載の組換え微生物。

【請求項 1 4】

前記エタノールデヒドロゲナーゼがadhE、その相同体または変異体である、請求項 1 3 に記載の組換え微生物。

【請求項 1 5】

前記微生物がadhE、その相同体または変異体の欠失またはノックアウトを有する、請求項 1 4 に記載の組換え微生物。

【請求項 1 6】

前記微生物がピルビン酸を α -ケト-イソ吉草酸に変換する酵素の発現または発現の増大を有する、請求項 1 または 1 0 に記載の組換え微生物。 10

【請求項 1 7】

前記酵素が2-ケト酸デカルボキシラーゼである、請求項 1 6 に記載の組換え微生物。

【請求項 1 8】

親の微生物と比較して、2-ケト酸デカルボキシラーゼおよびアルコールデヒドロゲナーゼの発現または活性の増大を有する、請求項 1 に記載の組換え微生物。

【請求項 1 9】

前記2-ケト酸デカルボキシラーゼが、Pdc、Pdc1、Pdc5、Pdc6、Aro10、Thi3、KivdおよびKdcA、上記のいずれかの相同体または変異体、ならびに上記のいずれかと少なくとも60%の同一性を有し、且つ2-ケト酸デカルボキシラーゼ活性を有するポリペプチドから成る群より選択される、請求項 1 7 または 1 8 に記載の組換え微生物。 20

【請求項 2 0】

前記2-ケト酸デカルボキシラーゼが、pdc、pdc1、pdc5、pdc6、aro10、thi3、kivd、kdcA、上記のいずれかの相同体もしくは変異体、またはその断片から成る群より選択される核酸と少なくとも60%の同一性を有するポリヌクレオチドによりコードされ、且つ該ポリヌクレオチドが2-ケト酸デカルボキシラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする、請求項 1 7 または 1 8 に記載の組換え微生物。

【請求項 2 1】

前記2-ケト酸デカルボキシラーゼがkivd遺伝子またはその相同体に由来するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項 2 0 に記載の組換え微生物。 30

【請求項 2 2】

前記アルコールデヒドロゲナーゼが、Adh1、Adh2、Adh3、Adh4、Adh5、Adh6、Sfa1、上記のいずれかの相同体または変異体、および上記のいずれかと少なくとも60%の同一性を有し、且つアルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドから成る群より選択される、請求項 1 8 に記載の組換え生物。

【請求項 2 3】

前記アルコールデヒドロゲナーゼが、adh1、adh2、adh3、adh4、adh5、adh6、sfa1遺伝子および上記のいずれかの相同体から成る群より選択される核酸と少なくとも60%の同一性を有するポリヌクレオチドによりコードされ、且つ該ポリヌクレオチドが2-アルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードする、請求項 1 8 に記載の組換え微生物。 40

【請求項 2 4】

前記組換え微生物が、アセチル-coAからエタノールへの変換の触媒作用、ピルビン酸から乳酸への変換の触媒作用、フマル酸からコハク酸への変換の触媒作用、アセチル-coAおよびリン酸からcoAおよびアセチルホスフェートへの変換の触媒作用、アセチル-coAおよびギ酸からcoAおよびピルビン酸への変換の触媒作用、アセチル-CoAのアセチル基と3-メチル-2-オキソブタノエート（2-オキソイソバレレート）との縮合の触媒作用、2-イソプロピルリンゴ酸と3-イソプロピルリンゴ酸との間の異性化の触媒作用、 α -ケト酸から分岐鎖アミノ酸への変換の触媒作用、Phe Tyr AspまたはLeuの合成の触媒作用、ピルビン酸からアセチル-coAへの変換の触媒作用、分岐鎖アミノ酸の生成の触媒作用、トレオニンか 50

らの α -ケト酪酸の生成の触媒作用、メチオニン生合成の最初のステップの触媒作用、ならびにトレオニンの異化の触媒作用を有する酵素をコードする遺伝子に1以上の欠失またはノックアウトを有する、請求項1に記載の組換え微生物。

【請求項25】

前記組換え微生物が、adhE、ldhA、frdBC、fnr、pta、pflB、leuA、leuB、leuC、leuD、ilvE、tyrB、poxB、ilvB、ilvI、ilvA、metA、tdh、上記のいずれかの相同体および上記のいずれかの天然の変異体から成る群より選択される1以上の遺伝子欠失を有する、請求項1または24に記載の組換え微生物。

【請求項26】

以下から成る群より選択される遺伝子型を有する、請求項1に記載の組換え微生物。

10

(a) $\Delta adhE$ 、 $\Delta ldhA$ 、 Δpta 、 $\Delta leuA$ 、 $\Delta leuB$ 、 $\Delta leuC$ 、 $\Delta leuD$ 、 $\Delta poxB$ 、 $\Delta ilvB$ 、 $\Delta ilvI$ 、 $\Delta metA$ 、 Δtdh およびそれらのいずれかの組合せから成る群より選択される欠失またはノックアウト、且つkivd、ThrABCおよびadh2の発現またはこれらの発現の増大を有し、微生物は1-プロパノールを生成する；

(b) $\Delta adhE$ 、 $\Delta ldhA$ 、 $\Delta frdB$ 、 $\Delta frdC$ 、 Δfnr 、 Δpta 、 $\Delta pflB$ 、 $\Delta leuA$ 、 $\Delta ilvE$ 、 $\Delta poxB$ 、 $\Delta ilvA$ およびそれらのいずれかの組合せから成る群より選択される欠失またはノックアウト、且つkivd、ThrABCおよびadh2の発現またはこれらの発現の増大を有し、微生物はイソブタノールを生成する；

(c) $\Delta adhE$ 、 $\Delta ldhA$ 、 Δpta 、 $\Delta poxB$ 、 $\Delta ilvB$ 、 $\Delta ilvI$ 、 $\Delta metA$ 、 Δtdh およびそれらのいずれかの組合せから成る群より選択される欠失またはノックアウト、且つkivd、ThrABCおよびadh2の発現またはこれらの発現の増大を有し、微生物は1-ブタノールを生成する；

20

(d) $\Delta ilvB$ 、 $\Delta ilvI$ 、 $\Delta metA$ 、 Δtdh およびそれらのいずれかの組合せから成る群より選択される欠失またはノックアウト、且つkivd、ThrABCおよびadh2の発現またはこれらの発現の増大を有し、微生物は2-メチル1-ブタノールを生成する；

(e) $\Delta adhE$ 、 $\Delta ldhA$ 、 $\Delta frdB$ 、 $\Delta frdC$ 、 Δfnr 、 Δpta 、 $\Delta pflB$ 、 $\Delta ilvE$ 、 $\Delta tyrB$ およびそれらのいずれかの組合せから成る群より選択される欠失またはノックアウト、且つkivd、ThrABCおよびadh2の発現またはこれらの発現の増大を有し、微生物は3-メチル1-ブタノールを生成する；ならびに、

(f) $\Delta adhE$ 、 $\Delta ldhA$ 、 $\Delta frdB$ 、 $\Delta frdC$ 、 Δfnr 、 Δpta 、 $\Delta pflB$ 、 $\Delta leuA$ 、 $\Delta ilvE$ 、 $\Delta poxB$ 、 $\Delta ilvA$ およびそれらのいずれかの組合せから成る群より選択される欠失またはノックアウト、且つkivd、ThrABCおよびadh2の発現またはこれらの発現の増大を有し、微生物は2-フェニルエタノールを生成する。

30

【請求項27】

ThrABCがフィードバック耐性ThrA^{*}である、請求項26に記載の組換え微生物。

【請求項28】

親の微生物と比較して、以下の発現または活性の増大を有する組換え微生物であって、エタノールデヒドロゲナーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、フマル酸レダクターゼ、リン酸アセチルトランスフェラーゼ、ギ酸アセチルトランスフェラーゼおよびそれらのいずれかの組合せから成る群より選択される酵素をコードする少なくとも1つの遺伝子のノックアウトまたは破壊を有し、且つイソブタノールを生成する、前記組換え微生物。

40

a) アセトヒドロキシ酸シンターゼ；

b) アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ；

c) ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ；

d) 2-ケト酸デカルボキシラーゼ；および

e) アルコールデヒドロゲナーゼ。

【請求項29】

親の微生物と比較して、以下の発現または活性の増大を有する組換え微生物であって、エタノールデヒドロゲナーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、フマル酸レダクターゼ、リン酸アセチルトランスフェラーゼ、ギ酸アセチルトランスフェラーゼおよびそれらのいずれかの

50

組合せから成る群より選択される酵素をコードする少なくとも1つの遺伝子のノックアウトまたは破壊を有し、且つイソブタノールを生成する、前記組換え微生物。

- a) アセト乳酸シンターゼ；
- b) アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ；
- c) ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ；
- d) 2-ケト酸デカルボキシラーゼ；および
- e) アルコールデヒドロゲナーゼ。

【請求項 30】

さらに親の微生物と比較してピルビン酸の流量の増加を有する、請求項 28 または 29 に記載の組換え微生物。

10

【請求項 31】

前記ノックアウトまたは破壊が、adhE、ldhA、frdBC、fnr、pflBもしくはpta遺伝子、それらのいずれかの組合せ、それらのいずれかの相同体またはそれらのいずれかの天然変異体の発現の欠失または破壊を含む、請求項 28 または 29 に記載の組換え微生物。

【請求項 32】

前記ノックアウトまたは破壊が、adhE、ldhAおよびfrdBC遺伝子、それらのいずれかの相同体または天然変異体の発現の欠失または破壊を含む、請求項 28 または 29 に記載の組換え微生物。

【請求項 33】

前記ノックアウトまたは破壊が、adhE、ldhA、frdBC、pta、fnr、それらのいずれかの組合せ、それらのいずれかの相同体または天然変異体から成る群より選択される欠失または破壊を含む、請求項 28 または 29 に記載の組換え微生物。

20

【請求項 34】

adhE、ldhA、frdBCおよびpta、それらの相同体または変異体の欠失または破壊を含む、請求項 33 に記載の組換え微生物。

【請求項 35】

adhE、ldhA、frdBC、ptaおよびfnr、それらの相同体または変異体の欠失または破壊を含む、請求項 33 に記載の組換え微生物。

【請求項 36】

adhE、ldhA、frdBCおよびfnr、それらの相同体または変異体の欠失または破壊を含む、請求項 33 に記載の組換え微生物。

30

【請求項 37】

adhE、ldhA、frdBC、ptaおよびpflBの欠失または破壊を含む、請求項 28 または 29 に記載の組換え微生物。

【請求項 38】

大腸菌である、請求項 28 または 29 に記載の組換え微生物。

【請求項 39】

前記ノックアウトが、大腸菌ゲノムの約ヌクレオチド1,397,551から約ヌクレオチド1,439,877までの組換え微生物ゲノム部分の欠失を含む、請求項 38 に記載の組換え微生物。

【請求項 40】

前記アセトヒドロキシ酸シンターゼがilvIHオペロンまたはその相同体に由来するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項 28 に記載の組換え微生物。

40

【請求項 41】

前記ilvIHオペロンのilvI遺伝子がアセトヒドロキシ酸シンターゼの大サブユニットポリペプチドをコードする、請求項 40 に記載の組換え微生物。

【請求項 42】

前記ilvIHオペロンのilvH遺伝子がアセトヒドロキシ酸シンターゼの小サブユニットポリペプチドをコードする、請求項 40 に記載の組換え微生物。

【請求項 43】

前記アセト乳酸シンターゼが枯草菌由来のalsSである、請求項 29 に記載の組換え微生物

50

物。

【請求項 4 4】

前記アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼが、ilvC遺伝子またはその相同体に由来するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項 2 8 または 2 9 に記載の組換え微生物。

【請求項 4 5】

前記ジヒドロキシ酸デヒドラターゼが、ilvD遺伝子またはその相同体に由来するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項 2 8 または 2 9 に記載の組換え微生物。

【請求項 4 6】

前記2-ケト酸デカルボキシラーゼが、kivd遺伝子もしくはその相同体、またはAR010遺伝子もしくはその相同体に由来するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項 2 8 または 2 9 に記載の組換え微生物。

10

【請求項 4 7】

前記アルコールデヒドロゲナーゼが、ADH2遺伝子またはその相同体に由来するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項 2 8 または 2 9 に記載の組換え微生物。

【請求項 4 8】

ATCCアクセッション番号_____ (SA237と称する) の表現型を有する、請求項 2 8 または 2 9 に記載の組換え微生物。

【請求項 4 9】

ATCCアクセッション番号_____ (CRS-BuOH23と称する) のゲノムを有する、請求項 2 8 または 2 9 に記載の組換え微生物。

20

【請求項 5 0】

親の微生物と比較して、以下の発現または活性の増大を有する組換え微生物であって、1-ブタノールを生成する、前記組換え微生物。

- a) 2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ；
- b) β -イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ；
- c) イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼ；および
- d) トレオニンデヒドラターゼ。

【請求項 5 1】

さらに、親の微生物と比較して、2-ケトイソ吉草酸、2-ケト-3-メチル-バレレートもしくは2-ケト-4-メチル-ペンタノエートまたはそれらのいずれかの組合せのレベルの低下を有する、請求項 5 0 に記載の組換え微生物。

30

【請求項 5 2】

さらに、親の微生物と比較して、ilvD遺伝子の発現の欠失または破壊を有する、請求項 5 0 に記載の組換え微生物。

【請求項 5 3】

前記2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼがleuA遺伝子、その相同体またはその天然変異体に由来するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項 5 0 に記載の組換え微生物。

【請求項 5 4】

前記 β -イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼがleuB遺伝子、その相同体またはその天然変異体に由来するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項 5 0 に記載の組換え微生物。

40

【請求項 5 5】

前記イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼがleuCDオペロンまたはその相同体に由来するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項 5 0 に記載の組換え微生物。

【請求項 5 6】

前記leuCDオペロンのleuC遺伝子が、イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼの大サブユニットポリペプチドをコードする、請求項 5 5 に記載の組換え微生物。

【請求項 5 7】

前記leuCDオペロンのleuD遺伝子が、イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼの小サブユニ

50

ットポリペプチドをコードする、請求項 55 に記載の組換え微生物。

【請求項 58】

前記トレオニンデヒドラターゼがilvA遺伝子またはその相同体に由来するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項 50 に記載の組換え微生物。

【請求項 59】

さらに、親の微生物と比較して、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ、ピルビン酸カルボキシラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、ホモセリンデヒドロゲナーゼ、アスパラギン酸-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、ホモセリンキナーゼ、トレオニンシンターゼ、L-セリンデヒドラターゼもしくはトレオニンデヒドラターゼまたはそれらのいずれかの組合せの発現または活性の増大を有する、請求項 50 に記載の組換え微生物。

10

【請求項 60】

ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ、ピルビン酸カルボキシラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、ホモセリンデヒドロゲナーゼ、アスパラギン酸-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、ホモセリンキナーゼ、トレオニンシンターゼ、L-セリンデヒドラターゼおよびトレオニンデヒドラターゼが、それぞれppc、pyc、aspC、thrA、asd、thrB、thrC、sdaABおよびtdcB遺伝子、それらの相同体またはそれらの天然変異体に由来するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項 50～59 のいずれか 1 項に記載の組換え微生物。

【請求項 61】

ATCCアクセッション番号_____（CRS-BuOH23と称する）の表現型を有する、請求項 50 に記載の組換え微生物。

20

【請求項 62】

ATCCアクセッション番号_____（CRS-BuOH23と称する）のゲノムを有する、請求項 50 に記載の組換え微生物。

【請求項 63】

親の微生物と比較して、以下の発現または活性の増大を有する組換え微生物であって、1-プロパノールを生成する、前記組換え微生物。

- a) α -イソプロピルリンゴ酸シンターゼ；
- b) β -イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ；
- c) イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼ；および
- d) トレオニンデヒドラターゼ。

30

【請求項 64】

前記 α -イソプロピルリンゴ酸シンターゼが、cimA遺伝子、その相同体またはその天然変異体に由来するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項 63 に記載の組換え微生物。

【請求項 65】

前記 β -イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼが、leuB遺伝子、その相同体またはその天然変異体に由来するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項 63 に記載の組換え微生物。

40

【請求項 66】

前記イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼが、leuCDオペロン、その相同体またはその天然変異体に由来するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項 63 に記載の組換え微生物。

【請求項 67】

前記leuCDオペロンのleuC遺伝子がイソプロピルリンゴ酸イソメラーゼの大サブユニットポリペプチドをコードする、請求項 66 に記載の組換え微生物。

【請求項 68】

前記leuCDオペロンのleuD遺伝子がイソプロピルリンゴ酸イソメラーゼの小サブユニットポリペプチドをコードする、請求項 66 に記載の組換え微生物。

50

【請求項 69】

前記cimA遺伝子がメタノカルドコッカス・ジャナシイのcimA遺伝子である、請求項64に記載の組換え微生物。

【請求項 70】

親の微生物と比較して、以下の発現または活性の増大を有する組換え微生物であって、2-メチル1-ブタノールを生成する、前記組換え微生物。

- a) トレオニンデヒドラターゼ；
- b) アセトヒドロキシ酸シンターゼ；
- c) アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ；
- d) ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ；
- e) 2-ケト酸デカルボキシラーゼ；および
- f) アルコールデヒドロゲナーゼ。

10

【請求項 71】

前記トレオニンデヒドラターゼが、ilvA遺伝子、その相同体またはその天然変異体に由来するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項70に記載の組換え微生物。

【請求項 72】

前記アセトヒドロキシ酸シンターゼが、ilvIHオペロン、その相同体またはその天然変異体に由来するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項70に記載の組換え微生物。

【請求項 73】

前記アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼが、ilvC遺伝子、その相同体またはその天然変異体に由来するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項70に記載の組換え微生物。

20

【請求項 74】

前記ジヒドロキシ酸デヒドラターゼが、ilvD遺伝子、その相同体またはその天然変異体に由来するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項70に記載の組換え微生物。

【請求項 75】

前記2-ケト酸デカルボキシラーゼが、kivd遺伝子、その相同体もしくはその天然変異体；またはPDC6遺伝子、その相同体もしくはその天然変異体；またはTHI3遺伝子、その相同体もしくはその天然変異体に由来するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項70に記載の組換え微生物。

30

【請求項 76】

前記アルコールデヒドロゲナーゼが、ADH2遺伝子またはその相同体に由来するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項70～75のいずれか1項に記載の組換え微生物。

【請求項 77】

親の微生物と比較して、以下の発現または活性の増大を有する組換え微生物であって、3-メチル1-ブタノールを生成する、前記組換え微生物。

- a) アセトヒドロキシ酸シンターゼまたはアセト乳酸シンターゼ；
- b) アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ；
- c) ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ；
- d) 2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ；
- e) イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼ；
- f) β -イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ；
- g) 2-ケト酸デカルボキシラーゼ；および
- h) アルコールデヒドロゲナーゼ。

40

【請求項 78】

前記アセトヒドロキシ酸シンターゼが、ilvIHオペロン、その相同体またはその天然変異体に由来するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項77に記載の組換え微生物。

【請求項 79】

50

前記アセト乳酸シンターゼが、ilvMGオペロン、その相同体またはその天然変異体に由来するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項 77 に記載の組換え微生物。

【請求項 80】

前記アセト乳酸シンターゼが、ilvNBオペロン、その相同体またはその天然変異体に由来するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項 77 に記載の組換え微生物。

【請求項 81】

前記アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼが、ilvC遺伝子、その相同体またはその天然変異体に由来するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項 77 に記載の組換え微生物。

【請求項 82】

前記ジヒドロキシ酸デヒドラターゼが、ilvD遺伝子、その相同体またはその天然変異体に由来するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項 77 に記載の組換え微生物。

【請求項 83】

前記2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼが、leuA遺伝子、その相同体またはその天然変異体に由来するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項 77 に記載の組換え微生物。

【請求項 84】

前記イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼが、leuCDオペロン、その相同体またはその天然変異体に由来するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項 77 に記載の組換え微生物。

【請求項 85】

前記β-イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼが、leuB遺伝子、その相同体またはその天然変異体に由来するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項 77 に記載の組換え微生物。

【請求項 86】

前記2-ケト酸デカルボキシラーゼが、kivd遺伝子もしくはその相同体、またはPDC6遺伝子もしくはその相同体、またはTHI3遺伝子、その相同体もしくはその天然変異体に由来するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項 77 に記載の組換え微生物。

【請求項 87】

前記アルコールデヒドロゲナーゼが、ADH2遺伝子、その相同体またはその天然変異体に由来するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項 77 ～ 86 のいずれか 1 項に記載の組換え微生物。

【請求項 88】

親の微生物と比較して、以下の発現または活性の増大を有する組換え微生物であって、フェニルエタノールを生成する、前記組換え微生物。

- a) コリスミ酸ムターゼP/プレフェン酸デヒドラターゼ；
- b) コリスミ酸ムターゼT/プレフェン酸デヒドロゲナーゼ；
- c) 2-ケト酸デカルボキシラーゼ；および
- d) アルコールデヒドロゲナーゼ。

【請求項 89】

前記コリスミ酸ムターゼP/プレフェン酸デヒドラターゼが、pheA遺伝子、その相同体またはその天然変異体に由来するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項 88 に記載の組換え微生物。

【請求項 90】

前記コリスミ酸ムターゼT/プレフェン酸デヒドロゲナーゼが、tyrA遺伝子、その相同体またはその天然変異体に由来するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項 88 に記載の組換え微生物。

【請求項 91】

前記2-ケト酸デカルボキシラーゼが、kivd遺伝子もしくはその相同体、またはPDC6遺伝子もしくはその相同体、またはTHI3遺伝子、その相同体もしくはその天然変異体に由来す

10

20

30

40

50

るポリヌクレオチドによりコードされる、請求項 88 に記載の組換え微生物。

【請求項 92】

前記アルコールデヒドロゲナーゼが、ADH2 遺伝子またはその相同体に由来するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項 88～91 のいずれか 1 項に記載の組換え微生物。

【請求項 93】

適切な基質または代謝中間生成物を 1-ブタノールに変換する組換え微生物を生成する方法であって、微生物を、2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ活性、 β -イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ活性、イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼ活性およびトレオニンデヒドラターゼ活性を有するポリペプチドをコードする 1 以上の組換えポリヌクレオチドで形質転換することを含む、前記方法。

10

【請求項 94】

生成される組換え微生物が、ATCC アクセション番号 _____ (CRS-BuOH23 と称する) のアルコールプロファイルと実質的に類似のブドウ糖存在下で生成されるアルコールプロファイルを有する、請求項 93 に記載の方法。

【請求項 95】

適切な基質または代謝中間生成物を イソブタノールに変換する組換え微生物を生成する方法であって、微生物を、アセトヒドロキシ酸シンターゼ活性、アセトヒドロキシ酸イソメロダクターゼ活性、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ活性、2-ケト酸デカルボキシラーゼ活性およびアルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする 1 以上の組換えポリヌクレオチドで形質転換することを含む、前記方法。

20

【請求項 96】

生成される組換え微生物が、ATCC アクセション番号 _____ (SA237 と称する) のアルコールプロファイルと実質的に類似のブドウ糖存在下で生成されるアルコールプロファイルを有する、請求項 95 に記載の方法。

【請求項 97】

適切な基質または代謝中間生成物を 1-プロパノールに変換する組換え微生物を生成する方法であって、微生物を、 α -イソプロピルリンゴ酸シンターゼ活性、 β -イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ活性、イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼ活性およびトレオニンデヒドラターゼ活性を有するポリペプチドをコードする 1 以上の組換えポリヌクレオチドで形質転換することを含む、前記方法。

30

【請求項 98】

適切な基質または代謝中間生成物を 2-メチル 1-ブタノールに変換する組換え微生物を生成する方法であって、微生物を、トレオニンデヒドラターゼ活性、アセトヒドロキシ酸シンターゼ活性、アセトヒドロキシ酸イソメロダクターゼ活性、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ活性、2-ケト酸デカルボキシラーゼ活性およびアルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする 1 以上の組換えポリヌクレオチドで形質転換することを含む、前記方法。

【請求項 99】

適切な基質または代謝中間生成物を 3-メチル 1-ブタノールに変換する組換え微生物を生成する方法であって、微生物を、アセトヒドロキシ酸シンターゼ活性またはアセト乳酸シンターゼ活性、アセトヒドロキシ酸イソメロダクターゼ活性、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ活性、2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ活性、イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼ活性、 β -イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ活性、2-ケト酸デカルボキシラーゼ活性およびアルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする 1 以上の組換えポリヌクレオチドで形質転換することを含む、前記方法。

40

【請求項 100】

適切な基質または代謝中間生成物を フェニルエタノールに変換する組換え微生物を生成する方法であって、微生物を、コリスミ酸ムターゼ P/プレフェン酸デヒドラターゼ活性、コリスミ酸ムターゼ T/プレフェン酸デヒドロゲナーゼ活性、2-ケト酸デカルボキシラーゼ活性およびアルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする 1 以上の

50

組換えポリヌクレオチドで形質転換することを含む、前記方法。

【請求項 101】

SA237と称され、且つATCCアクセッション番号_____を有する組換え微生物。

【請求項 102】

CRS-BuOH23と称され、且つATCCアクセッション番号_____を有する組換え微生物。

【請求項 103】

アルコールを生成する方法であって、

a) 請求項 1、28、29、50、63、70、77、78、101または102のいずれか1項に記載の組換え微生物を提供すること；

b) 適切な基質または代謝中間生成物の存在下で、且つ該基質からアルコールへの変換にとって適切な条件下でa)に記載の微生物を培養すること；および、

c) アルコールを実質的に精製すること、を含む、前記方法。

【請求項 104】

前記アルコールが、1-プロパノール、イソブタノール、1-ブタノール、2-メチル1-ブタノール、3-メチル1-ブタノールおよび2-フェニルエタノールから成る群より選択される、請求項 103に記載の方法。

【請求項 105】

前記基質または代謝中間生成物が2-ケト酸を含む、請求項 103に記載の方法。

【請求項 106】

前記2-ケト酸が、2-ケト酪酸、2-ケトイソ吉草酸、2-ケト吉草酸、2-ケト3-メチルバレレート、2-ケト4-メチル-ペンタノエートおよびフェニルピルビン酸から成る群より選択される、請求項 105に記載の方法。

【請求項 107】

前記基質がブドウ糖を含み、且つ前記アルコールがイソブタノールを含む、請求項 103に記載の方法。

【請求項 108】

収量がブドウ糖1グラム当たりイソブタノール約0.12～約0.41グラムを有する、請求項 107に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2007年2月9日出願の米国仮出願第60/900,477号、2007年2月9日出願の第60/900,546号、2007年4月4日出願の第60/921,927号、および2007年8月17日出願の第60/956,634号に対して優先権を主張し、参照によりその開示が本明細書に組み込まれる。

【0002】

技術分野

代謝的に改変された微生物およびかかる微生物を生成する方法を提供する。また、適切な基質を代謝的に改変した微生物と接触させることによりバイオ燃料を生成する方法と、その酵素製剤を提供する。

【背景技術】

【0003】

経済的および環境的懸念のため、石油代替品としてのバイオ燃料に対する需要は増えると期待される。一般的なバイオ燃料であるエタノールは、ガソリンよりエネルギー密度が低く、輸送燃料としての目的を果たすためには限られた濃度範囲でガソリンと混合しなければならないため、理想的でない。またエタノールは吸湿性と腐食性があり、保管および配送システムにおいて問題を引き起こす。

【発明の概要】

【0004】

10

20

30

40

50

本開示は、以下のものから成る群から選択されたアルコールを生成する組換え微生物を提供するものである：(a) 1-プロパノール、(b) イソブタノール、収量はグルコース(ブドウ糖)1グラム当たりイソブタノール約0.12～約0.41グラム、(c) 1-ブタノール、(d) 2-メチル1-ブタノール、(e) 3-メチル1-ブタノール、および(f) 2-フェニルエタノール。当該アルコールは2-ケト酸を含む代謝産物から生成される。一実施形態では、当該生物は約112時間の培養で約240 mg/L未満のエタノールを生成した。別の実施形態では、類似の条件で培養された時、微生物のアルコール生成プロファイルはSA237またはCRS-BuOH23と称される微生物のアルコール生成プロファイルと実質的に同一である。さらに別の実施形態では、培養時間約16～約64時間におけるイソブタノールの収量は、グルコース1グラム当たりイソブタノール約0.33～0.36グラムまたはグルコース1グラム当たりイソブタノール約0.36～0.40グラムである。さらなる実施形態では、グルコース1グラムのエタノールの収量は約0.0037 g/g未満である。一実施形態では、微生物は親微生物と比べて低いエタノール生成能力を有する。さらに別の実施形態では、微生物は、アセチル-coAからエタノールへの変換の低下または阻害を有する。さらなる実施形態では、組換え微生物は、エタノールデヒドロゲナーゼの低下を有し、その結果エタノール生成能力が低下する。一実施形態では、微生物はピルビン酸を α -ケト-イソ吉草酸に変換する酵素の発現または高度発現を有する。さらなる実施形態では、該酵素は2-ケト酸デカルボキシラーゼ(例えば、Pdc、Pdc1、Pdc5、Pdc6、Aro10、Thi3、Kivd、およびKdcA、前述のものの1つの相同体または変異体、および前述のものの1つと少なくとも60%同一性を有し、且つ2-ケト酸デカルボキシラーゼ活性を有するポリペプチド)。別の実施形態では、2-ケト酸デカルボキシラーゼは、pdc、pdc1、pdc5、pdc6、aro10、thi3、kivd、kdcA、前述のものの相同体または変異体、あるいはそれらの断片から成る群から選択される核酸と少なくとも60%の同一性を有するポリヌクレオチドによってコードされ、該ポリヌクレオチドは2-ケト酸デカルボキシラーゼ活性を持つポリペプチドをコードする。特定の実施形態では、2-ケト酸デカルボキシラーゼは、kivd遺伝子、またはその相同体に由来するポリヌクレオチドによってコードされる。一実施形態では、微生物は親微生物に比べ、2-ケト酸デカルボキシラーゼとアルコールデヒドロゲナーゼの高度発現または活性上昇を有する。一実施形態では、アルコールデヒドロゲナーゼは、Adh1、Adh2、Adh3、Adh4、Adh5、Adh6、Sfa1、前述のものの相同体または変異体、および前述のものと同様に少なくとも60%の同一性を有し、且つアルコールデヒドロゲナーゼ活性を持つポリペプチドからなる群から選択される。さらに別の実施形態では、アルコールデヒドロゲナーゼは、adh1、adh2、adh3、adh4、adh5、adh6、sfa1遺伝子、および前述のものの相同体からなる群より選択される核酸と少なくとも60%の同一性を持つポリヌクレオチドによってコードされ、該ポリヌクレオチドは2-アルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードする。一実施形態では、組換え微生物は、アセチル-coAからエタノールへの変換を触媒する酵素、ピルビン酸から乳酸への変換を触媒する酵素、フマル酸からコハク酸への変換を触媒する酵素、アセチル-coAおよびリン酸からcoAおよびアセチルリン酸への変換を触媒する酵素、アセチル-coAおよびギ酸からcoAおよびピルビン酸への変換、3-メチル-2-オキソブタン酸(2-オキソイソ吉草酸)とアセチル-CoAのアセチル基の縮合、2-イソプロピルリンゴ酸と3-イソプロピルリンゴ酸との間の異性化を触媒する酵素、 α -ケト酸から分枝鎖アミノ酸への変換、Phe Tyr A spまたはLeuの合成、ピルビン酸からアセチル-coAへの変換を触媒する酵素、分子鎖アミノ酸の形成を触媒する酵素、トレオニンから α -ケト酪酸の形成を触媒する酵素、メチオニン生合成の第一段階を触媒する酵素、およびトレオニンの異化を触媒する酵素をコードしている遺伝子に1つ以上の欠失またはノックアウトを有する。例えば、微生物は、adhE、ldhA、frdBC、fnr、pta、pflB、leuA、leuB、leuC、leuD、ilvE、tyrB、poxB、ilvB、ilvI、ilvA、metA、tdh、前述のものの相同体および前述のものの天然変異体から成る群から選択される1つ以上の遺伝子欠失を有する。特定の実施形態では、微生物の遺伝子型は以下の群から選択される：(a) $\Delta adhE$ 、 $\Delta ldhA$ 、 Δpta 、 $\Delta leuA$ 、 $\Delta leuB$ 、 $\Delta leuC$ 、 $\Delta leuD$ 、 $\Delta poxB$ 、 $\Delta ilvB$ 、 $\Delta ilvI$ 、 $\Delta metA$ 、 Δtdh およびそれらのいずれかの組み合わせで、kivd、ThrABCおよびadh2の発現または高度発現(発現増大)を有し、微生物が1-プロパノ

10

20

30

40

50

ールを生成するものから成る群から選択される欠失またはノックアウト；(b) $\Delta adhE$ 、 $\Delta ldhA$ 、 $\Delta frdB$ 、 $\Delta frdC$ 、 Δfnr 、 Δpta 、 $\Delta pflB$ 、 $\Delta leuA$ 、 $\Delta ilvE$ 、 $\Delta poxB$ 、 $\Delta ilvA$ 、およびそれらのいずれかの組み合わせで、 $kivd$ 、 $ThrABC$ および $adh2$ の発現または高度発現を有し、微生物がイソブタノールを生成するものから成る群から選択される欠失またはノックアウト；(c) $\Delta adhE$ 、 $\Delta ldhA$ 、 Δpta 、 $\Delta poxB$ 、 $\Delta ilvB$ 、 $\Delta ilvI$ 、 $\Delta metA$ 、 Δtdh 、およびそれらのいずれかの組み合わせで、 $kivd$ 、 $ThrABC$ および $adh2$ の発現または高度発現を有し、微生物が1-ブタノールを生成するものから成る群から選択される欠失またはノックアウト；(d) $\Delta ilvB$ 、 $\Delta ilvI$ 、 $\Delta metA$ 、 Δtdh 、およびそれらのいずれかの組み合わせで、 $kivd$ 、 $ThrABC$ および $adh2$ の発現または高度発現を有し、微生物が2-メチル1-ブタノールを生産するものから成る群から選択される欠失またはノックアウト；(e) $\Delta adhE$ 、 $\Delta ldhA$ 、 $\Delta frdB$ 、 $\Delta frdC$ 、 Δfnr 、 Δpta 、 $\Delta pflB$ 、 $\Delta ilvE$ 、 $\Delta tyrB$ 、およびそれらのいずれかの組み合わせで、 $kivd$ 、 $ThrABC$ および $adh2$ の発現または高度発現を有し、微生物が3-メチル1-ブタノールを生成するものから成る群から選択される欠失またはノックアウト；および(f) $\Delta adhE$ 、 $\Delta ldhA$ 、 $\Delta frdB$ 、 $\Delta frdC$ 、 Δfnr 、 Δpta 、 $\Delta pflB$ 、 $\Delta leuA$ 、 $\Delta ilvE$ 、 $\Delta poxB$ 、 $\Delta ilvA$ 、およびそれらのいずれかの組み合わせで、 $kivd$ 、 $ThrABC$ および $adh2$ の発現または高度発現を有し、微生物が2-フェニルエタノールを生成するものから成る群から選択される欠失またはノックアウト。さらなる実施形態では、 $ThrABC$ はフィードバック耐性 $ThrA^*$ を含む。一実施形態では、組換え微生物は、SA237またはCRS-BuOH23と称される微生物の表現型を有する。

【0005】

本明細書では、代謝的に操作された微生物による適切な基質の変換を介した、イソブタノール、2-メチル-1-ブタノール、3-メチル-1-ブタノール、2-フェニルエタノール、1-プロパノール、または1-ブタノールなどのバイオ燃料の生成に有用な組換え生化学的経路を含む代謝改変された微生物を提供する。また、本明細書に記載された微生物を使用したバイオ燃料の生成方法を提供する。

【0006】

一実施形態では、アルコールを生成する組換え微生物を提供する。そのアルコールは1-プロパノール、イソブタノール、1-ブタノール、2-メチル-1-ブタノール、3-メチル-1-ブタノールまたは2-フェニルエタノールであり得る。一般に、アルコールは2-ケト酸を含む代謝産物(代謝生成物)から発酵的または非発酵的(例えば、酸素の存在下または非存在下)に生成されうる。一部の態様では、2-ケト酸には、2-ケト酪酸、2-ケトイソ吉草酸、2-ケト吉草酸、2-ケト-3-メチル吉草酸、2-ケト-4-メチル-ペンタノエート、またはフェニルピルビン酸を含む。他の態様では、組換え微生物は、親微生物と比べて、2-ケト酸デカルボキシラーゼおよびアルコールデヒドロゲナーゼの高度発現または活性上昇を有する。2-ケト酸デカルボキシラーゼは、サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)からのPdc6、サッカロミセス・セレビシエからのAro10、サッカロミセス・セレビシエからのThi3、ラクトコッカス・ラクティス(*Lactococcus lactis*)からのKivd、またはクロストリジウム・アセトブチリカム(*Clostridium acetobutylicum*)からのPdc、またはそれらの相同体であり得る。2-ケト酸デカルボキシラーゼは、サッカロミセス・セレビシエからのPDC6、サッカロミセス・セレビシエからのARO10、サッカロミセス・セレビシエからのTHI3、ラクトコッカス・ラクティスからのkivd、またはクロストリジウム・アセトブチリカムからのpdc、あるいはそれらの相同体から選択される遺伝子に由来するポリヌクレオチドによってコードされ得る。一部の態様では、アルコールデヒドロゲナーゼは、サッカロミセス・セレビシエ由来のAdh2またはその相同体であってよく、サッカロミセス・セレビシエ由来のADH2遺伝子に由来するポリヌクレオチドによってコードされる。別の実施形態では、イソブタノールを生成する組換え微生物を提供する。その微生物は、親微生物と比べて、アセトヒドロキシ酸シンターゼ、アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ、2-ケト酸デカルボキシラーゼ、およびアルコールデヒドロゲナーゼの高度発現または活性上昇がある。一部の態様では、微生物には、アセト乳酸シンターゼ、アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ

、2-ケト酸デカルボキシラーゼ、およびアルコールデヒドロゲナーゼの高度発現があり得る。一部の態様では、組換え微生物はさらに、親微生物に比べて高レベルのピルビン酸を有する。従って、組換え微生物にはさらにadhE、ldh、frd、fnr、pflB、ackAまたはpta遺伝子、またはそれらのいずれかの組み合わせの発現の欠失または阻害があり得る。具体的には、組換え微生物にはadh、ldh、frd単独またはfnr、fnrおよびpta、またはptaおよびpflBとの組み合わせの欠失があり得る。一部の態様では、組換え微生物にはさらに、大腸菌ゲノムの約1,397,551から約1,439,877のヌクレオチドなどの組換え微生物ゲノムの一部の欠失があり得る。1つの態様では、アセトヒドロキシ酸シンターゼは、大腸菌のilvIHオペロン、ilvBNオペロン、ilvGM、または枯草菌からのalsS遺伝子、またはそれらの相同体によってコードされ得る。ilvIHオペロンのilvI遺伝子は、アセトヒドロキシ酸シンターゼ大サブユニットポリペプチドをコードし、ilvIHオペロンのilvH遺伝子はアセトヒドロキシ酸シンターゼ小サブユニットポリペプチドをコードする。別の態様では、アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼは、大腸菌のilvC遺伝子、またはその相同体由来するポリヌクレオチドによってコードされ得る。別の態様では、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼは、ilvD遺伝子、またはその相同体から生じるポリヌクレオチドによってコードされ得る。さらに別の態様では、2-ケト酸デカルボキシラーゼは、ラクトコッカス・ラクティスのkivd遺伝子またはその相同体、またはサッカロミセス・セレビシエからのARO10遺伝子、またはその相同体から生じるポリヌクレオチドによってコードされ得る。さらなる態様では、アルコールデヒドロゲナーゼは、サッカロミセス・セレビシエからのADH2遺伝子、またはその相同体から生じるポリヌクレオチドによってコードされ得る。

10

20

【0007】

一般に、大腸菌のilvIHオペロンは、イソロイシン、バリンおよびロイシン生合成経路の最初の酵素であるアセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする。アセトヒドロキシ酸シンターゼIIIアイソザイムは、大腸菌K-12のイソロイシン、ロイシンおよびバリン生合成の最初の共通段階を触媒し、ilvI（アセトヒドロキシ酸シンターゼIII大サブユニット）およびilvH（アセトヒドロキシ酸シンターゼ小サブユニット）遺伝子生成物の2つのサブユニットから成る。大腸菌のilvC遺伝子は、平行したイソロイシン-バリン生合成経路の第2の酵素であるアセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼをコードする。大腸菌のilvD遺伝子は、イソロイシン-バリン生合成経路の第3の酵素であるジヒドロキシ酸デヒドラターゼをコードする。一部の態様では、組換え微生物にはアセト乳酸シンターゼの高度発現があった。アセト乳酸シンターゼは、枯草菌からのAlsSであり得る。

30

【0008】

一実施形態では、1-ブタノールを生成する組換え微生物を提供する。その微生物には、親微生物と比べて、2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ、β-イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ、イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼ、およびトレオニンデヒドラターゼの高度発現または活性上昇がある。別の実施形態では、組換え微生物にはさらに、親微生物と比べて、2-ケト吉草酸のレベル上昇がある。別の実施形態では、組換え微生物にはさらに、親微生物と比べて、2-ケトイソ吉草酸、2-ケト-3-メチル-吉草酸、または2-ケト-4-メチル-ペンタノエート、またはそれらのいずれかの組み合わせのレベルの低下がある。従って、微生物にはさらに、親微生物と比べて、ilvD遺伝子の発現の欠失または阻害があり得る。1つの態様では、2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼは、leuA遺伝子、またはその相同体から生じるポリヌクレオチドによってコードされ得る。別の態様では、β-イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼは、leuB遺伝子、またはその相同体から生じるポリヌクレオチドによってコードされ得る。さらに別の態様では、イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼは、leuCDオペロン、またはその相同体から生じるポリヌクレオチドによってコードされ得る。一般に、leuCDオペロンのleuC遺伝子は、イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼ大サブユニットポリペプチドをコードし、leuCDオペロンのleuD遺伝子はイソプロピルリンゴ酸イソメラーゼ小サブユニットポリペプチドをコードする。別の態様では、トレオニンデヒドラターゼは、ilvA遺伝子、またはその相同体から生じるポリヌクレオチドによってコードされ得る。さらに別の態様では、トレオニンデヒドラターゼは、tdcB遺伝子、

40

50

またはその相同体から生じるポリヌクレオチドによってコードされ得る。さらに別の実施形態では、組換え微生物はさらに、親微生物と比べて、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ、ピルビン酸カルボキシラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、ホモセリンデヒドロゲナーゼ、アスパラギン酸-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、ホモセリンキナーゼ、トレオニンシンターゼ、L-セリンデヒドラターゼ、またはトレオニンデヒドラターゼ、またはそれらのいずれかの組み合わせの高度発現または活性上昇を有する。一部の態様では、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ、ピルビン酸カルボキシラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、ホモセリンデヒドロゲナーゼ、アスパラギン酸-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、ホモセリンキナーゼ、トレオニンシンターゼ、L-セリンデヒドラターゼ、およびトレオニンデヒドラターゼは、それぞれppc、pyc、aspC、thrA、asd、thrB、thrC、sdaAB、およびtdcB遺伝子、またはそれらの相同体から生じるポリヌクレオチドによってコードされる。

【0009】

一実施形態では、1-プロパノールを生成する組換え微生物を提供する。その微生物には、親微生物と比べて、 α -イソプロピルリンゴ酸シンターゼ、レプトスピラ・インターロガンズ(*Leptospira interrogans*)のLeuB、イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼ、およびトレオニンデヒドラターゼの高度発現または活性上昇がある。1つの態様では、 α -イソプロピルリンゴ酸シンターゼは、cimA遺伝子、またはその相同体から生じるポリヌクレオチドによってコードされ得る。cimA遺伝子は、レプトスピラ・インターロガンズcimA遺伝子またはメタノカルドコッカス・ジャナシイ(*Methanocaldococcus jannaschii*)cimA遺伝子であり得る。別の態様では、 β -イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼは、leuB遺伝子、またはその相同体から生じるポリヌクレオチドによってコードされ得る。別の態様では、イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼは、leuCDオペロン、またはその相同体から生じるポリヌクレオチドによってコードされ得る。さらに別の実施形態では、組換え微生物にはさらに、親微生物と比べて、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ、ピルビン酸カルボキシラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、ホモセリンデヒドロゲナーゼ、アスパラギン酸-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、ホモセリンキナーゼ、トレオニンシンターゼ、L-セリンデヒドラターゼ、またはトレオニンデヒドラターゼ、またはそれらのいずれかの組み合わせの高度発現または活性上昇があり得る。一部の態様では、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ、ピルビン酸カルボキシラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、ホモセリンデヒドロゲナーゼ、アスパラギン酸-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、ホモセリンキナーゼ、トレオニンシンターゼ、L-セリンデヒドラターゼ、およびトレオニンデヒドラターゼは、それぞれppc、pyc、aspC、thrA、asd、thrB、thrC、sdaAB、およびtdcB遺伝子、またはそれらの相同体から生じるポリヌクレオチドによってコードされる。

【0010】

別の実施形態では、2-メチル1-ブタノールを生成する組換え微生物を提供する。その微生物には、親微生物と比べて、トレオニンデヒドラターゼ、アセトヒドロキシ酸シンターゼ、アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ、2-ケト酸デカルボキシラーゼ、およびアルコールデヒドロゲナーゼの高度発現または活性上昇があり、組換え微生物は2-メチル1-ブタノールを生成する。一部の態様では、トレオニンデヒドラターゼは、ilvA遺伝子、またはその相同体から生じるポリヌクレオチドによってコードされ得る。別の態様では、トレオニンデヒドラターゼは、tdcB遺伝子、またはその相同体から生じるポリヌクレオチドによってコードされ得る。別の実施形態では、組換え微生物にはさらに、親微生物と比べて、2-ケト-3-メチル-吉草酸のレベル上昇がある。さらに別の態様では、2-ケト酸デカルボキシラーゼは、kivd遺伝子またはその相同体、またはPDC6遺伝子またはその相同体、またはTHI3遺伝子またはその相同体から生じるポリヌクレオチドによってコードされ得る。

【0011】

別の実施形態では、3-メチル1-ブタノールを生成する組換え微生物を提供する。その微

生物には、親微生物と比べて、アセトヒドロキシ酸シンターゼまたはアセト乳酸シンターゼ、アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ、2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ、イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼ、 β -イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ、2-ケト酸デカルボキシラーゼ、およびアルコールデヒドロゲナーゼの高度発現または活性上昇がある。一部の態様では、アセトヒドロキシ酸シンターゼは、ilvIHオペロンまたはその相同体から生じるポリヌクレオチドによってコードされ得る。別の態様では、アセト乳酸シンターゼは、alsS遺伝子、またはその相同体から生じるポリヌクレオチドによってコードされ得る。別の態様では、アセト乳酸シンターゼは、ilvMGオペロン、またはその相同体から生じるポリヌクレオチドによってコードされ得る。別の実施形態では、組換え微生物にはさらに、親微生物と比べて、2-ケトイソカプロン酸のレベル上昇がある。さらに別の態様では、アセト乳酸シンターゼは、ilvNBオペロン、またはその相同体から生じるポリヌクレオチドによってコードされ得る。

10

【0012】

別の実施形態では、フェニルエタノールを生成する組換え微生物を提供する。その微生物には、親微生物と比べて、コリスミ酸ムターゼP/プレフェン酸デヒドラターゼ、コリスミ酸ムターゼT/プレフェン酸デヒドロゲナーゼ、2-ケト酸デカルボキシラーゼおよびアルコールデヒドロゲナーゼの高度発現または活性上昇がある。1つの態様では、コリスミ酸ムターゼP/プレフェン酸デヒドラターゼは、pheA遺伝子、またはその相同体から生じるポリヌクレオチドによってコードされ得る。別の態様では、コリスミ酸ムターゼT/プレフェン酸デヒドロゲナーゼは、tyrA遺伝子、またはその相同体から生じるポリヌクレオチドによってコードされ得る。さらに別の実施形態では、組換え微生物にはさらに、親微生物と比べて、フェニルピルビン酸のレベル上昇がある。

20

【0013】

一実施形態では、適切な基質または代謝中間物を1-ブタノールへ変換する組換え微生物の生成方法を提供する。その方法は、2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ活性、 β -イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ活性、イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼ活性、およびトレオニンデヒドラターゼ活性を有するポリペプチドをコードする1つ以上の組換えポリヌクレオチドで微生物を形質転換することを含む。

【0014】

別の実施形態では、適切な基質または代謝中間物をイソブタノールへ変換する組換え微生物の生成方法を提供する。その方法は、アセトヒドロキシ酸シンターゼ活性、アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ活性、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ活性、2-ケト酸デカルボキシラーゼ活性、およびアルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする1つ以上の組換えポリヌクレオチドで微生物を形質転換することを含む。

30

【0015】

別の実施形態では、適切な基質または代謝中間物を1-プロパノールへ変換する組換え微生物の生成方法を提供する。その方法は、 α -イソプロピルリンゴ酸シンターゼ活性、 β -イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ活性、イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼ活性、およびトレオニンデヒドラターゼ活性を有するポリペプチドをコードする1つ以上の組換えポリヌクレオチドで微生物を形質転換することを含む。

40

【0016】

一実施形態では、適切な基質または代謝中間物を2-メチル1-ブタノールへ変換する組換え微生物の生成方法を提供する。その方法は、トレオニンデヒドラターゼ活性、アセトヒドロキシ酸シンターゼ活性、アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ活性、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ活性、2-ケト酸デカルボキシラーゼ活性、およびアルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする1つ以上の組換えポリヌクレオチドで微生物を形質転換することを含む。

【0017】

別の実施形態では、適切な基質または代謝中間物を3-メチル1-ブタノールへ変換する組換え微生物の生成方法を提供する。その方法は、アセトヒドロキシ酸シンターゼ活性また

50

はアセト乳酸シンターゼ活性、アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ活性、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ活性、2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ活性、イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼ活性、 β -イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ活性、2-ケト酸デカルボキシラーゼ活性、およびアルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする1つ以上の組換えポリヌクレオチドで微生物を形質転換することを含む。

【0018】

別の実施形態では、適切な基質または代謝中間物をフェニルエタノールへ変換する組換え微生物の生成方法を提供する。その方法は、コリスミ酸ムターゼP/プレフェン酸デヒドラターゼ活性、コリスミ酸ムターゼT/プレフェン酸デヒドロゲナーゼ活性、2-ケト酸デカルボキシラーゼ活性、およびアルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする1つ以上の組換えポリヌクレオチドで微生物を形質転換することを含む。

10

【0019】

別の実施形態では、アルコールの生成方法を提供する。その方法は、本明細書に提供される組換え微生物の提供；適切な基質または代謝中間体の存在下および基質のアルコールへの変換に適切な条件での微生物の培養；ならびにアルコールの生成の検出を含む。さまざまな態様では、アルコールは、1-プロパノール、イソブタノール、1-ブタノール、2-メチル1-ブタノール、3-メチル1-ブタノール、および2-フェニルエタノールから選択される。別の態様では、基質または代謝中間体には、2-ケト酪酸、2-ケトイソ吉草酸、2-ケト吉草酸、2-ケト3-メチル吉草酸、2-ケト4-メチル-ペンタノエート、またはフェニルピルビン酸などの2-ケト酸を含む。

20

【0020】

本開示の1つ以上の実施形態の詳細は、添付の図面および下記の説明で示す。他の特徴、目的、および利益は説明と図、および特許請求の範囲から明らかであろう。

【0021】

添付の図は、本明細書に組み込まれその一部を成し、本開示の1つ以上の実施形態を図解し、詳細な説明とともに本発明の原理および実施を説明するものである。

【0022】

さまざまな図面の同種参照記号は、同種要素を示す。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】図1A-Cは、本開示を理解するために有用な経路を示す。(A)は、アルコール生成のために2-ケト酸代謝を使用する典型的な非発酵合成経路を示す。(B)は、遺伝子組換え大腸菌の典型的なアルコール生成経路を示す。灰色の矢印は2-ケト酸の分解経路を表す。酵素、LeuABCD、IlvAおよびIlvIHCDはアミノ酸生合成経路を表す。二重線はアミノ酸生合成経路の副反応を表す。(C)は、微生物の一般的経路を表し、生物中で障害またはノックアウトされ得る酵素を特定し、望ましい方向への流れを改善する（例えば、ピルビン酸合成の流れを増加させ、他の競合的経路へのピルビン酸の流れを減少させる）。

30

【図2】図2A-Cは、イソブタノールおよび1-ブタノール生成改善のための改変アミノ酸生合成経路を示す。パネルAは、操作されたilvIHCD経路がある場合またはない場合のイソブタノール生成を示す。左パネル：イソブタノール生成、右パネル：グルコース1 g当たりのイソブタノール収量。イソブタノールの理論的最大収量は0.41 g/gである。パネルBは、操作されたilvA-leuABCD経路がある場合またはない場合のグルコースからの1-ブタノール生成を示す。左パネル：1-ブタノール生成、右パネル：同一株における1-プロパノール生成。パネルCは、L-トレオニン添加時の1-ブタノール生成を示す。左パネル：1-ブタノール生成、右パネル：同一株からの1-プロパノール生成。

40

【図3】図3はイソブタノールの細胞成長への影響を示す。2%イソブタノール添加時または非添加時の、野生型および高耐性突然変異体の細胞成長の経時変化を示す。両株ともLB中で指数増殖期へ成長した。約3.5のOD₆₀₀で、2%イソブタノールを培地に添加した。三角：イソブタノール非添加の野生型、ひし形：イソブタノール添加の野生型、四角：イソブタノール非添加の高耐性突然変異体、丸：イソブタノール添加の高耐性突然変異体。

50

- 【図 4】図4は、大腸菌におけるイソブタノール生成の典型的経路を示す。
- 【図 5】図5は、質量分析によるイソブタノール生成の検出を示す。
- 【図 6】図6は質量分析データを示す。
- 【図 7】図7は、ピルビン酸からの2-ケト-イソ吉草酸生成の典型的経路を示す。
- 【図 8】図8は、ロイシン生合成の典型的経路を示す。
- 【図 9】図9は、イソロイシン生合成の典型的経路を示す。
- 【図 10】図10は、生合成中間体としての2-ケト酪酸を含むブタノール生合成の典型的経路を示す。
- 【図 11】図11は、ピルビン酸からのブタノール生合成の典型的経路を示す。
- 【図 12】図12は、生合成中間体としてのトレオニンを含むブタノール生合成の典型的経路を示す。 10
- 【図 13】図13は、イソブタノール（例えば、2-メチルプロピルアルコール）、3-メチル1-ブタノール、1-ブタノール、エタノール、2-メチル1-ブタノールおよび1-プロパノール生成の典型的生合成経路を示す。
- 【図 14】図14は、フェニルエタノール、エタノール、3-メチル1-ブタノール、およびイソブタノール（例えば、2-メチルプロピルアルコール）生成の典型的生合成経路を示す。
- 【図 15】図15は、2-ケト酸デカルボキシラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする kivd 遺伝子に由来する核酸配列（配列番号27）を示す。
- 【図 16】図16は、2-ケト酸デカルボキシラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする PDC6 遺伝子に由来する核酸配列（配列番号29）を示す。 20
- 【図 17】図17は、2-ケト酸デカルボキシラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする ARO10 遺伝子に由来する核酸配列（配列番号31）を示す。
- 【図 18】図18は、2-ケト酸デカルボキシラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする THI3 遺伝子に由来する核酸配列（配列番号33）を示す。
- 【図 19】図19は、2-ケト酸デカルボキシラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする pdc 遺伝子に由来する核酸配列（配列番号35）を示す。
- 【図 20】図20は、アルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする ADH2 遺伝子に由来する核酸配列（配列番号37）を示す。
- 【図 21】図21は、アセト乳酸シンターゼ大サブユニット活性を有するポリペプチドをコードする ilvI 遺伝子に由来する核酸配列（配列番号39）を示す。 30
- 【図 22】図22は、アセト乳酸シンターゼ小サブユニット活性を有するポリペプチドをコードする ilvH 遺伝子に由来する核酸配列（配列番号41）を示す。
- 【図 23】図23は、アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ活性を有するポリペプチドをコードする ilvC 遺伝子に由来する核酸配列（配列番号43）を示す。
- 【図 24】図24は、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ活性を有するポリペプチドをコードする ilvD 遺伝子に由来する核酸配列（配列番号45）を示す。
- 【図 25】図25は、トレオニンデヒドラターゼ活性を有するポリペプチドをコードする ilvA 遺伝子に由来する核酸配列（配列番号47）を示す。
- 【図 26】図26は、2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ活性を有するポリペプチドをコードする leuA 遺伝子に由来する核酸配列（配列番号49）を示す。 40
- 【図 27】図27は、 β -イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする leuB 遺伝子に由来する核酸配列（配列番号51）を示す。
- 【図 28】図28は、イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼ大サブユニット活性を有するポリペプチドをコードする leuC 遺伝子に由来する核酸配列（配列番号53）を示す。
- 【図 29】図29は、イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼ小サブユニット活性を有するポリペプチドをコードする leuD 遺伝子に由来する核酸配列（配列番号55）を示す。
- 【図 30】図30は、 α -イソプロピルリンゴ酸シンターゼ活性を有するポリペプチドをコードする cimA 遺伝子に由来する核酸配列（配列番号57）を示す。
- 【図 31】図31は、アセト乳酸シンターゼ大サブユニット活性を有するポリペプチドをコードする ilvM 遺伝子に由来する核酸配列（配列番号59）を示す。 50

【図 3 2】図32は、アセト乳酸シンターゼ小サブユニット活性を有するポリペプチドをコードする *ilvG* 遺伝子に由来する核酸配列（配列番号61）を示す。

【図 3 3】図33は、アセト乳酸シンターゼ大サブユニット活性を有するポリペプチドをコードする *ilvN* 遺伝子に由来する核酸配列（配列番号63）を示す。

【図 3 4】図34は、アセト乳酸シンターゼ小サブユニット活性を有するポリペプチドをコードする *ilvB* 遺伝子に由来する核酸配列（配列番号65）を示す。

【図 3 5】図35は、アルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする *adhE2* 遺伝子に由来する核酸配列（配列番号67）を示す。

【図 3 6】図36は、 α -イソプロピルリンゴ酸シンターゼ活性を有するポリペプチドをコードする *Li-cimA* 遺伝子に由来する核酸配列（配列番号69）を示す。

【図 3 7】図37は、イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼ大サブユニット活性を有するポリペプチドをコードする *Li-leuC* 遺伝子に由来する核酸配列（配列番号71）を示す。

【図 3 8】図38は、イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼ小サブユニット活性を有するポリペプチドをコードする *Li-leuD* 遺伝子に由来する核酸配列（配列番号73）を示す。

【図 3 9】図39は、 β -イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする *Li-leuB* 遺伝子に由来する核酸配列（配列番号75）を示す。

【図 4 0】図40は、コリスミ酸ムターゼP/プレフェン酸デヒドラターゼ活性を有するポリペプチドをコードする *pheA* 遺伝子に由来する核酸配列（配列番号77）を示す。

【図 4 1】図41は、コリスミ酸ムターゼT/プレフェン酸デヒドラターゼ活性を有するポリペプチドをコードする *TyrA* 遺伝子に由来する核酸配列（配列番号79）を示す。

【図 4 2】図42は、アセト乳酸シンターゼ活性を有するポリペプチドをコードする *alsS* 遺伝子に由来する核酸配列（配列番号81）を示す。

【図 4 3】図43は、ノックアウト突然変異と様々な生物のイソブタノール生成との相関関係を示す。

【図 4 4】図44は、標準振とうフラスコ内とスクリュウキャップフラスコ内でのイソブタノール生成の比較を示す。

【図 4 5】図45は、200時間に渡るフィードバッチ(fed batch)におけるイソブタノール生成に対する異なる複合培地成分添加の影響を示す。

【図 4 6】図46はグルコースから3-メチル-1-ブタノールへの代謝経路を示す。特に断りがない限り、全ての遺伝子は大腸菌に由来するものである。BS = 枯草菌、LL = ラクトコッカス・ラクティス、SC = サッカロミセス・セレビシエ。

【図 4 7】図47A-Bは3-メチル-1-ブタノールの初期生成を示す。格子縞のカラムはイソブタノールを示し、無地のカラムは3-メチル-1-ブタノールを示す。(A) JCL16における3-メチル-1-ブタノール生成。*ilvIH* (EC) または *alsS* (BS) のどちらかを持ち、染色体またはプラスミドベースの *leuABCD* 発現がある株について、アルコール生成の分析を行った。

(B) JCL260における3-メチル-1-ブタノール生成。*ilvIH* (IAA92) または *alsS* (IAA85) のどちらかを持つ株について、アルコール生成試験を行った。

【図 4 8】図48A-Bは、 α -ケト酸生成を表すグラフと表である。格子縞のカラムは2-ケトイソ吉草酸を示し、無地のカラムは2-ケトイソカプロン酸を示す。(A) JCL260バックグラウンドにおける α -ケト酸の生成。株について、2-ケトイソ吉草酸（イソブタノール）および2-ケトイソカプロン酸（3-メチル-1-ブタノール）の生成試験を行った。RBS変化は *leuA* 遺伝子産物に対してのみである (IPMS)。(B) L-ロイシン合成ノックアウトバックグラウンドにおける α -ケト酸の生成。「 Δ 」は欠失を示す。

【図 4 9】図49A-Bは、フィードバック阻害除去での3-メチル-1-ブタノール生成を示す。

(A) WT IPMS (IAA88) および IPMS (G462D) (IAA89) を有する JCL260 宿主を、成長およびアルコール生成に関して比較した。(B) JCL260 $\Delta ilvE \Delta tyrB$ (IAA69) バックグラウンドにおいて、WT IPMS (IAA90) を有する株の成長およびアルコール生成を定量した。

【図 5 0】図50は、遺伝子組換え大腸菌におけるトレオニン生合成経路を介したプロパノールとブタノール生成の概略図である。特定経路の破壊が図示されており、白抜きの方角形ボックスはアルコール生成の前駆体を表す。また、非天然のノルバリニン経路が示されて

10

20

30

40

50

いる。バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、およびメチオニン生合成経路は、灰色のボックスに囲まれたそれぞれの対応する略語で示される。

【図 5 1】図51は、BW WTのアルコールおよび主要代謝産物生成に対するthrA^{*}BC過剰発現の効果を示す。CRS-BuOH 12（黒いひし形）およびCRS-BuOH 31（白いひし形）の、プロパノール、ブタノール、主要副産物、成長およびグルコース消費の経時変化を示す。CRS-BuOH 12およびCRS-BuOH 31は両方ともBW WT株であった。CRS-BuOH 31 はpSA62およびpSA55Iを含み、一方、CRS-BuOH 12はPLlac01の後ろにthrA^{*}BCを持つ追加的プラスミドpCS49を含んでいた。細胞は、材料および方法に記載のように培養された。

【図 5 2】図52A-Bは、さまざまなノックアウト株におけるアルコール生成の比較を示す。A. 株には左から右に、CRS-BuOH 12、32、2、11、23と番号を付けた。すべての株は、プラスミドpCS49、pSA62、およびpSA55Iの同じセットを含んでいた。本明細書に記載の通り、細胞は72時間培養した。示されたデータは72時間時点のものである。B. Aに示された各株の成長の経時変化。

【図 5 3】図53は、代替的フィードバック耐性トレオニンデヒドラターゼおよび2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼを使用したプロパノール生成とブタノール生成の比較を示す。比較には、バックグラウンド株としてBW ΔmetA、Δtdh、ΔilvB、ΔilvIを使用した。株はCRS-BuOH 11、18、19、20と番号が付けられ、それらすべては図の下に示されたプラスミドに加えてpSA62およびpSA55Iを含んでいた。発現する特定のトレオニンデヒドラターゼおよび2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼの遺伝子名は、プラスミド番号の下に列挙されている。本明細書に記載の通り、細胞は72時間培養した。示されたデータは72時間時点のものである。

【図 5 4】図54A-Eは、CRS-BuOH 23におけるプロパノール、ブタノール、および代謝副産物の経時変化を示す。A. 1-プロパノールおよび1-ブタノールの生成。黒いひし形はブタノールを表し、白いひし形はプロパノールを示す。B. 主要副産物の酢酸の生成。C. 副次副産物のピルビン酸、乳酸およびエタノールの生成。黒いひし形はピルビン酸を、白い四角は乳酸を、Xはエタノールを表す。D. グルコースの消費。E. 100時間の期間でのCRS-BuOH 23の成長。

【発明を実施するための形態】

【0024】

本明細書や添付の特許請求の範囲で使用される場合、「a」、「an」および「the」の単数形は、文脈において明確な別段の指示がない限り複数形も含む。従って、例えば「ポリヌクレオチド (a polynucleotide)」には、かかるポリヌクレオチドの複数形を含み、「その微生物 (the microorganism)」には1つ以上の微生物を含む。

【0025】

別途定義のない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語や科学用語は、本開示が属する技術分野の当業者に一般に理解されている用語と同一の意味を持つ。開示された方法や組成物の実践において本明細書の記載内容と類似または同等の方法や材料を使用することは可能だが、本明細書には模範的方法、装置および物質を記載している。

【0026】

前記および本文全体を通して取り上げた刊行物は、本願の出願日前の刊行物を開示するためのみに提供されるものである。本明細書には、先行発明に基づいて本発明者らがこのような開示に先行する権利がないことが認められると解釈される記述は一切ない。

【0027】

ブタノールは疎水性で、エタノールよりも揮発性が低い。1-ブタノールはガソリンに近いエネルギー密度を持つ。85%強度のブタノールは、（エタノールとは違って）エンジンの変更なしに車に使用することができ、エタノールよりも大きなガソリンとほぼ同程度の動力を生成する。またブタノールは化学工程および繊維加工、有機合成の溶媒として、および化学的中間体としても使用される。またブタノールは、液圧の成分やブレーキ液および香水の基剤としても使用される。

【0028】

10

20

30

40

50

イソブタノールは、エタノールと比べて1-ブタノールと同じメリットを持つ。さらなるメリットとして、イソブタノールはその分岐炭素鎖のために1-ブタノールより高いオクタン価を持つ。1-ブタノールは発酵産物として生産され、モーター燃料として使用されるが、イソブタノールが再生可能資源から高収率で生産されたことはなく、エンジン添加物として使用されてきているにもかかわらず、ガソリン代替物として考えられたことはなかった。

【0029】

クロストリジウム・アセトブチリカムなどの1-ブタノールの天然生産者も、発酵産物としてアセトン、エタノールおよび酪酸などの副産物を生成する。しかし、これらの微生物は操作するのが比較的困難である。これらの生物用の遺伝子操作ツールは、大腸菌などの使いやすい宿主用のツールほど効率的でなく、生理機能やその代謝調節があまり理解されていないため、高効率な生産に向けての急速な進展が阻まれている。さらに、少量のものは微生物副産物として特定されているが、イソブタノール、2-メチル1-ブタノール、3-メチル1-ブタノール、および2-フェニルエタノールなどの他の高級アルコールをグルコースから工業的な量で生成する天然微生物は同定されていない。

【0030】

燃料アルコールにはしばしば好ましくない効果があるため、サッカロミセス・セレビシエを含むさまざまな酵母種によるイソブタノールおよび他の燃料アルコールの生成は、アルコール飲料蒸留業者にとって特別な興味を引くものである。野生型酵母のイソブタノール生成は、12~219 mg/Lのイソブタノールを生成したワイン造りのブドウマスト (Romano, et al., Metabolic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains from spontaneously fermented grape musts, 19:311-315, 2003) から、16~34 mg/Lのイソブタノールを生成した最小添加培地 (Oliviera, et al. (2005) World Journal of Microbiology and Biotechnology 21:1569-1576) まで、さまざまな成長培地で記録されている。Dickinsonらの研究 (J Biol Chem. 272 (43) :26871-8, 1997) では、分岐鎖アミノ酸 (例えば、バリンまたはロイシン) からイソブタノールへの変換経路で使用される酵素的段階を同定した。

【0031】

本開示は、イソブタノール、1-ブタノール、1-プロパノール、2-メチル-1-ブタノール、3-メチル-1-ブタノールおよび2-フェニルエタノールなどの高級アルコールを、適切な基質から生成する生化学経路を有する代謝的に操作された微生物を提供する。本開示の代謝的に操作された微生物は、生物のゲノム内または生物のゲノムの外側に、1つ以上の組換えポリヌクレオチドを有する。その微生物は、野生型生物に見られる遺伝子の減少、破壊またはノックアウト、および／または異種ポリヌクレオチドの導入を含み得る。

【0032】

また本開示は、生物の天然アミノ酸経路を使用する代謝的に操作された生合成経路も含む。生物の天然アミノ酸経路を使用するバイオ燃料生成には、いくつかのメリットがある。それは大きな外来遺伝子を発現することの難しさを回避するだけでなく、有毒中間体蓄積の可能性も最小化する。クロストリジウムの多くの種で見られるブタノール生成経路とは対照的に、バイオ燃料生成のための遺伝子操作アミノ酸生合成経路は、酸素感受性酵素およびCoA依存性中間体関与の必要性を回避できる。本開示は、バイオ燃料を生成するために、アミノ酸生合成経路の生物の天然代謝産物を使用して、はるかに宿主フレンドリーなバイオ燃料生成システムを提供する。

【0033】

1つの態様では、本開示は、親微生物と比べて、少なくとも1つの標的酵素の高度発現を有するか、親生物には見られない酵素をコードする組換え微生物を提供する。別のまたはさらなる態様では、微生物は、望ましい高級アルコール産物の生成に必要な代謝産物と競合する酵素をコードする少なくとも1つの遺伝子の減少、破壊、またはノックアウトを有する。組換え微生物は、イソブタノール、1-ブタノール、1-プロパノール、2-メチル-1-ブタノール、3-メチル-1-ブタノールまたは2-フェニルエタノール生成の生合成経路に関

与する少なくとも1つの代謝産物を生成する。一般に、組換え微生物は、標的酵素を含む少なくとも1つの組換え代謝経路を有し、さらに競合的生合成経路の酵素の活性または発現の低下を含むことがある。その経路は、イソブタノール、1-ブタノール、1-プロパノール、2-メチル-1-ブタノール、3-メチル-1-ブタノールまたは2-フェニルエタノール生成の基質または代謝中間体を改変する役割を果たす。標的酵素は、適切な生物学的起源から生じるポリヌクレオチドによってコードされ、発現する。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、バクテリアまたは酵母源から由来し、組換え操作で本開示の微生物に組み入れられる遺伝子を含む。

【0034】

本明細書で使用される場合、「代謝的に操作された」または「代謝操作」という用語は、2-ケト酸または高級アルコールなどの微生物内の望ましい代謝産物の生成のための合理的経路設計および生合成遺伝子の組立、オペロンに関する遺伝子、およびかかるポリヌクレオチドの制御要素に関する。さらに「代謝的に操作された」とは、望ましい経路につながる中間体と競合する競合代謝経路の減少、破壊またはノックアウトを含む遺伝子操作および適切な培養条件を使った転写、翻訳、タンパク質安定性およびタンパク質機能の制御および最適化による代謝フラックス(flux)の最適化を含む。生合成遺伝子は、宿主に対して外来であるか、または突然変異生成、組換え、および／または内因性宿主細胞の異種発現制御配列との関連により改変されていることのいずれかに基づいて、宿主微生物に対して異種であり得る。1つの態様では、ポリヌクレオチドが宿主生物に対して異種である場合、そのポリヌクレオチドはコドン最適化することができる。

【0035】

「代謝経路」とも言及される「生合成経路」という用語は、1つの化学種を別のものに変換する（変化させる）ための同化または異化生化学反応のセットを指す。遺伝子産物が、同じ基質と代謝体最終生成物の間で、並行または連続して、同じ基質上で作動する場合、同じ生成物を産生する場合、または代謝中間体を生成またはその上で作動する場合（例えば、代謝産物）、それらは同じ「代謝経路」に属する。

【0036】

例えば、L-ロイシンは、L-バリン生合成系の中間体（2-ケトイソ吉草酸）から分岐するL-ロイシンに固有の生合成経路を通して合成される。エシェリキア属(*Escherichia*)では、L-バリン生合成およびL-ロイシンに固有の生合成は、それぞれilvGMEDAオペロンによってコードされる酵素およびleuABCDオペロンによってコードされる酵素によって実行される。

【0037】

leuABCDオペロンには、leuA、leuB、leuCおよびleuD遺伝子を含む。この中で、leuAは α -イソプロピルリンゴ酸シンターゼをコードし、leuBは β -イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼをコードし、leuCとleuDは α -イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼをコードする。これらの酵素のうち、 α -イソプロピルリンゴ酸シンターゼは、 α -ケトイソ吉草酸から α -イソプロピルリンゴ酸への合成反応を触媒し、 α -イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼは α -イソプロピルリンゴ酸から β -イソプロピルリンゴ酸への異性化反応を触媒し、 β -イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼは β -イソプロピルリンゴ酸からL-ロイシン生合成の最終中間体である α -ケトイソカプロン酸への脱水素反応を触媒する。エシェリキア属は4種類のトランスアミナーゼ、すなわち、aspC遺伝子によってコードされるトランスアミナーゼA（アスパラギン酸-グルタミン酸アミノトランスフェラーゼ）、ilvGMEDAオペロンに含まれるilvE遺伝子によってコードされるトランスアミナーゼB（BCAAアミノトランスフェラーゼ）、avtA遺伝子によってコードされるトランスアミナーゼC（アラニン-バリンアミノトランスフェラーゼ）、およびtyrB遺伝子によってコードされるトランスアミナーゼD（チロシンアミノトランスフェラーゼ）を持つ。これらの酵素はさまざまなアミノ化反応に関与する。これらの酵素のトランスアミナーゼBとトランスアミナーゼDは、上記の α -ケトイソカプロン酸からL-ロイシンへのアミノ化反応を触媒する。トランスアミナーゼCとトランスアミナーゼDは、L-バリン生合成経路の最終段階を触媒し、これにはL-

バリン生合成およびL-ロイシン生合成の共通経路を含む。

【0038】

また、leuABCDオペロンの発現はL-ロイシンによって抑制される。アセトヒドロキシ酸シンターゼIをコードするilvBN遺伝子の発現は、L-バリンとL-ロイシンによる協奏的抑制を受け、アセトヒドロキシ酸シンターゼIIをコードするilvGM遺伝子の発現は、L-イソロイシン、L-バリンおよびL-ロイシンによる協奏的抑制を受け、アセトヒドロキシ酸シンターゼIIIをコードするilvIH遺伝子の発現は、L-ロイシンによる抑制を受ける。

【0039】

「基質」または「適切な基質」という用語は、酵素の働きによって別の化合物に変換される、または変換されるはずのすべての基質または化合物を指す。この用語は単一化合物だけではなく、溶液、混合物、および少なくとも1つの基質またはその誘導体を含む他の物質などの化合物の組み合わせも含む。さらに、「基質」という用語は、バイオマス由来の糖などの出発物質としての使用に適切な炭素源を提供する化合物だけではなく、本明細書に記載されている代謝的に操作された微生物に関連する経路に使用される中間体および最終産物の代謝物も包含する。「バイオマス由来の糖」には、グルコース、ショ糖、マンノース、キシロース、およびアラビノースなどの分子を含むが、これに限定されるものではない。バイオマス由来の糖という用語は、6炭素糖などの通常微生物によって使用される適切な炭素基質（D またはL型のグルコース、ラクトース、ソルボース、フラクトース、イドース、ガラクトースおよびマンノースを含むがこれに限定されない）、またはグルコースとフラクトースなどの6炭素糖の組み合わせ、および／または6炭素糖酸（2-ケト-L-グルコン酸、イドン酸（IA）、グルコン酸（GA）、6-ホスホグルコン酸、2-ケト-D-グルコン酸（2 KDG）、5-ケト-D-グルコン酸、2-ケトグルコン酸リン酸、2, 5-ジケト-L-グルコン酸、2,3-L-ジケトグルコン酸、デヒドロアスコルビン酸、エリソルビン酸（EA）、およびD-マンノン酸を含むがこれに限定されない）を含む。

【0040】

「アルコール」という用語は、例えば1-プロパノール、イソブタノール、1-ブタノール、2-メチル1-ブタノール、3-メチル1-ブタノールまたは2-フェニルエタノールを含む。「1-ブタノール」または「n-ブタノール」という用語は一般的に、末端炭素にアルコール官能基を持つ直鎖異性体を指す。内部炭素にアルコールを持つ直鎖異性体は、sec-ブタノールまたは2-ブタノールである。末端炭素にアルコールを持つ分岐異性体はイソブタノールであり、内部炭素にアルコールを持つ分岐異性体はtert-ブタノールである。

【0041】

本明細書で提供される組換え微生物は、適切な炭素基質を使って、例えば、1-プロパノール、イソブタノール、1-ブタノール、2-メチル1-ブタノール、3-メチル1-ブタノールまたは2-フェニルエタノールなどの生成経路に関与する複数の標的酵素を発現できる。

【0042】

従って、宿主または最適な親微生物への遺伝物質の導入し、その結果微生物の細胞生理機能および生化学を改変または変更することにより、代謝的に「操作された」または「改変された」微生物が生産される。遺伝物質の導入を通して、親微生物は、例えば新規またはより大量の細胞内代謝産物を生成する能力などの新しい特性を獲得する。1つの例示的实施形態では、親微生物への遺伝物質の導入は、1-プロパノール、イソブタノール、1-ブタノール、2-メチル1-ブタノール、3-メチル1-ブタノールまたは2-フェニルエタノールなどのアルコールを生成する新しいまたは変更された能力をもたらす。親微生物に導入される遺伝物質は、アルコール生成の生合成経路に関与する1つ以上の酵素をコードする遺伝子、または遺伝子の一部を含み、また、例えばプロモーター配列など、これらの遺伝子の発現、および／または発現制御のための追加的成分も含むことができる。

【0043】

操作または改変された微生物は、宿主または親微生物への遺伝物質の導入に代えて、またはそれに加えて、微生物の細胞生理機能および生化学を変化させるための遺伝子またはポリヌクレオチドの破壊、欠失またはノックアウトも含むことができる。遺伝子またはポ

リヌクレオチドの減少、破壊またはロックアウトを通して、微生物は新しいまたは向上した機能（例えば、新しいまたはより大量の細胞内代謝産物を生成する能力、望ましい経路への代謝産物のフラックスを改善する能力、および／または望ましくない副産物の生成を減少させる能力など）を獲得する。

【0044】

本開示は、 α -イソプロピルリンゴ酸シンターゼ活性を持つポリペプチド、 β -イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ活性を持つポリペプチド、 α -イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼ活性を持つポリペプチド、トレオニンデヒドラターゼ活性を持つポリペプチド、ホモセリンデヒドロゲナーゼ活性を持つポリペプチド、ホモセリンキナーゼ活性を持つポリペプチド、およびトレオニンシンターゼ活性を持つポリペプチドの存在下、ケト酸デカルボキシラーゼ活性を持つポリペプチドおよびアルコールデヒドロゲナーゼ活性を持つポリペプチドをコードする、1つ以上の異種ポリヌクレオチドの発現または1つ以上の異種ポリヌクレオチドの過剰発現を示す。

【0045】

例えば、本開示は、異種kivdおよびadh2および大腸菌ilvA、leuA、leuB、leuC、leuD（またはLeuオペロン、例えばleuABCDなど）、およびthrA、thrB、thrCまたはThrオペロン（例えば、thrABCなど、thrAはthrA^{*}などのフィードバック耐性ポリペプチドであり得る）の過剰発現で、1-ブタノールおよび1-プロパノールの生成が起こりうることを論証する。1-ブタノールの生成には、中間体2-ケト酪酸および非天然ノルバリン生合成経路に関与する2-ケト吉草酸を使用する。Kivdは、両方の2-ケト酸に対して類似の親和性を持ち、2-ケト酪酸はLeuAの第二の基質であるため、1-プロパノールは1-ブタノールと同じような量で共に生成された。

【0046】

本明細書で提供される微生物は、親微生物では利用不可能な量の代謝産物を生成するために改変される。「代謝産物」とは、代謝によって生成される物質または特定の代謝過程に必要なまたは関与する物質を指す。代謝産物は、代謝の出発物質（例えば、グルコースまたはピルビン酸）、中間体（例えば、2-ケト酸）、または最終産物（例えば、1-プロパノール、イソブタノール、1-ブタノール、2-メチル1-ブタノール、3-メチル1-ブタノールまたは2-フェニルエタノール）である有機化合物であり得る。代謝産物は、より複雑な分子を構築するために使用することができ、または単純な分子に分解することができる。中間代謝産物は、他の代謝産物から合成してもよく、おそらくはより複雑な物質を作るために使用されるか、単純な化合物に分解され、しばしば化学エネルギーの放出を伴う。

【0047】

典型的代謝産物には、グルコース、ピルビン酸、1-プロパノール、イソブタノール、1-ブタノール、2-メチル1-ブタノール、3-メチル1-ブタノールまたは2-フェニルエタノール、および2-ケト酸を含む。図1Aに示されるように、典型的な2-ケト酸中間体には、2-ケト酪酸、2-ケトイソ吉草酸、2-ケト吉草酸、2-ケト3-メチル吉草酸、2-ケト4-メチルペンタノエート、およびフェニルピルビン酸を含む。図1Aに示される典型的な2-ケト酸は、1-プロパノール、イソブタノール、1-ブタノール、2-メチル1-ブタノール、3-メチル1-ブタノールまたは2-フェニルエタノールの生成における代謝中間体として使用され得る。例えば、図1Bに示されるように、例えば、Leuオペロン（例えば、LeuABCD）によってコードされる、2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ、 β -イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼおよびイソプロピルリンゴ酸イソメラーゼ酵素の高度発現を提供するように代謝的に操作された組換え微生物は、2-ケト酪酸から2-ケト吉草酸を生成する。2-ケト吉草酸代謝産物は、代謝的に改変された微生物によって生成される追加的酵素で、1-ブタノールを生成するために使用され得る。さらに、1-プロパノールおよび2-メチル1-ブタノールは、例えば、ilvIHDC、kdcおよびadh遺伝子によってコードされるアセトヒドロキシ酸シンターゼ、 α -ケト酸デカルボキシラーゼ、およびアルコールデヒドロゲナーゼ酵素を発現または過剰発現するように代謝的に操作された組換え微生物により、2-ケト酪酸および2-ケト-3-メチル-吉草酸から生成され得る。さらに、代謝産物2-ケトイソ吉草酸は、例えばilvIHDC

遺伝子によってコードされるアセトヒドロキシ酸シンターゼ酵素を発現または過剰発現するように代謝的に操作された組換え微生物により、生成され得る。この代謝産物はその後、イソブタノールまたは3-メチル1-ブタノールの生成に使用され得る。代謝産物のピルビン酸およびフェニルピルビン酸は、例えば、kdcおよびadhによってコードされる α -ケト酸デカルボキシラーゼ、およびアルコールデヒドロゲナーゼ酵素を発現または過剰発現するように代謝的に操作された組換え微生物により、2-フェニルエタノールを生成するために使用され得る。追加的代謝産物および遺伝子を図1Bに示す。

【0048】

従って、本明細書は、イソブタノールを生成する組換え微生物を提供し、一部の態様には、アセトヒドロキシ酸シンターゼ（例えばilvIHオペロン）、アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ（例えばilvC）、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ（例えばilvD）、2-ケト酸デカルボキシラーゼ（例えばPDC6、AR010、TH13、kivd、またはpdc）、およびアルコールデヒドロゲナーゼ（例えばADH2）などの標的酵素の高度発現を含み得る。微生物はさらに、ピルビン酸の利用可能性を増加させるため、または望ましい生合成経路の代謝産物に競合する酵素を減少させるために、エタノールデヒドロゲナーゼ（例えば adhE）、ldh（例えばldhA）、frd（例えばfrdB、frdCまたはfrdBC）、fnr、leuA、ilvE、poxB、ilvA、pflB、またはpta遺伝子、またはそれらのいずれかの組み合わせの発現の欠失または阻害を有し得る。一部の態様では、組換え微生物は、アセト乳酸シンターゼ（例えば、alsS）、アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ（例えば、ilvC）、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ（例えば、ilvD）、2-ケト酸デカルボキシラーゼ（例えば、PDC6、AR010、TH13、kivd、またはpdc）、およびアルコールデヒドロゲナーゼ（例えば、ADH2）の高度発現を有し得る。アルコールデヒドロゲナーゼに関しては、エタノールデヒドロゲナーゼはアルコールデヒドロゲナーゼであるが、エタノールの合成は生合成経路の副産物として望ましくない。従って、微生物のアルコールデヒドロゲナーゼ活性または発現の増加に関しては、エタノールデヒドロゲナーゼ活性を厳密に排除する。

【0049】

また、1-ブタノールを生成する組換え微生物を提供し、2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ（例えば、leuA）、 β -イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ（例えば、leuB）、イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼ（例えば、leuC、leuD、またはleuCDオペロン）、トレオニンデヒドラターゼ（例えば、ilvA）などの標的酵素の高度発現も含み得る。微生物にはさらに、親微生物と比べて、2-ケトイソ吉草酸、2-ケト-3-メチル-吉草酸、または2-ケト-4-メチル-ペンタノエート、またはそれらのいずれかの組み合わせのレベルの低下があり得る。さらに、微生物には、親微生物と比べて、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ（例えば、ilvD遺伝子）発現の破壊、欠失またはノックアウトがあり得る。1-ブタノールを生成する組換え微生物は、さらにppc、pyc、aspC、thrA、asd、thrB、thrC、sdaAB、およびtdcB遺伝子に由来する核酸配列、またはその相同体によってそれぞれコードされる、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ、ピルビン酸カルボキシラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、ホモセリンデヒドロゲナーゼ、アスパラギン酸-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、ホモセリンキナーゼ、トレオニンシンターゼ、L-セリンデヒドラターゼ、および／またはトレオニンデヒドラターゼの高度発現または活性上昇があり得る。

【0050】

また、1-プロパノールを生成する組換え微生物を提供し、 α -イソプロピルリンゴ酸シンターゼ（例えば、cimA）、 β -イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ（例えば、leuB）、イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼ（例えば、leuCDオペロン）およびトレオニンデヒドラターゼなどの標的酵素の高度発現を含み得る。

【0051】

また、2-メチル1-ブタノールを生成する組換え微生物を提供し、トレオニンデヒドラターゼ（例えばilvAまたはtdcB）、アセトヒドロキシ酸シンターゼ（例えば、ilvIHオペロン）、アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ（例えば、ilvC）、ジヒドロキシ酸デヒ

ドラターゼ（例えば、ilvD）、2-ケト酸デカルボキシラーゼ（例えば、PDC6、ARO10、THI3、kivd、および／またはpdc）、およびアルコールデヒドロゲナーゼ（例えば、ADH2）などの標的酵素の高度発現を含み得る。

【0052】

また、3-メチル1-ブタノールを生成する組換え微生物を提供し、アセト乳酸シンターゼ（例えば、alsS）、アセトヒドロキシ酸シンターゼ（例えば、ilvIH）、アセト乳酸シンターゼ（例えば、ilvMG）または（例えば、ilvNB）、アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ（例えば、ilvC）、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ（例えば、ilvD）、2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ（leuA）、イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼ（例えば、leuC、DまたはleuCDオペロン）、 β -イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ（例えば、leuB）、2-ケト酸デカルボキシラーゼ（例えば、kivd、PDC6、またはTHI3）、およびアルコールデヒドロゲナーゼ（例えば、ADH2）などの標的酵素の高度発現を含み得る。

10

【0053】

また、フェニルエタノールを生成する組換え微生物を提供し、コリスミ酸ムターゼP/プレフェン酸デヒドラターゼ（例えば、pheA）、コリスミ酸ムターゼT/プレフェン酸デヒドロゲナーゼ（例えば、tyrA）、2-ケト酸デカルボキシラーゼ（例えば、kivd、PDC6、またはTHI3）、およびアルコールデヒドロゲナーゼ（例えば、ADH2）などの標的酵素の高度発現を含み得る。

【0054】

先述の通り、本開示を全体を通して記載の標的酵素は一般に代謝産物を生成する。例えば、酵素2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ（leuA）、 β -イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ（leuB）、およびイソプロピルリンゴ酸イソメラーゼ（leuC、leuDまたはleuCDオペロン）は、2-ケト酪酸を含む基質から2-ケト吉草酸を生成し得る。さらに、本開示を全体を通して記載の標的酵素は、ポリヌクレオチドによってコードされる。例えば、トレオニンデヒドラターゼは、ilvA遺伝子に由来するポリヌクレオチドによってコードされ得る。アセトヒドロキシ酸シンターゼは、ilvIHオペロンに由来するポリヌクレオチドによってコードされ得る。アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼは、ilvC遺伝子に由来するポリヌクレオチドによってコードされ得る。ジヒドロキシ酸デヒドラターゼは、ilvD遺伝子に由来するポリヌクレオチドによってコードされ得る。2-ケト酸デカルボキシラーゼは、PDC6、ARO10、THI3、kivd、および／またはpdc遺伝子に由来するポリヌクレオチドによってコードされ得る。アルコールデヒドロゲナーゼは、ADH2遺伝子に由来するポリヌクレオチドによってコードされ得る。追加的酵素および典型的遺伝子は、本文書を全体を通して記載される。さまざまなポリペプチドおよびポリヌクレオチドの相同体は、適切な酵素をコードする適切なポリヌクレオチドを提供するすべての生物学的起源から生じ得る。例えば、相同体はさまざまなデータベースを参照することにより特定できる。

20

30

【0055】

本開示では、本開示の方法、組成および生物に有用な個別の遺伝子を識別するが、かかる遺伝子の絶対的な識別は必要ないことが分かるであろう。例えば、ポリペプチドまたは酵素をコードする配列を含む特定の遺伝子またはポリヌクレオチドの変更は実行でき、活性をスクリーニングできる。かかる変更は一般に、保存的変異およびサイレント変異を含む。かかる修飾または変異ポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、当技術分野で周知の方法を使用して機能酵素活性の発現をスクリーニングできる。

40

【0056】

遺伝コードの固有の縮重のため、実質的に同一または機能的に同等のポリペプチドをコードする他のポリヌクレオチドは、かかる酵素をコードするポリヌクレオチドのクローンおよび発現のために使用することもできる。

【0057】

当業者には知られているように、特定の宿主では、その発現を強化するためにコード配列を修飾することが有利となり得る。遺伝コードは64の潜在的コドンを持ち重複しているが、ほとんどの生物は、一般にこれらのコドンのサブセットを使用する。1つの種におい

50

て最もよく使用されるコドンは最適コドンと呼ばれ、あまり使用されないものは希少または低使用コドンとして分類される。コドンは、宿主の優先コドン使用を反映するために代用されることが可能で、このプロセスは時に「コドン最適化」または「種コドン偏向のための制御」と呼ばれる。

【0058】

特定の原核生物または真核生物宿主によって優先されるコドンを含む最適化されたコード配列 (Murray et al. (1989) Nucl. Acids Res. 17:477-508参照) は、例えば翻訳速度を増すため、または非最適化配列から生成される転写産物と比べて半減期が長いなど、望ましい特性を持つ組換えRNA転写産物を生成するために調製され得る。翻訳停止コドンは、宿主選択を反映するために改変することもできる。例えば、サッカロミセス・セレビスエおよび哺乳類の典型的停止コドンはそれぞれ、UAAおよびUGAである。単子葉植物の典型的ストップコドンはUGAで、昆虫および大腸菌は一般的にUAAを停止コドンとして使用する (Dalphin et al. (1996) Nucl. Acids Res. 24: 216-218)。例えば、米国特許第6,015,891号およびその引用文献において、植物における発現のためのヌクレオチド配列の最適化方法が提供されている。

【0059】

当業者には知られているように、遺伝コードの縮重性のために、ヌクレオチド配列の異なるさまざまなDNA化合物を使用して、本開示の任意の酵素をコードすることができる。上記の生合成酵素をコードする天然DNA配列は、本明細書では単に本開示の説明としてのみ言及されるものとし、本開示には、本開示の方法で使用される酵素のポリペプチドおよびタンパク質のアミノ酸配列をコードするすべての配列のDNA化合物を含む。同様に、ポリペプチドは一般に、望ましい活性の喪失または著しい喪失を伴うことなく、アミノ酸配列への1つ以上のアミノ酸置換、欠失および挿入に耐える。本開示には、修飾または変異体ポリペプチドが参照ポリペプチドの酵素同化または異化活性を持つ限り、本明細書に記載の特定タンパク質とは異なるアミノ酸配列を持つかかるポリペプチドを含む。さらに、本明細書に示されるDNA配列によってコードされるアミノ酸配列は、本開示の実施形態を単に説明するものにすぎない。

【0060】

さらに、代謝産物生成に有用な酵素の相同体 (例えば、ケトチオラーゼ、アセチル-CoA アセチルトランスフェラーゼ、ヒドロキシブチリルCoAデヒドロゲナーゼ、クロトナーゼ、クロトニル-CoAレダクターゼ、ブチリル-coAデヒドロゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ (ADH)) は、本明細書で提供される微生物および方法によって包含される。第一のファミリーまたは種の原酵素または遺伝子に関して使用される「相同体」という用語は、第二のファミリーまたは種の固有酵素または遺伝子を指し、これは機能的、構造的またはゲノムの解析が、第一のファミリーまたは種の原酵素または遺伝子に相当する第二のファミリーまたは種の酵素または遺伝子のものであることによって決定される。ほとんどの場合、相同体は機能的、構造的またはゲノム的に類似性を持つ。遺伝子プローブおよびPCRを使用して、酵素または遺伝子の相同体を容易にクローニングできる技術が知られている。相同体としてのクローン配列の同一性は、機能的解析および／または遺伝子のゲノムマッピングによって確認できる。

【0061】

あるタンパク質をコードする核酸配列が第二のタンパク質をコードする核酸配列と類似の配列を持つ場合、そのタンパク質は第二のタンパク質に対して「相同性」を持つまたは「相同」である。つまり、2つのタンパク質が「類似の」アミノ酸配列を持つ場合、1つのタンパク質は第二のタンパク質に対して相同性を持つ。(このように、「相同タンパク質」という用語は、2つのタンパク質が類似のアミノ酸配列を持つことと定義される)。

【0062】

本明細書で使用される場合、アミノ酸配列が少なくとも約30%、40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を持つ場合、2つのタンパク質 (またはタンパク質の領域) は、実質的に相同である。2

10

20

30

40

50

つのアミノ酸配列または2つの核酸配列の同一性パーセントを決定するためには、最適比較ができるように配列をアラインメントする（例えば、最適にアラインメントするために、第一および第二のアミノ酸または核酸配列のどちらかまたは両方にギャップを導入することができ、比較のために非相同配列を無視することができる）。一実施形態では、比較目的用にアラインメントされた参照配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも30%、典型的には少なくとも40%、さらに典型的には少なくとも50%、さらにより典型的には少なくとも60%、さらにより典型的には少なくとも70%、80%、90%、100%である。対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置のアミノ酸残基またはヌクレオチドを、その後比較する。第一の配列のある位置が、第二の配列の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドで占められている場合、分子はその位置では同一である（本明細書で使用される場合、アミノ酸または核酸「同一性」は、アミノ酸または核酸「相同性」と同等である）。2つの配列間の同一性パーセントは、それらの配列が共有する同一位置の数の関数であり、2つの配列を最適にアラインメントするために導入する必要のあるギャップの数、および各ギャップの長さを考慮する。例えば、kivd遺伝子に関しては、かなり類似の他の生物からの相同体（例えば、pdc6、aro10、thI3、pdc、kdcA、pdc1、pdc5）および、参照遺伝子に対して少なくとも30、40、50、60、70、80、85、90、95、98、または99%の同一性を持ち、参照遺伝子とかなり類似の酵素活性を持つ酵素をコードする遺伝子を含む。例えば、クルイペロミセス・ラクチスのピルビン酸デカルボキシラーゼは、アミノ酸レベルでKivdと37%の同一性を持つ。kivdとthI3は核酸レベルで32%同一である。シゾサッカロミセス・ポンベのアルコールデヒドロゲナーゼは、アミノ酸配列レベルでサッカロミセス・セレビスエのADH2と52%の同一性を持つ。サッカロミセス・セレビスエのadh2とラクトコッカス・ラクティスのadhは49%同一である。KIVD（ラクトコッカス・ラクティス）とPDC6（サッカロミセス・セレビスエ）は36%の同一性を共有する（陽性= 322/562（57%）、ギャップ= 24/562（4%））。KIVD（ラクトコッカス・ラクティス）およびTHI3（サッカロミセス・セレビスエ）は32%の同一性を共有する（陽性= 307/571（53%）、ギャップ= 35/571（6%））。kivd（ラクトコッカス・ラクティス）およびARO10（サッカロミセス・セレビスエ）は30%の同一性を共有する（陽性= 296/598（49%）、ギャップ= 65/598（10%））。ARO10（サッカロミセス・セレビスエ）およびPDC6（サッカロミセス・セレビスエ）は34%の同一性を共有する（陽性 = 320/616（51%）、ギャップ= 61/616（9%））。ARO10（サッカロミセス・セレビスエ）およびTHI3（サッカロミセス・セレビスエ）は30%の同一性を共有する（陽性= 304/599（50%）、ギャップ = 48/599（8%））。ARO10（サッカロミセス・セレビスエ）およびピルビン酸デカルボキシラーゼ（クロストリジウム・アセトブチリカム ATCC 824）は30%の同一性を共有する（陽性= 291/613（47%）。ギャップ= 73/613（11%））。PDC6（サッカロミセス・セレビスエ）およびTHI3（サッカロミセス・セレビスエ）は50%の同一性を共有する（陽性= 402/561（71%）、ギャップ = 17/561（3%））。PDC6（サッカロミセス・セレビスエ）およびピルビン酸デカルボキシラーゼ（クロストリジウム・アセトブチリカム ATCC 824）は38%の同一性を共有する（陽性= 328/570（57%）、ギャップ = 30/570（5%））。THI3（サッカロミセス・セレビスエ）およびピルビン酸デカルボキシラーゼ（クロストリジウム・アセトブチリカム ATCC 824）は35%の同一性を共有する（陽性= 284/521（54%）。ギャップ = 25/521（4%））。本明細書にリストされた各遺伝子およびポリペプチド／酵素の配列は、ワールドワイドウェブで利用できるデータベースを使用して容易に特定できる（例えば、<http://eecoli.kaist.ac.kr/main.html>参照）。さらに、アミノ酸配列および核酸配列は、本技術分野で一般的に使用されるアルゴリズムを用いて、容易に同一性を比較できる。

【0063】

タンパク質またはペプチドとの関連で「相同」が使用される場合、同一でない残基位置は、しばしば保存的アミノ酸置換により異なっていることが分かる。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、類似の化学特性の側鎖（R基）を持つ別のアミノ酸残基によって置換されるものである（例えば、電荷または疎水性）。一般に、保存的アミノ酸置換は、タンパク質の機能特性を大きく変えることはない。保存的置換によって、2つ以上のア

ミノ酸配列がお互いに異なっている場合、配列同一性パーセントまたは相同性の程度は、置換の保存性を修正するために上方調整され得る。この調整を行う手段は、当業者には良く知られている（例えば、Pearson et al., 1994を参照、これは参照により本明細書に組み込まれる）。

【0064】

次の6つのグループは、お互いの保存的置換のアミノ酸をそれぞれ含む。1) セリン (S)、トレオニン (T) ; 2) アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E) ; 3) アスパラギン (N)、グルタミン (Q) ; 4) アルギニン (R)、リシン (K) ; 5) イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、アラニン (A)、バリン (V)、および 6) フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W)。

10

【0065】

ポリペプチドの配列相同性は、配列同一性パーセントとしても言及されるが、これは一般に配列分析ソフトウェアを使用して測定される。例えば、Genetics Computer Group (GCG) の配列分析ソフトウェア・パッケージ (University of Wisconsin Biotechnology Center, 910 University Avenue, Madison, Wis. 53705) を参照。タンパク質分析ソフトウェアは、保存的アミノ酸置換を含むさまざまな置換、欠失および他の改変に割り当てられた相同の尺度を用いて、類似の配列を一致させる。例えば、GCGは、異なる生物種からの相同ポリペプチド、または野生型タンパク質およびその突然変異タンパク質間など、密接に関連したポリペプチド間の配列相同性または配列同一性を初期設定パラメータで決定するのに使用できる「Gap」および「Bestfit」などのプログラムを含む。例えば、GCGバージョン 6.1参照。

20

【0066】

分子配列を、異なる生物の多数の配列を含むデータベースと比較するのに使用される典型的アルゴリズムは、コンピュータプログラムBLAST (Altschul, 1990; Gish, 1993; Madden, 1996; Altschul, 1997; Zhang, 1997)、特にblastpまたはtblastn (Altschul, 1997) である。BLASTpの一般的パラメータは以下のとおりである。期待値：10 (初期値)、フィルター：seg (初期値)、ギャップを開けるためのコスト：11 (初期値)、ギャップを広げるためのコスト：1 (初期値)、最大アラインメント：100 (初期値)、ワードサイズ：11 (初期値)、記述数：100 (初期値)、ペナルティ・マトリクス：BLOWSUM62。

【0067】

30

多数の異なる生物の配列を含むデータベースを検索する場合は、アミノ酸配列を比較するのが一般的である。アミノ酸配列を使ったデータベース検索は、本分野で周知のblastpのほかにアルゴリズムで評価できる。例えば、ポリペプチド配列は、GCGバージョン 6.1のプログラムであるFASTAを使用して比較できる。FASTAは、クエリーと検索配列間の最高重複領域のアラインメントと配列同一性パーセントを提供する (Pearson, 1990、これは参照により本明細書に組み込まれる)。例えば、アミノ酸配列間の配列同一性パーセントは、GCGバージョン 6.1で提供されるFASTAとその初期設定パラメータ (ワードサイズ2、およびPAM250スコア・マトリクス) を使って決定でき、これは参照により本明細書に組み込まれる。

【0068】

40

次の表および本開示では、遺伝子、および当業者が利用できるポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列を持つ各遺伝子の相同体の非限定的例を提供する。

表1：さまざまな高級アルコール生成の組換え経路の説明 (「+」=発現、発現または活性の増加／「-」=発現もしくは活性の減少またはノックアウト*)

【表 1】

酵素	代表的な 遺伝子	インブタノール	1-ブタノール (L-トレオニン 経由)	1-ブタノール (ピルビン酸 経由)	1-プロパノール (L-トレオニン 経由)	1-プロパノール (ピルビン酸 経由)	3-M-1- ブタノール (ピルビン酸 経由)	2-M-1- ブタノール (L-トレオニン 経由)
エタノールデヒドロゲナーゼ	adhE	-	-	-	-	-	-	-
乳酸デヒドロゲナーゼ	ldhA	-	-	-	-	-	-	-
フマル酸レダクターゼ	frdBC	-					-	-
	fmr	-					-	-
酢酸キナーゼ	ackA	-	-	-	-	-	-	-
リン酸アセチルトランスフェラーゼ	pta	-	-	-	-	-	-	-
ギ酸アセチルトランスフェラーゼ	pflB	-					-	-
α -インプロピルリンゴ酸シンターゼ	leuA	-	+	+			+	
β -インプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ	leuB		+	+	-	+	+	
α -インプロピルリンゴ酸イソメラーゼ	leuC		+	+		+	+	
α -インプロピルリンゴ酸イソメラーゼ	leuD		+	+		+		
BCAAアミノトランスフェラーゼ	ilvE	-					-	
チロシンアミノトランスフェラーゼ	tyrB、 tyrAT						-	
ピルビン酸デヒドロゲナーゼ	poxB	-	-	-	-	-		
アセト乳酸シンターゼ	ilvB		-	-	-	-		
アセト乳酸シンターゼ	ilvI、alsS		-	-	-	-		
トレオニンデヒドラターゼ	ilvA、tdcB	-	+	+	+	+		+
ホモセリントランススクスニラーゼ	metA		-	-	-	-		-
L-トレオニン3-デヒドロゲナーゼ	tdh		-	-	-	-		-
アセトヒドロキシ酸シンターゼ	ilvH、 ilvNB、 ilvGM、 alsS	+					+	+

10

20

30

40

アセトヒドロキシ酸イノメロレダクターゼ	ilvC、ilv5	+							+	+
ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ	ilvD、ilv3	+							+	+
2-ケト酸デカルボキシラーゼ	pdh6、 aro10、 thl3、 kivd、 pdc、 kdcA、 pdc1、 pdc5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	adh1、 adh2、 adh3、 adh4、 adh5、 adh6、sfal	+	+	+	+	+	+	+	+	+
アルコールデヒドロゲナーゼ										
シトラマル酸シンターゼ	cimA					+		+		

*ノックアウトまたは発現の減少は生成物の合成において随意なものであるが、当該ノックアウトはさまざまな基質中間体を増大させ、収率を改善する。

【0069】

表2～9に、典型的な遺伝子および相同体並びに生物源のリストを含め、本開示のさま

10

20

30

40

50

ざまな組換え微生物に対する反応経路を示す。

【表 2】

イソブタノール生成経路(ピルビン酸経由)

反応 1
ピルビン酸 → 2-アセト乳酸
遺伝子
ilvHI(大腸菌)、ilvNB(大腸菌)、ilvGM(大腸菌)、alsS(枯草菌)またはそれらの相同体
反応 2
2-アセト乳酸 → 2,3-ジヒドロキシ-イソ吉草酸
遺伝子
ilvC(大腸菌)またはその相同体
反応 3
2,3-ジヒドロキシ-イソ吉草酸 → 2-ケト-イソ吉草酸
遺伝子
ilvD(大腸菌)またはその相同体
反応 4
2-ケト-イソ吉草酸 → イソブチルアルデヒド
遺伝子
kivd(ラクトコッカス・ラクティス)、kdcA(ラクトコッカス・ラクティス)、PDC1(サッカロミセス・セレビシエ)、PDC5(サッカロミセス・セレビシエ)、PDC6(サッカロミセス・セレビシエ)、THI3(サッカロミセス・セレビシエ)、ARO10(サッカロミセス・セレビシエ)またはそれらの相同体
反応 5
イソブチルアルデヒド → イソブタノール
遺伝子
ADH1(サッカロミセス・セレビシエ)、ADH2(サッカロミセス・セレビシエ)、ADH3(サッカロミセス・セレビシエ)、ADH4(サッカロミセス・セレビシエ)、ADH5(サッカロミセス・セレビシエ)、ADH6(サッカロミセス・セレビシエ)、SFA1(サッカロミセス・セレビシエ)またはそれらの相同体

【 0 0 7 0 】

10

20

30

【表 3】

L-トレオニン経由の 1-ブタノール生成経路

反応 1
L-トレオニン → 2-ケト-酪酸
遺伝子
ilvA (大腸菌)、tdcB (大腸菌) またはそれらの相同体
反応 2
2-ケト-酪酸 → 2-エチルマレート
遺伝子
leuA (大腸菌) またはその相同体
反応 3
2-エチルマレート → 3-エチルマレート
遺伝子
leuCD (大腸菌) またはその相同体
反応 4
3-エチルマレート → 2-エチル-3-オキソスクシネート
遺伝子
leuB (大腸菌) またはその相同体
反応 5
2-エチル-3-オキソスクシネート → 2-ケト-吉草酸
遺伝子
n/a (自然反応)
反応 6
2-ケト-吉草酸 → ブチルアルデヒド
遺伝子
kivd (ラクトコッカス・ラクティス)、kdcA (ラクトコッカス・ラクティス)、PDC1 (サッカロミセス・セレビシエ)、PDC5 (サッカロミセス・セレビシエ)、PDC6 (サッカロミセス・セレビシエ)、THI3 (サッカロミセス・セレビシエ)、ARO10 (サッカロミセス・セレビシエ) またはそれらの相同体
反応 7
ブチルアルデヒド → 1-ブタノール
遺伝子
ADH1 (サッカロミセス・セレビシエ)、ADH2 (サッカロミセス・セレビシエ)、ADH3 (サッカロミセス・セレビシエ)、ADH4 (サッカロミセス・セレビシエ)、ADH5 (サッカロミセス・セレビシエ)、ADH6 (サッカロミセス・セレビシエ)、SFA1 (サッカロミセス・セレビシエ)、またはそれらの相同体

10

20

30

【 0 0 7 1 】

【表 4】

ピルビン酸経由の 1-ブタノール生成経路

反応 1	
ピルビン酸+アセチル-CoA → (R)-シトラマル酸	
遺伝子	
cimA (メタノカルドコッカス・ジヤナシイ)、cimA (レプトスピラ・インターロガンズ) またはそれらの相同体	
反応 2	
(R)-シトラマル酸 → シトラコン酸	
遺伝子	10
leuCD (レプトスピラ・インターロガンズ)、leuCD (大腸菌) またはそれらの相同体	
反応 3	
シトラコン酸 → β-メチル-D-マレート	
遺伝子	
leuCD (レプトスピラ・インターロガンズ)、leuCD (大腸菌) またはそれらの相同体	
反応 4	
β-メチル-D-マレート → 2-ケト-酪酸	
遺伝子	20
leuB (レプトスピラ・インターロガンズ)、leuB (大腸菌) またはそれらの相同体	
反応 5	
2-ケト-酪酸 → 2-エチルマレート	
遺伝子	
leuA (大腸菌) またはその相同体	
反応 3	
2-エチルマレート → 3-エチルマレート	
遺伝子	
leuCD (大腸菌) またはその相同体	
反応 4	30
3-エチルマレート → 2-エチル-3-オキシスクシネート	
遺伝子	
leuB (大腸菌) またはその相同体	
反応 5	
2-エチル-3-オキシスクシネート → 2-ケト-吉草酸	
遺伝子	
(自然)	
反応 6	
2-ケト-吉草酸 → ブチルアルデヒド	
遺伝子	40
kivd (ラクトコッカス・ラクティス)、kdcA (ラクトコッカス・ラクティス)、PDC1 (サッカロミセス・セレビシエ)、PDC5 (サッカロミセス・セレビシエ)、PDC6 (サッカロミセス・セレビシエ)、THI3 (サッカロミセス・セレビシエ)、ARO10 (サッカロミセス・セレビシエ) またはそれらの相同体	

(続き)

反応 7
ブチルアルデヒド → 1-ブタノール
遺伝子
ADH1 (サッカロミセス・セレビシエ)、ADH2 (サッカロミセス・セレビシエ)、ADH3 (サッカロミセス・セレビシエ)、ADH4 (サッカロミセス・セレビシエ)、ADH5 (サッカロミセス・セレビシエ)、ADH6 (サッカロミセス・セレビシエ)、SFA1 (サッカロミセス・セレビシエ) またはそれらの相同体

【 0 0 7 2 】

10

【 表 5 】

L-トレオニン経由の 1-プロパノール生成経路

反応 1
L-トレオニン → 2-ケト-酪酸
遺伝子
ilvA (大腸菌)、tdcB (大腸菌) またはそれらの相同体
反応 2
2-ケト-酪酸 → プロピルアルデヒド
遺伝子
kivd (ラクトコッカス・ラクティス)、kdcA (ラクトコッカス・ラクティス)、PDC1 (サッカロミセス・セレビシエ)、PDC5 (サッカロミセス・セレビシエ)、PDC6 (サッカロミセス・セレビシエ)、THI3 (サッカロミセス・セレビシエ)、ARO10 (サッカロミセス・セレビシエ) またはそれらの相同体
反応 3
プロピルアルデヒド → 1-プロパノール
遺伝子
ADH1 (サッカロミセス・セレビシエ)、ADH2 (サッカロミセス・セレビシエ)、ADH3 (サッカロミセス・セレビシエ)、ADH4 (サッカロミセス・セレビシエ)、ADH5 (サッカロミセス・セレビシエ)、ADH6 (サッカロミセス・セレビシエ)、SFA1 (サッカロミセス・セレビシエ) またはそれらの相同体

20

30

【 0 0 7 3 】

【表 6】

ピルビン酸経由の 1-プロパノール生成経路

反応 1	
ピルビン酸+アセチル-CoA → (R)-シトラマル酸	
遺伝子	
cimA (メタノカルドコッカス・ジャナシイ)、cimA (レプトスピラ・インターロガンス) またはそれらの相同体	
反応 2	
(R)-シトラマル酸 → シトラコン酸	
遺伝子	
leuCD (レプトスピラ・インターロガンス)、leuCD (大腸菌) またはそれらの相同体	
反応 3	
シトラコン酸 → β-メチル-D-マレート	
遺伝子	
leuCD (レプトスピラ・インターロガンス)、leuCD (大腸菌) またはそれらの相同体	
反応 4	
β-メチル-D-マレート → 2-ケト-酪酸	
遺伝子	
leuB (レプトスピラ・インターロガンス)、leuB (大腸菌) またはそれらの相同体	
反応 5	
2-ケト-酪酸 → ブチルアルデヒド	
遺伝子	
kivd (ラクトコッカス・ラクティス)、kdcA (ラクトコッカス・ラクティス)、PDC1 (サッカロミセス・セレビシエ)、PDC5 (サッカロミセス・セレビシエ)、PDC6 (サッカロミセス・セレビシエ)、THI3 (サッカロミセス・セレビシエ)、ARO10 (サッカロミセス・セレビシエ) またはそれらの相同体	
反応 7	
ブチルアルデヒド → 1-ブタノール	
遺伝子	
ADH1 (サッカロミセス・セレビシエ)、ADH2 (サッカロミセス・セレビシエ)、ADH3 (サッカロミセス・セレビシエ)、ADH4 (サッカロミセス・セレビシエ)、ADH5 (サッカロミセス・セレビシエ)、ADH6 (サッカロミセス・セレビシエ)、SFA1 (サッカロミセス・セレビシエ) またはそれらの相同体	

10

20

30

【 0 0 7 4 】

【表 7】

2-メチル-1-ブタノール生成経路(L-トレオニン経由)

反応 1
L-トレオニン → 2-ケト-酪酸
遺伝子
ilvA (大腸菌)、tdcB (大腸菌) またはそれらの相同体
反応 2
2-ケト-酪酸 → 2-アセト-2-ヒドロキシ-ブチレート
遺伝子
ilvHI (大腸菌)、ilvNB (大腸菌)、ilvGM (大腸菌)、alsS (枯草菌) またはそれらの相同体
反応 3
2-アセト-2-ヒドロキシ-ブチレート → 2,3-ジヒドロキシ-3-メチルバレレート
遺伝子
ilvC (大腸菌) またはその相同体
反応 4
2,3-ジヒドロキシ-3-メチルバレレート → 2-ケト-3-メチル-バレレート
遺伝子
ilvD (大腸菌) またはその相同体
反応 5
2-ケト-3-メチル-バレレート → 2-メチルブチルアルデヒド
遺伝子
kivd (ラクトコッカス・ラクティス)、kdcA (ラクトコッカス・ラクティス)、PDC1 (サッカロミセス・セレビシエ)、PDC5 (サッカロミセス・セレビシエ)、PDC6 (サッカロミセス・セレビシエ)、THI3 (サッカロミセス・セレビシエ)、ARO10 (サッカロミセス・セレビシエ) またはそれらの相同体
反応 6
2-メチルブチルアルデヒド → 2-メチル-1-ブタノール
遺伝子
ADH1 (サッカロミセス・セレビシエ)、ADH2 (サッカロミセス・セレビシエ)、ADH3 (サッカロミセス・セレビシエ)、ADH4 (サッカロミセス・セレビシエ)、ADH5 (サッカロミセス・セレビシエ)、ADH6 (サッカロミセス・セレビシエ)、SFA1 (サッカロミセス・セレビシエ) またはそれらの相同体

10

20

30

【 0 0 7 5 】

【表 8】

3-メチル-1-ブタノール生成経路(ピルビン酸経由)

反応 1	
ピルビン酸 → 2-アセト乳酸	
遺伝子	
ilvHI(大腸菌)、ilvNB(大腸菌)、ilvGM(大腸菌)、alsS(枯草菌)またはそれらの相同体	
反応 2	
2-アセト乳酸 → 2,3-ジヒドロキシ-イソバレレート	10
遺伝子	
ilvC(大腸菌)またはその相同体	
反応 3	
2,3-ジヒドロキシ-イソバレレート → 2-ケト-イソ吉草酸	
遺伝子	
ilvD(大腸菌)またはその相同体	
反応 4	
2-ケト-イソ吉草酸 → 2-イソプロピルマレート	20
遺伝子	
leuA(大腸菌)またはその相同体	
反応 5	
2-イソプロピルマレート → 3-イソプロピルマレート	
遺伝子	
leuCD(大腸菌)またはその相同体	
反応 6	
3-イソプロピルマレート → 2-イソプロピル-3-オキソスクシネート	
遺伝子	
leuB(大腸菌)またはその相同体	30
反応 7	
2-イソプロピル-3-オキソスクシネート → 2-ケトイソカプロン酸	
遺伝子	
(自然)	
反応 8	
2-ケトイソカプロン酸 → 3-メチルブチルアルデヒド	
遺伝子	
kivd(ラクトコッカス・ラクティス)、kdcA(ラクトコッカス・ラクティス)、PDC1(サッカロミセス・セレビシエ)、PDC5(サッカロミセス・セレビシエ)、PDC6(サッカロミセス・セレビシエ)、THI3(サッカロミセス・セレビシエ)、ARO10(サッカロミセス・セレビシエ)またはそれらの相同体	40
反応 9	
3-メチルブチルアルデヒド → 3-メチル-1-ブタノール	
遺伝子	
ADH1(サッカロミセス・セレビシエ)、ADH2(サッカロミセス・セレビシエ)、ADH3(サッカロミセス・セレビシエ)、ADH4(サッカロミセス・セレビシエ)、ADH5(サッカロミセス・セレビシエ)、ADH6(サッカロミセス・セレビシエ)、SFA1(サッカロミセス・セレビシエ)またはそれらの相同体	

【表 9】

フェニル-エタノール生成経路(コリスミ酸経由)

反応 1
コリスミ酸 → プレフェン酸
遺伝子
tyrA (大腸菌)、pheA (大腸菌) またはそれらの相同体
反応 2
プレフェン酸 → フェニルピルビン酸
遺伝子
pheA (大腸菌) またはその相同体
反応 3
フェニルピルビン酸 → フェニルアルデヒド
遺伝子
kivd (ラクトコッカス・ラクティス)、kdcA (ラクトコッカス・ラクティス)、PDC1 (サッカロミセス・セレビシエ)、PDC5 (サッカロミセス・セレビシエ)、PDC6 (サッカロミセス・セレビシエ)、THI3 (サッカロミセス・セレビシエ)、ARO10 (サッカロミセス・セレビシエ) またはそれらの相同体
反応 4
フェニルアルデヒド → 2-フェニルエタノール
遺伝子
ADH1 (サッカロミセス・セレビシエ)、ADH2 (サッカロミセス・セレビシエ)、ADH3 (サッカロミセス・セレビシエ)、ADH4 (サッカロミセス・セレビシエ)、ADH5 (サッカロミセス・セレビシエ)、ADH6 (サッカロミセス・セレビシエ)、SFA1 (サッカロミセス・セレビシエ) またはそれらの相同体

10

20

【0077】

本開示は、本明細書に記載される組換え微生物の生成に有用なさまざまな遺伝子、相同体および変異体のアクセッション番号を提供する。本明細書に記載される相同体および変異体は、例示的かつ非制限的なものであることが理解されるべきである。追加的な相同体、変異体および配列は、例えば、ワールドワイドウェブから利用できる国立生物工学情報センター (NCBI) へのアクセスを含め、さまざまなデータベースを用いて当業者が利用できる。

30

【0078】

エタノールデヒドロゲナーゼ (アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼとも呼ばれる) は、adhEにより大腸菌内でコードされる。adhEは、アルコールデヒドロゲナーゼ (ADH)、アセトアルデヒド/アセチル-CoAデヒドロゲナーゼ (ACDH)、ピルビン酸-ギ酸-リアーゼディアクティベース (deactivase) (PFLディアクティベース) という三つの活性から構成され、PFLディアクティベース活性は鉄、NAD、およびCoA依存性の反応におけるピルビン酸-ギ酸-リアーゼ触媒のクエンチングを触媒する。相同体は当技術分野で知られており (例えば、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (ポリトメラ種プリングスハイム1 98.80) gi|40644910|emb|CAD42653.2| (40644910)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (クロストリジウム・ボツリヌムA株ATCC 3502) gi|148378348|ref|YP_001252889.1| (148378348)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (エルシニア・ベスチスC092) gi|16122410|ref|NP_405723.1| (16122410)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (仮性結核菌IP 32953) gi|51596429|ref|YP_070620.1| (51596429)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (エルシニア・ベスチスC092) gi|115347889|emb|CAL20810.1| (115347889)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (仮性結核菌IP 32953) gi|51589711|emb|CAH21341.1| (51589711)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (大腸菌CFT073) gi|26107972|gb|AAN80172.1|AE016760_31 (26107972)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (エルシニア・ベスチス次亜種ハタネズミ株91001) gi|45441777|ref|N

40

50

P_993316.1| (45441777)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (エルシニア・ペスチス次亜種ハタネズミ株91001) gi|45436639|gb|AAS62193.1| (45436639)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (ウェルシュ菌ATCC 13124) gi|110798574|ref|YP_697219.1| (110798574)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (シェワネラ・オネイデンシスMR-1) gi|24373696|ref|NP_717739.1| (24373696)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (クロストリジウム・ボツリヌムA株ATCC 19397) gi|153932445|ref|YP_001382747.1| (153932445)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (エルシニア・ペスチス次亜種Antiqua株E1979001) gi|165991833|gb|EDR44134.1| (165991833)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (クロストリジウム・ボツリヌムA株Hall) gi|153937530|ref|YP_001386298.1| (153937530)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (ウェルシュ菌ATCC 13124) gi|110673221|gb|ABG82208.1| (110673221)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (クロストリジウム・ボツリヌムA株Hall) gi|152933444|gb|ABS38943.1| (152933444)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (エルシニア・ペスチス次亜種オリエンタリス株F1991016) gi|165920640|gb|EDR37888.1| (165920640)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (エルシニア・ペスチス次亜種オリエンタリス株IP275) gi|165913933|gb|EDR32551.1| (165913933)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (エルシニア・ペスチスアンゴラ) gi|162419116|ref|YP_001606617.1| (162419116)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (クロストリジウム・ボツリヌムF株Langeland) gi|153940830|ref|YP_001389712.1| (153940830)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (大腸菌HS) gi|157160746|ref|YP_001458064.1| (157160746)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (大腸菌E24377A) gi|157155679|ref|YP_001462491.1| (157155679)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (エルシニア・エンテロコリチカ亜種エンテロコリチカ8081) gi|123442494|ref|YP_001006472.1| (123442494)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (シネココッカス種 JA-3-3Ab) gi|86605191|ref|YP_473954.1| (86605191)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (リステリア・モノサイトゲネス株4b F2365) gi|46907864|ref|YP_014253.1| (46907864)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (エンテロコッカス・フェカリスV583) gi|29375484|ref|NP_814638.1| (29375484)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (ストレプトコッカス・アガラクティエ2603V/R) gi|22536238|ref|NP_687089.1| (22536238)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (クロストリジウム・ボツリヌムA株ATCC 19397) gi|152928489|gb|ABS33989.1| (152928489)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (大腸菌E24377A) gi|157077709|gb|ABV17417.1| (157077709)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (大腸菌HS) gi|157066426|gb|ABV05681.1| (157066426)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (クロストリジウム・ボツリヌムF株Langeland) gi|152936726|gb|ABS42224.1| (152936726)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (エルシニア・ペスチスCA88-4125) gi|149292312|gb|EDM42386.1| (149292312)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (エルシニア・エンテロコリチカ亜種エンテロコリチカ8081) gi|122089455|emb|CAL12303.1| (122089455)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (クラミドモナス・ラインハーディ) gi|92084840|emb|CAF04128.1| (92084840)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (シネココッカス種 JA-3-3Ab) gi|86553733|gb|ABC98691.1| (86553733)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (シェワネラ・オネイデンシスMR-1) gi|24348056|gb|AAN55183.1|AE015655_9 (24348056)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (エンテロコッカス・フェカリスV583) gi|29342944|gb|AA080708.1| (29342944)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (リステリア・モノサイトゲネス株4b F2365) gi|46881133|gb|AAT04430.1| (46881133)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (リステリア・モノサイトゲネス株1/2a F6854) gi|47097587|ref|ZP_00235115.1| (47097587)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (リステリア・モノサイトゲネス株4b H7858) gi|47094265|ref|ZP_00231973.1| (47094265)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (リステリア・モノサイトゲネス株4b H7858) gi|47017355|gb|EAL08180.1| (47017355)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (リステリア・モノサイトゲネス株1/2a F6854) gi|

47014034|gb|EAL05039.1| (47014034)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (スト
レプトコッカス・アガラクティエ2603V/R) gi|22533058|gb|AAM98961.1|AE014194_6 (225
33058) p、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (エルシニア・ペスチス次亜種Antiq
ua株E1979001) gi|166009278|ref|ZP_02230176.1| (166009278)、アルデヒド-アルコー
ルデヒドロゲナーゼ (エルシニア・ペスチス次亜種オリエンタリス株IP275) gi|16593827
2|ref|ZP_02226831.1| (165938272)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (エルシ
ニア・ペスチス次亜種オリエンタリス株F1991016) gi|165927374|ref|ZP_02223206.1| (1
65927374)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (エルシニア・ペスチスアンゴラ
) gi|162351931|gb|ABX85879.1| (162351931)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナー
ゼ (仮性結核菌IP 31758) gi|153949366|ref|YP_001400938.1| (153949366)、アルデヒ
ド-アルコールデヒドロゲナーゼ (仮性結核菌IP 31758) gi|152960861|gb|ABS48322.1| (1
52960861)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (エルシニア・ペスチスCA88-412
5) gi|149365899|ref|ZP_01887934.1| (149365899)、アセトアルデヒドデヒドロゲナー
ゼ (アセチル化) (大腸菌CFT073) gi|26247570|ref|NP_753610.1| (26247570)、アルデ
ヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (左記を含む: アルコールデヒドロゲナーゼ、アセト
アルデヒドデヒドロゲナーゼ (アセチル化) (EC 1.2.1.10) (acdH)、ピルビン酸-ギ酸
-リアーゼ・ディアクティベース (pfl ディアクティベース)) (クロストリジウム・ボ
ツリヌムA株ATCC 3502) gi|148287832|emb|CAL81898.1| (148287832)、アルデヒド-アル
コールデヒドロゲナーゼ (左記を含む: アルコールデヒドロゲナーゼ (ADH)、アセトア
ルデヒドデヒドロゲナーゼ (アセチル化) (ACDH)、ピルビン酸-ギ酸-リアーゼ・ディア
クティベース (PFL ディアクティベース)) gi|71152980|sp|P0A9Q7.2|ADHE_ECOLI (7115
2980)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (左記を含む: アルコールデヒドロゲ
ナーゼおよびアセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ、およびピルビン酸-ギ酸-リアーゼ・デ
ィアクティベース (桿状細菌亜種アトロセプティカSCRI1043) gi|50121254|ref|YP_05042
1.1| (50121254)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (左記を含む: アルコール
デヒドロゲナーゼおよびアセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ、およびピルビン酸-ギ酸-リ
アーゼ・ディアクティベース (桿状細菌亜種アトロセプティカSCRI1043) gi|49611780|em
b|CAG75229.1| (49611780)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (左記を含む: ア
ルコールデヒドロゲナーゼ (ADH)、アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ (アセチル化)
(ACDH)) gi|19858620|sp|P33744.3|ADHE_CLOAB (19858620)、アルデヒド-アルコール
デヒドロゲナーゼ (左記を含む: アルコールデヒドロゲナーゼ (ADH)、アセトアルデヒ
ドデヒドロゲナーゼ (アセチル化) (ACDH)、ピルビン酸-ギ酸-リアーゼ・ディアクティ
ベース (PFLディアクティベース)) gi|71152683|sp|P0A9Q8.2|ADHE_ECO57 (71152683)
、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (左記を含む: アルコールデヒドロゲナーゼ
、アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ (アセチル化)、ピルビン酸-ギ酸-リアーゼ・デ
ィアクティベース (クロストリジウム・ディフィシル 630) gi|126697906|ref|YP_00108680
3.1| (126697906)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (左記を含む: アルコール
デヒドロゲナーゼ、アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ (アセチル化)、ピルビン酸-ギ
酸-リアーゼ・ディアクティベース (クロストリジウム・ディフィシル 630) gi|11524934
3|emb|CAJ67156.1| (115249343)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ (左記を含
む: アルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) およびアセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ (ア
セチル化) (ACDH)、ピルビン酸-ギ酸-リアーゼ・ディアクティベース (PFL ディアクテ
ィベース)) (フォトラブダス・ルミネッセンス 亜種ラウモンディイTT01) gi|37526388
|ref|NP_929732.1| (37526388)、アルデヒド-アルコールデヒドロゲナーゼ 2 (左記を含
む: アルコールデヒドロゲナーゼ、アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ) (化膿レンサ球
菌株Manfredo) gi|134271169|emb|CAM29381.1| (134271169)、アルデヒド-アルコールデ
ヒドロゲナーゼ (左記を含む: アルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) およびアセトアルデ
ヒドデヒドロゲナーゼ (アセチル化) (ACDH)、ピルビン酸-ギ酸-リアーゼ・ディアクテ
ィベース (PFLディアクティベース)) (フォトラブダス・ルミネッセンス 亜種ラウモン
ディイTT01) gi|36785819|emb|CAE14870.1| (36785819)、アルデヒド-アルコールデヒド

10

20

30

40

50

ロゲナーゼ（左記を含む：アルコールデヒドロゲナーゼおよびピルビン酸-ギ酸-リアーゼ・ディアクティブース（クロストリジウム・ディフィシル630）gi|126700586|ref|YP_001089483.1|（126700586）、アルコールデヒドロゲナーゼ（左記を含む：アルコールデヒドロゲナーゼおよびピルビン酸-ギ酸-リアーゼ・ディアクティブース（クロストリジウム・ディフィシル630）gi|115252023|emb|CAJ69859.1|（115252023）、アルコールデヒドロゲナーゼ 2（化膿レンサ球菌株Manfredo）gi|139472923|ref|YP_001127638.1|（139472923）、アルコールデヒドロゲナーゼE（ウェルシュ菌株13）gi|18311513|ref|NP_563447.1|（18311513）、アルコールデヒドロゲナーゼ E（ウェルシュ菌株13）gi|18146197|dbj|BAB82237.1|（18146197）、アルコールデヒドロゲナーゼ、ADHE1（クロストリジウム・アセトブチリカムATCC 824）gi|15004739|ref|NP_149199.1|（15004739）、アルコールデヒドロゲナーゼ、ADHE1（クロストリジウム・アセトブチリカムATCC 824）gi|14994351|gb|AAK76781.1|AE001438_34（14994351）、アルコールデヒドロゲナーゼ 2（左記を含む：アルコールデヒドロゲナーゼ（ADH）、アセトアルデヒド／アセチル-CoAデヒドロゲナーゼ（ACDH））gi|2492737|sp|Q24803.1|ADH2_ENTHI（2492737）、アルコールデヒドロゲナーゼ（サルモネラ・エンテリカ亜種腸チフス菌株CT18）gi|16760134|ref|NP_455751.1|（16760134）、およびアルコールデヒドロゲナーゼ（サルモネラ・エンテリカ亜種腸チフス菌）gi|16502428|emb|CAD08384.1|（16502428）を参照のこと）、またアクセッション番号に関連する各配列の全体を参照により本明細書に組み込む。

【0079】

乳酸デヒドロゲナーゼ（D-乳酸デヒドロゲナーゼおよび発酵デヒドロゲナーゼとも呼ばれる）は、大腸菌においてldhAによりコードされ、ピルビン酸のD-乳酸へのNADH依存性変換を触媒する。ldhA相同体および変異体が知られている。事実、現在、1664種の細菌乳酸デヒドロゲナーゼがNCBIから利用可能である。例えば、かかる相同体および変異体には、例えば、D-乳酸デヒドロゲナーゼ（D-LDH）（発酵乳酸デヒドロゲナーゼ）gi|1730102|sp|P52643.1|LDHD_ECOLI（1730102）、D-乳酸デヒドロゲナーゼgi|1049265|gb|AAB51772.1|（1049265）、D-乳酸デヒドロゲナーゼ（大腸菌APEC 01）gi|117623655|ref|YP_852568.1|（117623655）、D-乳酸デヒドロゲナーゼ（大腸菌CFT073）gi|26247689|ref|NP_753729.1|（26247689）、D-乳酸デヒドロゲナーゼ（大腸菌0157：H7 EDL933）gi|15801748|ref|NP_287766.1|（15801748）、D-乳酸デヒドロゲナーゼ（大腸菌APEC 01）gi|115512779|gb|ABJ00854.1|（115512779）、D-乳酸デヒドロゲナーゼ（大腸菌CFT073）gi|26108091|gb|AN80291.1|AE016760_150（26108091）、発酵D-乳酸デヒドロゲナーゼ、NAD依存性（大腸菌K12）gi|16129341|ref|NP_415898.1|（16129341）、発酵D-乳酸デヒドロゲナーゼ、NAD依存性（大腸菌UTI89）gi|91210646|ref|YP_540632.1|（91210646）、発酵D-乳酸デヒドロゲナーゼ、NAD依存性（大腸菌K12）gi|1787645|gb|AAC74462.1|（1787645）、発酵D-乳酸デヒドロゲナーゼ、NAD依存性（大腸菌W3110）gi|89108227|ref|AP_002007.1|（89108227）、発酵D-乳酸デヒドロゲナーゼ、NAD依存性（大腸菌W3110）gi|1742259|dbj|BAA14990.1|（1742259）、発酵D-乳酸デヒドロゲナーゼ、NAD依存性（大腸菌UTI89）gi|91072220|gb|ABE07101.1|（91072220）、発酵D-乳酸デヒドロゲナーゼ、NAD依存性（大腸菌0157：H7 EDL933）gi|12515320|gb|AAG56380.1|AE005366_6（12515320）、発酵D-乳酸デヒドロゲナーゼ（大腸菌0157：H7株Sakai）gi|13361468|dbj|BAB35425.1|（13361468）、COG1052：乳酸デヒドロゲナーゼおよび関連するデヒドロゲナーゼ（大腸菌101-1）gi|83588593|ref|ZP_00927217.1|（83588593）、COG1052：乳酸デヒドロゲナーゼおよび関連するデヒドロゲナーゼ（大腸菌53638）gi|75515985|ref|ZP_00738103.1|（75515985）、COG1052：乳酸デヒドロゲナーゼおよび関連するデヒドロゲナーゼ（大腸菌E22）gi|75260157|ref|ZP_00731425.1|（75260157）、COG1052：乳酸デヒドロゲナーゼおよび関連するデヒドロゲナーゼ（大腸菌F11）gi|75242656|ref|ZP_00726400.1|（75242656）、COG1052：乳酸デヒドロゲナーゼおよび関連するデヒドロゲナーゼ（大腸菌E110019）gi|75237491|ref|ZP_00721524.1|（75237491）、COG1052：乳酸デヒドロゲナーゼおよび関連するデヒドロゲナーゼ（大腸菌B7A）gi|75231601|ref|ZP_00717959.1|（75231601）、およびCOG1052：

乳酸デヒドロゲナーゼおよび関連するデヒドロゲナーゼ（大腸菌B171）gi|75211308|ref|ZP_00711407.1|（75211308）があり、アクセッション番号に関連する各配列の全体を参照により本明細書に組み込む。

【0080】

2つの膜結合性FAD含有酵素がフマル酸およびコハク酸相互変換の触媒に関与し、フマル酸レダクターゼは嫌気性生育で、コハク酸デヒドロゲナーゼは好気生育で使用される。フマル酸レダクターゼは複数のサブユニットから構成される（例：大腸菌内のfrdA、B、およびC）。サブユニットのいずれの1つの改変は、本明細書における望ましい活性を結果的に生む可能性がある。例えば、frdB、frdCまたはfrdBCのノックアウトが開示の方法において有益である。Frd相同体および変異体が知られている。例えば、相同体および変異体には、フマル酸レダクターゼサブユニットD（フマル酸レダクターゼ13 kDa疎水性タンパク質）gi|67463543|sp|P0A8Q3.1|FRDD_ECOLI（67463543）、フマル酸レダクターゼサブユニットC（フマル酸レダクターゼ15 kDa疎水性タンパク質）gi|1346037|sp|P20923.2|FRDC_PROVU（1346037）、フマル酸レダクターゼサブユニットD（フマル酸レダクターゼ13 kDa疎水性タンパク質）gi|120499|sp|P20924.1|FRDD_PROVU（120499）、フマル酸レダクターゼサブユニットC（フマル酸レダクターゼ15 kDa疎水性タンパク質）gi|67463538|sp|P0A8Q0.1|FRDC_ECOLI（67463538）、フマル酸レダクターゼ鉄硫黄サブユニット（大腸菌）gi|145264|gb|AAA23438.1|（145264）、フマル酸レダクターゼ・フラビントタンパク質サブユニット（大腸菌）gi|145263|gb|AAA23437.1|（145263）、フマル酸レダクターゼ・フラビントタンパク質サブユニットgi|37538290|sp|P17412.3|FRDA_WOLSU（37538290）、フマル酸レダクターゼ・フラビントタンパク質サブユニットgi|120489|sp|P00363.3|FRDA_ECOLI（120489）、フマル酸レダクターゼ・フラビントタンパク質サブユニットgi|120490|sp|P20922.1|FRDA_PROVU（120490）、フマル酸レダクターゼ・フラビントタンパク質サブユニット前駆体（フラボチトクロムc）（フラボチトクロムc3）（Fcc3）gi|119370087|sp|Q07WU7.2|FRDA_SHEFN（119370087）、フマル酸レダクターゼ鉄-硫黄サブユニットgi|81175308|sp|P0AC47.2|FRDB_ECOLI（81175308）、フマル酸レダクターゼ・フラビントタンパク質サブユニット（フラボチトクロムc）（フラボチトクロムc3）（Fcc3）gi|119370088|sp|P0C278.1|FRDA_SHEFR（119370088）、Frdオペロンの特性化されていないタンパク質C gi|140663|sp|P20927.1|YFRC_PROVU（140663）、Frdオペロン推定鉄-硫黄サブユニットA gi|140661|sp|P20925.1|YFRA_PROVU（140661）、フマル酸レダクターゼ鉄-硫黄サブユニットgi|120493|sp|P20921.2|FRDB_PROVU（120493）、フマル酸レダクターゼ・フラビントタンパク質サブユニットgi|2494617|sp|006913.2|FRDA_HELPY（2494617）、フマル酸レダクターゼ・フラビントタンパク質サブユニット前駆体（鉄（III）誘導フラボチトクロムC3）（Ifc3）gi|13878499|sp|Q9Z4P0.1|FRD2_SHEFN（13878499）、フマル酸レダクターゼ・フラビントタンパク質サブユニットgi|54041009|sp|P64174.1|FRDA_MYCTU（54041009）、フマル酸レダクターゼ・フラビントタンパク質サブユニットgi|54037132|sp|P64175.1|FRDA_MYCBO（54037132）、フマル酸レダクターゼ・フラビントタンパク質サブユニットgi|12230114|sp|Q9ZMP0.1|FRDA_HELPJ（12230114）、フマル酸レダクターゼ・フラビントタンパク質サブユニットgi|1169737|sp|P44894.1|FRDA_HAEIN（1169737）、フマル酸レダクターゼ・フラビントタンパク質サブユニット（ウォリネラ・スクシノゲン）gi|13160058|emb|CAA04214.2|（13160058）、フマル酸レダクターゼ・フラビントタンパク質サブユニット前駆体（フラボチトクロムc）（FL cyt）gi|25452947|sp|P83223.2|FRDA_SHEON（25452947）、フマル酸レダクターゼ鉄硫黄サブユニット（ウォリネラ・スクシノゲン）gi|2282000|emb|CAA04215.1|（2282000）、およびフマル酸レダクターゼ・シトクロムbサブユニット（ウォリネラ・スクシノゲン）gi|2281998|emb|CAA04213.1|（2281998）があり、アクセッション番号に関連する各配列の全体を参照により本明細書に組み込む。

【0081】

酢酸キナーゼは、ackAにより大腸菌内においてコードされている。AckAは、アセチル-coAから酢酸への変換に関与する。具体的には、ackAはアセチル-リン酸の酢酸への変換を触媒する。AckA相同体および変異体が知られている。NCBIデータベースでは、およそ1450

種のポリペプチドを細菌酢酸キナーゼとして列記している。例えば、かかる相同体および変異体には、酢酸キナーゼ（ストレプトマイセス・セリカラーA3（2））gi|21223784|ref|NP_629563.1|（21223784）、酢酸キナーゼ（ストレプトマイセス・セリカラーA3（2））gi|6808417|emb|CAB70654.1|（6808417）、酢酸キナーゼ（化膿レンサ球菌M1 GAS）gi|15674332|ref|NP_268506.1|（15674332）、酢酸キナーゼ（カンピロバクター・ジェジュニ亜種ジェジュニNCTC 11168）gi|15792038|ref|NP_281861.1|（15792038）、酢酸キナーゼ（化膿レンサ球菌M1 GAS）gi|13621416|gb|AAK33227.1|（13621416）、酢酸キナーゼ（ヴェルコミクロビウムSH 1）gi|32476009|ref|NP_869003.1|（32476009）、酢酸キナーゼ（ヴェルコミクロビウムSH 1）gi|32472045|ref|NP_865039.1|（32472045）、酢酸キナーゼ（カンピロバクター・ジェジュニ亜種ジェジュニNCTC 11168）gi|112360034|emb|CAL34826.1|（112360034）、酢酸キナーゼ（ヴェルコミクロビウムSH 1）gi|32446553|emb|CAD76388.1|（32446553）、酢酸キナーゼ（ヴェルコミクロビウムSH 1）gi|32397417|emb|CAD72723.1|（32397417）、AckA（クロストリジウム・クルイベリDSM 555）gi|153954016|ref|YP_001394781.1|（153954016）、酢酸キナーゼ（ビフィドバクテリウム・ロンガムNCC2705）gi|23465540|ref|NP_696143.1|（23465540）、AckA（クロストリジウム・クルイベリDSM 555）gi|146346897|gb|EDK33433.1|（146346897）、酢酸キナーゼ（ジフテリア菌）gi|38200875|emb|CAE50580.1|（38200875）、酢酸キナーゼ（ビフィドバクテリウム・ロンガムNCC2705）gi|23326203|gb|AAN24779.1|（23326203）、酢酸キナーゼ（アセトキナーゼ）gi|67462089|sp|P0A6A3.1|ACKA_ECOLI（67462089）、およびAckA（バチルス・リケニホルミスDSM 13）gi|52349315|gb|AAU41949.1|（52349315）があり、かかるアクセッション番号に関連する配列を参照により本明細書に組み込む。

【0082】

リン酸アセチルトランスフェラーゼは、ptaにより大腸菌内においてコードされる。PTAは、酢酸のアセチル-CoAへの変換に関与する。具体的に、PTAはアセチル-coAのアセチル-リン酸への変換を触媒する。PTA相同体および変異体が知られている。NCBIから利用できる細菌リン酸アセチルトランスフェラーゼには、およそ1075種ある。例えば、かかる相同体および変異体には、リン酸アセチルトランスフェラーゼ Pta（リケッチア・フェリスUR RWXCal2）gi|67004021|gb|AAV60947.1|（67004021）、リン酸アセチルトランスフェラーゼ（ブフネラ・アフィディコラ株Cc（*Cinara cedri*））gi|116256910|gb|ABJ90592.1|（116256910）、pta（ブフネラ・アフィディコラ株Cc（*Cinara cedri*））gi|116515056|ref|YP_802685.1|（116515056）、pta（グロシナ・ブレビバルピスのウィグレスウォルシア・グロッシニディア内部共生体）gi|25166135|dbj|BAC24326.1|（25166135）、Pta（パスツレラ・マルトシダ亜種マルトシダ株Pm70）gi|12720993|gb|AAK02789.1|（12720993）、Pta（ロドスピリラム・ラブラム）gi|25989720|gb|AAN75024.1|（25989720）、pta（リステリア・ウェルシメリーserovar 6b株SLCC5334）gi|116742418|emb|CAK21542.1|（116742418）、Pta（マイコバクテリウム・アビウム亜種ヨーネ菌K-10）gi|41398816|gb|AAS06435.1|（41398816）、リン酸アセチルトランスフェラーゼ（pta）（ボレリア・ブルグドルフェリB31）gi|15594934|ref|NP_212723.1|（15594934）、リン酸アセチルトランスフェラーゼ（pta）（ボレリア・ブルグドルフェリB31）gi|2688508|gb|AAB91518.1|（2688508）、リン酸アセチルトランスフェラーゼ（pta）（インフルエンザ菌Rd KW20）gi|1574131|gb|AAC22857.1|（1574131）、リン酸アセチルトランスフェラーゼPta（リケッチア・ベリイRML369-C）gi|91206026|ref|YP_538381.1|（91206026）、リン酸アセチルトランスフェラーゼPta（リケッチア・ベリイRML369-C）gi|91206025|ref|YP_538380.1|（91206025）、リン酸アセチルトランスフェラーゼ pta（結核菌F11）gi|148720131|gb|ABR04756.1|（148720131）、リン酸アセチルトランスフェラーゼpta（結核菌株Haarlem）gi|134148886|gb|EBA40931.1|（134148886）、リン酸アセチルトランスフェラーゼ pta（結核菌C）gi|124599819|gb|EAY58829.1|（124599819）、リン酸アセチルトランスフェラーゼ Pta（リケッチア・ベリイRML369-C）gi|91069570|gb|ABE05292.1|（91069570）、リン酸アセチルトランスフェラーゼ Pta（リケッチア・ベリイRML369-C）gi|91069569|gb|ABE05291.1|（91069569）、リン酸アセチルトランスフェラーゼ（pta）（梅毒トレポネーマ亜種梅毒株Nic

hols) gi|15639088|ref|NP_218534.1| (15639088)、およびリン酸アセチルトランスフェラーゼ (pta) (梅毒トレポネーマ亜種梅毒株Nichols) gi|3322356|gb|AAC65090.1| (3322356) があり、アクセッション番号に関連する各配列の全体を参照により本明細書に組み込む。

【0083】

ピルビン酸-ギ酸リアーゼ (ギ酸アセチルトランスフェラーゼ) は、ピルビン酸のアセチル-CoAおよびギ酸への変換を触媒する酵素である。これは、有機フリーラジカルの生成による嫌気性条件下でのpfl活性化酵素により誘導され、リン酸制限中に大幅に減少する。ギ酸アセチルトランスフェラーゼは、pflBにより大腸菌においてコードされる。PFLB 10
 相同体および変異体が知られている。例えば、かかる相同体および変異体には、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ1 (ピルビン酸ギ酸-リアーゼ1) gi|129879|sp|P09373.2|PFLB_ECOLI (129879)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ1 (エルシニア・ペスチスC092) gi|16121663|ref|NP_404976.1| (16121663)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ1 (仮性結核菌I
 P 32953) gi|51595748|ref|YP_069939.1| (51595748)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ1 (エルシニア・ペスチス次亜種ハタネズミ株91001) gi|45441037|ref|NP_992576.1| (45441037)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ1 (エルシニア・ペスチスC092) gi|115347142|emb|CAL20035.1| (115347142)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ1 (エルシニア・
 ペスチス次亜種ハタネズミ株91001) gi|45435896|gb|AAS61453.1| (45435896)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ1 (仮性結核菌IP 32953) gi|51589030|emb|CAH20648.1| (51589030)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ1 (サルモネラ・エンテリカ亜種腸チフス菌株C
 T18) gi|16759843|ref|NP_455460.1| (16759843)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ1 (サルモネラ・エンテリカ亜種パラチフスA菌株ATCC 9150) gi|56413977|ref|YP_151052.1| (56413977)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ1 (サルモネラ・エンテリカ亜種腸チフ
 ス菌) gi|16502136|emb|CAD05373.1| (16502136)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ1 (サルモネラ・エンテリカ亜種パラチフスA菌株ATCC 9150) gi|56128234|gb|AAV77740.1| (56128234)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ1 (赤痢菌Sd197) gi|82777577|ref|YP_403926.1| (82777577)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ1 (シゲラ・フレックスネリ2a株2
 457T) gi|30062438|ref|NP_836609.1| (30062438)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ1 (シゲラ・フレックスネリ2a株2457T) gi|30040684|gb|AAP16415.1| (30040684)、ギ酸
 アセチルトランスフェラーゼ1 (シゲラ・フレックスネリ5株8401) gi|110614459|gb|ABF03126.1| (110614459)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ1 (赤痢菌Sd197) gi|81241725|gb|ABB62435.1| (81241725)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ1 (大腸菌O157:H7 EDL9
 33) gi|12514066|gb|AAG55388.1|AE005279_8 (12514066)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ1 (エルシニア・ペスチスKIM) gi|22126668|ref|NP_670091.1| (22126668)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ1 (ストレプトコッカス・アガラクティエA909) gi|76787667|r
 ef|YP_330335.1| (76787667)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ1 (エルシニア・ペスチスKIM) gi|21959683|gb|AAM86342.1|AE013882_3 (21959683)、ギ酸アセチルトランスフ
 ェラーゼ1 (ストレプトコッカス・アガラクティエA909) gi|76562724|gb|ABA45308.1| (76562724)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ1 (エルシニア エンテロコリチカ亜種エン
 テロコリチカ8081) gi|123441844|ref|YP_001005827.1| (123441844)、ギ酸アセチルト
 ランスフェラーゼ1 (シゲラ・フレックスネリ5株8401) gi|110804911|ref|YP_688431.1| (110804911)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ1 (大腸菌UTI89) gi|91210004|ref|YP_539990.1| (91210004)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ1 (シゲラ・ボイディSb227) g
 i|82544641|ref|YP_408588.1| (82544641)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ1 (シゲラ・ソネイSs046) gi|74311459|ref|YP_309878.1| (74311459)、ギ酸アセチルトランスフ
 ェラーゼ1 (肺炎桿菌亜種ニューモニエMGH 78578) gi|152969488|ref|YP_001334597.1| (152969488)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ1 (サルモネラ・エンテリカ亜種腸チフス
 菌Ty2) gi|29142384|ref|NP_805726.1| (29142384) ギ酸アセチルトランスフェラーゼ1 (シゲラ・フレックスネリ2a株301) gi|24112311|ref|NP_706821.1| (24112311)、ギ酸ア
 セチルトランスフェラーゼ1 (大腸菌O157:H7 EDL933) gi|15800764|ref|NP_286778.1| (

10

20

30

40

50

15800764)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ1(肺炎桿菌亜種ニューモニエMGH 78578) gi|150954337|gb|ABR76367.1|(150954337)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ1(エルシニア・ペスチスCA88-4125) gi|149366640|ref|ZP_01888674.1|(149366640)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ1(エルシニア・ペスチスCA88-4125) gi|149291014|gb|EDM41089.1|(149291014)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ1(エルシニア・エンテロコリチカ 亜種エンテロコリチカ8081) gi|122088805|emb|CAL11611.1|(122088805)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ1(シゲラ・ソネイSs046) gi|73854936|gb|AAZ87643.1|(73854936)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ1(大腸菌UTI89) gi|91071578|gb|ABE06459.1|(91071578)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ1(サルモネラ・エンテリカ亜種腸チフス菌Ty2) gi|29138014|gb|AA069575.1|(29138014)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ1(シゲラ・ポイディSb227) gi|81246052|gb|ABB66760.1|(81246052)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ1(シゲラ・フレックスネリ2a株301) gi|24051169|gb|AAN42528.1|(24051169)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ1(大腸菌O157:H7株Sakai) gi|13360445|dbj|BAB34409.1|(13360445)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ1(大腸菌O157:H7株Sakai) gi|15830240|ref|NP_309013.1|(15830240)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ I(ピルビン酸ギ酸-リアーゼ1)(フォトラブダス・ルミネッセンス亜種ラウモンディイ TT01) gi|36784986|emb|CAE13906.1|(36784986)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ I(ピルビン酸ギ酸-リアーゼ1)(フォトラブダス・ルミネッセンス亜種ラウモンディイ TT01) gi|37525558|ref|NP_928902.1|(37525558)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ(黄色ブドウ球菌亜種アウレウスMu50) gi|14245993|dbj|BAB56388.1|(14245993)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ(黄色ブドウ球菌亜種アウレウスMu50) gi|15923216|ref|NP_370750.1|(15923216)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ(ピルビン酸ギ酸-リアーゼ) gi|81706366|sp|Q7A7X6.1|PFLB_STAAN(81706366)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ(ピルビン酸ギ酸-リアーゼ) gi|81782287|sp|Q99WZ7.1|PFLB_STAAM(81782287)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ(ピルビン酸ギ酸-リアーゼ) gi|81704726|sp|Q7A1W9.1|PFLB_STAAW(81704726)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ(黄色ブドウ球菌亜種アウレウスMu3) gi|156720691|dbj|BAF77108.1|(156720691)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ(桿状細菌亜種アトロセプティカSCRI1043) gi|50121521|ref|YP_050688.1|(50121521)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ(桿状細菌亜種アトロセプティカSCRI1043) gi|49612047|emb|CAG75496.1|(49612047)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ(黄色ブドウ球菌亜種アウレウス株Newman) gi|150373174|dbj|BAF66434.1|(150373174)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ(シェワネラ・オネイデンシスMR-1) gi|24374439|ref|NP_718482.1|(24374439)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ(シェワネラ・オネイデンシスMR-1) gi|24349015|gb|AAN55926.1|AE015730_3(24349015)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ(アクチノバチルス・プルロニューモニア血清型3株JL03) gi|165976461|ref|YP_001652054.1|(165976461)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ(アクチノバチルス・プルロニューモニア血清型3株JL03) gi|165876562|gb|ABY69610.1|(165876562)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ(黄色ブドウ球菌黄色ブドウ球菌亜種アウレウスMW2) gi|21203365|dbj|BAB94066.1|(21203365)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ(黄色ブドウ球菌亜種アウレウスN315) gi|13700141|dbj|BAB41440.1|(13700141)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ(黄色ブドウ球菌亜種アウレウス株Newman) gi|151220374|ref|YP_001331197.1|(151220374)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ(黄色ブドウ球菌亜種アウレウスMu3) gi|156978556|ref|YP_001440815.1|(156978556)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ(シネココッカス種 JA-2-3B'a(2-13)) gi|86607744|ref|YP_476506.1|(86607744)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ(シネココッカス種 JA-3-3Ab) gi|86605195|ref|YP_473958.1|(86605195)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ(連鎖球菌ニューモニエD39) gi|116517188|ref|YP_P_815928.1|(116517188)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ(シネココッカス種 JA-2-3B'a(2-13)) gi|86556286|gb|ABD01243.1|(86556286)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ(シネココッカス種 JA-3-3Ab) gi|86553737|gb|ABC98695.1|(86553737)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ(クロストリジウム・ノバイNT) gi|118134908|gb|ABK61952.1

| (118134908)、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ (黄色ブドウ球菌亜種アウレウスMRSA 252) gi|49482458|ref|YP_039682.1| (49482458)、およびギ酸アセチルトランスフェラーゼ (黄色ブドウ球菌亜種アウレウスMRSA252) gi|49240587|emb|CAG39244.1| (49240587) があり、アクセッション番号に関連する各配列の全体を参照により本書に組み込む。

【0084】

α イソプロピルリンゴ酸シンターゼ (EC 2.3.3.13、時として2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ、アルファ-IPM シンターゼとも呼ばれる) は、3-メチル-2-オキソブタン酸 (2-オキソイソ吉草酸) とアセチル-CoAのアセチル基の縮合を触媒して、3-カルボキシ-3-ヒドロキシ-4-メチルペンタン酸 (2-イソプロピルリンゴ酸) を形成する。α イソプロピルリンゴ酸シンターゼは、leuAにより大腸菌内においてコードされる。LeuA相同体および変異体が知られている。例えば、かかる相同体および変異体には、例えば、2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ (コリネバクテリウム・グルタミカム) gi|452382|emb|CAA50295.1| (452382)、2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ (大腸菌K12) gi|16128068|ref|NP_414616.1| (16128068)、2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ (大腸菌K12) gi|1786261|gb|AAC73185.1| (1786261)、2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ (シロイヌナズナ) gi|15237194|ref|NP_197692.1| (15237194)、2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ (シロイヌナズナ) gi|42562149|ref|NP_173285.2| (42562149)、2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ (シロイヌナズナ) gi|15221125|ref|NP_177544.1| (15221125)、2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ (ストレプトマイセス・セリカラーA3 (2)) gi|32141173|ref|NP_733575.1| (32141173)、2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ (ヴェルコミクロビウムSH 1) gi|32477692|ref|NP_870686.1| (32477692)、2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ (ヴェルコミクロビウムSH 1) gi|32448246|emb|CAD77763.1| (32448246)、2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ (アッカーマンシア・ムシニフィラATCC BAA-835) gi|166241432|gb|EDR53404.1| (166241432)、2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ (ヘルペトシフォン・オーランティアカスATCC 23779) gi|159900959|ref|YP_001547206.1| (159900959)、2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ (ディノロセオバクター・シバエDFL 12) gi|159043149|ref|YP_001531943.1| (159043149)、2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ (サリニスボラ・アレニコラCNS-205) gi|159035933|ref|YP_001535186.1| (159035933)、2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ (トマトかいよう病菌亜種ミシガネンシスNCPPB 382) gi|148272757|ref|YP_001222318.1| (148272757)、2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ (大腸菌B) gi|124530643|ref|ZP_01701227.1| (124530643)、2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ (大腸菌C株ATCC 8739) gi|124499067|gb|EAY46563.1| (124499067)、2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ (百日咳菌Tohama I) gi|33591386|ref|NP_879030.1| (33591386)、2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ (ポリヌクレオバクター・ネッセサリウスSTIR1) gi|164564063|ref|ZP_02209880.1| (164564063)、2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ (ポリヌクレオバクター・ネッセサリウスSTIR1) gi|164506789|gb|EDQ94990.1| (164506789)、および2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ (パチルス・ウェイヘンステファネンシスKBAB4) gi|163939313|ref|YP_001644197.1| (163939313) があり、アクセッション番号に関連する配列の全体を参照により本書に組み込む。

【0085】

BCAAアミノトランスフェラーゼは、分岐鎖アミノ酸 (BCAA) の生成を触媒する。多数のアミノトランスフェラーゼは既知であり、大腸菌内のilvEを例証とする。典型的な相同体および変異体には、下記のアクセッション番号により指定される配列: ilvE (ミクロキスティス・エルギノーザPCC 7806) gi|159026756|emb|CA086637.1| (159026756)、IlvE (大腸菌) gi|87117962|gb|ABD20288.1| (87117962)、IlvE (大腸菌) gi|87117960|gb|ABD20287.1| (87117960)、IlvE (大腸菌) gi|87117958|gb|ABD20286.1| (87117958)、IlvE (シゲラ・フレックスネリ) gi|87117956|gb|ABD20285.1| (87117956)、IlvE (シゲラ・フレックスネリ) gi|87117954|gb|ABD20284.1| (87117954)、IlvE (シゲラ・フレックスネリ) gi|87117952|gb|ABD20283.1| (87117952)、IlvE (シゲラ・フレックスネリ) gi|87117950|gb|ABD20282.1| (87117950)、IlvE (シゲラ・フレックスネリ) gi|87117948|gb

|ABD20281.1| (87117948)、IlvE (シゲラ・フレックスネリ) gi|87117946|gb|ABD20280.1| (87117946)、IlvE (シゲラ・フレックスネリ) gi|87117944|gb|ABD20279.1| (87117944)、IlvE (シゲラ・フレックスネリ) gi|87117942|gb|ABD20278.1| (87117942)、IlvE (シゲラ・フレックスネリ) gi|87117940|gb|ABD20277.1| (87117940)、IlvE (シゲラ・フレックスネリ) gi|87117938|gb|ABD20276.1| (87117938)、IlvE (シゲラ・ディセンテリアエ) gi|87117936|gb|ABD20275.1| (87117936)、IlvE (シゲラ・ディセンテリアエ) gi|87117934|gb|ABD20274.1| (87117934)、IlvE (シゲラ・ディセンテリアエ) gi|87117932|gb|ABD20273.1| (87117932)、IlvE (シゲラ・ディセンテリアエ) gi|87117930|gb|ABD20272.1| (87117930)、およびIlvE (シゲラ・ディセンテリアエ) gi|87117928|gb|ABD20271.1| (87117928) があり、アクセッション番号に関連する各配列を参照により本明細書に組み込む。

10

【0086】

チロシニアミノトランスフェラーゼは、ジカルボキシアミノ酸および芳香族アミノ酸の基質の両方に対するアミノ基転移を触媒する。大腸菌のチロシニアミノトランスフェラーゼは、遺伝子tyrBによりコードされる。TyrB相同体および変異体が知られている。例えば、かかる相同体および変異体には、tyrB (ボルデテラ・ペツリイ) gi|163857093|ref|YP_001631391.1| (163857093)、tyrB (ボルデテラ・ペツリイ) gi|163260821|emb|CAP43123.1| (163260821)、アミノトランスフェラーゼ gi|551844|gb|AAA24704.1| (551844)、アミノトランスフェラーゼ (ブラディリゾビウム種 BTAi1) gi|146404387|gb|ABQ32893.1| (146404387)、チロシニアミノトランスフェラーゼ TyrB (サルモネラ・エンテリカ) gi|4775574|emb|CAB40973.2| (4775574)、チロシニアミノトランスフェラーゼ (チフス菌 LT2) gi|16422806|gb|AAL23072.1| (16422806)、およびチロシニアミノトランスフェラーゼ gi|148085|gb|AAA24703.1| (148085) があり、その各配列を参照により本明細書に組み込む。

20

【0087】

ピルビン酸酸化酵素は、ピルビン酸の酢酸およびCO₂への変換を触媒する。大腸菌では、ピルビン酸酸化酵素はpoxBによりコードされる。PoxBおよびその相同体および変異体には、例えば、ピルビン酸酸化酵素、PoxB (大腸菌) gi|685128|gb|AAB31180.1| |bbm|348451|bbs|154716 (685128)、PoxB (蛍光菌) gi|32815820|gb|AAP88293.1| (32815820)、poxB (大腸菌) gi|25269169|emb|CAD57486.1| (25269169)、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (サルモネラ・エンテリカ亜種腸チフス菌) gi|16502101|emb|CAD05337.1| (16502101)、ピルビン酸酸化酵素 (植物性乳酸菌) gi|41691702|gb|AAS10156.1| (41691702)、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (ブラディリゾビウム・ジャポニクム) gi|20257167|gb|AAM12352.1| (20257167)、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (エルシニア・ペスチスKIM) gi|22126698|ref|NP_670121.1| (22126698)、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (シトクロム) (エルシニア・ペスチス次亜種Antiqua株B42003004) gi|166211240|ref|ZP_02237275.1| (166211240)、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (シトクロム) (エルシニア・ペスチス次亜種Antiqua株B42003004) gi|166207011|gb|EDR51491.1| (166207011)、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (トマト斑葉細菌病株DC3000) gi|28869703|ref|NP_792322.1| (28869703)、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (チフス菌LT2) gi|16764297|ref|NP_459912.1| (16764297)、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (サルモネラ・エンテリカ亜種腸チフス菌株CT18) gi|16759808|ref|NP_455425.1| (16759808)、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (シトクロム) (コクシエラ・ブルネッティDugway 5J108-111) gi|154706110|ref|YP_001424132.1| (154706110)、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (トマトかいよう病菌亜種ミシガネンシスNCPPB 382) gi|148273312|ref|YP_001222873.1| (148273312)、ピルビン酸酸化酵素 (ラクトバチルス・アシドフィルスNCFM) gi|58338213|ref|YP_194798.1| (58338213)、およびピルビン酸デヒドロゲナーゼ (エルシニア・ペスチスC092) gi|16121638|ref|NP_404951.1| (16121638) があり、各アクセッション番号の配列を参照により本明細書に組み込む。

30

40

【0088】

L-トレオニン3-デヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.103) は、L-トレオニンのL-2-アミノ-3-

50

オキソブタン酸への変換を触媒する。遺伝子tdhは、L-トレオニン3-デヒドロゲナーゼをコードする。NCBIで認識されている細菌生物からのL-トレオニン3-デヒドロゲナーゼはおよそ700種存在する。tdhのさまざまな相同体および変異体には、L-トレオニン3-デヒドロゲナーゼ gi|135560|sp|P07913.1|TDH_ECOLI (135560)、L-トレオニン3-デヒドロゲナーゼ gi|166227854|sp|A4TSC6.1|TDH_YERPP (166227854)、L-トレオニン3-デヒドロゲナーゼ gi|166227853|sp|A1JHX8.1|TDH_YERE8 (166227853)、L-トレオニン3-デヒドロゲナーゼ gi|166227852|sp|A6UBM6.1|TDH_SINMW (166227852)、L-トレオニン3-デヒドロゲナーゼ gi|166227851|sp|A1RE07.1|TDH_SHE5W (166227851)、L-トレオニン3-デヒドロゲナーゼ gi|166227850|sp|A0L2Q3.1|TDH_SHE5A (166227850)、L-トレオニン3-デヒドロゲナーゼ gi|166227849|sp|A4YCC5.1|TDH_SHEPC (166227849)、L-トレオニン3-デヒドロゲナーゼ gi|166227848|sp|A3QJC8.1|TDH_SHELP (166227848)、L-トレオニン3-デヒドロゲナーゼ gi|166227847|sp|A6WUG6.1|TDH_SHEB8 (166227847)、L-トレオニン3-デヒドロゲナーゼ gi|166227846|sp|A3CYN0.1|TDH_SHEB5 (166227846)、L-トレオニン3-デヒドロゲナーゼ gi|166227845|sp|A1S1Q3.1|TDH_SHEAM (166227845)、L-トレオニン3-デヒドロゲナーゼ gi|166227844|sp|A4FND4.1|TDH_SACEN (166227844)、L-トレオニン3-デヒドロゲナーゼ gi|166227843|sp|A1SVW5.1|TDH_PSYIN (166227843)、L-トレオニン3-デヒドロゲナーゼ gi|166227842|sp|A5IGK7.1|TDH_LEGPC (166227842)、L-トレオニン3-デヒドロゲナーゼ gi|166227841|sp|A6TFL2.1|TDH_KLEP7 (166227841)、L-トレオニン3-デヒドロゲナーゼ gi|166227840|sp|A4IZ92.1|TDH_FRATW (166227840)、L-トレオニン3-デヒドロゲナーゼ gi|166227839|sp|A0Q5K3.1|TDH_FRATN (166227839)、L-トレオニン3-デヒドロゲナーゼ gi|166227838|sp|A7NDM9.1|TDH_FRATF (166227838)、L-トレオニン3-デヒドロゲナーゼ gi|166227837|sp|A7MID0.1|TDH_ENTS8 (166227837)、およびL-トレオニン3-デヒドロゲナーゼ gi|166227836|sp|A1AHF3.1|TDH_ECOK1 (166227836)があり、各アクセッション番号に関連する配列を参照により本明細書に組み込む。

【0089】

アセトヒドロキシ酸シンターゼ (例: ilvH) およびアセト乳酸シンターゼ (例: alsS、ilvB、ilvI) は、分岐鎖アミノ酸 (バリン、ロイシン、およびイソロイシン) の合成を触媒する。IlvHは、大腸菌内のアセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする (例えば参照により本明細書に組み込まれたアセトヒドロキシ酸シンターゼAHAS III (IlvH) (大腸菌) gi|40846|emb|CAA38855.1| (40846) を参照)。ilvHを構成する相同体および変異体やオペロンが知られており、これには例えば、ilvH (ミクロキスティス・エルギノーザPCC 7806) gi|159026908|emb|CA089159.1| (159026908)、IlvH (バチルス・アミロリキフアシエンスFZB42) gi|154686966|ref|YP_001422127.1| (154686966)、IlvH (バチルス・アミロリキフアシエンスFZB42) gi|154352817|gb|ABS74896.1| (154352817)、IlvH (ゼノラブダス・ネマトフィラ) gi|131054140|gb|AB032787.1| (131054140)、IlvH (チフス菌) gi|7631124|gb|AAF65177.1|AF117227_2 (7631124)、ilvN (リステリア菌) gi|16414606|emb|CAC97322.1| (16414606)、ilvN (リステリア・モノサイトゲネス) gi|16411438|emb|CAD00063.1| (16411438)、アセトヒドロキシ酸シンターゼ (カウロバクター・クレセンタス) gi|408939|gb|AAA23048.1| (408939)、アセトヒドロキシ酸シンターゼ I、小型サブユニット (サルモネラ・エンテリカ亜種腸チフス菌) gi|16504830|emb|CAD03199.1| (16504830)、アセトヒドロキシ酸シンターゼ、小型サブユニット (トロフェリマ・ホウィップリTW08/27) gi|28572714|ref|NP_789494.1| (28572714)、アセトヒドロキシ酸シンターゼ、小型サブユニット (トロフェリマ・ホウィップリTW08/27) gi|28410846|emb|CAD67232.1| (28410846)、アセトヒドロキシ酸シンターゼ I、小型サブユニット (サルモネラ・エンテリカ亜種パラチフスA菌株ATCC 9150) gi|56129933|gb|AAV79439.1| (56129933)、アセトヒドロキシ酸シンターゼ小型サブユニット、アセトヒドロキシ酸シンターゼ、小型サブユニット gi|551779|gb|AAA62430.1| (551779)、アセトヒドロキシ酸シンターゼ I、小型サブユニット (サルモネラ・エンテリカ亜種腸チフス菌Ty2) gi|29139650|gb|AA071216.1| (29139650)、アセトヒドロキシ酸シンターゼ小型サブユニット (スレプトミセス・シンナモネンシス) gi|5733116|gb|AAD49432.1|AF175526_1 (5733116)、アセトヒ

ドロキシ酸シンターゼ大型 サブユニット、およびアセトヒドロキシ酸シンターゼ、大型サブユニット gi|400334|gb|AAA62429.1| (400334) があり、アクセッション番号に関連する配列を参照により本明細書に組み込む。アセト乳酸シンターゼ遺伝子は、alsSおよびilvIを含む。ilvIおよびalsSの相同体が知られており、これには例えば、アセト乳酸シンターゼ小型サブユニット (ビフィドバクテリウム・ロンガムNCC2705) gi|23325489|gb|AAN24137.1| (23325489)、アセト乳酸シンターゼ小型サブユニット (ジオバチルス・ステアロサーモフィルス) gi|19918933|gb|AAL99357.1| (19918933)、アセト乳酸シンターゼ (アゾアルカス種 BH72) gi|119671178|emb|CAL95091.1| (119671178)、アセト乳酸シンターゼ小型サブユニット (ジフテリア菌) gi|38199954|emb|CAE49622.1| (38199954)、アセト乳酸シンターゼ (アゾカルカス種 BH72) gi|119669739|emb|CAL93652.1| (119669739)、アセト乳酸シンターゼ小型サブユニット (コリネバクテリウム・ジェイケイウムK411) gi|68263981|emb|CAI37469.1| (68263981)、アセト乳酸シンターゼ小型サブユニット (枯草菌) gi|1770067|emb|CAA99562.1| (1770067)、アセト乳酸シンターゼイソゾーム1小型サブユニット (AHAS-I) (アセトヒドロキシ酸シンターゼI小型サブユニット) (ALS-I) gi|83309006|sp|POADF8.1|ILVN_ECOLI (83309006)、アセト乳酸シンターゼ大型サブユニット (ジオバチルス・ステアロサーモフィルス) gi|19918932|gb|AAL99356.1| (19918932)、およびアセト乳酸シンターゼ、小型サブユニット (サーモアナエロバクターテンコジェネシスMB4) gi|20806556|ref|NP_621727.1| (20806556) があり、アクセッション番号に関連する配列を参照により本明細書に組み込む。NCBIには、およそ1120種のilvB相同体および変異体が列記されている。

10

20

【0090】

アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼは、イソロイシンおよびバリンの生合成について並行経路での第二の酵素である。IlvCは、大腸菌内でアセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼをコードする。ilvCの相同体および変異体が知られており、これには例えば、アセトヒドロキシ酸レダクトイソメラーゼ (シゾサッカロミセス・ポンベ972h-) gi|162312317|ref|NP_001018845.2| (162312317)、アセトヒドロキシ酸レダクトイソメラーゼ (シゾサッカロミセス・ポンベ) gi|3116142|emb|CAA18891.1| (3116142)、アセトヒドロキシ酸レダクトイソメラーゼ (サッカロミセス・セレピシエYJM789) gi|151940879|gb|EDN59261.1| (151940879)、Ilv5p: アセトヒドロキシ酸レダクトイソメラーゼ (サッカロミセス・セレピシエ) gi|609403|gb|AAB67753.1| (609403)、ACL198Wp (アスヒブヤ・ゴシピATCC 10895) gi|45185490|ref|NP_983206.1| (45185490)、ACL198Wp (アスヒブヤ・ゴシピATCC 10895) gi|44981208|gb|AAS51030.1| (44981208)、アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ、Ilv5x (サッカロミセス・セレピシエ) gi|957238|gb|AAB33579.1| |bbm|369068|bbs|165406 (957238)、アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ、Ilv5g (サッカロミセス・セレピシエ) gi|957236|gb|AAB33578.1| |bbm|369064|bbs|165405 (957236)、およびケト酸レダクトイソメラーゼ (シゾサッカロミセス・ポンベ) gi|2696654|dbj|BAA24000.1| (2696654) があり、アクセッション番号に関連する各配列を参照により本明細書に組み込む。

30

【0091】

ジヒドロキシ酸デヒドラターゼは、イソロイシンおよびバリンの生合成の第4のステップである、2,3-ジヒドロキシ-イソ吉草酸のアルファ-ケトイソ吉草酸への脱水を触媒する。IlvDおよびilv3はジヒドロキシ酸デヒドラターゼをコードする。ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ相同体および変異体が知られており、これには例えば、IlvD (ライ菌) gi|2104594|emb|CAB08798.1| (2104594)、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ (トロフェリマ・ホイップリTW08/27) gi|28410848|emb|CAD67234.1| (28410848)、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ (ライ菌) gi|13093837|emb|CAC32140.1| (13093837)、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ (ヴェルコミクロビウムSH 1) gi|32447871|emb|CAD77389.1| (32447871)、および推定ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ (黄色ブドウ球菌亜種アウレウスMRSA252) gi|49242408|emb|CAG41121.1| (49242408) があり、アクセッション番号に関連する各配列を参照により本明細書に組み込む。

40

50

【0092】

2-ケト酸デカルボキシラーゼは、2-ケト酸のそれぞれのアルデヒドへの変換を触媒する。例えば、2-ケトイソ吉草酸デカルボキシラーゼは、2-ケトイソ吉草酸のイソブチルアルデヒドへの変換を触媒する。多数の2-ケト酸デカルボキシラーゼが知られており、pdc、pdc1、pdc5、pdc6、aro10、thI3、kdcAおよびkivd遺伝子などが典型的なものである。2-ケト酸のそれぞれのアルデヒドへの変換に有益な例証的相同体および変異体は、下記のアクセッション番号により指定される配列と特定される酵素活性から構成される。gi|44921617|gb|AAS49166.1| 分岐鎖アルファ-ケト酸デカルボキシラーゼ（ラクトコッカス・ラクティス）、gi|15004729|ref|NP_149189.1| ピルビン酸デカルボキシラーゼ（クロストリジウム・アセトブチリカムATCC 824）、gi|82749898|ref|YP_415639.1| 推定ピルビン酸デカルボキシラーゼ（黄色ブドウ球菌RF122）、gi|77961217|ref|ZP_00825060.1| COG3961：ピルビン酸デカルボキシラーゼおよび関連するチアミンピロリン酸要求酵素（エルシニア・モラレッティイATCC 43969）、gi|71065418|ref|YP_264145.1| 推定ピルビン酸デカルボキシラーゼ（ホッキョクサイクロバクター273-4）、gi|16761331|ref|NP_456948.1| 推定デカルボキシラーゼ（サルモネラ・エンテリカ亜種腸チフス菌株CT18）、gi|93005792|ref|YP_580229.1| ピルビン酸デカルボキシラーゼ（Psychrobacter cryohalolentis K5）、gi|23129016|ref|ZP_00110850.1| COG3961：ピルビン酸デカルボキシラーゼおよび関連するチアミンピロリン酸要求酵素（窒素固定藍藻PCC 73102）、gi|16417060|gb|AAL18557.1|AF354297_1 ピルビン酸デカルボキシラーゼ（サルシナ・ベントリクリ）、gi|15607993|ref|NP_215368.1| 推定ピルビン酸またはインドール-3-ピルビン酸デカルボキシラーゼ PDC（結核菌H37Rv）、gi|41406881|ref|NP_959717.1| Pdc（マイコバクテリウム・アビウム亜種ヨーネ菌K-10）、gi|91779968|ref|YP_555176.1| 推定ピルビン酸デカルボキシラーゼ（バークホルデリア・ゼノボランスLB400）、gi|15828161|ref|NP_302424.1| ピルビン酸（またはインドールピルビン酸）デカルボキシラーゼ（ライ菌TN）、gi|118616174|ref|YP_904506.1| ピルビン酸またはインドール-3-ピルビン酸デカルボキシラーゼPdc（マイコバクテリウム・ウルセランスAgy99）、gi|67989660|ref|NP_001018185.1| 仮定タンパク質SPAC3H8.01（シゾサッカロミセス・ボンベ972h-）、gi|21666011|gb|AAM73540.1|AF282847_1 ピルビン酸デカルボキシラーゼPdcB（リゾプス・オリザエ）、gi|69291130|ref|ZP_00619161.1| ピルビン酸デカルボキシラーゼ：ピルビン酸デカルボキシラーゼ（キネオコッカス・ラジオトレランスSRS30216）、gi|66363022|ref|XP_628477.1| ピルビン酸デカルボキシラーゼ（クリプトスポリジウム・パルバムIowa II）、gi|70981398|ref|XP_731481.1| ピルビン酸デカルボキシラーゼ（アスペルギルス・フミガーツスAf293）、gi|121704274|ref|XP_001270401.1| ピルビン酸デカルボキシラーゼ、推定（アスペルギルス・クラバタスNRRL 1）、gi|119467089|ref|XP_001257351.1| ピルビン酸デカルボキシラーゼ、推定（ネオサルトリア・フィシェリNRRL 181）、gi|26554143|ref|NP_758077.1| ピルビン酸デカルボキシラーゼ（マイコプラズマ・ペネトランスHF-2）、gi|21666009|gb|AAM73539.1|AF282846_1 ピルビン酸デカルボキシラーゼPdcA（リゾプス・オリザエ）。

【0093】

アルコールデヒドロゲナーゼ（adh）は、アミノ酸異化作用の最終ステップである、アルコールの長鎖または複合アルコールへの変換を触媒する。当技術分野では、さまざまなadh遺伝子が知られている。本明細書に示すとおり、adh1相同体および変異体には例えば、adh2、adh3、adh4、adh5、adh 6およびsfa1がある（例えばSFA（サッカロミセス・セレビシエ）gi|288591|emb|CAA48161.1|（288591）、アクセッション番号に関連する配列を参照により本明細書に組み込む）。

【0094】

シトラマル酸シンターゼは、ピルビン酸および酢酸の縮合を触媒する。CimAはシトラマル酸シンターゼをコードする。相同体および変異体が知られており、これには例えば、シトラマル酸シンターゼ（レプトスピラ・ビフレクサ血清型パトック菌）gi|116664687|gb|ABK13757.1|（116664687）、シトラマル酸シンターゼ（レプトスピラ・ビフレクサ血清型

Monteralerio) gi|116664685|gb|ABK13756.1| (116664685)、シトラマル酸シンターゼ (レプトスピラ・インターロガンス血清型ヘブドマディス) gi|116664683|gb|ABK13755.1| (116664683)、シトラマル酸シンターゼ (レプトスピラ・インターロガンス血清型ボモナ) gi|116664681|gb|ABK13754.1| (116664681)、シトラマル酸シンターゼ (レプトスピラ・インターロガンス血清型オーストラリス) gi|116664679|gb|ABK13753.1| (116664679)、シトラマル酸シンターゼ (レプトスピラ・インターロガンス血清型オータムナリス) gi|116664677|gb|ABK13752.1| (116664677)、シトラマル酸シンターゼ (レプトスピラ・インターロガンス血清型ピロゲネス) gi|116664675|gb|ABK13751.1| (116664675)、シトラマル酸シンターゼ (レプトスピラ・インターロガンス血清型カニコラ) gi|116664673|gb|ABK13750.1| (116664673)、シトラマル酸シンターゼ (レプトスピラ・インターロガンス血清型Lai) gi|116664671|gb|ABK13749.1| (116664671)、CimA (レプトスピラ・メイリ血清型Semaranga) gi|119720987|gb|ABL98031.1| (119720987)、(R)-シトラマル酸シンターゼ gi|2492795|sp|Q58787.1|CIMA_METJA (2492795)、(R)-シトラマル酸シンターゼ gi|22095547|sp|P58966.1|CIMA_METMA (22095547)、(R)-シトラマル酸シンターゼ gi|22001554|sp|Q8TJJ1.1|CIMA_METAC (22001554)、(R)-シトラマル酸シンターゼ gi|22001553|sp|026819.1|CIMA_METTH (22001553)、(R)-シトラマル酸シンターゼ gi|22001555|sp|Q8TYB1.1|CIMA_METKA (22001555)、(R)-シトラマル酸シンターゼ (メタノサーモコッカス・マルバリディスS2) gi|45358581|ref|NP_988138.1| (45358581)、(R)-シトラマル酸シンターゼ (メタノサーモコッカス・マルバリディスS2) gi|44921339|emb|CAF30574.1| (44921339)、および類似の (R)-シトラマル酸シンターゼ (Candidatus Kuenenia stuttgartiensis) gi|91203541|emb|CAJ71194.1| (91203541) があり、前記のアクセッション番号と関連する各配列を参照により本明細書に組み込む。

【0095】

1つの実施態様において、開示の微生物はrrnBT14DlacZWJ16 hsdR514 DaraBADAH33 DrhaBADLD78 (lacIq供給のためXL-1 blueからF'を形質導入)、 $\Delta adhE$ 、 $\Delta ldhA$ 、 $\Delta frdBC$ 、 Δfnr 、 Δpta および $\Delta pflB$ から構成され、pSA55およびpSA69を含有する大腸菌として特徴付けることができ、ここでpSA55はPLlac01およびアンピシリン耐性遺伝子の制御下にあるkivd (ラクトコッカス・ラクティス) およびadh2 (サッカロミセス・セレビシエ) 遺伝子を持つColE1起源由来プラスミドであり、pSA69はPLlac01およびカナマイシン耐性遺伝子の制御下にあるalsS (枯草菌)、ilvC (大腸菌) およびilvD (大腸菌) 遺伝子を持つp15A起源由来プラスミドである。

【0096】

別の実施態様において、開示の微生物は、pCS49、pSA62およびpSA55Iを持つrrnBT14DlacZWJ16 hsdR514 DaraBADAH33 DrhaBADLD78 (lacIq供給のためXL-1 blueからF'を形質導入)、 $\Delta metA$ 、 Δtdh 、 $\Delta ilvB$ 、 $\Delta ilvI$ および $\Delta adhE$ から構成される大腸菌として特徴付けることができ、ここでpSA55IはPLlac01およびアンピシリン耐性遺伝子の後にlacIを持つアンピシリン耐性遺伝子の制御下にあるkivd (ラクトコッカス・ラクティス) およびadh2 (サッカロミセス・セレビシエ) 遺伝子を持つColE1起源由来プラスミドから構成され、pSA62はPLlac01およびカナマイシン耐性遺伝子の制御下にあるilvA (大腸菌) およびleuABCD (大腸菌) 遺伝子を持つp15A起源由来プラスミドであり、pCS49はPLlac01およびスペクチノマイシン耐性遺伝子の制御下にあるthrA (fbr) BC (大腸菌) 遺伝子を持つpSC101*起源由来プラスミドである。

【0097】

本開示は、また寄託された微生物も提供する。寄託された微生物は例証のみのものであり、開示に基づき、当業者であればさまざまな種または遺伝子型の追加的な親生物を組換えて、イソブタノールおよびn-ブタノールを生成する開示の微生物へと達することができる。

【0098】

開示では、SA237と指定される組換え微生物を提供し、2008年2月7日にATCCに寄託されたATCC受託番号は_____である。開示には、混合培養物を含めてATCC受託番号を_____

10

20

30

40

50

とする微生物集団から構成される、微生物の培養物が含まれる。また、ATCC受託番号_____から由来するポリヌクレオチド断片も提供されており、これは、グルコースのグラム当たり0.12～約0.41グラムのイソブタノール収率でイソブタノールを生成するための準備に有益である。例えば、かかる断片は、約1000の塩基対～数百万の塩基対より構成することができる。また、イソブタノールまたはフェニルエタノールの生成においてATCC受託番号_____を持つ微生物集団から構成されるバイオリアクターも含まれる。当業者であれば、寄託された微生物を用いて、ノックアウトまたは遺伝子破壊の位置を含め、本明細書に記載される遺伝子およびポリヌクレオチドをコードする寄託された生物またはその断片の配列をすぐに決定することができる。

【0099】

本開示はまた、CRS-BuOH23と指定された組換え微生物も提供し、2008年2月7日にATCCに寄託されたATCC受託番号は_____である。これには、混合培養物を含めてATCC受託番号を_____とする微生物集団の微生物の培養物も含む。また、ATCC 受託番号_____から由来するポリヌクレオチド断片も提供されており、これはn-ブタノールを生成する微生物の準備に有益である。例えば、かかる断片は約1000つの塩基対～数百万の塩基対を持つポリヌクレオチドから構成されうる。また、n-ブタノールの生成においてATCC受託番号_____を持つ微生物集団から構成されるバイオリアクターも含まれる。当業者であれば、寄託された微生物を用いて、ノックアウトまたは遺伝子破壊の位置を含め、本明細書に記載される遺伝子およびポリヌクレオチドをコードする寄託された生物またはその断片の配列をすぐに決定することができる。

【0100】

さまざまな範囲の微生物を改変し、例えば1-プロパノール、イソブタノール、1-ブタノール、2-メチル1-ブタノール、3-メチル1-ブタノールまたは2-フェニルエタノールの生成に適当な組換え代謝経路を含めることができることが理解される。また、さまざまな微生物は、本明細書に記載する組換え微生物での使用に適当な標的酵素をコードする遺伝子物質の「源」としての役目を果たしうることも理解される。「微生物 (microorganism)」という用語は、古細菌ドメイン、細菌ドメインおよび真核生物ドメインからの原核・真核の微生物種を含み、真核生物ドメインには酵母菌および糸状菌、原生動物、藻類、または高等原生生物を含む。「微生物細胞 (microbial cells)」および「微生物 (microbes)」という用語は、微生物という用語と同じ意味で使用される。

【0101】

「原核生物」という用語は、当技術分野において、核またはその他の細胞小器官を持たない細胞であると認識・言及される。原核生物は一般的に、細菌および古細菌ドメインという二つのドメインの1つに分類される。古細菌ドメインおよび細菌ドメインの生物間の確実な違いは、16SリボソームRNAにおけるヌクレオチド塩基配列の基本的相違に基づく。

【0102】

「古細菌」という用語は、典型的には通常ではない環境で見受けられ、リボソームタンパク質の数や細胞壁内でのムラミン酸の欠如を含む幾つかの基準により残りの原核生物とは区別される、メンドシクテス門の生物分野を意味する。ssrRNA分析に基づき、古細菌ドメインはクレンアーキオータ門およびユリアーキオータ門という二つの系統発生的に異なる群から構成される。その生理機能に基づき、古細菌ドメインは、メタン菌（メタンを生成する原核生物）、高度好塩菌（非常に高い塩濃度 (NaCl) で生きる原核生物）および高度好熱菌（非常に高い温度で生きる原核生物）という三つのタイプに整理することができる。細菌とは異なる点として上記に統一する古細菌の機能（すなわち細胞壁内でのムレイン欠如、エステル結合した膜脂質など）の他には、これらの原核生物は特定の居住地に自らを適応させる独自の構造的または化学的な特質を示している。クレンアーキオータ門は主に高度好塩菌の硫黄依存性原核生物から構成され、ユリアーキオータ門にはメタン菌および高度好塩菌を含む。

【0103】

「細菌」、または「真正細菌」とは、原核生物のドメインを意味する。細菌には、少な

くとも下記の11つの異なる群がある。(1) グラム陽性 (gram+) 細菌、これには(1) 高G+C群 (放線菌、抗酸菌、ミクロコッカス、他) (2) 低G+C群 (バチルス属菌、クロストリジウム、乳酸菌、ブドウ球菌、連鎖球菌、マイコプラズマ) という二つの主な細分がある。(2) プロテオバクテリア、例えば紫色光合成+非光合成グラム陰性菌 (大多数の「一般的な」グラム陰性菌を含む)。(3) 藍色細菌、例えば酸素発生型光合成生物。(4) スピロヘータおよび関連する種。(5) プランクトミセス。(6) バクテロイデス、フラボバクテリウム。(7) クラミジア。(8) 緑色硫黄細菌。(9) 緑色非硫黄細菌 (嫌気性光合成も)。(10) 放射線耐性ミクロコッカスおよび近縁個体。(11) サーモトガおよびサーモシフォ好熱菌。

【0104】

10

「グラム陰性細菌」は、球菌、非腸内桿菌、および腸内桿菌を含む。グラム陰性菌の属には、例えば、ナイセリア、スピリルム、バステラ、ブルセラ、エルシニア、フランシセラ、ヘモフィルス、ボルデテラ、エシェリキア、サルモネラ、赤痢菌、クレブシエラ、プロテウス、ビブリオ、緑膿菌、バクテロイデス、アセトバクター、アエロバクター、アグロバクテリウム、アゾトバクター、らせん菌、セラチア菌、ビブリオ、リゾビウム、クラミジア、リケッチア、トレポネーマ、およびフソバクテリウムが含まれる。

【0105】

「グラム陽性細菌」は、球菌、非孢子形成桿菌、および孢子形成桿菌を含む。グラム陽性菌の属には、例えば、アクチノミセス、バチルス属菌、クロストリジウム、コリネバクテリウム、エリシペロスリクス、乳酸菌、リステリア、マイコバクテリウム、ミキソコッカス、ノカルジア、ブドウ球菌、連鎖球菌、およびストレプトマイセスが含まれる。

20

【0106】

「組換え微生物」および「組換え宿主細胞」という用語は、本明細書において同じ意味で使用され、内因性ポリヌクレオチドを発現または過剰発現する、または内因性遺伝子の発現が低下した非内因性配列(バクターに含まれたものなど)を発現するために組換えされた微生物を意味する。ポリヌクレオチドは一般的に、上述のとおり望ましい代謝産物を生成するための代謝経路に関与する標的酵素をコードする。従って、本明細書に記載される組換え微生物は、親微生物によって以前に発現または過剰発現されていない標的酵素を発現または過剰発現させるよう遺伝子工学された。「組換え微生物」および「組換え宿主細胞」という用語は、特定の組換え微生物だけでなく、かかる微生物の子孫または潜在的な子孫も含むことが理解される。

30

【0107】

「親微生物」とは、組換え微生物の生成に使用される細胞を意味する。「親微生物」という用語は、自然発生する細胞、すなわち遺伝子組換えされていない「野生型」細胞を記述するものである。「親微生物」という用語はまた、遺伝子組換えされたものの標的酵素、例えば1-プロパノール、イソブタノール、1-ブタノール、2-メチル1-ブタノール、3-メチル1-ブタノールまたは2-フェニルエタノールなどの望ましい代謝産物の生成のための合成経路に関与する酵素を発現または過剰発現していない細胞を記述する。例えば、野生型微生物は、チオラーゼなどの第一の標的酵素を発現または過剰発現するために遺伝子組換えすることができる。この微生物は組換えされる微生物の生成において親微生物として機能し、第二の標的酵素、例えばヒドロキシブチリルCoAデヒドロゲナーゼなどを発現または過剰発現することができる。次に、例えばチオラーゼおよびヒドロキシブチリルCoAデヒドロゲナーゼを発現するよう組換えされた微生物は、第三の標的酵素、例えばクロトナーゼを発現または過剰発現するために組換えすることもできる。従って、親微生物は、次に起こる遺伝子組換え事象に対する基準細胞として機能する。各組換え事象は、核酸分子を基準細胞に導入することで達成できる。導入は、標的酵素の発現または過剰発現を促進する。「促進する」という用語は、例えば親微生物におけるプロモーター配列などの遺伝子組換えを通して標的酵素をコードする内因性ポリヌクレオチドの活性化を包含することが理解される。さらに、「促進する」という用語は、標的酵素をコードする外因性ポリヌクレオチドの親微生物内への導入も包含することが理解される。

40

50

【0108】

別の実施態様において、適当な炭素基質を例えば1-プロパノール、イソブタノール、1-ブタノール、2-メチル1-ブタノール、3-メチル1-ブタノールまたは2-フェニルエタノールに変換する組換え微生物を生成する方法が提供される。方法には、例えば、アセトヒドロキシ酸シンターゼ（例：ilvIHオペロン）、アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ（例：ilvC）、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ（例：ilvD）、2-ケト酸デカルボキシラーゼ（例：PDC6、ARO10、THI3、kivd、またはpdc）、2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ（例：leuA）、ベータ-イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ（例：leuB）、イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼ（例：leuCDオペロン）、トレオニンデヒドラターゼ（例：ilvA）、アルファ-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ（例：cimA）、ベータ-イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ（例：leuB）、イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼ（例：leuCDオペロン）、トレオニンデヒドラターゼ（例：ilvA）、アセト乳酸シンターゼ（例：ilvMGまたはilvNB）、アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ（例：ilvC）、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ（例：ilvD）、ベータ-イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ（例：leuB）、コリスミ酸ムターゼP/プレフェン酸デヒドラターゼ（例：pheA）、コリスミ酸ムターゼT/プレフェン酸デヒドロゲナーゼ（例：tyrA）、2-ケト酸デカルボキシラーゼ（例：kivd、PDC6、またはTHI3）、およびアルコールデヒドロゲナーゼ活性を含むポリペプチドをコードする1つ以上の組換えポリヌクレオチドによる微生物の形質変換が含まれる。相同体、変異体、断片、関連する融合タンパク質、またはその機能同等物を含む代謝産物を生成する上で有益な酵素をコードするポリヌクレオチドは、細菌細胞または酵母細胞などの適切な宿主細胞においてかかるポリペプチドの発現を指示する組換え核酸分子に使用される。非機能または非コード配列の追加などポリヌクレオチドのコード活性を変えない配列の追加は、塩基核酸の保存的変異であることが理解される。酵素の「活性」は、すなわち「機能する」ために代謝産物内で結果生じる反応を触媒する能力を測り、反応の代謝産物が生成される割合で発現されうる。例えば、酵素活性は、単位時間当たりまたは酵素単位当たり（例：濃度または重量）、または親和性または解離定数という点で、代謝産物量として示すことができる。

【0109】

本明細書では同じ意味で使用される「タンパク質」または「ポリペプチド」は、ペプチド結合と呼ばれる化学結合により結合されたアミノ酸と呼ばれる化学的成分の1つ以上の鎖から構成される。「酵素」は、1つ以上の化学的または生化学反応を多かれ少なかれ具体的に触媒または促進する完全または主にタンパク質から構成される物質を意味する。「酵素」という用語はまた、触媒ポリヌクレオチド（例：RNAまたはDNA）も意味する。「天然」または「野生型」タンパク質、酵素、ポリヌクレオチド、遺伝子、または細胞は、自然に発生するタンパク質、酵素、ポリヌクレオチド、遺伝子、または細胞を意味する。

【0110】

上述されたポリヌクレオチドには「遺伝子」を含み、上述の核酸分子には「ベクター」または「プラスミド」を含むことが理解される。例えば、ケトチオラーゼをコードするポリヌクレオチドは、atoB遺伝子またはその相同体により、またはfadA遺伝子またはその相同体によりコードすることができる。従って、「遺伝子」（または「構造遺伝子」とも呼ばれる）という用語は、アミノ酸の特定の配列をコードするポリヌクレオチドを意味し、すべてまたは一部の1つ以上のタンパク質または酵素から構成され、例えば遺伝子が発現される条件を決定するプロモーター配列などの調節（非転写）DNA配列を含みうる。遺伝子の転写領域には、イントロン、5'-非翻訳領域（UTR）、および3'-UTRを含む非翻訳領域ならびにコード配列が含まれる。「核酸」または「組換え核酸」という用語は、デオキシリボ核酸（DNA）、また適切な場合はリボ核酸（RNA）などのポリヌクレオチドを意味する。遺伝子配列に関連する「発現」という用語は、遺伝子の転写および、適切な場合には結果生じるmRNA転写のタンパク質への翻訳を意味する。それ故、文脈より明らかなように、タンパク質の発現はオープン・リーディング・フレーム配列の転写および翻訳から生じる。

10

20

30

40

50

【0111】

「オペロン」という用語は、共通プロモーターからの単一の転写単位として転写される二つ以上の遺伝子を意味する。幾つかの実施態様において、オペロンから成る遺伝子は隣接遺伝子である。全体的なオペロンの転写は共通プロモーターを改変することで、改変（すなわち増加、減少、除去）可能であることが理解される。別の方法として、オペロンにおける遺伝子または遺伝子の組み合わせは、コードされたポリペプチドの機能または活性を変えるために改変できる。改変により、コードされたポリペプチドの活性が結果的に向上する。さらに、改変はコードされたポリペプチドに新規活性を提供する可能性がある。例証的な新規活性には、代替的基質の使用および／または代替的な環境条件で機能を果たす能力がある。

10

【0112】

「ベクター」は、生物、細胞、または細胞成分の間で核酸が増殖および／または転移されうる手段である。ベクターには、自己複製または宿主細胞の染色体に統合できる「エピソーム」であるウイルス、バクテリオファージ、プロウイルス、プラスミド、ファージミド、トランスポゾン、およびYAC（酵母人工染色体）、BAC（細菌人工染色体）、およびPLAC（植物人工染色体）などの人工染色体や同類物が含まれる。ベクターはまた、性質的にエピソームではない、裸のRNAポリヌクレオチド、裸のDNAポリヌクレオチド、同一の鎖内においてDNAおよびRNAの両方から構成されるポリヌクレオチド、ポリ-リジン共役DNAまたはRNA、ペプチド共役DNAまたはRNA、リボソーム共役DNA、または同類物、またはアグロバクテリウムもしくは細菌などの1つ以上の上記ポリヌクレオチド構築物から構成される生物でありうる。

20

【0113】

「形質転換」は、ベクターが宿主細胞に導入される過程を意味する。形質転換（または形質導入、またはトランスフェクション）は、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、バイオリスティック（または粒子衝撃媒介性の送達）、またはアグロバクテリウム媒介性の形質転換を含む多数の任意の手段により達成することができる。

【0114】

当業者であれば、遺伝子コードの縮重的性質を理由として、ヌクレオチド配列が異なるさまざまなDNA化合物を使用して開示の任意のアミノ酸配列をコードできることが認識されるだろう。上述される生合成酵素をコードする天然のDNA配列は、開示の実施態様を例証するためにのみ本明細書で言及されており、開示には、開示方法で使用される酵素のポリペプチドおよびタンパク質のアミノ酸配列をコードする配列のDNA化合物が含まれる。類似の方法で、ポリペプチドは通常、望ましい活性の損失または大幅な損失がない状態での、1つ以上のアミノ酸のアミノ酸配列への置換、欠失、および挿入を許容することができる。開示には代替的なアミノ酸配列のポリペプチドを含み、DNA配列によりコードされるアミノ酸配列は開示の実施態様を例証するのみである。

30

【0115】

本開示は、下記でより詳述されるとおり、1つ以上の標的酵素をコードする、組換えDNA発現ベクターまたはプラスミドという形態での核酸分子を提供する。一般的に、かかるベクターは宿主微生物の細胞質で複製するか、宿主微生物の染色体DNAへと統合されうる。いずれの場合でも、ベクターは安定したベクター（すなわちベクターは選択圧のみがかかる場合でも多くの細胞分割において引き続き存在する）または一過性ベクター（すなわちベクターが細胞分割数の増加に伴い宿主微生物によって徐々に喪失する）でありうる。開示は、DNA分子を分離（すなわち純粋なものではないが、自然で見られない存在度および／または濃度で調合液に存在する）および精製（すなわち実質的に汚染物質のない、または実質的に対応するDNAが自然界に見られる物質のない）した形態で提供する。

40

【0116】

本明細書では、方法において有益な1-プロパノール、イソブタノール、1-ブタノール、2-メチル1-ブタノール、3-メチル1-ブタノール、および／または2-フェニルエタノールの生合成に関与する、1つ以上の生合成遺伝子および組換えDNA発現ベクターの異種発現の方

50

法を提供している。それ故、かかる核酸を含む組換え発現ベクターも開示範囲内である。発現ベクターという用語は、宿主微生物または無細胞転写および翻訳システムに導入される核酸を意味する。発現ベクターは、細胞質内の複製ベクターなど細胞内コンパートメントにおける染色体またはその他のDNAの一部として、微生物内に恒久的または一時的に維持することができる。発現ベクターはまた、RNAの発現を促すプロモーターを含み、これが通常は微生物または細胞抽出物におけるポリペプチドへと翻訳される。RNAのタンパク質への効率的な翻訳のために、発現ベクターはまた通常、発現対象の遺伝子のコード配列の開始コドンの上流に位置するリボソーム結合部位配列を含む。エンハンサー、分泌シグナル配列、転写終止配列、およびベクターを含む宿主微生物が特定および／または選択されうる基となる1つ以上のマーカー遺伝子などのその他の要素もまた、発現ベクターに存在することができる。選択可能マーカー、すなわち抗生物質抵抗性または感受性を与える遺伝子も使用され、細胞が適切な選択培地へと生育した時に形質転換された細胞で選択可能表現型を与える。

10

【0117】

発現ベクターのさまざまな構成要素は広く異なるが、ベクターの意図される用途およびベクターが発現を複製または促す意図を持つ宿主細胞に左右される。大腸菌、酵母、ストレプトミセス、およびその他の一般に使用される細胞において、遺伝子の発現およびベクターの維持に適当な発現ベクターの構成要素は、広く知られており市販されている。例えば、開示の発現ベクターに含むべき適当なプロモーターには、真核または原核宿主微生物で機能するものも含まれる。プロモーターは、宿主微生物の生育に関して発現の調節を実現し、化学的または物理的刺激に反応した遺伝子の発現を開始・中止する調節配列から構成することができる。大腸菌および特定のその他の細菌宿主細胞について、生合成酵素、抗生物質抵抗性を与える酵素、およびファージタンパク質のための遺伝子から由来するプロモーターを使用することができ、これには例えば、ガラクトース、ラクトース (lac)、マルトース、トリプトファン (trp)、ベータ-ラクタマーゼ (bla)、バクテリオファージλ PL、およびT5プロモーターがある。さらに、tacプロモーター (米国特許第4,551,433号) などの合成プロモーターも使用することができる。大腸菌の発現ベクターでは、pUC、p1P、p1、およびpBRからのものなど大腸菌の複製起点を含むことが有益である。

20

【0118】

それ故、組換え発現ベクターは、少なくとも1つの発現システムを含み、これが次に適合性の宿主細胞におけるコード配列の発現を実現するため操作するプロモーターおよび随意に終止配列に機能的に連結される、少なくとも一部のPKSおよび／またはその他の生合成遺伝子コード配列から構成される。宿主細胞は、過剰染色体要素または染色体に統合されたものとしての発現システム配列を含めるよう、開示の組換えDNA発現ベクターによる形質転換によって改変される。

30

【0119】

本開示の核酸は、標準的なPCR増幅技法および下記の実施例セクションに記載する手順に従って、テンプレートとしてcDNA、mRNAまたはゲノムDNA、および適切なオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、増幅することができる。そのように増幅された核酸は、適切なベクターへとクローン化され、DNA配列分析により特徴付けを行うことができる。さらに、ヌクレオチド配列に対応するオリゴヌクレオチドは、標準的な合成技法、例えば自動DNA合成器を用いて準備することができる。

40

【0120】

本明細書に記載される酵素と相同のポリペプチドをコードする単離された核酸分子は、1つ以上のアミノ酸置換、付加または欠失がコードされたタンパク質に導入されるように、特定のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列へと1つ以上のヌクレオチド置換、付加または欠失を導入することで作製できることが理解される。突然変異は、部位特異的突然変異誘発およびPCR媒介性の突然変異誘発などの標準的な技法により、ポリヌクレオチドへと導入することができる。アミノ酸の非保存的置換 (上記参照) を行うことが望ましい場合の位置とは対照的に、一部の位置ではアミノ酸の保存的置換を行うことがより好

50

ましい。「アミノ酸の保存的置換」は、類似の側鎖を持つアミノ酸残基によりアミノ酸残基が置き換えられる置換である。類似の側鎖を持つアミノ酸残基ファミリーは、当技術分野において定義されてきた。これらのファミリーには、塩基側鎖（例：リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例：アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電性極性側鎖（例：グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例：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）、ベータ-分岐側鎖（例：トレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖（例：チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を持つアミノ酸が含まれる。

【0121】

別の実施態様において、例えば1-プロパノール、イソブタノール、1-ブタノール、2-メチル1-ブタノール、3-メチル1-ブタノールまたは2-フェニルエタノールを生成する方法が提供される。方法は、適当な基質が存在し、基質の1-プロパノール、イソブタノール、1-ブタノール、2-メチル1-ブタノール、3-メチル1-ブタノールまたは2-フェニルエタノールへの変換に適当な条件下において、本明細書で提供されるとおりの組換え微生物の培養を含む。本明細書で提供される微生物により生成されるアルコールは、当業者に既知の任意の方法により検出することができる。かかる方法は、下記でより詳述され図6に示す質量分析法を含む。本明細書に記載される生育に適当な培養条件および組換え微生物の維持は、下記の実施例に記述されている。当業者であれば、各微生物の要件に順応するようにかかる条件を修正することができることが認識されるだろう。

【0122】

前記で考察したとおり、ベクター、プロモーターおよび多くのその他の関連するトピックの使用を含む、本明細書で有益な分子生物学的技法を記述する一般的な文章には、「Berg and Kimmel, Guide to Molecule Cloning Techniques, Methods in Enzymology Volume 152 (Academic Press, Inc., San Diego, Calif.) (「バーガー」)」 「Sambrook et al., Molecule Cloning--A Laboratory Manual, 2d ed., Vol.1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989 (「サンプルック」)」 および 「Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1999年まで増補) (「オースベル」)」がある。in vitro増幅方法により当業者を導く上で十分なプロトコルの例には、例えば開示の相同性核酸の生成に対する、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、リガーゼ連鎖反応 (LCR)、Q-β-レプリカーゼ増殖およびその他のRNAポリメラーゼ媒介性の技法 (例：NASBA) があり、バーガー、サンプルック、およびオースベルの他、「Mullis et al. (1987年) 米国特許第4,683,202号」「Innis et al., eds. (1990年) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Academic Press Inc. San Diego, Calif.) (「イニス」)」 「Arnheim & Levinson (1990年10月1日) C&EN 36-47」「The Journal Of NIH Research (1991年) 3: 81-94」「Kwoh et al. (1989年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173」「Guatelli et al. (1990年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874」「Lomell et al. (1989年) J. Clin. Chem 35: 1826」「Landegren et al. (1988年) Science 241: 1077-1080」「Van Brunt (1990年) Biotechnology 8: 291-294」「Wu and Wallace (1989年) Gene 4: 560」「Barringer et al. (1990年) Gene 89: 117」 および 「Sooknanan and Malek (1995年) Biotechnology 13: 563-564」に見られる。in vitroで増幅された核酸をクローニングする改善された方法は、Wallace et al., 米国特許第5,426,039号に記載されている。PCRによる大型核酸を増幅する改善された方法は、Cheng et al. (1994年) Nature 369: 684-685および同書で引用される参考文献に記載され、ここでは最高40 kbのPCRアンプリコンが生成される。当業者であれば、実質的にいかなるRNAも逆転写酵素およびポリメラーゼを使用して、制限消化、PCR拡張および配列決定分析に適当な二重鎖DNAへと変換できることが理解される。例えばオースベル、サンプルックおよびバーガー (すべて前掲) を参照。

【0123】

適切な培養条件は、培養培地のpH、イオン強度、栄養素含量など、温度、酸素／CO₂／窒素含有量、湿度や、すなわち微生物の代謝作用など宿主微生物による化合物の生成を可能にするその他の培養条件を条件とする。適切な培養条件は、宿主細胞としての役目を果たす微生物についてよく知られている。

【0124】

本開示は下記の実施例で例証されているが、これは例証目的で提供され、制限的であることを意図するものではない。

【0125】

本開示の典型的な微生物は、ブダペスト条約に基づき、2008年2月7日にAmerican Type Culture Collection, P.O. Box 1549 Manassas, Va. に、ATCC番号_____（名称SA237）およびATCC番号_____（名称CRS-BuOH23）として寄託された。この寄託は、検体の公開に対する直近の要請が寄託機関により受理されてから5年間、寄託日後は少なくとも三十年間、または関連する特許の有効期間中のうちより長い方の期間、権限のある寄託機関に維持され、変異、非生存可能性または破壊が発生した場合には置き換えられる。これらの細胞株の一般への利用可能性に対するすべての制限は、出願からの特許発行に伴い回復不可能な形で削除される。

【0126】

（実施例）

PCR反応のためのDNA ポリメラーゼKODは、EMD Chemicals（カリフォルニア州サンディエゴ）から購入された。すべての制限酵素およびAntarcticホスファターゼは、New England Biolabs（マサチューセッツ州イプスウィッチ）からのものである。Rapid DNAライゲーションキットは、Roche（ドイツ、マンハイム）から得られた。オリゴヌクレオチドはオペロン（アラバマ州ハンツビル）に注文した。培地におけるすべての抗生物質および試薬は、Sigma Aldrich（ミズーリ州セントルイス）またはFisher Scientifics（テキサス州ヒューストン）のいずれかから購入された。使用したオリゴヌクレオチド一覧を表10に示す。

10

20

【表 10】

使用した株、プラスミドおよびオリゴヌクレオチド

株	遺伝子型	
BW25113	<i>rrnB</i> _{T14} Δ <i>lacZ</i> _{WJ16} <i>hsdR</i> 514 Δ <i>araBAD</i> _{AH33} Δ <i>rhaBAD</i> _{LD78}	
XL-1 Blue	<i>recA</i> 1 <i>endA</i> 1 <i>gyrA</i> 96 <i>thi</i> -1 <i>hsdR</i> 17 <i>supE</i> 44 <i>relA</i> 1 <i>lac</i> (F' <i>proAB lacI</i> ^q <i>ZAM</i> 15 <i>Tn</i> 10 (Tet ^R))	
BW25113 F'	BW25113 (<i>traD</i> 36, <i>proAB</i> +, <i>lacI</i> ^q <i>ZAM</i> 15 (Tet ^R))	
CRS 21	BW25113F' Δ <i>metA</i>	
CRS 22	BW25113F' Δ <i>metA</i> , <i>tdh</i>	10
CRS 23	BW25113F' Δ <i>metA</i> , <i>tdh</i> , <i>ilvB</i>	
CRS 24	BW25113F' Δ <i>metA</i> , <i>tdh</i> , <i>ilvB</i> , <i>ilvI</i>	
CRS 31	BW25113F' Δ <i>metA</i> , <i>tdh</i> , <i>ilvB</i> , <i>ilvI</i> , <i>adhE</i>	
CRS-BuOH 2	BW25113F' Δ <i>metA</i> , <i>tdh</i> + pCS49 / pSA62 / pSA55I	
CRS-BuOH 11	BW25113F' Δ <i>metA</i> , <i>tdh</i> , <i>ilvB</i> , <i>ilvI</i> + pCS49 / pSA62 / pSA55I	
CRS-BuOH 12	BW25113F' + pCS49 / pSA62 / pSA55I	
CRS-BuOH 18	BW25113F' Δ <i>metA</i> , <i>tdh</i> , <i>ilvB</i> , <i>ilvI</i> + pCS49 / pCS51 / pSA55I	
CRS-BuOH 19	BW25113F' Δ <i>metA</i> , <i>tdh</i> , <i>ilvB</i> , <i>ilvI</i> + pCS49 / pCS20 / pSA55I	
CRS-BuOH 20	BW25113F' Δ <i>metA</i> , <i>tdh</i> , <i>ilvB</i> , <i>ilvI</i> + pCS49 / pCS50 / pSA55I	
CRS-BuOH 23	BW25113F' Δ <i>metA</i> , <i>tdh</i> , <i>ilvB</i> , <i>ilvI</i> , <i>adhE</i> + pCS49 / pSA62 / pSA55I	
CRS-BuOH 31	BW25113F' + pSA62 / pSA55I	
CRS-BuOH 32	BW25113F' Δ <i>metA</i> + pCS49 / pSA62 / pSA55I	20
プラスミド	遺伝子型	
pZA31-luc	<i>P</i> _{LtetO1} :: <i>luc</i> (VF); p15A ori; Cm ^R	
pZS24-MCS1	<i>P</i> _{Llac/ara-1} :: MCS1; pSC101 ori; Kan ^R	
pCS20	<i>P</i> _{LlacO1} :: <i>tdcB</i> (EC) - <i>leuABCD</i> (EC); p15A ori; Kan ^R	
pCS27	<i>P</i> _{LlacO1} :: MCS1; p15A ori; Kan ^R	
pCS49	<i>P</i> _{LlacO1} :: <i>thrA</i> *BC (EC ATCC 21277); pSC101 ori; Spec ^R	
pCS50	<i>P</i> _{LlacO1} :: <i>tdcB</i> (EC) - <i>leuA</i> *BCD (EC G462D mut); p15A ori; Kan ^R	
pCS51	<i>P</i> _{LlacO1} :: <i>ilvA</i> (EC) - <i>leuA</i> *BCD (EC G462D mut); p15A ori; Kan ^R	
pSA55I	<i>P</i> _{LlacO1} :: <i>kivd</i> (LL) - <i>adh2</i> (SC), <i>lacI</i> ; ColE1 ori; Amp ^R	30
pCS59	<i>P</i> _{LlacO1} :: <i>thrABC</i> (EC); pSC101 ori; Spec ^R	
pSA62	<i>P</i> _{LlacO1} :: <i>ilvA</i> (EC) - <i>leuABCD</i> (EC); p15A ori; Kan ^R	
プライマー名称	配列 5' → 3'	
<i>lacI</i> SacI f	CTAGAGCTCGAAGGAGATATACCATGAAACCAGTAACGTTATACGATG (配列番号 83)	
<i>lacI</i> SacI r	CTAGAGCTCTCACTGCCCCGCTTTCCAGTC (配列番号 84)	
<i>tdcB</i> f Acc65	CGAGCGGTACCATGCATATTACATACGATCTGCCGG (配列番号 85)	
<i>tdcB</i> r Sall	ACGCAGTCGACTTAAGCGTCAACGAAACCGGTGATT (配列番号 86)	
<i>thrA</i> f Acc65	TCAGGTACCATGCGAGTGTTGAAGTTCGGCGGTACAT (配列番号 87)	
<i>thrC</i> r HindIII	TCAAAGCTTTTACTGATGATTCATCATCAATTTACGCAA (配列番号 88)	40

【0127】

細菌株：大腸菌BW25113 (*rrnB*_{T14} Δ *lacZ*_{WJ16} *hsdR*514 Δ *araBAD*_{AH33} Δ *rhaBAD*_{LD78}) は、比較のため野生型 (WT) (Datsenko and Wanner, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 6640-6645, 2000) と指定された。イソブタノールに対する実験の一部では、JCL16 (*rrnB*_{T14} Δ *lacZ*_{WJ16} *hsdR*514 Δ *araBAD*_{AH33} Δ *rhaBAD*_{LD78} / F' (*traD*36, *proAB*+, *lacI*^q *ZAM*15) が野生型 (WT) として使用された。宿主遺伝子の *metA*, *tdh*, *ilvB*, *ilvI*, *adhE*, *pta*, *ldhA*, および *pflB* の欠失は、Keio collection 株 (Baba et al., Mol. Systems Biol. 2, 2006) をドナーとして用いた P1 形質導入により達成された。標的遺伝子領域に挿入された kan^R は、それぞれの連続的なノックアウトの間で pCP20 (Datsenko and Wanner, 前掲

）により除去された。次に、遺伝子セグメントの除去は、適切なプライマーを用いたコロニーPCRにより検証された。すべてのプラスミドの増殖には、XL-1 Blue（Stratagene、カリフォルニア州ラ・ホーヤ）を使用した。

【0128】

プラスミド構築：pSA40、pSA55、およびpSA62は、本明細書の別の所で記載されたとおり設計・構築された。lacI遺伝子は、大腸菌MG 1655 ゲノムDNAからのプライマーlacI SacI fおよびlacI SacI rにより増幅された。PCR生成物は次に、SacIにより消化され、アンピシリン耐性遺伝子のプロモーターの背後にある同一酵素により切断されたpSA55オープンベクターにライゲートされ、pSA55Iを生成した。

【0129】

遺伝子tdcBは、大腸菌BW25113 WTのゲノムDNAからのプライマーtdcB f Acc65およびtdcB r SalIを用いてPCRにより増幅された。結果生じるPCR生成物はゲル精製され、Acc65およびSalIにより消化された。消化された断片は次に、同一酵素対により切断されたpSA40オープンベクターにライゲートされ、pCS14を生成した。

【0130】

pCS14の複製起点をcolE1からp15Aに置き換えるために、pZA31-lucがSacIおよびAvrIIにより消化された。より短い断片はゲル精製され、同一酵素により切断されたプラスミドpCS14にクローニングされ、pCS16を生成した。

【0131】

オペロンleuABCDは、プライマーA106およびA109ならびにテンプレートとして大腸菌BW25113 ゲノムDNAを用いて増幅された。PCR生成物はSalIおよびBglIIIにより切断され、SalIおよびBamHIにより消化されたpCS16へとライゲートされ、pCS20を生成した。

【0132】

pSA40と同一だがp15A複製起点を有する発現プラスミドを生成するために、pZA31-lucをSacIおよびAvrIIと消化することで得られたp15A断片が、同一制限酵素により切断されたpSA40オープンベクターへとクローニングされ、pCS27を生成した。

【0133】

leuA* G462D突然変異体は、leuA*BCDを得るために、プライマーG462DfおよびG462Drならびにテンプレートとして大腸菌BW25113 WTゲノムDNAによりSOE（スプライス重複伸長法）を用いて構築された。次にSOE生成物は消化され、制限部位Acc65およびXbaIにクローニング化され、PZE_leuABCDを生成した。結果生じるプラスミドは次に、プライマーA106およびA109を用いたleuA*BCDからのPCRのテンプレートとして使用された。生成物はSalIおよびBglIIIにより切断され、SalIおよびBamHIにより消化されたpCS27にライゲートされ、pCS48を生成した。

【0134】

遺伝子ilvAは、プライマーA110およびA112により大腸菌BW25113 WTゲノムDNAから増幅された。次に、これはAcc65およびXhoIにより切断され、Acc65およびSalIで消化されたpCS48オープンベクターにライゲートされ、pCS51を生成した。

【0135】

大腸菌BW25113 WTのゲノムDNAからの遺伝子tdcBは、プライマーtdcB f Acc65およびtdcB r SalIを用いてPCRにより増幅された。結果生じるPCR生成物はゲル精製され、Acc65およびSalIにより消化されてから、同じ酵素対により切断されたpCS48オープンベクターにライゲートされ、pCS50を生成した。

【0136】

WT thrABCは、プライマーthrA f Acc65およびthrC r HindIIIを用いてPCRにより増幅された。結果生じる生成物は、Acc65およびHindIIIにより消化され、同一の酵素対により切断されてpSA40にクローニング化され、pCS41を生成した。

【0137】

pCS41の複製起点をcolE1からpSC101に置き換えるために、pZS24-MCS1がSacIおよびAvrIIにより消化された。より短い断片はゲル精製され、同一酵素により切断されたプラスミ

10

20

30

40

50

ドpCS41へとクローニング化され、pCS59を生成した。

【0138】

フィードバック耐性突然変異型thrA^{*}は、プライマーthrA f Acc65およびthrC r HindIIIを用いてトレオニンを過剰生成するATCC 21277から単離されたゲノムDNAからthrBおよびthrCとともにPCRにより増幅された。結果生じる生成物は、Acc65およびHindIIIにより消化され、同一の酵素対により切断されてpSA40にクローニングされ、pCS43を生成した。

【0139】

pCS43の複製起点をcolE1からpSC101に置き換えるために、pZS24-MCS1がSacIおよびAvrIIにより消化された。より短い断片はゲル精製され、同一酵素により切断されたプラスミドpCS43へとクローニング化され、pCS49を生成した。

10

【0140】

分岐鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ (ilvEによりコードされる) およびチロシンアミノトランスフェラーゼ (tyrBによりコードされる) はそれぞれ株JWXXXおよびJWXXX (Baba et al.) からのPI形質導入により欠失された。

【0141】

L-バリン生合成遺伝子i) ilvIHCD (EC) およびii) als (BS) をilvCD (EC) とともにクローニング化するために、pZS24-MCS1からの低コピー複製起点 (ori) をSacIおよびAvrIIでの消化により除去し、対応する部位i) pSA54およびii) pSA69にライゲートしてそれぞれプラスミドpIAA1およびpIAA11を生成した。

【0142】

kivdをラクトコッカス・ラクティスから、ADH2をサッカロミセス・セレビシエからクローニングするために、pSA55のColE1 oriがSacIおよびAvrIIでの消化によって除去され、同一の制限酵素により消化されたpSA54のp15A oriにより置き換えてpIAA13を生成した。これらの遺伝子の発現をより一層制御するために、lacIはプライマーlacISacIfおよびlacISacIrを用いてKOD ポリメラーゼにより大腸菌MG1655ゲノムDNAから増幅され、アンピシリン耐性遺伝子blaとともに発現されるべきpCS22のSacI部位にライゲートされ、プラスミドpIAA12を生成した。

20

【0143】

染色体からのBW25113/F' においてleuABCDオペロンを過剰発現するために、天然プロモーターおよびリーダー配列をP_{LlacO-1}プロモーターで置き換えた。P_{LlacO-1}プロモーターは、プライマーlac01KanSOEfおよびlac01LeuA1rを用いてKODポリメラーゼによりpZE12-lucから増幅された。カナマイシンに対する耐性をコードする遺伝子aphは、プライマーKanLeu01fおよびKanlac01SOErを用いてpKD13から増幅された。各反応からの生成物1μLは、プライマーKanLeu02fおよびlac01LeuA2rとともにテンプレートとして添加され、SOEを用いてKODポリメラーゼにより増幅された。新しい構築物は、プライマーleuK0v1およびleuK0v2を用いてカナマイシン耐性クロンのゲノムDNAから増幅され、クローニングの精度を確認する配列検証のために送られた。プラスミドからleuABCDオペロンを過剰発現するためには、pSA54からのp15A oriをSacIおよびAvrIIにより取り出し、pCS22の対応する部位 (ColE1、Cm^R、P_{LlacO-1}: leuABCD) にライゲートしてプラスミドpIAA2を生成した。より密着した発現のために、lacIはpIAA12について前述されたとおり増幅され、クロラムフェニコール耐性遺伝子catとともに発現されるべきpCS22にライゲートされ、プラスミドpIAA15を生成した。IPMS (G462D) をコードするleuA (G1385A) を含有するプラスミドpIAA16は、XhoIおよびNdeIにより消化されたpIAA15の5.5kb断片をライゲートし、同一制限酵素により切断されたpZE12-leuABCD (ColE1、Amp^R、P_{LlacO-1}: leuA (G1385A) BCD) の2.3kb断片でライゲートした。発現レベルを制御するために、pIAA16のRBSと一致するようにRBSはpIAA15において置き換えられた。これを行うため、HindIIIおよびNdeIでの消化によるpIAA16の5.6kb断片を同一酵素により消化されたpIAA15の2.2kb断片によりライゲートして、pIAA17を生成した。

30

40

【0144】

培地および培養：初回の生成実験では、株は、10g/Lグルコース、5g/L酵母抽出物、お

50

よび1000X Trace Metals Mix A5 (2.86g H_3BO_3 、1.81g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、0.222g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.39g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.079g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、49.4mg $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ／リットル水)を含有する改良されたM9培地(6g Na_2HPO_4 、3g KH_2PO_4 、1g NH_4Cl 、0.5g NaCl 、1mM MgSO_4 、1mM CaCl_2 、10mg ビタミンB1／リットル水)において生育され、LB中の一晩培養物3 mLから1%、125mLねじ口付フラスコ内での新鮮な培地10mLへと接種され、回転振盪機において37℃で4時間生育された。培養はその後、1mM IPTGで導入され、30℃で18時間生育された。必要に応じて抗生物質が添加された(アンピシリン100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、クロラムフェニコール35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、カナマイシン50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。

【0145】

一部のアルコール発酵実験では、LBプレートから単一コロニーが選ばれ、適切な抗生物質(アンピシリン100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、カナマイシン50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、およびスペクチノマイシン50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を有するLB培地3mLに接種された。回転振盪機(250 rpm)においてLB内で37℃で生育された一晩培養物は次に、250mL三角フラスコにおいて30g/Lグルコース、5g/L酵母抽出物、適切な抗生物質、および1000x Trace Metal Mix A5 (2.86 g H_3BO_3 、1.81g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、0.222g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.39 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.079 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、49.4 mg $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ／リットル水)を含有するM9培地20mL (6 g Na_2HPO_4 、3g KH_2PO_4 、0.5 g NaCl 、1 g NH_4Cl 、1mM MgSO_4 、10mgビタミンB1および0.1 mM CaCl_2 ／リットル水)に接種(1% vol/vol)された。培養物は、回転振盪機(250 rpm)で37℃で OD_{600} の0.4~0.6になるまで生育され、次に培養物12mLを250mLねじ口付三角フラスコに移し、1mM IPTGで誘導された。誘導された培養物は30℃で回転振盪機(240rpm)で生育された。検体(サンプル)は次の三日から四日間にわたりねじ口付フラスコの開口部から採取され、培養ブ罗斯は上清を得るために遠心分離にかけるか、ろ過された。示されるとおり一部の実験では、誘導と同時に8 g/Lのトレオニンが直接細胞培養物に添加された。

【0146】

すべての α -ケト酸実験は、別途指摘されない限り、酸素の「豊富な」条件下で行われた。酸素が豊富な実験では、250mLバッフル振とうフラスコ内の培養物10mLがLB内の一晩培養物3mLから1%接種された。酸素不足実験では、培養物10mLが125mLねじ口付フラスコから前述のとおり接種された。すべての培養物は37℃で4時間生育され、1mM IPTGで誘導され、30℃で18時間生育された後に回収された。

【0147】

5g/Lグルコースを含有する改良されたM9培地20mLが250mLねじ口付フラスコで使用された場合を除き、最終的な生成実験は前述のとおり実施された。

【0148】

代謝産物の検出：生成されたアルコール化合物は、フレイムイオン化検出器を備えたガスクロマトグラフ(GC)により定量化された。システムは、モデル5890A GC(ヒューレット・パッカード、ペンシルベニア州アボンデール)およびモデル7673A自動噴射器、検出器および制御器(ヒューレット・パッカード)から構成された。メタノールを内部標準として用い、培養ブ罗斯の上清(0.1mL)が分割噴射モード(1:15分割比)で注入された。

【0149】

アルコール化合物の分離は、Agilent Technologies(カリフォルニア州サンタクララ)から購入されたA DB-WAXキャピラリーカラム(30 m、0.32 mm-i.d.、0.50 μm 膜厚)により実施された。GCオープン温度は当初は5分間40℃で維持し、15℃／分で120℃に達するまで徐々に上昇させた。次に、50℃／分で230℃に達するまで徐々に上昇させ、4分維持した。9.3 psi入口圧力でのヘリウムをキャリアガスとして使用した。噴射器および検出器は25℃で維持された。培養ブ罗斯の0.5 μL 上清が分割噴射モードで1:15の分割比で注入された。メタノールを内部標準として使用した。

【0150】

その他の分泌された代謝産物については、自動検出器(Agilent Technologies)およびBioRad(Biorad Laboratories、カリフォルニア州ハーキュリーズ)のAmin ex HPX87カラム(5mM H_2SO_4 、0.6mL／分、カラム温度65℃)を備えたAgilent 1100 HPLCに、ろ過され

た上清 (20ul) がかけられた。グルコースは屈折率検出器を用いて検出され、その一方有機酸は210 nmでのフォトダイオードアレイ検出器を用いて検出された。濃度は検量線からの外挿により決定された。

【0151】

分泌されたその他の代謝生成物について、ろ過した上清 (0.02 ml) を、自動サンプラー (Agilent Technologies) およびBioRad (Biorad Laboratories、カリフォルニア州ハーキュリーズ) Aminex HPX87 カラム (0.5mM H₂SO₄、0.6mL/分、カラム温度65℃) を備えたAgilent 1100 HPLCに適用した。屈折検出器でブドウ糖(グルコース)が検出された一方、フォトダイオードアレイ検出器を用いて210 nmで有機酸が検出された。濃度は検量線からの外挿により決定された。

10

【0152】

L-バリンおよびL-ロイシン生合成経路遺伝子の発現が、3-メチル-1-ブタノール生成につながる。大腸菌中に3-メチル-1-ブタノールを生成するために、ピルビン酸から3-メチル-1-ブタノールへの経路全体を過剰発現させた。ilvIHCD (大腸菌)、kivd (ラクトコッカス・ラクティス)、およびADH2 (サッカロミセス・セレビスエ) はすべてP_{LlacO-1} プロモーターの制御下でプラスミド (pSA54およびpSA55) から発現させた。JCL16でleuAの上流非コード領域をP_{LlacO-1} プロモーターで置き換えることによりleuABCDオペロンを過剰発現させた。菌株は、IPTGによる18時間の誘導後、56mg/Lの3-メチル-1-ブタノールを生成することができた (図47A)。3-メチル-1-ブタノールの生成を増加させるために、ilvIHを枯草菌からのalsSで置き換えた。ilvIHをalsSで置き換えることで、3-メチル-1-ブタノール生成の増加 (67mg/L) が示された (図47A)。ロイシン生合成経路の発現レベルを高めるために、leuABCDもp15A由来のプラスミドにクローン化し、P_{LlacO-1} プロモーターの制御下で発現させた。プラスミドによるleuABCDの発現によって、ilvIH (177mg/L) またはalsS (124mg/L) (図47B) のいずれかを含む菌株で3-メチル-1-ブタノール生成が増加したが、alsSの過剰発現はイソブタノール生成の劇的な増加につながる。

20

【0153】

炭素を奪い合い減力につながる宿主経路は削除した。adhE、frdBC、ldhA、pta、fnr、およびpflBの欠失があると、野生型 (WT) のバックグラウンドと比較して大腸菌中でのイソブタノール生成を増加させることが示された。3-メチル-1-ブタノール経路がこの菌株内に形質変換された場合、alsSを発現する菌株について、3-メチル-1-ブタノールの最終滴定量は、76mg/Lであった (図47B)。3-メチル-1-ブタノール蓄積は減少したが、アルコール生成はイソブタノールが大半を占め、最終濃度は1.3g/Lを超えた。標的生成物のそれよりも10倍を上回るイソブタノールの滴定量があったが、この結果を説明するためにプロセスおよび代謝経路を調べた。

30

【0154】

トレオニン生合成の調節解除：図50に示すとおり、2-ケト酪酸および2-ケト吉草酸はそれぞれ、1-プロパノールおよび1-ブタノール生成の前駆物質である。2-ケト酪酸は、トレオニンに由来する一般的な中間体であり、イソロイシン生合成のための前駆物質である一方、2-ケト吉草酸は、非天然アミノ酸であるノルバリンの合成に細胞により使用される希少な代謝生成物である。1-ブタノール用に2-ケト吉草酸のプールを増加させる目的で、プラスミドpSA62を使用して、i) 2-ケト酪酸に高めの代謝流束を向け、ii) 主な2-ケト吉草酸生成経路としてノルバリン合成の化学反応を利用するために、大腸菌からの遺伝子ilvAおよびleuABCDを過剰発現させた (図50)。pSA55IからのKivdおよびAdh2も過剰発現させ、2種のケト酸をその対応するアルコールに変換させた。

40

【0155】

kivdおよびADH2に加えて、ilvAおよびleuABCDを過剰発現することで、1-プロパノールおよび1-ブタノールのレベルがBW WTで、事実上検出不可能な量からそれぞれ約60 mg/Lおよび30 mg/Lにほぼ5倍上昇した (図51)。それにもかかわらず、転写レベルおよび酵素学的なレベルでの、アミノ酸生合成の本来的なフィードバック調節はどちらも、引き続きトレオニン生成に作用し、その結果、24時間後に1-プロパノールおよび1-ブタノールはほぼ

50

一定となり、また過剰なNADHを処分するためにイソブタノールおよびエタノールの生成は安定して増加した。

【0156】

トレオニンの制限が重大なボトルネックであるかを識別するために、誘導時にトレオニン8g/Lを大腸菌培養液に追加した。結果から仮説が検証され、72時間に蓄積されたプロパノールおよびブタノールは、2g/Lに上昇したが、これは両方のアルコールについて約10倍増加であった。トレオニンによるThrAの転写減衰およびアロステリックフィードバック阻害は主要な調節機構であるため、非天然プロモーターの後に続くThrAのフィードバック抵抗性突然変異型の発現により、トレオニン合成の調節解除が助けられることになるため、下流でのアルコール生成が改善される。フィードバック抵抗性ThrA (ThrA^{*}として称する、トレオニン過剰生成菌ATCC 21277)。次に、この菌株のthrA^{*}BCオペロンをクローニングし、P_Llac01プロモーターの制御下でプラスミドpCS49から発現させた。比較として、WT thrABCオペロンもクローニングし、P_Llac01下でPCS 59から発現させた。ThrA^{*}BC過剰発現を追加すると、1-プロパノールおよび1-ブタノールの生成レベルは、ThrA^{*}BCなしの場合に比べて3~4倍高く上昇した(図51)。WT ThrABC過剰発現のある菌株では、ThrA^{*}BC過剰発現のある同一の菌株により生成されるレベルと比較して、BW WTバックグラウンドと、BW ΔmetA、Δtdh、ΔilvB、ΔilvI、ΔadhEの両方で、2種の標的アルコールに10~20%の減少が見られた(図51および54)。これは、細胞内のトレオニン蓄積は微量であったものの、低レベルでWT ThrA活性への影響が管理されたことを示している。イソブタノール生成の減少により説明されるとおり(図51)、thrA^{*}BCの存在により、より多くの代謝流束をトレオニン経路に向ける助けとなり、それによって1-プロパノールおよび1-ブタノール生産性全体が向上した。

【0157】

競合する経路の除去：プロパノールおよびブタノール生成滴定量をさらに増加させるために、競合的な副作用に関与する遺伝子を除去して、望ましい中間体の消費または分解を回避した。トレオニン生成は2-ケト酪酸合成の主なチェックポイントであるため、まずホモセリン0-スクシニルトランスフェラーゼmetAおよびトレオニンデヒドロゲナーゼtdhを不活性化して、メチオニン生合成への望ましい前駆物質の喪失を最小限に抑え、またトレオニンの2-アミノ-3-ケト酪酸への異化作用を阻止した。metAおよびtdhを破壊させると、1-プロパノールおよび1-ブタノールの総合的な生成は、図52に示すとおり約1.2g/Lに増加したが、その大半は主に1-プロパノールによるものであった。これら2つの遺伝子欠失の比較的有意性の低い効果が1-ブタノール生成で見られたが、これは、2-ケト酪酸のイソロイシン経路への分岐、またはアセチル-CoAの利用可能性、あるいはその両方に起因するものと考えられる。1-ブタノール生成のための2つの重要な前駆物質であるアセチル-CoAおよび2-ケト酪酸をさらに保存するために、バリン、ロイシンおよびイソロイシンの生合成の第一の酵素反応を中断させた。アセトヒドロキシ酸シンターゼアイソザイム(AHAS I)の大きい方の触媒的サブユニット(ilvBでコード化)、およびAHAS IIIの触媒的サブユニット(ilvIでコード化)を除去することで、上記アミノ酸の栄養要求体をもたらした。これら2つの追加的欠失は、結果的に1-ブタノール生成に2倍の増加をもたらしたが(図52)、1-プロパノールのレベルは変化しなかった。イソブタノールおよび(2-、3-)メチルブタノールの生成も、それらの前駆物質を除去することにより、ほぼ除去された。イソブタノールの微小な蓄積は、IlvEにより触媒されるバリン合成の最終ステップでの逆反応によるものであると考えられるが、これはバリンが培養液(酵母エキスで補充)中にもたらされ、2-ケト-イソ吉草酸に変換し戻される反応である。

【0158】

エタノール生成を低減するために、大腸菌adhE遺伝子を欠失させた。adhE破壊では、全体的なC3およびC4アルコール生成はそれほど改善されなかったが、これによって、エタノール生成が0.25g/Lからおおよそ0.1g/Lに低下することで特異性が増加した。これらの遺伝子をゲノムから除去することで、最終的な菌株(ΔmetA、Δtdh、ΔilvB、ΔilvI、ΔadhE)で、ほぼ1:1の1-プロパノールおよび1-ブタノールが同等に生成され、微量のエタノ

ールの蓄積と基底レベルのイソブタノールおよび（2-、3-）メチル-ブタノールがあることが示された。

【0159】

代替的なフィードバック抵抗酵素の評価：ここで提示した1-プロパノールおよび1-ブタノール生成は、宿主のアミノ酸合成機構に著しく依存しているため、トレオニンの下流の必須のアルコール前駆物質が、細胞内に存在する多様なアミノ酸調節機構、特にそれぞれイソロイシンおよびロイシンによるIlvAおよびLeuAの酵素活性の阻害によって制限されないことを検証することが重要である。

【0160】

TdcBは、大腸菌の異化のトレオニンデヒドラターゼであり、2-ケト酪酸へのトレオニンの脱アミノ化を触媒するためにIlvAの代わりに提供されたものである一方、もともとイソロイシン・フィードバック阻害に対して非感受性である。生成に対するこの代替的な酵素の利点を評価するために、tdcBをpCS20上でleuABCDを用いてP_Llac01の背後で過剰発現させた。結果から、TdcBが両方の標的アルコールの生成が、IlvAに比較して70%低くなることが示された（図53）。酵母エキスを追加することでもたらされる微量のイソロイシンは、IlvA酵素活性の抑制にはあまり重要でないと考えられる。その結果、TdcBのフィードバック阻害に対する非感受性は、所定の実験条件下での酵素自体の活性よりも重要性は低くなる。

【0161】

同様に、酵母エキスにあるロイシンによるLeuAに対するフィードバック阻害は、leuA^{*}フィードバック非感受性突然変異体G462Dの形成および試験につながる。leuA^{*}に対する点突然変異は、SOEを用いて部位特異的突然変異誘発により導入され、また結果的に生じるオペロンleuA^{*}BCDは、プラスミドpCS51に対して過剰発現した。図53に示すとおり、フィードバック非感受性LeuA^{*}では、1-プロパノールおよび1-ブタノールの生成は増加しなかった。この場合も、これによって細胞中にあるロイシンの量は、恐らくLeuA酵素活性に対する有害影響を引き起こす抑制レベルよりを下回るであろうことが実証された。

【0162】

CRS-BuOH 23およびその主な副産物からの1-プロパノールおよび1-ブタノールの共生成。プラスミドpCS49、pSA62およびpSA55Iを有する最終的な菌株BW ΔmetA、Δtdh、ΔilvB、ΔilvI、ΔadhE（CRS-BuOH 23）におけるアルコールおよび代謝生成物の生成の時間経過を図54に示す。プロパノールおよびブタノールの両方の生成は、72時間期間全体ではほぼ直線的に着実に増大し、また3日目の終りにほぼ一定になったと見られた。同一の挙動は、エタノール生成でも観察された。ΔadhEバックグラウンドでのエタノール生成は、ピルビン酸に対するKivdのわずかな親和性による可能性がある。一方、主要な代謝生成物である酢酸および乳酸の細胞外レベルは、引き続きアルコール生成期間後に著しく増加したが、これはそれぞれ過剰なアセチル-CoAおよびNADHの結果である可能性がある。図54で見たとおり、ブドウ糖の主な消費は、アルコール生成期間に発生し、また成長単独とは独立していると思われる。最初の24時間後、細胞の成長は止まり、その後数日間のアルコール生成期間中は、いくらか変化のない状態が続いた。

【0163】

発酵生成物の除去およびバイオ燃料生成に対するその効果。本C3/C4アルコール生成システムをさらに特徴付けるために、主な混合酸発酵遺伝子adhE、ldhA、pta、pflBを多様な組み合わせで欠失させた。表12に示すとおり、エタノール生成は、過剰なNADHについて主なシンクであり、adhEの破壊は、より顕著な乳酸の蓄積につながった。ldhAを欠失させたとき、およそ1g/Lのエタノールが分泌され、酢酸生成も増加した。ptaおよびldhAの両方のノックアウト菌株でブドウ糖消費の減少が観察された。adhE、ldhA、pta、およびその組み合わせの欠失は、どれも低級プロパノールおよびブタノール生成をもたらした一方、pflBノックアウトは、その点で比較的少ない効果しかなかった。これは、大量のアセチル-CoAプールは、PflB複合体の代わりにピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体（PDHc）の活性からのものであることが示された。

【表 1 1】

標的アルコールおよび微量副産物レベルに対する発酵遺伝子ノックアウトの効果

生成レベル(mg/L)	BW25113F ⁺ バックグラウンドでΔmetA、tdh、ilvB、ilvIに加えて 削除した遺伝子					
	--	ΔadhE	Δpta	ΔldhA	ΔpflB	ΔadhE、pta
プロパノール	1017.0	1218.5	576.8	649.0	788.5	710.0
ブタノール	1006.5	1094.5	770.5	581.5	932.5	853.5
エタノール	278.0	127.4	358.5	923.0	285.5	122.0
ピルビン酸	17.9	16.7	23.8	40.2	9.9	8.4
酢酸	2882.8	2726.7	2895.5	4230.0	3390.0	2346.1
乳酸	0.0	494.6	0.0	0.0	0.0	0.0
ギ酸	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
消費されたブドウ糖(g/L)	25.3	26.1	23.7	18.7	23.4	25.4

材料及び方法で説明したように、細胞を 72 時間培養した。表記データは、72 時間経過時のものである。

【0 1 6 4】

異種kivdおよびadh2ならびに大腸菌のilvA、leuABCD、およびthrA^{*}BCの過剰発現を用いて、本開示は、1-ブタノールおよび1-プロパノールの生成を明らかにしている。1-ブタノールの生成では、2-ケト吉草酸を使用するが、これには必然的に中間体である2-ケト酪酸および非天然のノルバリン生合成経路が関与する。Kivdは両方の2-ケト酸に対して類似した親和性を持ち、また2-ケト酪酸はLeuAについて第二の基質であるため、類似した量の1-ブタノールとともに1-プロパノールが同時生成された。

【0 1 6 5】

トレオニン生合成の調節解除およびmetAおよびtdhにより触媒された分岐経路の除去により、トレオニンプールが首尾よく保存され、また両方の1-プロパノールおよび1-ブタノール生成滴定量が改善された。一方で、リジン生合成は、これもトレオニン経路の分岐したものであるが、バクテリアの細胞壁の合成に関与するその必須の中間体ジアミノピメリン酸のために除去されなかった。それにもかかわらず、リジン栄養要求体の有意性が意図される。理論的な設計を用いたトレオニンの過剰生成も、lysA欠失の有益な効果をほのめかすものである。1-ブタノール生産性は、AHAS IおよびIIIを不活性化することによりバリリン、ロイシン、およびイソロイシン生合成経路を妨害したとき、さらに最適化されたが、これは1-ブタノールの2倍の増加につながったものの、1-プロパノールに対する効果はほとんどなかった。この選択的な改善は、i) 2-ケト酪酸およびアセチル-CoAの利用可能性の増大、およびii) ロイシン経路内のそれらの天然の基質からの必須酵素LeuABCDの放出に起因するものであった。

【0 1 6 6】

図54で見たとおり、各アルコールの約13~15mg/L/hrの生成が、実験条件下で観察された。1-プロパノールおよび1-ブタノールの菌株耐性の改善は、より高い生産性につながる。

【0 1 6 7】

アミノ酸調節の2つの主なメカニズムである転写調節および転写減衰は、すべての必須の遺伝子はクローニングされ、リーダー配列なしに非天然のプロモーターの後に続いて発現されているため、ここでの重要な酵素に対してはほとんど効果がない。一方で、その自らのアミノ酸生成物による酵素のアロステリックフィードバック阻害は、特にIlvAおよびLeuAは無視できなかった。TdcBは、嫌気性成長下でアミノ酸が過剰に存在しブドウ糖が乏しいときに、細胞に代謝エネルギーを供給する生分解性トレオニンデヒドラターゼである。その発現は、異化代謝産物抑制により転写的に調節され、そのアロステリック・エフェクターAMPにより、トレオニンについてのそのK_mを減少させることで活性化する。高濃度のピルビン酸および一部の2-ケト酸（2-ケト酪酸を含む）は、TdcBを酵素的に不活性化することが示されているため、これらの中間体の蓄積は、この負の効果に対抗する十分なAM

Pがないとき、その酵素活性に有害な影響を与えうる。また、TdcBに関連したトレオニンについて、有意な細胞内のAMPレベルの不在下でのIlvAよりも K_m 値が高いと、図53に示すとおりに、脱アミノ化の速度が遅くなり、そのため全体的なアルコール生産性の性能が低下することがある（イソロイシンの不在下で精製した大腸菌 IlvAでは、 $K_m = 8 \text{ mM}$ 、AMPの不在下で大腸菌 TdcBでは20 mM）。LeuA*突然変異体に関して、ロイシン生合成経路内で2-ケト-イソ吉草酸に対して選択した突然変異G462Dは、2-ケト酪酸に対するその親和性のさらなる減少につながった。

【0168】

準好気性の培地環境での発酵副産物を最小限に抑える試みから、本生成システムでのNADH (P) Hバランスが注目されるようになってきた。トレオニン生合成には、3モルのNADPH および2モルのATPの消費が要求されるが、一方で2-ケト酪酸から始まる1-ブタノールおよび1-プロパノール生成では、それぞれ正味0モルのNADHおよび正味1モルのNADHが消費される。遺伝子ppcによりコードされたホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼは、トレオニン経路により取り去られるオキサロ酢酸塩 (OAA) を構成的に補充するために機能し、TCAサイクルが維持された。準好気性条件下でのTCAサイクルの部分的活性は、過剰な低減力につながり、その結果、余分なNADHを処分するためにエタノールおよび乳酸といった発酵性生成物を使用した。表11で見たとおり、乳酸の生成と比較して、エタノールはその追加モル数のNADH消費にとって望ましいNADHシンクであった。adhEを破壊させたとき、乳酸の分泌はさらに顕著になったが、一方、ldhAを欠如させたとき、培養液ブロス内に約1g/Lのエタノールが蓄積された。解糖に対して、下流経路の好気性および非効率徐徐に失われることで、TCAサイクルの活性は低くなり、酢酸生成が、過剰なアセチル-CoAおよび/またはピルビン酸についてATP生成の主な供給源およびシンクとなると見られる。これらは、図51および54でのWT菌株およびCRS-BuOH 23を比較することで説明されたとおり、ブタノール生成および酢酸分泌の間の負の相関を説明しうる。期待されたとおり、ptaの除去により特定の培養液システムでのブドウ糖の消費および成長が減少した。ところが、現在調査中の理由により酢酸生成は除去できなかった。培養液ブロス中のギ酸の不在、およびpflBノックアウトのブタノール生産性に対するその微々たる効果から、PDHcがアルコール生成期間中の主要なアセチル-CoA供給体であったと見られる。

【0169】

当初、仮説は、kivdおよびleuAの遺伝子産物間での基質 α -ケトイソ吉草酸の競合により、イソブタノール生成は、3-メチル-1-ブタノール生成よりもずっと多いというものであった。この仮説を調査するために、イソブタノールおよび3-メチル-1-ブタノールに対する、kivdのための基質である α -ケト酸前駆物質の生成を調べた。これを実現するために、 $P_{LlacO-1}$ の制御下で、leuABCDをalsS-ilvCD (pSC101由来のプラスミド) とともにColE1由来のプラスミド上に発現させた。酸素の不足条件下および酸素の豊富な条件下で、イソブタノール前駆物質でありleuA基質である α -ケトイソ吉草酸 (KIV) が主要生成物であった (図48A)。KIVは、それぞれ最終濃度0.25および0.29g/Lで生成されたが、一方3-メチル-1-ブタノール前駆物質、 α -ケトイソカプロン酸 (KIC) は検出されなかった (< 5mg/L)。KICプールを増大することを期待しつつ、RBSをその本来の配列からより共通配列のものに変化させることによりleuAの発現レベルを増加させた。leuA遺伝子生成物の発現が増加することで、KIC濃度が0.20g/Lに増大したが、KIVはなおも主要生成物であった (0.37g/L) (図48A)。この結果は、3-メチル-1-ブタノール生成の低下は、完全にはKIVの競合によるものではなく、むしろleuA遺伝子生成物 (イソプロピルリンゴ酸シンターゼ) の活性が低いことによるものであることを示唆している。

【0170】

イソプロピルリンゴ酸シンターゼ (IPMS) は、KIVのアセチル-CoAとの縮合を触媒する。 α -ケトイソ吉草酸の蓄積は、 α -ケトイソカプロン酸から合成された遊離L-ロイシンによるIPMSのフィードバック阻害によるものであることが考えられる。leuA遺伝子生成物のフィードバック阻害を軽減するために、2つの方法を採用した。IPMSのフィードバック非感受性突然変異体 (IPMS (G462D)) を採用した。第二に、L-ロイシン生合成経路の最終ス

テップを、 α -ケトイソカプロン酸のL-ロイシンへの変換を担う2つのアイソザイム、ilvE（分岐鎖アミノトランスフェラーゼ）およびtyrB（チロシンアミノトランスフェラーゼ）の欠失により不活性化した。

【0171】

IPMS (G462D) が発現されたとき、生成物の分布は、KIC側に著しく移行し、最終濃度は1.61g/Lで、一方、KIV蓄積は0.17g/Lに減少した（図48A）。ilvEの不活性化により、WT IPMSを発現する菌株中でKICの生成は0.53g/Lに増加し、一方、ilvEおよびtyrBの欠失により、さらにKICの蓄積は1.23g/Lに増加した（図48B）。 Δ ilvEバックグラウンドおよび Δ ilvE Δ tyrBバックグラウンドでのKIV生成は、ilvE⁺ tyrB⁺菌株のそれと類似したものとなり、最終濃度はそれぞれ0.40g/Lおよび0.37g/Lであった。IPMS (G462D) を発現させた Δ ilvEおよび Δ ilvE Δ tyrB宿主菌株を組み合わせることにより、KICはそれぞれ2.31g/Lおよび1.95g/Lに増加した（図48B）。

【0172】

KICの生成を増加させて、ピルビン酸からの3-メチル-1-ブタノール生成の経路全体を、WT IPMSまたはIPMS (G462D) のいずれかを用いて形質転換させた。ケト酸生成で見られた結果と類似して、WT IPMSを持つ菌株はなおもilvE⁺ tyrB⁺バックグラウンドで有意な量のイソブタノール（169mg/L）を生成するが、3-メチル-1-ブタノールが主要生成物（308mg/L）であった（図49A）。期待されたとおり、IPMS (G462D) をilvE⁺ tyrB⁺バックグラウンドで発現させたとき、3-メチル-1-ブタノールが主要生成物であり、最終的な滴定量は459mg/L、イソブタノールの蓄積はわずか15mg/Lであった（図49）。IPMSのフィードバック阻害を、突然変異により除去すると、生成物の分布がWT IPMSを用いた1.8:1（3-メチル-1-ブタノール:イソブタノール）から、30:1を超えるものに変化した。ピルビン酸、フマル酸、および酢酸を含めたその他の共通的な代謝副産物の蓄積は極小であった（表12）。

【表12】

3-メチル-1-ブタノール産生菌株の代謝副産物

菌株		代謝生成物濃度 (g/L)			
		ブドウ糖	ピルビン酸	フマル酸	酢酸
IAA88 IPMS (WT) ilvE ⁺ tyrB ⁺	初期(0時間)	4.7	ND	ND	ND
	最終(16時間)	ND ^a	ND	ND	0.03
	最大	4.7	0.53	0.02	0.03
	(時間)	(0時間)	(4時間)	(6時間)	(16時間)
IAA90 IPMS (WT) ilvE ⁻ tyrB ⁻	初期(0時間)	4.7	ND	ND	ND
	最終(16時間)	ND	ND	ND	0.06
	最大	4.7	0.66	0.02	0.07
	(時間)	(0時間)	(4時間)	(6時間)	(6時間)
IAA89 IPMS (G462D) ilvE ⁺ tyrB ⁺	初期(0時間)	4.7	ND	ND	ND
	最終(16時間)	ND	ND	ND	0.02
	最大	4.7	0.54	0.02	0.02
	(時間)	(0時間)	(4時間)	(6時間)	(16時間)

^aND = 未検出

乳酸およびコハク酸などのその他の代謝生成物は、検出されなかった。

【0173】

WT leuA遺伝子生成物を発現させた Δ ilvE Δ tyrB菌株を3-メチル-1-ブタノール生成について調べたとき、結果は、突然変異体IPMSを含む菌株のそれと似たものとなった。3-メチル-1-ブタノールは最終濃度553mg/Lに蓄積され、一方でイソブタノールは42mg/Lのみが存在した（図49）。これは、3-メチル-1-ブタノールのイソブタノールの生成物分布である13:1を超える比に一致する。

【0174】

本開示では、次世代のバイオ燃料としての高級アルコール類の生成のための合成的なアプローチを提供している。本明細書で提供した例は、組換え生合成経路を含めるために代謝的に改変した宿主細胞として大腸菌を利用している。ところが、サッカロミセス・セレビスエなどのその他の微生物が、その中に組換え生合成経路を含めるために適した宿主細胞を提供することは理解される。これらの宿主生物は、成長率が速く、また条件の嫌気性生物であり、大規模な生成のための柔軟性があり経済的なプロセス設計が可能となる。ところが、その他の生物から非天然の経路を取り込むことには、不都合がある。異種経路の発現は、代謝不均衡につながる恐れがあり、一方で異種代謝生成物の蓄積は、細胞毒性の原因となりうる。例えば、クロストリジウム・アセトブチリカムの1-ブタノール生成経路は、補酵素A (CoA) を運ぶ3つの中間体代謝生成物を持つ。この経路の過剰な発現は、遊離CoAプールの枯渇の原因となり、大腸菌中の代謝を混乱させることがある。外来性の標的生成物の高い生産性を達成するためには、宿主に適合した経路を探すことが望ましい。1-ブタノール生成のための一般的な経路を非天然の宿主である大腸菌に直接転写する代わりに、本明細書で提供した改変微生物では、大腸菌の既存の代謝能力および2-ケト酸分解のためのエールリヒ (Ehrlich) 経路での最後の2ステップの広範な基質の範囲を利用している。

10

【0175】

2-ケト酸は、アミノ酸生合成経路での中間体である。これらの代謝生成物は、広範な基質の範囲の2-ケト酸脱炭酸酵素 (KDC) によりアルデヒドに変換した後、アルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) によりアルコールに変換できる。この方法を使用して、アミノ酸生合成経路からの中間体をアルコール生成に分路することによりバイオ燃料を生成するには、2つの非天然のステップが必要である (図1A)。アミノ酸生合成経路により、多様な2-ケト酸が生成される (図1B)。本研究では、アルコール生成のために異なる6種の2-ケト酸を使用した。イソロイシン生合成経路では、2-ケト酪酸および2-ケト-3-メチル-吉草酸が生成され、これらはそれぞれ1-プロパノールおよび2-メチル-1-ブタノールに変換できる。バリン生合成経路では、イソブタノールの前駆物質である2-ケト-イソ吉草酸が生成される。ロイシン生合成経路では、3-メチル-1-ブタノールの基質である2-ケト-4-メチル-ペンタノエートが生成される。フェニルアラニン生合成経路では、2-フェニルエタノールをもたらすフェニルピルビン酸が生成される。ノルバリン生合成経路は、ロイシン生合成の副反応であるが、これにより1-ブタノールの基質、2-ケト吉草酸が生成される。

20

30

【0176】

2-ケト酸デカルボキシラーゼ活性は、サッカロミセス・セレビスエからのPDC6、ラクトコッカス・ラクティスからのkivd、およびTHI3サッカロミセス・セレビスエ (α -ケトイソカプロン酸デカルボキシラーゼ) およびpdcクロストリジウム・アセトブチリカムの遺伝子の一つにより提供されうる。アルコールデヒドロゲナーゼ (Adh) 活性は、サッカロミセス・セレビスエからのADH2により提供されうる。

【0177】

バリンは、AHAS (ilvBN遺伝子生成物)、イソメロレダクターゼ (ilvC遺伝子生成物)、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ (ilvD遺伝子生成物)、およびトランスアミナーゼB (ilvE遺伝子生成物) により触媒される4つの反応が関与する経路内で、ピルビン酸の2つの分子から合成される。その他の生物については、同一の酵素は、ピルビン酸および2-ケト酪酸からのL-イソロイシン合成も触媒する。後者は、L-トレオニンからトレオニンデヒドラターゼにより形成される (ilvA遺伝子生成物)。AHASは、分岐鎖アミノ酸合成の重要な酵素である。バリンは、ilvBNによりコードされたAHAS Iおよびアセトヒドロキシ酸シンターゼオペロンilvIHによりコードされたAHAS IIIのフィードバック阻害の原因となり、その小規模な調節サブユニットIlvNおよびIlvHは、バリン感受性のために必要であることが示された。

40

【0178】

このアルコール生成方法での酵素はKDCで、これは植物、酵母および菌類では一般的であるが、バクテリアではそれほど一般的ではない。生成されたアルデヒドは、その後、多

50

くの生物体で一般的に見られるAdhによりアルコールに変換しうる。KDCには、広い基質の範囲を持つものと、より特異的なものがある。内在性の2-ケト酸の大腸菌でのKDCのための基質としての能力を試すために、サッカロミセス・セレビシエからのPdc6、Aro10、Thi3、ラクトコッカス・ラクティスからのkivd、およびクロストリジウム・アセトブチリカムからのPdcを含めた5種のKDCを、サッカロミセス・セレビシエのアルコールデヒドロゲナーゼ2 (Adh2) を用いて過剰生成させた。これらの外来性の遺伝子を発現させた大腸菌培養液を、0.2 Mブドウ糖を含む最小の培地で培養した。GC-MS分析（表13を参照）では、kivdまたはARO10のいずれかを発現させた菌株で、期待されたアルコールすべてが生成されたことを明らかにしている。サッカロミセス・セレビシエのPDC6およびクロストリジウム・アセトブチリカムのpdcは、あまり多変性はなく、またサッカロミセス・セレビシエのTHI3では、期待された活性が示されなかった。

10

【0179】

表13は下記のとおり、大腸菌でのKDCおよびADHを用いたアルコール生成を示す：

【表13】

KDC	Kivd	ARO10	PDC6	THI3	Pdc(C.A.)
プラスミド	pSA55	pSA56	pSA49	pSA57	pSA59
生成物(μM)					
1-プロパノール	520	290	125	ND	ND
イソブタノール	5242	2094	260	ND	75
1-ブタノール	220	95	ND	ND	ND
2-メチル-1-ブタノール	766	652	56	ND	ND
3-メチル-1-ブタノール	1495	1099	92	ND	ND
2-フェニルエタノール	324	469	ND	ND	175

20

【0180】

微量のアルデヒドが検出されたが、これはAdh2の十分な活性を示す。これらの結果は、Kivdは活性のおよび多変性デカルボキシラーゼであり、従って、これらの目的に適していることを実証するものである。

【0181】

30

多様な2-ケト酸（表12を参照）をkivdを発現させた大腸菌培養物に追加することで、対応するアルコールの特異的な生成が2～23倍となることが確認された。2-ケト酸の供給によってもその他のアルコールの生成が劇的に減少した。これらの結果は、2-ケト酸への流れを増やすことで、アルコール生成の生産性および特異性の両方が改善されうること示すものである。

【0182】

表13は以下のとおり、2-ケト酸の供給を用いたアルコール生成を示す：

	2-ケト酪酸	2-ケト-イソ吉草酸	2-ケト吉草酸	2-ケト-3-メチル-ノバレート	2-ケト-4-メチル-ペンタノエート	フェニルピルビン酸
生成物 (μM)						
1-プロパノール	2138	ND	ND	ND	ND	8
イソブタノール	98	10016	ND	ND	ND	64
1-ブタノール	492	ND	3926	ND	ND	23
2-メチル-1-ブタノール	1315	ND	ND	5284	ND	ND
3-メチル-1-ブタノール	ND	ND	52	ND	3756	105
2-フェニルエタノール	26	109	66	ND	ND	7269

10

【0183】

20

既存の大腸菌代謝経路を、特定の2-ケト酸の生成が増加するよう遺伝的に組換えて、望ましいアルコールが生成されるようにした。イソブタノールを生成するために、ilvIHCD遺伝子を増幅して2-ケトイソ吉草酸合成を高めた（図1B）。大腸菌のilvIHオペロンは、イソロイシン、バリンおよびロイシン合成経路での第一の酵素であるアセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする。大腸菌K-12でのイソロイシン、ロイシン、およびバリンの生合成において最初の一般的なステップを触媒するアセトヒドロキシ酸シンターゼIIIアイソザイムは、2つのサブユニットであるilvI（アセト乳酸シンターゼIIIの大型サブユニット）およびilvH（アセト乳酸シンターゼの小型サブユニット）遺伝子産物で構成される。大腸菌のilvIHオペロンは、イソロイシン、バリンおよびロイシン合成経路での第一の酵素であるアセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする。大腸菌のilvC遺伝子は、並列のイソロイシン-バリン合成経路の第二の酵素であるアセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼをコードする。大腸菌のilvD遺伝子は、イソロイシン-バリン合成経路の第三の酵素であるジヒドロキシ酸デヒドラターゼをコードする。

30

【0184】

P_Llac01の制御下でilvI、ilvH、ilvCおよびilvD遺伝子をコードするオペロンを、プラスミド上に構築した。次に、増幅されたIlv経路を合成アルコール生成経路（KivdおよびA_{dh}2）と組み合わせて、イソブタノール生成を達成する。ilvIHCD経路の発現の結果として、この菌株では、23mMのイソブタノールが生成されたが、これはilvIHCD経路の過剰発現のない菌株に対して約5倍の増加である（下記表14および図2Aを参照）。

【0185】

40

表14は以下のとおり、ilvIHD経路および過剰発現を用いたアルコール生成を示す：

【表 1 4】

KDC	kivd	kivd	kivd	kivd	kivd	kivd
菌株	JCL16	JCL16	JCL16	JCL16	JCL88	JCL88
プラスミド	pSA55	pSA55	pSA54 pSA55	pSA54 pSA55	pSA54 pSA55	pSA54 pSA55
時間(hr)	16	24	16	24	16	24
生成物(μM)						
エタノール	1277	1744	2047	2228	850	1430
1-プロパノール	321	420	612	808	210	493
イソブタノール	2069	2172	12979	20813	13794	30910
1-ブタノール	67	112	146	198	89	127
2-メチル-1-ブタノール	223	629	262	345	195	239
3-メチル-1-ブタノール	1096	1696	1103	1577	727	1333
2-フェニルエタノール	545	1220	282	425	454	820

【0186】

これらの結果は、この合成的な経路は、効率的なイソブタノール生成に必要な2-ケトイソ吉草酸の供給について機能的でありかつその能力があることを実証するものである。イソブタノール生成をさらに増加させるために、adh、ldh、frd、fnr、pflB、および/またはpta等の副産物の生成に寄与する1つ以上の遺伝子を欠失させた。これらの欠失によって、ilvIHCD経路で使用できるピルビン酸のレベルを増大することができた。実際に、この菌株では30mMのイソブタノールが生成され、これらの欠失はイソブタノール生成にとって有益であったことが示されている。さらに、この菌株では、ブドウ糖がイソブタノールに変換され、16時間～24時間の間でのブドウ糖1グラム当たりのイソブタノール収量が0.21gであった（図2A、右パネル）。図42に図示した追加データでは、さらにこれらの欠失により、アセト乳酸シンターゼ経路で使用可能なピルビン酸のレベルも向上されうることが示されており、これはイソブタノール生成に影響を与え、イソブタノールがJCL16についての4.5 g/L (61 mM) から、64時間経過後のJCL260についての13.2 g/L (356 mM) に増加している。この結果は、収量が経路および生成の条件の詳細な最適化をしていない理論的な最大値の50%に達しているため、この方法の潜在性を実証している。この高い収量は、合成経路が宿主細胞の生理機能と完全に適合しているためである。追加的な収量データは、菌株SA237のすぐ下の表に記載している：

10

20

30

時間 (hr-hr)	収量(g/g)	時間 (hr)	(g/L)
0-16	~0.32	0	0.00
16-40	~0.4	16	~7.172
40-64	~0.36	40	~12.01
64-88	~0.32	64	~17.11
88-112	~0.33	88	~19.41
0-40	~0.34	112	~21.89
0-64	~0.35		
0-88	~0.34		
0-112	~0.34		

30 C

M9+0.5% YE

0.1mM IPTG

0~112 時間についてのエタノール生成は、~0.0037 g/g (240 mg/L) であった

	イソブタノール(mM)					
時間	#1	#2	#3	AVE	STDEV	IsoBuOH (g/L)
0						
16	98.45	108.29	83.56	96.77	12.45	7.172345
40	158.21	173.42	154.3	161.98	10.10	12.00571
64	225.54	253.33	213.67	230.85	20.36	17.11035
88	256.23	281.21	248.11	261.85	17.25	19.40832
112	296.43	312.56	277.12	295.37	17.74	21.89282

時間	ブドウ糖(g/L)				
0	36	36	36	36.00	
16	13.2	12.5	14.1	13.27	0.80
40	1.2	0.9	1.5	1.20	0.30
40.1	31.2	30.9	31.5	31.20	
64	17.4	15.6	18.9	17.30	1.65
88	10.3	7.8	12.5	10.20	2.35
112	2.8	1.4	4.1	2.77	1.35

【0187】

当初、T=0で36g/Lのブドウ糖が存在した。40.1時間経過時点で、さらに30gのブドウ糖を培養液に追加した。異なる時点でのブドウ糖の値は、特定の時点でのg/Lで表現されている（例えば、16時間経過時に、約22.8gのブドウ糖が代謝された）。

【0188】

類似した方法を1-ブタノールを生成する微生物の生成に適用した。発酵成長中に、その天然の生成体においては1-ブタノール生成経路を使用するが、この経路内の多くの酵素は酸素感受性でCoA依存性である。データから、1-ブタノール発酵経路を持たない大腸菌中

で、kivdまたはARO10を過剰発現させることで、細胞では非発酵性成長でブドウ糖から少量の1-ブタノール（表13）が既に生成されていることが示され、対応する2-ケト酸前駆物質、2-ケト吉草酸の存在が示唆される。ところが、2-ケト吉草酸は、大腸菌中の一般的な代謝生成物ではない。合成された2-ケト吉草酸の量を増加させるために、その天然の基質が2-ケトイソ吉草酸（図1B）であるleuABCD経路の広範な基質特異性を利用した。2-ケトイソ吉草酸（図1A）よりもメチル基が1つ少ない小さい方の基質、2-ケト酪酸を使用して、ロイシン生合成での形質変換と類似した手段で2-ケト吉草酸を合成した。2-ケト酪酸は、ilvA遺伝子によりコードされたトレオニンデヒドラターゼによりL-トレオニンから、あるいはレプトスピラ・インターロガンズ血清型およびメタノカルドコッカス・ジャナシイで特定される酢酸およびピルビン酸で始まる代替的な経路により生成しうる。後者の経路で、2-ケト酪酸は、イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼ（LeuCD）およびベータ-イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ（LeuB）といった酵素により、シトラマル酸から生成される。

【0189】

1-ブタノールを生成するために、PLlac01の制御下でilvA-leuABCD経路をコードするオペロンを構築した。ilvA-leuABCD経路を持つ菌株により、0.6mMの1-ブタノールが生成されたが、これはilvA-leuABCD経路の過剰発現のない菌株と比較して約3倍の増加であった（下記表15および図2Bを参照）。

【0190】

表15は以下のとおり、トレオニン経路の過剰発現を用いたアルコール生成を示す：

【表15】

KDC	kivd	kivd	kivd	kivd
プラスミド	pSA55	pSA55 pSA62	pSA55 pSA62	pSA54 pSA62
菌株	JCL16	JCL16	JCL16	SA203
0.8% L-トレオニン	-	-	+	+
生成物(μM)				
エタノール	2450	2343	3243	1493
1-プロパノール	520	1356	7592	9849
イソブタノール	2242	4322	1061	ND
1-ブタノール	220	583	3157	9232
2-メチル-1-ブタノール	766	1444	2002	ND
3-メチル-1-ブタノール	1495	4074	1349	ND
2-フェニルエタノール	324	358	269	524

【0191】

さらに、培地を0.8% L-トレオニンで補充したとき、1-ブタノール生成が3.2mMになる劇的な増加が観察されたが、これは2-ケト吉草酸は、IlvAを媒体とした反応によりL-トレオニンから生成しうることを示すものである（図2Cを参照）。

【0192】

1-ブタノール生成をさらに向上させるため、ilvD遺伝子を欠失させた。この遺伝子は、2-ケトイソ吉草酸（ロイシンおよびバリンの前駆物質）および2-ケト-3-メチル-吉草酸（イソロイシンの前駆物質）の両方を生成する酵素であるジヒドロキシ酸デヒドラターゼをコードする。この欠失は、2つの理由から有益であると考えられる。まず、ilvDの欠失により、leuABCD経路のための天然の基質、2-ケトイソ吉草酸が除去され、このため競合性の基質阻害が低減される。第二に、ilvDの欠失により、Kivdの競合する基質、2-ケト-3-メチル-吉草酸および2-ケト-4-メチル-ペンタノエートが除去される。期待されたとおり、ilvDの欠失により、1-ブタノール生成が改善された（図2C）。

【0193】

大腸菌菌株でのL-トレオニンの過剰生成は、商業的な生成のために開発されたため、トレオニンを生成する菌株は、1-ブタノールを生成する生物を生成する目的で、上記の方法を使用して改変できる。さらに改善するために、非天然の基質、2-ケト酪酸に対するleuABCD経路の活性を高め、2-ケト吉草酸に対するKivdの特異性を高める必要がある。2-ケト酪酸は、1-プロパノール用の基質でもあるため（図1B）、2-ケト酪酸の利用可能性を高めることでも、1-プロパノールの生成が増強される（図2Bおよび図2C、右パネル）。従って、leuABCD活性およびKDCの特異性を高めることは、高い効率での1-ブタノール生成のために非常に重要となる。

【0194】

1-ブタノールおよび1-プロパノール生成菌株CRS-BuOH23のアルコールプロファイルおよび収量は、下記のとおりである：

時間	PrOH	BuOH	合計	EtOH
0-20	0.037	0.015	0.053	0.004
20-28	0.054	0.046	0.1	0.004
28-52	0.033	0.042	0.075	0.003
52-76	0.061	0.066	0.127	0.009
76-100	-0.016	-0.014	-0.03	0.003
0-76	0.043	0.038	0.081	0.005
0-28	0.042	0.024	0.066	0.004
20-76	0.046	0.05	0.097	0.005
28-76	0.044	0.052	0.096	0.005

合計=1-プロパノール+1-ブタノール;最終 EtOH:116.2 mg/L

【0195】

3-メチル-1-ブタノール生成菌株のアルコールプロファイルおよび収量は、下記のとおりである：

3-メチル-1-ブタノール菌株		
時間(hr-hr)	3MB収量(g/g)	合計アルコール収量(g/g)
0-4	0.000	0.000
4-6	0.040	0.040
6-8	0.180	0.180
8-12	0.160	0.170
12-20	0.120	0.160
20-28	-0.050	-0.010
0-28	0.100	0.120

【0196】

2種の異なる2-メチル-1-ブタノール菌株についてのアルコールプロファイルおよび収量を以下に提示する：

2-メチル-1-ブタノール菌株1 (AFC-2MB-01BW25113:pAFC46:kivd (ラクトコッカス・ラクティス) AHD2 (サッカロミセス・セレビシエ) ilvA (コリネバクテリウム・グルタミカム) pAFC3:ilvGM (サルモネラ・ティフィムリウム) ilvCD (大腸菌) PCS49:thrA^{FBR}BC (大腸菌))

時間 (hr-hr)	2MB収量 (g/g)	合計アルコール収量 (g/g)	EtOH収量	EtOH mg/L
0-9	0.026	0.081	0.063	230.6
9-15	0.050	0.171	0.019	156.1
15-18	0.043	0.164	0.016	196.0
18-21	0.038	0.163	0.016	226.2
21-24	0.037	0.157	0.017	271.6
24-27	0.034	0.144	0.017	288.7
27-33	0.046	0.146	0.022	376.4
33-39	0.031	0.123	0.018	329.5

10

2-メチル-1-ブタノール菌株2 (AFC-2MB-02:CRS22:BW25113 ΔmetA Δtdh pAFC46:kivd (ラクトコッカス・ラクティス) AHD2 (サッカロミセス・セレビシエ) ilvA (コリネバクテリウム・グルタミカム) pAFC3:ilvGM (サルモネラ・ティフィムリウム) ilvCD (大腸菌) PCS49:thrA^{FBR}BC (大腸菌))

時間 (hr-hr)	2MB収量	合計アルコール収量	EtOH収量	EtOH mg/L
0-9	0.183	0.305	0.243	301.7
9-15	0.089	0.161	0.014	133.4
15-18	0.083	0.164	0.014	166.5
18-21	0.080	0.169	0.016	214.8
21-24	0.073	0.161	0.016	256.7
24-27	0.065	0.149	0.017	315.1
27-33	0.058	0.138	0.017	326.5
33-39	0.064	0.151	0.018	344.8

20

合計アルコール収量=2-メチル-1-ブタノール、3-メチル-1-ブタノール、イソブタノール、1-ブタノールおよび1-プロパノール

30

【0197】

大腸菌などの非天然宿主は、高級アルコールに対する耐性を欠く。イソブタノールは、微生物に対して1-ブタノールと同様に毒性があり、天然の1-ブタノール生成体は最高約2%の1-ブタノール濃度に耐えうる。耐性を向上させる潜在性を示すために、培養液の連続的転移による *in vitro* での進化を使用して、イソブタノール耐性を増大させる突然変異により菌株を濃縮した。データは、野生型大腸菌菌株 (JCL16) は、1.5%のイソブタノールにより阻害されたことを示している。ところが、培養液の転移のわずか5ラウンドの後、イソブタノール濃度が増大し、突然変異体が2%イソブタノールの存在下で成長することが分かった (図3)。この溶媒耐性レベルは、1-ブタノールの天然の生成体に匹敵するか、それより優れ、大腸菌は高濃度の長鎖アルコールに適応しうることを示唆されている。耐性をさらに改善するために、gTMEなどその他の方法を使用しうる。

40

【0198】

本明細書で説明した方法は、大腸菌およびその他の微生物の両方でのバイオ燃料生成のために提供されている。この方法は、アミノ酸生成技術と、アルコール生成のためにアミノ酸を2-ケト酸分解経路への仲介をするチャネルを利用している。この方法では、天然の生成体で1-ブタノール生成に使用されるCoAを媒体とした化学反応は回避し、その他のより高級かつ複合アルコールの工業規模での合成を可能にする。その他のアルコールを生成

50

するための特定の方法は、本明細書に記載の合成経路に基づき、簡単に考案することが可能である。例えば、2-フェニルエタノールの生成は、大腸菌で効率的に増幅されているフェニルアラニン経路を分岐することで、達成が可能である。これらの方法は、酵母またはその他の産業用微生物にも簡単に導入しうる。イソブタノール生成の場合に、完全な経路はCoA非依存で、前駆物質としてピルビン酸のみを必要とする。この特徴は、この方法を酵母に導入する際にアセチル-CoAのミトコンドリア区画化問題を回避するものである。イソブタノールおよび1-ブタノールの生成のためのこの方法では、1-ブタノールの天然の生成体からのそれと同等の理論的収量（0.41g/g ブドウ糖）が提供される。

【0199】

遺伝子欠失は、当業者にとって周知の方法を使用して実施した。簡潔に言えば、親の（例えば、野生型の）微生物として、BW25113（*rrnB*_{T14} Δ *lacZ*_{WJ16} *hsdR*514 Δ *araBAD*_{AH33} Δ *rhaBAD*_{LD78}）を使用した。説明したとおり、*adhE*、*ldhA*、*frdBC*、*fnr*、*pflB*および*ilvD*配列を欠失させた（DatsenkoおよびWanner、Proc Natl Acad Sci U.S.A 97:6640（2000））。*pta*配列の欠失は、P1形質導入によりJW2294（Baba et al., Mol Syst Biol 2:E1-E11（2006））を供与体として使用して行った。F'は、XL-1 blueから転移させて*lacIq*を供給した。本研究で使用した菌株のリストを表16に記載する。特に*pta*の欠失のために、ヌクレオチド2,412,772～2,414,893を除去した。*frdBC*の欠失のために、ヌクレオチド4,377,400～4,378,540を除去した。*adhE*の欠失のために、ヌクレオチド1,294,669～1,297,344を除去した。*ldhA*の欠失のために、ヌクレオチド1,439,878～1,440,867を除去した。*fnr*の欠失のために、ヌクレオチド1,396,798～1,397,550を除去した。*pflB*の欠失のために、ヌクレオチド950,508～952,784を除去した。

【表16】

菌株	関連する遺伝子型
BW25113	<i>rrnB</i> _{T14} Δ <i>lacZ</i> _{WJ16} <i>hsdR</i> 514 Δ <i>araBAD</i> _{AH33} Δ <i>rhaBAD</i> _{LD78}
JCL16	BW25113、F'(<i>traD</i> 36、 <i>proAB</i> +, <i>lacI</i> ^q ZDM15)
JCL88	JCL16、 Δ <i>adhE</i> 、 Δ <i>ldhA</i> - <i>fnr</i> 、 Δ <i>frdBC</i> 、 Δ <i>pta</i>
JCL93	JCL16、 Δ <i>adhE</i> 、 Δ <i>ldhA</i> 、 Δ <i>frdBC</i>
SA203	JCL16、 Δ <i>ilvD</i>
JCL260	JCL16、 Δ <i>adhE</i> 、 Δ <i>ldhA</i> - <i>fnr</i> 、 Δ <i>frdBC</i> 、 Δ <i>pflB</i> 、 Δ <i>pta</i>
JCL167	JCL16、 Δ <i>adhE</i> 、 Δ <i>ldhA</i> - <i>fnr</i> 、 Δ <i>frdBC</i>
JCL274	JCL16、 Δ <i>adhE</i> 、 Δ <i>ldhA</i> 、 Δ <i>frdBC</i> 、 Δ <i>pta</i>
JCL168	JCL16、 Δ <i>adhE</i> 、 Δ <i>ldhA</i> - <i>fnr</i> 、 Δ <i>frdBC</i> 、 Δ <i>pflB</i>
JCL171	JCL16、 Δ <i>adhE</i> 、 Δ <i>ldhA</i> 、 Δ <i>frdBC</i> 、 Δ <i>pflB</i> 、 Δ <i>pta</i>

【0200】

pSA46には、PDC6配列が含まれる。サッカロミセス・セレビスエ（ATCC）のゲノムDNAをPCRテンプレートとして、一対のプライマーA65およびA66を使用した（表17を参照）。PCR生成物は、*Acc*65Iおよび*Sph*Iで消化され、同一の酵素で切断されたpZE12-luc（3）にクローン化された。

【0201】

pSA49には、ADH2配列が含まれる。ADH2をクローン化するために、サッカロミセス・セレビスエ（ATCC）のゲノムDNAをPCRテンプレートとして使用し、一対のプライマーA67およびA68を併用した（表17を参照）。PCR生成物は、*Sph*Iおよび*Xba*Iで消化され、同一の酵素で切断されたpSA46にクローン化された。

【0202】

pSA53は、pSA49の複製開始点をp15Aで置き換えることで作製し、pZA31-lucは*Sac*Iおよび*Avr*IIで消化された。短い方の断片を精製し、同一の酵素で切断されたプラスミドpSA49にクローン化した。

【0203】

pSA55には、ラクトコッカス・ラクティスのゲノムDNAをPCRテンプレートとして使用し

て、一对のプライマーA96およびA97を併用して取得したkivd配列が含まれる（表17を参照）。PCR生成物は、Acc65IおよびSphIで消化され、同一の酵素で切断されたpSA49にクローン化された。

【0204】

pSA56には、ARO10配列が含まれる。サッカロミセス・セレビスエ（ATCC）のゲノムDNAをPCRテンプレートとして使用し、一对のプライマーA98およびA99を併用した（表17を参照）。PCR生成物は、Acc65IおよびSphIで消化され、同一の酵素で切断されたpSA49にクローン化された。

【0205】

pSA57には、THI3配列が含まれる。サッカロミセス・セレビスエ（ATCC）のゲノムDNAをPCRテンプレートとして使用し、一对のプライマーA100およびA101を併用した（表17を参照）。PCR生成物は、Acc65Iで消化された。pSA49は、SphIで消化され、Klenow Fragmentで平滑末端化し、その後でAcc65Iで消化された。このバックボーンをPCR生成物と結合させた。

【0206】

pSA58には、クロストリジウム・アセトブチリカムから獲得したpdc配列が含まれる。ゲノムDNAをPCRテンプレートとして使用し、一对のプライマーA102およびA103を併用した（表17を参照）。PCR生成物は、Acc65IおよびSphIで消化され、同一の酵素で切断されたpSA49にクローン化された。

【0207】

pSA40を作製するために、pZE21-MCS1のP_Ltet01配列をP_Llac01で置き換えた。pZE12-lucは、AatIIおよびAcc65Iで消化され、短い方の断片を精製し、同一の酵素で切断されたプラスミドpZE21-MCS1にクローン化された。

【0208】

pSA45には、ilvC配列が含まれる。ilvC配列は、大腸菌MG1655のゲノムDNAをPCRテンプレートとして使用し、一对のプライマーA71およびA72を併用して得られた（表17を参照）。PCR生成物は、SalIおよびXmaIで消化され、同一の酵素で切断されたpSA40にクローン化された。

【0209】

pSA47には、ilvD配列が含まれる。ilvD配列は、大腸菌MG1655のゲノムDNAをPCRテンプレートとして使用し、一对のプライマーA74およびA84を併用して得られた（表17を参照）。PCR生成物は、BspEIおよびMluIで消化され、SalIおよびMluIで切断されたpSA45にクローン化された。

【0210】

pSA51には、ilvIおよびilvH配列が含まれる。大腸菌MG1655のゲノムDNAをPCRテンプレートとして使用し、一对のプライマーA70およびA83を併用した（表17を参照）。PCR生成物は、BsaIおよびSalIで消化され、Acc65IおよびSalIで切断されたpSA40にクローン化された。

【0211】

pSA52には、ilvHの下流であるilvCおよびilvD配列が含まれる。pSA47は、SalIおよびMluIで消化された。短い方の断片を精製し、同一の酵素で切断されたプラスミドpSA51にクローン化された。

【0212】

pSA54は、pZA31-lucからのp15A複製開始点を、SacIおよびAvrIIで消化させ、プラスミドpSA52に転移させて作製した。

【0213】

pSA59には、leuABCD配列が含まれる。大腸菌MG1655のゲノムDNAをPCRテンプレートとして使用し、一对のプライマーA106およびA109を併用した（表17を参照）。PCR生成物は、SalIおよびBglIIで消化され、SalIおよびBamHIで切断されたpSA40にクローン化された。

【0214】

10

20

30

40

50

pSA60には、ilvA配列が含まれる。大腸菌MG1655のゲノムDNAをPCRテンプレートとして使用し、一对のプライマーA104およびA105を併用した（表17を参照）。PCR生成物は、Acc65IおよびXhoIで消化され、Acc65IおよびSalIで切断したpSA59にクローン化された。

【0215】

pSA62は、pZA31-lucからの複製開始点p15AをプラスミドpSA60にクローン化することで作製した。本明細書に記載した例示的なプラスミドの部分的記述は表18にリストしている。

【0216】

pSA66には、alsS配列の3'断片が含まれる。alsS配列は、枯草菌のゲノムDNAをPCRテンプレートとして使用し、一对のプライマーA123およびA124を併用して得られた（表17を参照）。PCR生成物は、Acc65IおよびSalIで消化され、同一の酵素で切断されたpSA40にクローン化された。

【0217】

pSA67には、alsS配列が含まれる。alsS配列の5'断片は、枯草菌のゲノムDNAをPCRテンプレートとして使用し、一对のプライマーA125およびA126を併用して得られた（表17を参照）。PCR生成物は、BsrGIおよびXbaIで消化され、Acc65IおよびXbaIで切断されたpSA66にクローン化された。

【0218】

pSA68には、alsSの下流であるilvCおよびilvD配列が含まれる。pSA47は、SalIおよびMluIで消化された。短い方の断片を精製し、同一の酵素で切断されたプラスミドpSA67にクローン化された。

【0219】

pSA69は、pZA31-lucからのp15A複製開始点を、SacIおよびAvrIIで消化させ、プラスミドpSA68に転移することで作製した。

【表18】

プラスミド	関連する遺伝子型
pSA54	p15Aの複製起点; P _L lacO1::ilvIHCD; kan ^r
pSA55	ColE1の複製起点; P _L lacO1::kivd-ADH2; amp ^r
pSA69	p15Aの複製起点; P _L lacO1::alsS-ilvCD; kan ^r

【0220】

PCRおよびクローン化手順で有用なオリゴヌクレオチドの例示的リストを表17に記載する。例示的なオリゴヌクレオチドは、PCRおよび/またはクローン化の手順で標的とされる特定の配列に従い改変できることが理解される。

10

20

30

【表 1 7】

名称	配列	(配列 番号)
A65	CGAGCGGTACCATGTCTGAAATTACTCTTGAAAAAT	(1)
A66	GCCTGCGCATGCTTATTGTTTGGCATTGTAGCGGCA	(2)
A67	GCCTGCGCATGCAGGAGATATACCATGTCTATTCCAGAACTCAAAAAG	(3)
A68	GCTCTAGATTATTTAGAAAGTGCAACAACGTAT	(4)
A70	ACGCAGTCGACTCAACGCATTATTTTATCGCCGCGC	(5)
A71	ACGCAGTCGACGAGGAATCACCATGGCTAACTACTT	(6)
A72	AATAACCCGGGTAAACCCGCAACAGCAATACGTTTC	(7)
A74	CGAGCACGCGTTTAACCCCCAGTTTCGATTTATCG	(8)
A83	GCCACCGGTCTCCGTACCATGGAGATGTTGTCTGGAGCCGAGA	(9)
A84	GGCTCCGGAAGGAGATATACCATGCCTAAGTACCGTTCCGCCACCA	(10)
A96	CGAGCGGTACCATGTATACAGTAGGAGATTACCTAT	(11)
A97	GCCTGCGCATGCTTATGATTTATTTTGTTCAGCAAAT	(12)
A98	CGAGCGGTACCATGGCACCTGTTACAATTGAAAAGT	(13)
A99	GCCTGCGCATGCCTATTTTTTATTTCTTTTAAGTGCCGC	(14)
A100	CGAGCGGTACCATGAATTCTAGCTATACACAGAGAT	(15)
A101	GGTCAGTATCCAACCTGATTTTTTTTAGAAG	(16)
A102	CGAGCGGTACCATGAAGAGTGAATACACAATTGGAAG	(17)
A103	GCCTGCGCATGCCTAATTATTTTGATTGCAAAACGT	(18)
A104	CGAGCGGTACCATGGCTGACTCGCAACCCCTGTCCG	(19)
A105	CCGCTCGAGCTAACCCGCCAAAAAGAACCTGAAC	(20)
A106	ACGCAGTCGACAAGAGACAAGGACCCAAACCATGAGCCAG	(21)
A109	GGAAGATCTTTAATTCATAAACGCAGGTTGTTTTGC	(22)
A123	GCCACCCGTCTCCGTACCATGTTGACAAAAGCAACAAAAGAAC	(23)
A124	ACGCAGTCGACCTAGAGAGCTTTCGTTTTTCATGAGT	(24)
A125	CGAGCTGTACAATGTTGACAAAAGCAACAAAAGAAC	(25)
A126	TCTCTAGAAAGGGTACCGGCAGCTTG	(26)

【0 2 2 1】

イソブタノール生成の例示的な手順で、宿主菌株JCL260を、プラスミドpSA69およびpSA55を用いて形質転換した。形質転換物をLB + 0.5% ブドウ糖 + 50 mg/L カナマイシン + 200 mg/L アンピシリン上にプレーティングした。新鮮な形質転換体を使用して、LB + 0.5% ブドウ糖 + 50 mg/L カナマイシン + 200 mg/L アンピシリンに2 mL培養液を接種した。培養物を37℃および290 rpmで夜通し培養した。

【0 2 2 2】

夜通し培養した培養物からの200 μLを使用して、250 mL スクリューキャップのフラスコ内で、20 mLのM9 + 1x Trace Metal Mix A5 + 7.2% ブドウ糖 + 3% トリプトン + 30 mg/L カナマイシン + 100 mg/L アンピシリンに接種した。培養物を37℃ / 260 rpmで培養した。1と2の間（約5時間）のOD600で、0.1 mM IPTGで培養物を誘導し、30℃ / 260 rpmで24時間培養した。

【0 2 2 3】

上記の溶液は、ろ過（チアミン）または高圧蒸気滅菌で別々に滅菌すべきである。培地はろ過により滅菌する。

【0 2 2 4】

10

20

30

40

50

イソブタノール生成はガスクロマトグラフィーで測定し、結果は図42～44に図示する。図42で、培養は以下のとおり実施した。7.2 % ブドウ糖、0.5 % 酵母エキス、100 $\mu\text{g/ml}$ アンピシリン、30 $\mu\text{g/ml}$ カナマイシンおよび1000 $\times$ Trace Metal Mix A5を含むM9 培地を準備した。3 mlのLB培地を含む試験管内で、pSA55およびpSA69を含む多様なノックアウト菌株の予備的な培養を、回転式振盪培養機（250 rpm）で37 $^{\circ}\text{C}$ で夜通し実施した。夜通し培養した培養液を、250 mlスクリュウキャップ付三角フラスコに入れた新鮮な培地20 mlに1:100に希釈した。細胞をOD₆₀₀で約2.0まで、37 $^{\circ}\text{C}$ で培養した後、0.1mMのIPTGを加えた。IPTG追加後、細胞を回転式振盪培養機（250 rpm）で30 $^{\circ}\text{C}$ で64時間培養した。スクリュウキャップを16時間、40時間および64時間経過時に開けて、サンプリングをした。培養試料をGC/FIDで分析した。図43で、培養は以下のとおり実施した。3.6 % ブドウ糖、100 $\mu\text{g/ml}$ アンピシリン、30 $\mu\text{g/ml}$ カナマイシンおよび1000 $\times$ Trace Metal Mix A5を含むM9培地を準備した。3 mlのLB培地を含む試験管内で、SA237（pSA55およびpSA69を含むJCL260）の予備的な培養を、回転式振盪培養機（250 rpm）で37 $^{\circ}\text{C}$ で夜通し実施した。夜通し培養した培養液を、250 mlスクリュウキャップ付三角フラスコ（赤）または250 ml三角フラスコ（青）に入れた新鮮な培地20 mlに1:100に希釈した。細胞をOD₆₀₀で約0.3まで、37 $^{\circ}\text{C}$ で培養した後、0.1mMのIPTGを加えた。IPTG追加後、培養液を回転式振盪培養機（250 rpm）で30 $^{\circ}\text{C}$ で72時間培養した。培養試料のイソブタノール濃度、OD₆₀₀およびpHを、24時間、48時間および72時間経過時に測定した。図45で、培養は以下のとおり実施した。培養用に、3.6 % ブドウ糖、100 $\mu\text{g/ml}$ アンピシリン、30 $\mu\text{g/ml}$ カナマイシンおよび1000 $\times$ Trace Metal Mix A5を含むM9培地を準備した。この培地に、0.8 % カザミノ酸（赤）、2 % トリプトン（緑）または0.5 % 酵母エキス（青）を加えた。3 mlのLB培地を含む試験管内で、SA237（pSA55およびpSA69を含むJCL260）の予備的な培養を、回転式振盪培養機（250 rpm）で37 $^{\circ}\text{C}$ で夜通し実施した。夜通し培養した培養液を、250 mlスクリュウキャップ付三角フラスコに入れた新鮮な培地20 mlに1:100に希釈した。細胞をOD₆₀₀で約0.8まで、37 $^{\circ}\text{C}$ で培養した後、0.1mMのIPTGを加えた。IPTG追加後、培養液を回転式振盪培養機（250 rpm）で30 $^{\circ}\text{C}$ で198時間培養した。培養液のイソブタノール濃度、ブドウ糖濃度、OD₆₀₀およびpHを各時点で測定した。40時間経過時に、1 mlの36 % ブドウ糖をすべての培養液に加えた。112時間経過時に、5 mlの新鮮な培地をカザミノ酸含有培養液（赤）およびトリプトン含有培養液（緑）に加えた。112時間経過時に、酵母エキスを含む培養液（青）に5 mlの新鮮な培地および2mlの36 % ブドウ糖を加えた。

【0225】

上記の実施例は、当業者に対して、開示の装置、システムおよび方法の実施形態を行い、使用する方法について完全な開示および説明を提供するものであり、その発明に関する発明者の関心の範囲を制限する意図はない。発明を実行するための上記に説明した態様に対する当業者にとって明らかな変更は、下記の特許請求の範囲に含まれることが意図される。本明細書で言及したすべての特許および刊行物は、本発明の関連する当業者の技術レベルを示す。本開示で引用したすべての参考文献は、各参考文献がその全文を個別に参照することで組み込まれているかのような同程度で参照することで組み込まれる。

【0226】

本発明の多数の実施形態を説明してきた。それにもかかわらず、本発明の精神や範囲から逸脱することなく、多様な改変が行われうることが理解される。従って、その他の実施形態も下記の特許請求の範囲の範囲内である。

【0227】

Applicant's or agent's file reference 0069697-000027	International application No. PCT/US08/53514
---	---

**INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL**

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page <u>throughout</u> , line _____	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet ☒	
Name of depositary institution American Type Culture Collection	
Address of depositary institution (including postal code and country) 10801 University Boulevard Manassas, Virginia 20110-2209 United States of America	
Date of deposit February 7, 2008	Accession Number PTA-8944
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet ☒	
Escherichi coli (E. coli) depositor reference number CRS-BuOH 23	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")	
For receiving Office use only	For International Bureau use only
☐ This sheet was received with the international application	☐ This sheet was received by the International Bureau on:
Authorized officer	Authorized officer

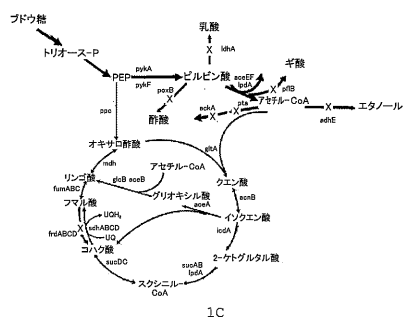
Applicant's or agent's file reference 0069697-000027	International application No. PCT/US08/53514
---	---

**INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL**

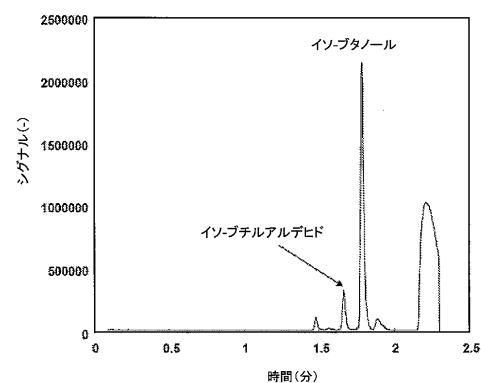
(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page <u>throughout</u> , line _____	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet ☐	
Name of depositary institution American Type Culture Collection	
Address of depositary institution (including postal code and country) 10801 University Boulevard Manassas, Virginia 20110-2209 United States of America	
Date of deposit February 7, 2008	Accession Number PTA-8945
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet ☒	
Escherichia coli (E. coli) depositor reference number SA237	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")	
For receiving Office use only ☐ This sheet was received with the international application Authorized officer	For International Bureau use only ☐ This sheet was received by the International Bureau on: Authorized officer

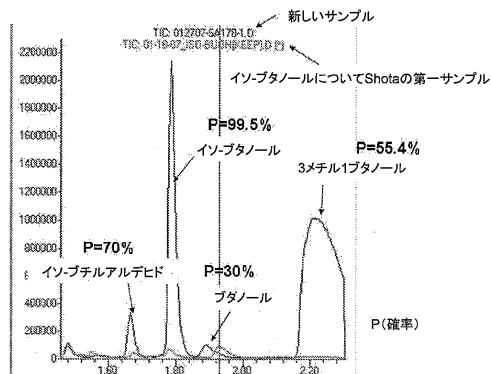
【图 2】



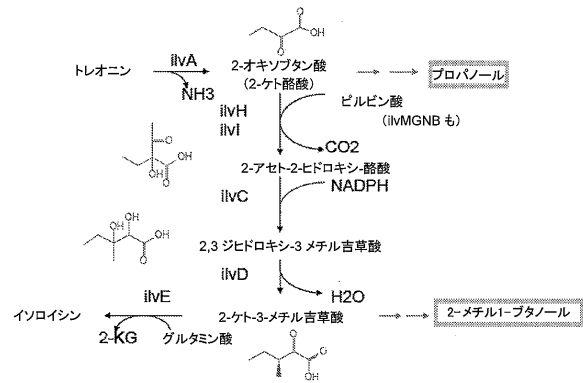
【图 5】



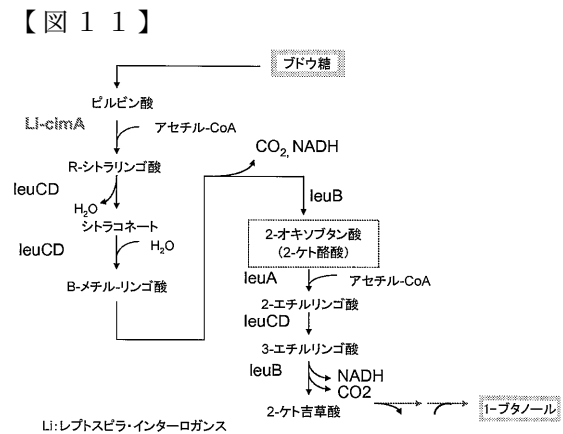
【图 6】



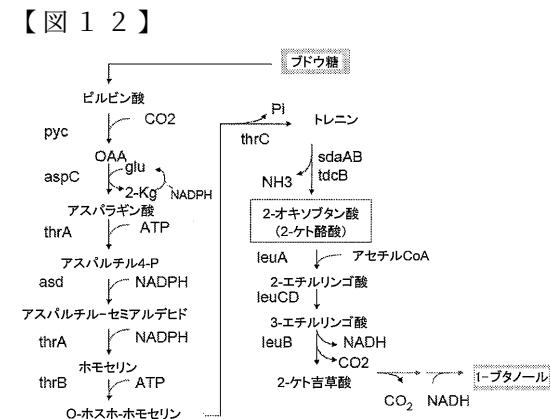
【图 9】



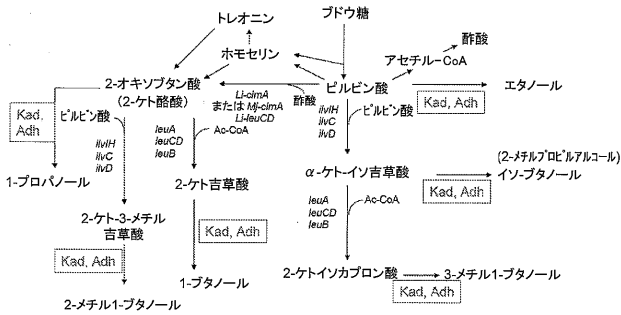
【 図 1 1 】



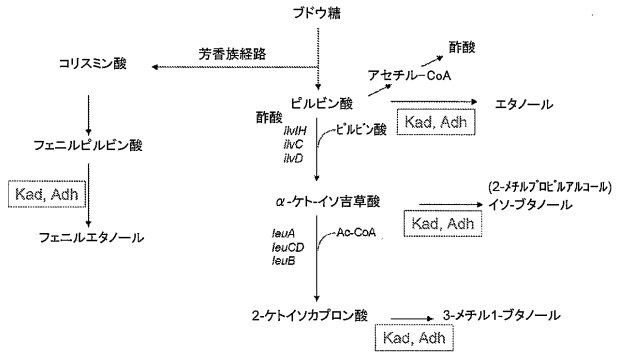
【 図 1 2 】



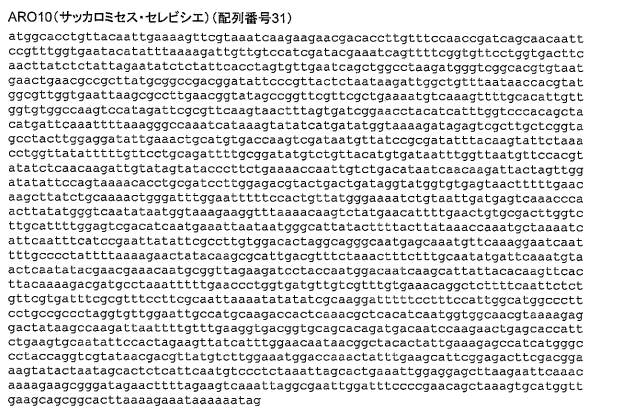
【図 13】



【図 14】



【図 17】



【図 18】



【 図 3 0 】

cimA(メタノカルドコッカス・ジャンシイ)：(配列番号57)

```
atgatgttaaggaattttgatcaaacacttagagatggagagcaaacaccaggagtttctttaacaccaaattgat
aagttagagatagcaaaaaaattggatgagcttggagttgatgttatagaggcaggttcagctataaactcaaaa
ggagagagagaaagaaataaaatttaatacaaaaagaaggtttaaattgcagaaatctgctcaatttgttagagcttta
cctgtagatattgatgctgcttgaagatgtgatgtagatagtccatttagtagtgccaacatctccaaatacac
atgaaataaagcttagaaaaacagaagatgaggttttagagcagctttaaagcgtgtagatgatgctaagaagaa
catggattgatgttgtgagttatctgcagagatgcgaacaagaagtgtatgtaaaattcttaataaaactatttaaa
gaaggggaaaaggttggagcagacagagatttgggtttgtgcacacataggagttttaaactccacaaaagagctcag
gaattatttaaaaaaataactgcgaataaattacacggtctcagttccatgtgcgcacaacgagctttggagtggtc
actgctaaacttgtctcagcgttttagtggaggtttcaggtgcgaacgtaacaggttaaggtattgtggagaga
gcaggaatactgctcatttgaagagggttgtctgctgtttaaaatactctatggtctgataaagataaaagatg
gaaaagtataatgaggtttcaagaattgtctcaagatgtgatgaacctctctgttcaccaaaataaagaacttgtt
ggggacaaatgctatttgtctcagcagcaggaatacactgtgtgatgttaataaaaaatactgaaacctatgagcca
ataaaacaggaatggttggggaatagaagaagaattatttgggtgaagcattctgtgtagaagaactttaaaatac
aaactgtattttagtgggcataaaacttagtgatgagcaataataaaaaatatatgaagaaggttaagaatttggg
gatttgggttaaatacatttcagacgctgatttgttgggtatagttagagaagttactggaanaattgtgtagaaga
aaaaataaattagatgaattaaactgtgttatctgggaataaaaaataacaccaattgcatctgtttaaactccattat
aaagagaagatataaactttaatagaacactgttatgtgttggacggttagatgcagcaataaaactgctgtgaag
aaggcataaagtggagttgcagatataaagttggttagagtatagagttgaagcaatttgggtggagaaactgcatgc
ttaatagagttgttgttaaatagaagaagaaactgaatttgttgaagttagaanaatacagacgctgatataata
agggctctgttagatgtgtaattgaaggaatacaattgtatttgaattaa
```

【 図 3 1 】

ilvM：(配列番号59)

```
atgatgcacaactcaggtcaattgtatcggtcgtctcaactccagaaaccttagaacgtgtttttacgcgtggtgcgt
catcgtggttttccacgctcgtcgtcaatgaatttggccgcgcgcgcagctgcacaaataataatcgaattgacc
gttgcagcccaacggtcggtcgacttaactgtttagtcaattaaataaactggtggacgtgcgcacacgttgcacac
tgccagagacaaacacacacacacaaacacccgcgcctga
```

【 図 3 2 】

ilvG：(配列番号61)

```
ttgttgttaaaacaactgtcggtatgtaaaactcgggatttgcgtcgtgacacagatttggggcagcacccagatg
tgggctgcgcagcacatgcgccacactgcgccggaanaatttcaactcaactccagcggtttagtaccatgggtttt
gggttaacggcgcgcggttggcgacaaactgcgcgcacgaacgataccgcttgtctgtatctccggtgacggctct
tcaatgatgaattgtcnaaggttggcgccacgtgaaacgcgaagcagttacogtggaaatcgtcttaactcgataac
caacggttagagatggctgcagaaatgggcagcaactgttttttcaggaagcatacagcgaagaaacaccccttaactgat
aaacccgatttctcattgttaacgcgcgcttcggatcccaatgcgcgaacacacacacccacccggaaagcagggttga
cgcgcacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacac
tgccgcgctggtgcgcgctgcgcgcacatgaattcagaanaattgttggagaattatcatga
```

【 図 3 3 】

ilvN：(配列番号63)

```
atgcacaaacacaaactcatgacaacgttaattctggagctcacogttcgcacaacatccgggcgttaatgacccaogtt
tgtgcccctttttgcccgcgcgcttttaacgttgaagcgtattctttgtctgcgatccaggacagcgcaaaaaagc
catatctggtcactggtcaatgacgcacacgctctggagcagatgataagccaaactcgataagctggaaagatgctc
gtgaaggtgcagcgtatcagtcgatccgcagattgtttaacagatcgcggtgttttccagtaa
```

【 図 3 5 】

図36 adhE2(クロストリジウム・アセトブトリカム)：(配列番号67)

```
atgaaagtatacaatcaaaaagaaactaaacaaaagctaaatgaattgagagagaagcgaagaaagatttgcaccc
taactcagcagcgaagtgtgataaaatttttaacaaatgtgcacatgcgcgcagctaaagaagaataaaacttagct
taactcagcgttagaagaacacaggaataggcttctgtagaagataaaattataaaaaactcatttgcagcagaatata
atatacaataaaataaaaaatgaaaaacttggcgataatagacacatgcgcatctctttaggcataaacaaggtt
gctgcacaaattggaaattgtgcagcatagttctactactactataacacttccacagcaatttcaaatcatta
attcttttaaaaaacaaacgaacgcaaatattctttccacacatccacggtgcgaanaattctcaaatgtctgcaga
aaatttaattttagtgcagctgtttaaagcagggacacactaaaaataataatagctggatagatagggcatcaata
gaactcttctcaagattttagttagtgaagctgatataaattatagaacacaggaagttccttcaatggtttaagcgcc
tatctcatctggaaaaactgcgaatttgggttgggacaggaataacacacacgaataatagatgagagtgcagatata
gatgtgcagtagaagctccataatttttcaaaagacttatgacaaatggagtaataatgcgctctgtgaacaaactaata
ttagtttatgaattcaatatacgaaaaaggttaaagaggaatttgaanaacaggaatcatataactcaatcaaaat
gaattagctcaaaataaagaacactatgtttaaaaaatggagctataatgctgcacatagtttggaaaaactgcttat
ataattgtcaaaatggcaggaatttgaagttctccaaactacaaagatacttataggcgaagtacaactctgtttaa
aaaaagcagcgtgttctcacatgaanaaactatcacacgtacttgaattgataaaagttaaagatttttgatgaagct
ctaaaaaaggcacaagaaggtcataagaattagggtggaaggggacacacgctcatcttataatagatttccacaaac
aataaagataaagttaaagaatttgggttaggaagaaagaaactcaagacatttatataacatgctccttccacag
ggagcaagcggagatttatacaattttggcgatagacccaacttactactgttggatgcgcgacttggggaggaac
ctgtgatctgcgaatttagagcctaaacatttataaataataaaaggttggctgaagaagagaaaaatagtctt
tggtttaaagtgcccaaaaaatatattttaaatgtgattgtgtgtatttgcatttaaagaattaaagaattatg
aataagaagaagccttataatgatacagataaagattcttttaaaacttgatattgttaataaaatacaaaaggta
catagtagatagatatataatacagatttatatacagatataaattcagatccactatgacttcagtagtaaaaaaa
gggtctaaagaagatgcttaacttgaacctgatatactataaattctctatttgggtggatgcgcaattggatgcagca
aaggtttatgcactgttatatgaatttcagagaacgagaanaatggaanaatcagctataaaacttatgtgataaaga
aagagaattatgcaatttccataaattagtgacaaaggcgaatttcagtagctatttctcaacactcgtggtacccgt
tcagaggccaacacctttgcagttataaactaatgaagaacaggaattgaataccctttaactcttatgatgaattg
accocaaacatggcacaataatagatactggaatttaattgtaaatgtgctagaaaaatbaacagcagcagaactggaata
gatgcattagttctgatatagagcctatatttgcatttgggtcagcgttatactatgatgaattagccttaaga
gcaataaaaatgatatttaaatatttgcgatagacccaacttactactgttggatgcgcgacttgggaaggaac
atggcacaactgctcctaataatttgcgggagtggaatttgcgaattgcttcttagtgtatgcaattcaattgctcat
aaacttggggcaatgcacacgttccacatggaaattgtctgtgtgttatataagaagaagttataataataaac
gctcacagactgtccacaagaacacacagcatttccctcaataataaactctcaatgtctaagagaanaattctgtgaa
attgcagagttatttgaatttaaagggttaactagcgtatccgcaaaaaggttaacagccttaataagaagctatttcaag
ttaagatagattttagatttccacaaataataagtcgcgctggaataaataaaaaagatttttataataagcgtata
gataaaaattgcagagcttgcctttttagtgaccaattgtacacagcgttaactcaggtatccactataatgtaactt
aaggatatctataaaaaacttttaa
```

【 図 3 4 】

ilvB：(配列番号65)

```
atggcaagtttcgggcacaaactcgacgcgtaaagcgttttacggcgcgagaatttatcgttcatttctcgtgaacag
cagggcattaagatttgtacagggcattccggcggtttctatcctgcctgttttaacgtgcttaagccaaagcacg
caaatccgccatattctgcgcgctcatgaacagggcgcgggctttatcgctcagggaatggcgcgcaacgcagctg
aaaccggggtctgtatggcgttagcggaacggggtgcgataaactgggtgaccgcattgccgatgcgcgcgctg
gactccatcccgctgatttgcatacctggtcaggttcccgctcgatgatacggcacacagccttccaggaaagt
gaacctcaaggctctctatccccatccacaaacacaaactatctggtcaagcatatcgaaagaactcccgaggtc
atggagcgtaccttcgcatgtgcgcaatcaggcgcccgacggccgggttggtagacatctcctaaggatgtggcaa
acgcagtttttgagattggaacacagccgctatggcgaaaaagagcgccgcgcctcttagcgaaagaagc
attctggaacagcggcgatgattaaacgtgcgaacggccggctgcttacttgcggcgcggttgatgataaagcgcg
ccgcacgpggtgcgtgaactggcggaagaagcgcaatgcctacccaactgaatttaattggcgctgggcgttgttgc
caaaaagcgcattccggtgtcgtgggtatgtctggggatgcacggcgtgcgcagaccaactatattttgcaggag
cggtatttgttagatgtctcgtgcgcggtttttagtgaacggcgcatggcgaaaaacagcagattctgtcogaat
gcaaaaactcatctatgctcgatacgcgcgcagagctgggttaaaatacaagcagccagcagcttaacgagc
gatgttgatgaagctgcgcgcgagttgatcccgctggtggaaagcgcaacccgctgcagagatggcacaggttggta
cggtatttgcagcgtgagtttccggtgtccaatcccgaaagcgtgcgactcggttaagccattacggcctgatcaac
gcggttgcgcgctgtgtcgatgacaatgcaattatcacacccagcgttggctcagcatcagatttggacgcgcgcga
ccttaccgctcaatgcgccacgcagtggtgtaacctccggtgggctggggcagtaggggttlttggcgtcgtgcg
gcgatttggcgctgcgttgaggagaacccggaatcgcaaaagtttgtgtttctccggcgacgcgagcgtgatgataat
attcagagatggcgaccgccaatgaaatacagctggatgcaaatcatcttctgatgaacaaagacgcgtcggtgg
ctgtgtcatcagcaacagagtcgtgttctacagcagaaggcgtttttgcgcgaactatccgcgcgaataaactctt
atgcagatttgcgcgcggattcgcgcctcgaaacactgtgatttgaatacagcagcgcgtccgcagggcttcatgtcag
gaactatcaactcccttggccgcgcgctgatccattgcgcgatttgatggcgaagaaaaagtttaccogattggtg
ccgcaggttgcgggaatactgaaattggtgggggaataa
```

【 図 3 6 】

Li-cimA(レプトスピラ・インターロガンズ)：(配列番号68)

```
atgacaaaagttagaaactcgattggaatttttagacgttaactttgagagacggggagcagacagcagaagggctcagt
tttccacttcgcgaanaactaaattatgcgaanaattctatatacaaaaaaataaattagatcgggttagatgttcgc
tgtcgaagagtttctaaagggaatttggaaacggttccaaaaaatactggaattgggtgcgaacacagcagcttaacg
taagcagatacgaataacttaggtttttagagaagggaataaaacgcgttagatttgatcaaaagatgtggggctaaagtt
ttaaattcttttagataaaggtatgccttcaatcttagaaaaaactaattggcaaaactccgaagaagattcttttaca
gaagttcttttttgaataagatcacggcatcaaaagcggcatataaaataagctatatttagaagattggtccaca
ggttttcagaagaacagttccagatttacgtcaaaactcgtctagaaacataagtaaaagaacataagaagaattttt
cttcagacacagcttaggcgttcttctgcgcagaagacagcgtttcaagtagtggtatctactcatcaaaaaacccg
gaattctcattttgaatttcaaggacataacgactacgatacttcttcgcgcaaatagttcttcaagcagattcgtgcg
ggagctaaaggtcttccagcttctataaattgggtctcgggaagaagaagcggaaaaatactccgttggaaagcactgta
acaacagatttcatgtagaattctactctaaaaagaacataaaacgaatttgcaattacggaagcagaacgcgtctgtga
gaagatttccagcggttaaaaaagaattttctgcaaatagcagattctgagagaagcagtggtttatccagacgcggga
gtcacgcgcagcggagacaaaaaaggaaatttatacgcgaactcttatttaccggaagaatttggtaggaagaaga
gaattacgcgttaggcgaacttgcaggttaaggcagattatctccgaanaattgaaacacactcggaattggttttaagt
aaagttgttttcaaaaaggttttagaaaggttgatcgaatttagagagatcagaataaactagtgcacactgaagat
cttccatcttatcattgcggagcgtttctgggaagaacgcgggaagaaggttacttacaatacaaatcttgttaattctat
tcoggaaattggaattcgtctcagcacaacttgaattggaaatcacgggaagaagattcataagaanaattcttgaa
ggagcgcggaggttatgtgcgtttatgaattgcacttactaaaaatcacgattcgcctcgttatagatttctcaaaa
ttgttagattatcgaagtagaagattcctcctggttggaaaaacagatgcactttagaanaactaggtacacgtggaac
aagtccttagatttagaagagagacagcagatttcaaaacagatgggaattctccggatcaaaccggttgcagcggtt
ctgcacactgaaaaagatgctcaattcaaatcttcaacacatggaagattctaa
```

【 図 3 7 】

Li-leuC(レプトスピラ・インターロガンズ)：(配列番号71)

```
atgaagacaattgtcgaaaaaatttgggaagatcatctagtccggagaactagatgctggatcctatctaactctat
atagatgcgcacttcaattcaatgaatttaacagctcctcagcggtttgaaggacttaaacctgcagggcagaagaagtt
cgtcgtcctgaagctacttbtgccacaatggaatacaaaagctttctactagaaacagtgatttaagctcgcgcgat
cctggttccgcaattcgaattcgagacttataaaaaagacgtgcgacgaacacgggaatccgcggttatagatttcaa
aaccttgcacaaggaatactcaagtaatcgtcctggaattgggaactgactcactcgtggaatgacaactcgtatgc
ggaagttctcaactctcacacacggttggttgggtgcgcttgctttcgggagtcggaacacagcagaagtagagacac
attctgtgcgactcaaaacttagttcaaaaaagagcaaaaaacaaatgagatttaggtgtgtgcggaacttccgat
aaagtcacagcgaagaagacatactcttgcgactctgggaanaattgggaacgcagctgcgcgaggttatgtatctc
gaattagaggtttctgcaattcaagccctcagtaggaagctagaattgacttattgttaattgtctatcgaacgcg
ggagcttagagcaggtttaaactgcacagatgaactacttttaattatctcaaggaagaagacttttctccaaaa
ggagtcgaattgggatttgcggttcaaaaaatggaacacatagtatacggcagcagaaggtgcataaatttgcataaga
ctaattcttcatcagatgaatactgcctcattggttaacttggggaactcttccacagcaggttttgcgataaaa
ggagtcgttccagatccaaaagatgcgaattgacccgttggaaaaaatttgggaattgagcttgcgttaaaattatg
gatctcaaatcggcgccgaagaatagaagacatttcaattataaagaattttatgcgttctcgtactactctaga
atcgagaattttagagcggcgctgcctaccgttaaaagggaaaaaaagtttcccttaaggttcaggcogatttggtt
ccggttccaggagcgttcaaaagcagcgggaacaaagaagcttggataaaaattttaccgcgcgcggttttgaa
tggagaattccagcgtctctatgctgtcttgcgtagtgaacgcagcgttatagaacccggagagctgttttagctct
acttctaacgcgaactttagaaggtcgtcaaggaaaggttgaagaaacccatctagttagcgcgaanaattgcgcgc
ggcgcgctatcogaagccatttttggatattcgaaactcgaaataa
```

【 図 3 8 】

Li-leuD(レプトスピラ・インターロガンズ)：(配列番号73)

```
atgaaacctttactatataaagggaattgcgcgcttacttggacagacccaacgtggatcaggtacagatcattt
caaaaacaaattttacggagaatagaacgaacggttccggagttcactgttgcagatttggagatcacttagac
gacgcgggttcaaaaactcaactcgtatttttccctcaactcaagaacgatataaaggagcttctcatcttataccc
agagaatactttggttgggtatcttccagagaacacgcgttcccttgggcttgaagaactcagcgttttaggcagta
attgctctcttcaagggaatttttttccaaactgcttcttaaaaagcgaattgcttccagctcatttttaaatcgc
gaagagtagaagagctgttcaattggtttgcgataaagcttaggcgcgaaggtcatttaggtatcttggcnaaacac
actgtaacgcgacagctggaaaaataatatttttgcgaataactgttgcgaataactgttcttatacgcga
cttgtagacataagctcaactcaataaaacagaagtaaaatttggcgagtttgaaaaaagcagaagaaggttgaa
ccttggttatacgcgcatataa
```

【図 4 2】

Li-leuB(レプトスピラ・インターロガンズ):(配列番号75)

atggaagatctgacgatctctccggagacggaatcgaccggaagatcatggaatgcacatctccgttttgaa
aagctccgtctggctgaagaagttcgctggtttcaattaaagaaagattttgattggttggaatcgactgaataaac
ggacacccattctccacggcctcttaaacattctggaagatattctccgaactctttccggaaagctgggaaggt
ctggatctgggaagaaactctccggaaaaaacacggcgacgggggacattcaactttcggaagaacatttgat
cttttgcaaacattgaagctcgcatatttatccaggattgaaaaattctccagttgctcttgatattat
ggaaacgtgacatagatattcttaataagagattacccgggaagatttatgtggacaacaaagaaagaa
ggatcagctcaggaaagatttgatgacacagatgattctccagaagaaagaaacggaggaattgcttaagtc
ttctgggaagaaagctggaagaaagaaataaagatgactgactgactgaagaagacgtctgactactcgttt
ttctgggaagaaagctggaagaaagctctgctgaataagaaattctcagcgtctctgactgactgactggtg
aatccggcgatcgatatactgaaatccgaacaaactccagcgtgctctttctggagaatattggtgtctct
ctctccagcagcgtctccatcattccggttctacatggagatctctctgctctctctccgaactcgattt
ggattctgacccattctctggttctctgcgcgaatgagcgaaaagaggtcgcaactcagatctgctcaagt
tgatgtggcgtggttgattgtaagttattctttttctatgaagcaagaaacaaacaaatgacaaacgcgtgtc
aaacagattgctctcgcaaaaagacacagagacatcggaagatgagattcagatctcagatcgaggactaaagaat
ctgcattgactgacatcctctctctaa

【図 40】

pheA: (配列番号77)

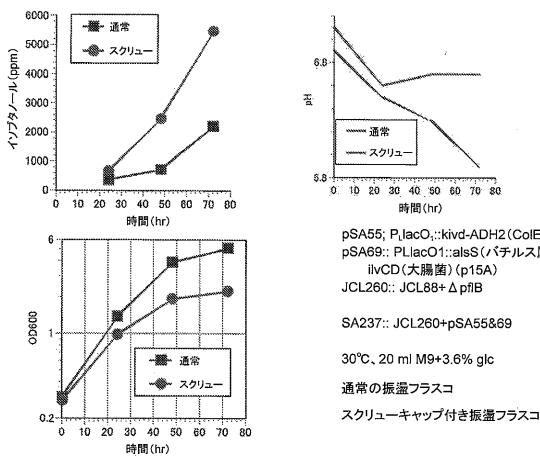
[illegible]

【図 4 1】

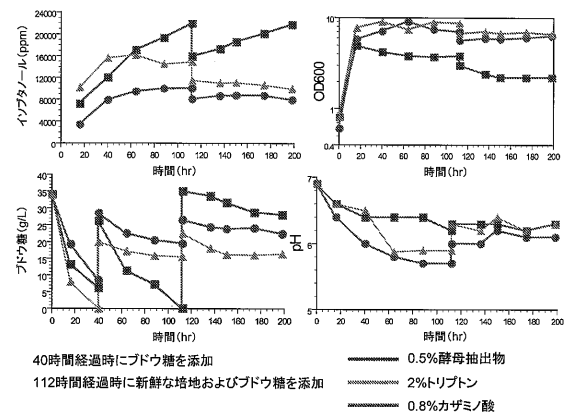
TyrA: (配列番号79)

11511521531541551561571581591601611621631641651661671681691701711721731741751761771781791801811821831841851861871881891901911921931941951961971981992002012022032042052062072082092102112122132142152162172182192202212222232242252262272282292302312322332342352362372382392402412422432442452462472482492502512522532542552562572582592602612622632642652662672682692702712722732742752762772782792802812822832842852862872882892902912922932942952962972982993003013023033043053063073083093103113123133143153163173183193203213223233243253263273283293303313323333343353363373383393403413423433443453463473483493503513523533543553563573583593603613623633643653663673683693703713723733743753763773783793803813823833843853863873883893903913923933943953963973983994004014024034044054064074084094104114124134144154164174184194204214224234244254264274284294304314324334344354364374384394404414424434444454464474484494504514524534544554564574584594604614624634644654664674684694704714724734744754764774784794804814824834844854864874884894904914924934944954964974984995005015025035045055065075085095105115125135145155165175185195205215225235245255265275285295305315325335345355365375385395405415425435445455465475485495505515525535545555565575585595605615625635645655665675685695705715725735745755765775785795805815825835845855865875885895905915925935945955965975985996006016026036046056066076086096106116126136146156166176186196206216226236246256266276286296306316326336346356366376386396406416426436446456466476486496506516526536546556566576586596606616626636646656666676686696706716726736746756766776786796806816826836846856866876886896906916926936946956966976986997007017027037047057067077087097107117127137147157167177187197207217227237247257267277287297307317327337347357367377387397407417427437447457467477487497507517527537547557567577587597607617627637647657667677687697707717727737747757767777787797807817827837847857867877887897907917927937947957967977987998008018028038048058068078088098108118128138148158168178188198208218228238248258268278288298308318328338348358368378388398408418428438448458468478488498508518528538548558568578588598608618628638648658668678688698708718728738748758768778788798808818828838848858868878888898908918928938948958968978988999009019029039049059069079089099109119129139149159169179189199209219229239249259269279289299309319329339349359369379389399409419429439449459469479489499509519529539549559569579589599609619629639649659669679689699709719729739749759769779789799809819829839849859869879889899909919929939949959969979989991000100110021003100410051006100710081009101010111012101310141015101610171018101910201021102210231024102510261027102810291030103110321033103410351036103710381039104010411042104310441045104610471048104910501051105210531054105510561057105810591060106110621063106410651066106710681069107010711072107310741075107610771078107910801081108210831084108510861087108810891090109110921093109410951096109710981099110011001100210031004100510061007100810091010101110121013101410151016101710181019102010211022102310241025102610271028102910301031103210331034103510361037103810391040104110421043104410451046104710481049105010511052105310541055105610571058105910601061106210631064106510661067106810691070107110721073107410751076107710781079108010811082108310841085108610871088108910901091109210931094109510961097109810991100110011002100310041005100610071008100910101011101210131014101510161017101810191020102110221023102410251026102710281029103010311032103310341035103610371038103910401041104210431044104510461047104810491050105110521053105410551056105710581059106010611062106310641065106610671068106910701071107210731074107510761077107810791080108110821083108410851086108710881089109010911092109310941095109610971098109911001100110021003100410051006100710081009101010111012101310141015101610171018101910201021102210231024102510261027102810291030103110321033103410351036103710381039104010411042104310441045104610471048104910501051105210531054105510561057105810591060106110621063106410651066106710681069107010711072107310741075107610771078107910801081108210831084

【图 4-4】



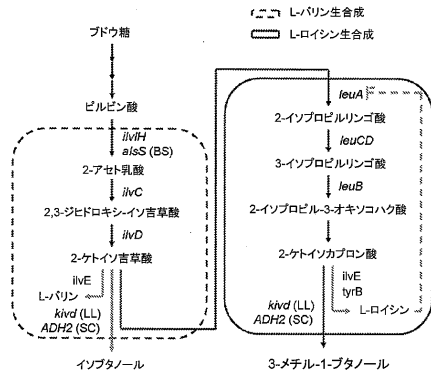
【图 4 5】



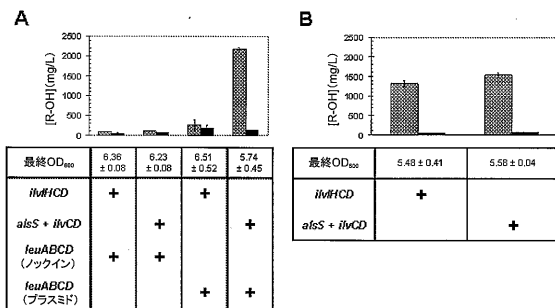
菌株
SA237:: JCL260+pSA55&69
pSA55; PLlacO1::kivd-ADH2(ColE1)
pSA69:: PLlacO1::alsS (バチルス属)-ilvCD (大腸菌) (p15A)
JCL260:: JCL88+ΔpflB

条件
30°C、20 ml M9+3.6% glc

【図 46】

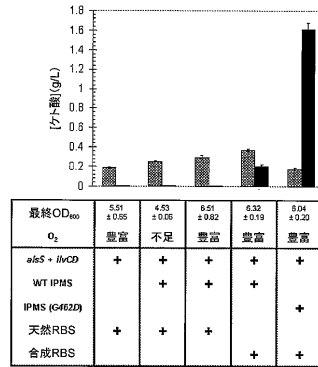


【図 47】

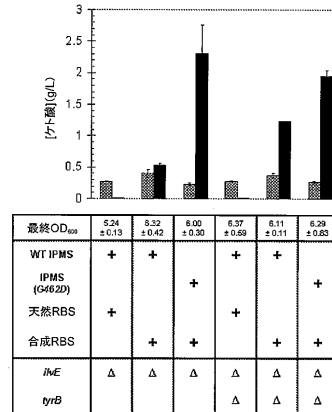


【図 48】

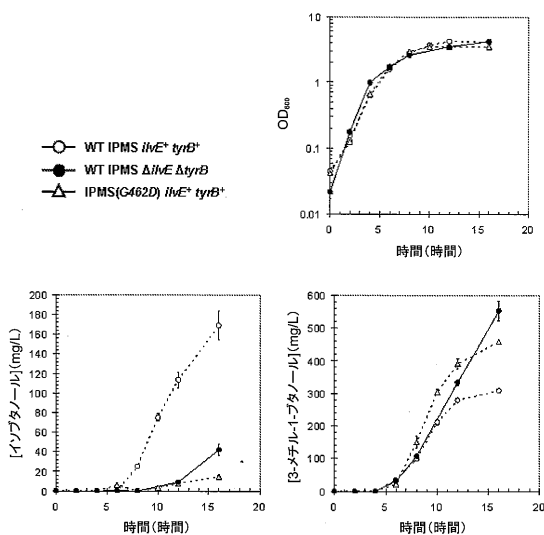
(A)



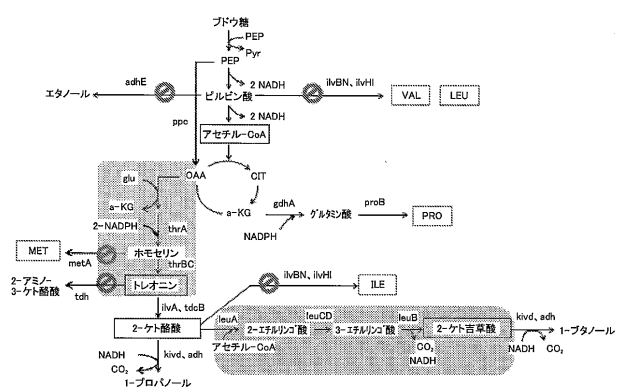
(B)



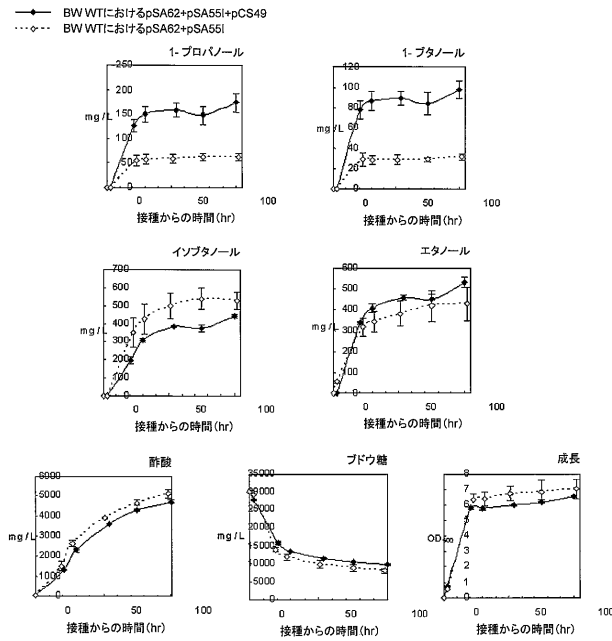
【図 49】



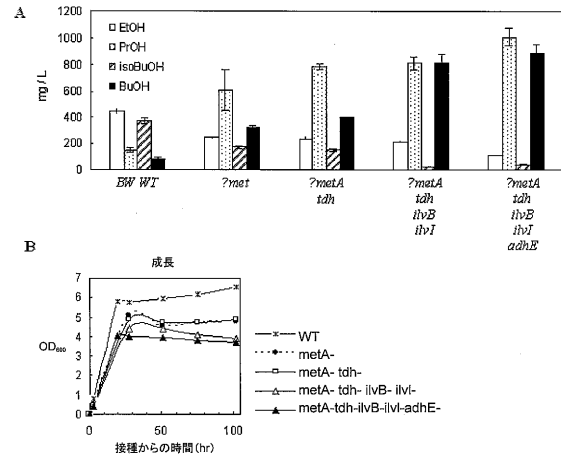
【図 50】



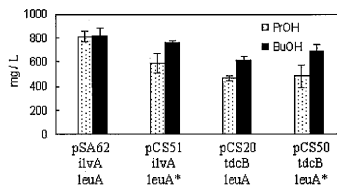
【図 5 1】



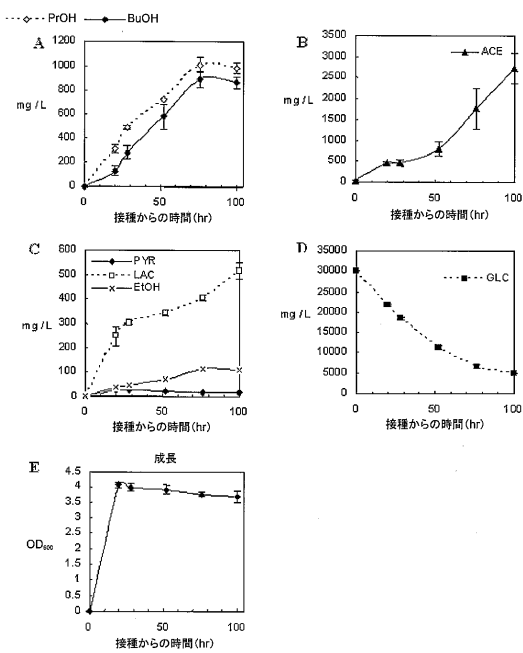
【図 5 2】



【図 5 3】



【図 5 4】



【配列表】

2011510611000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成22年7月23日(2010.7.23)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ブドウ糖1g当たりイソブタノールを少なくとも約0.12～約0.41gの収量で、及び/又はピルビン酸1g当たりイソブタノールを少なくとも約0.12～約0.42gの収量でイソブタノールを生成する組換え微生物。

【請求項2】

培養約112時間で約240mg/L未満のエタノールを生成する、請求項1に記載の組換え微生物。

【請求項3】

類似した条件下で培養したとき、前記微生物のアルコール生成プロファイルが、ATCC特許寄託名称PTA-8945(SA237)である微生物のアルコール生成プロファイルと実質的に類似である、請求項1又は2に記載の組換え微生物。

【請求項4】

イソブタノールの収量が、ブドウ糖1g当たり少なくとも約0.33～約0.36gのイソブタノールであるか、及び/又はピルビン酸1g当たり少なくとも約0.34～約0.37gのイソブタノールである、請求項1に記載の組換え微生物。

【請求項5】

イソブタノールの収量が、培養約16～約64時間でブドウ糖1g当たり少なくとも約0.36～0.40gのイソブタノールであるか、及び/又は培養約16～約64時間でピルビン酸1g当たり少なくとも約0.34～約0.37gのイソブタノールである、請求項1に記載の組換え微生物。

【請求項6】

ブドウ糖1g当たりのエタノールの収量が約0.0037g/g未満であるか、及び/又はピルビン酸1g当たりのエタノールの収量が約0.0038g/g未満である、請求項4又は5に記載の組換え微生物。

【請求項7】

(i) ピルビン酸からエタノール、及び

(ii) アセチル-CoAからエタノール

から選択される反応の変換の低下又は阻害を有する、請求項1に記載の組換え微生物。

【請求項8】

(a) エタノールデヒドロゲナーゼの発現の低下、

(b) エタノールデヒドロゲナーゼをコードする1以上の遺伝子の一部の欠失、及び

(c) エタノールデヒドロゲナーゼをコードする1以上の遺伝子のノックアウト

から選択される1以上の改変を有する、請求項1又は7に記載の組換え微生物。

【請求項9】

前記エタノールデヒドロゲナーゼがAdhE、その相同体又は変異体である、請求項8に記載の組換え微生物。

【請求項10】

(a) ピルビン酸からアセト乳酸、

(b) アセト乳酸から2,3-ジヒドロキシイソ吉草酸、

(c) 2,3-ジヒドロキシイソ吉草酸から α -ケト-イソ吉草酸、

(d) α -ケト-イソ吉草酸からイソブチルアルデヒド、

(e) イソブチルアルデヒドからイソブタノールから選択される反応を変換する1以上の酵素の発現又は発現の増大を有する、請求項1又は7に記載の組換え微生物。

【請求項11】

前記酵素が2-ケト酸デカルボキシラーゼである、請求項10に記載の組換え微生物。

【請求項12】

前記2-ケト酸デカルボキシラーゼが、Pdc、Pdc1、Pdc5、Pdc6、Aro10、Thi3、Kivd及びKdcA、上記のいずれかの相同体又は変異体、並びに上記のいずれか1つと少なくとも60%の同一性を有し、且つ2-ケト酸デカルボキシラーゼ活性を有するポリペプチドから成る群より選択される、請求項11に記載の組換え微生物。

【請求項13】

前記2-ケト酸デカルボキシラーゼがkivD遺伝子又はその相同体によりコードされる、請求項12に記載の組換え微生物。

【請求項14】

前記酵素がアルコールデヒドロゲナーゼである、請求項10に記載の組換え微生物。

【請求項15】

前記アルコールデヒドロゲナーゼが、Sfa1、Adh2、Adh1、Adh3、Adh4、Adh5、Adh6、上記のいずれかの相同体又は変異体、及び上記のいずれか1つと少なくとも60%の同一性を有し、且つアルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドから成る群より選択される、請求項14に記載の組換え生物。

【請求項16】

ピルビン酸からエタノールへの変換の触媒作用、アセチル-CoAからエタノールへの変換の触媒作用、ピルビン酸から乳酸への変換の触媒作用、フマル酸からコハク酸への変換の触媒作用、アセチル-CoA及びリン酸からCoA及びアセチルホスフェートへの変換の触媒作用、アセチル-CoA及びギ酸からCoA及びピルビン酸への変換の触媒作用、アセチル-CoAのアセチル基と3-メチル-2-オキソブタノエート（2-オキソイソバレレート）との縮合の触媒作用、2-イソプロピルリンゴ酸と3-イソプロピルリンゴ酸との間の異性化の触媒作用、 α -ケト酸から分岐鎖アミノ酸への変換の触媒作用、Phe、Tyr、Asp又はLeuの合成の触媒作用、ピルビン酸からアセチル-CoAへの変換の触媒作用、分岐鎖アミノ酸の生成の触媒作用、トレオニンからの α -ケト酪酸の生成の触媒作用、メチオニン生合成の最初のステップの触媒作用、並びにトレオニンの異化の触媒作用を有する酵素をコードする遺伝子に1以上の欠失又はノックアウトを有する、請求項1に記載の組換え微生物。

【請求項17】

adhE、ldhA、pflB、frdBC、fnr、pta、leuA、leuB、leuC、leuD、ilvE、tyrB、poxB、ilvB、ilvI、ilvA、metA、tdh、上記のいずれかの相同体及び上記のいずれかの天然の変異体から成る群より選択される1以上の遺伝子欠失を有する、請求項1又は16に記載の組換え微生物。

【請求項18】

adhE、ldhA、frdB、frdC、fnr、pta、pflB、leuA、ilvE、poxB、ilvA及びそれらのいずれかの組合せから成る群より選択される欠失又はノックアウトを有し、且つkivD、ThrABC及びadh2の発現又はこれらの発現の増大をさらに有する、請求項1又は16に記載の組換え微生物。

【請求項19】

親の微生物と比較して、

- a) アセトヒドロキシ酸シンターゼ、
- b) アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ、
- c) ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ、
- d) 2-ケト酸デカルボキシラーゼ、及び
- e) アルコールデヒドロゲナーゼ

の発現又は活性の増大を有する組換え微生物であって、ピルビン酸からエタノールへの変

換に関与する酵素をコードする少なくとも1つの遺伝子のノックアウト又は破壊を有し、且つイソブタノールを生成する、前記組換え微生物。

【請求項 20】

親の微生物と比較して、

- a) アセト乳酸シンターゼ、
- b) アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ、
- c) ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ、
- d) 2-ケト酸デカルボキシラーゼ、及び
- e) アルコールデヒドロゲナーゼ

の発現又は活性の増大を有する組換え微生物であって、エタノールデヒドロゲナーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、フマル酸レダクターゼ、リン酸アセチルトランスフェラーゼ、ピルビン酸ギ酸リアーゼ、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ及びそれらのいずれかの組合せから成る群より選択される酵素をコードする少なくとも1つの遺伝子のノックアウト又は破壊を有し、且つイソブタノールを生成する、前記組換え微生物。

【請求項 21】

イソブタノールを生成する方法であって、

- a) 請求項 1、2、7、11、14、19 及び 20 のいずれか 1 項に記載の組換え微生物を提供すること、
 - b) 適切な基質又は代謝中間生成物の存在下で、且つ該基質からイソブタノールへの変換にとって適切な条件下で a) に記載の微生物を培養すること、及び、
 - c) イソブタノールを実質的に精製すること、
- を含む、前記方法。

【請求項 22】

前記基質又は代謝中間生成物が 2-ケトイソ吉草酸を含む、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

適切な基質又は代謝中間生成物をイソブタノールに変換する組換え微生物を生成する方法であって、微生物を、アセトヒドロキシ酸シンターゼ活性、アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ活性、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ活性、2-ケト酸デカルボキシラーゼ活性及びアルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする 1 以上の組換えポリヌクレオチドで形質転換することを含む、前記方法。

【請求項 24】

生成される組換え微生物が、ATCC(登録商標)特許寄託名称 PTA-8945(SA237 と称する)のアルコールプロファイルと実質的に類似のブドウ糖存在下で生成されるアルコールプロファイルを有する、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記組換え微生物が、エシェリキア属、コリネバクテリウム属、ラクトバチルス属、ラクトコッカス属、サルモネラ属、エンテロバクター属、エンテロコッカス属、シアノバクテリア属、エルウィニア属、パンテア属、藻類、モルガネラ属、ペクトバクテリウム属、プロテウス属、セラチア属、シゲラ属、クレブシエラ属、シトロバクター属、サッカロマイセス属、デッケラ属、クリベロマイセス属及びビキア属から成る群より選択される微生物に由来する、請求項 1、19 及び 20 のいずれか 1 項に記載の組換え微生物。

【請求項 26】

前記エシェリキア属の微生物が大腸菌である、請求項 25 に記載の組換え微生物。

【請求項 27】

前記サッカロマイセス属の微生物がサッカロマイセス・セレビスエである、請求項 25 に記載の組換え微生物。

【請求項 28】

- (a) 1-プロパノール、
- (b) イソブタノール、
- (c) 1-ブタノール、

- (d) 2-メチル1-ブタノール、
- (e) 3-メチル1-ブタノール、及び
- (f) 2-フェニルエタノール

から成る群より選択されるアルコールを生成する組換え微生物であって、

a) 前記アルコールが2-ケト酸を含む代謝産物から生成され、且つ該2-ケト酸が2-ケト酸デカルボキシラーゼ及びアルコールデヒドロゲナーゼにより前記アルコールに変換され、及び、

b) 前記組換え微生物が、ピルビン酸からエタノールへの変換の触媒作用、アセチル-CoAからエタノールへの変換の触媒作用、ピルビン酸から乳酸への変換の触媒作用、フマル酸からコハク酸への変換の触媒作用、アセチル-CoA及びリン酸からCoA及びアセチルホスフェートへの変換の触媒作用、アセチル-CoA及びギ酸からCoA及びピルビン酸への変換の触媒作用、アセチル-CoAのアセチル基と3-メチル-2-オキソブタノエート(2-オキソイソバレレート)との縮合の触媒作用、2-イソプロピルリンゴ酸と3-イソプロピルリンゴ酸との間の異性化の触媒作用、 α -ケト酸から分岐鎖アミノ酸への変換の触媒作用、Phe、Tyr、Asp又はLeuの合成の触媒作用、ピルビン酸からアセチル-CoAへの変換の触媒作用、分岐鎖アミノ酸の生成の触媒作用、トレオニンからの α -ケト酪酸の生成の触媒作用、メチオニン生合成の最初のステップの触媒作用、並びにトレオニンの異化の触媒作用を有する酵素をコードする遺伝子に1以上の欠失又はノックアウトを有する、前記組換え微生物。

【請求項 29】

親の微生物と比較して、

- a) 2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ、
- b) β -イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ、
- c) イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼ、及び
- d) トレオニンデヒドラターゼ

の発現又は活性の増大を有し、且つ1-ブタノールを生成する、請求項 28 に記載の組換え微生物。

【請求項 30】

適切な基質又は代謝中間生成物を1-ブタノールに変換する組換え微生物を生成する方法であって、微生物を、2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ活性、 β -イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ活性、イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼ活性及びトレオニンデヒドラターゼ活性を有するポリペプチドをコードする1以上の組換えポリヌクレオチドで形質転換することを含む、前記方法。

【請求項 31】

生成される組換え微生物が、ATCC(登録商標)特許寄託名称PTA-8944(CRS-BuOH23と称する)のアルコールプロファイルと実質的に類似のブドウ糖存在下で生成されるアルコールプロファイルを有する、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

親の微生物と比較して、

- a) α -イソプロピルリンゴ酸シンターゼ、
- b) β -イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ、
- c) イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼ、及び
- d) トレオニンデヒドラターゼ

の発現又は活性の増大を有し、且つ1-プロパノールを生成する、請求項 28 に記載の組換え微生物。

【請求項 33】

適切な基質又は代謝中間生成物を1-プロパノールに変換する組換え微生物を生成する方法であって、微生物を、 α -イソプロピルリンゴ酸シンターゼ活性、 β -イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ活性、イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼ活性及びトレオニンデヒドラターゼ活性を有するポリペプチドをコードする1以上の組換えポリヌクレオチドで形

質転換することを含む、前記方法。

【請求項 3 4】

親の微生物と比較して、

- a) トレオニンデヒドラターゼ、
- b) アセトヒドロキシ酸シンターゼ、
- c) アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ、
- d) ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ、
- e) 2-ケト酸デカルボキシラーゼ、及び
- f) アルコールデヒドロゲナーゼ

の発現又は活性の増大を有し、且つ2-メチル1-ブタノールを生成する、請求項 2 8 に記載の組換え微生物。

【請求項 3 5】

適切な基質又は代謝中間生成物を2-メチル1-ブタノールに変換する組換え微生物を生成する方法であって、微生物を、トレオニンデヒドラターゼ活性、アセトヒドロキシ酸シンターゼ活性、アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ活性、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ活性、2-ケト酸デカルボキシラーゼ活性及びアルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする1以上の組換えポリヌクレオチドで形質転換することを含む、前記方法。

【請求項 3 6】

親の微生物と比較して、

- a) アセトヒドロキシ酸シンターゼ又はアセト乳酸シンターゼ、
- b) アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ、
- c) ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ、
- d) 2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ、
- e) イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼ、
- f) β -イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ、
- g) 2-ケト酸デカルボキシラーゼ、及び
- h) アルコールデヒドロゲナーゼ

の発現又は活性の増大を有し、且つ3-メチル1-ブタノールを生成する、請求項 2 8 に記載の組換え微生物。

【請求項 3 7】

適切な基質又は代謝中間生成物を3-メチル1-ブタノールに変換する組換え微生物を生成する方法であって、微生物を、アセトヒドロキシ酸シンターゼ活性又はアセト乳酸シンターゼ活性、アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ活性、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ活性、2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ活性、イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼ活性、 β -イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ活性、2-ケト酸デカルボキシラーゼ活性及びアルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする1以上の組換えポリヌクレオチドで形質転換することを含む、前記方法。

【請求項 3 8】

親の微生物と比較して、

- a) コリスミ酸ムターゼP/プレフェン酸デヒドラターゼ、
- b) コリスミ酸ムターゼT/プレフェン酸デヒドロゲナーゼ、
- c) 2-ケト酸デカルボキシラーゼ、及び
- d) アルコールデヒドロゲナーゼ

の発現又は活性の増大を有し、且つフェニルエタノールを生成する、請求項 2 8 に記載の組換え微生物。

【請求項 3 9】

適切な基質又は代謝中間生成物をフェニルエタノールに変換する組換え微生物を生成する方法であって、微生物を、コリスミ酸ムターゼP/プレフェン酸デヒドラターゼ活性、コリスミ酸ムターゼT/プレフェン酸デヒドロゲナーゼ活性、2-ケト酸デカルボキシラーゼ活

性及びアルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする1以上の組換えポリヌクレオチドで形質転換することを含む、前記方法。

【請求項 40】

SA237と称され、且つATCC(登録商標)特許寄託名称PTA-8945である組換え微生物。

【請求項 41】

CRS-BuOH23と称され、且つATCC(登録商標)特許寄託名称PTA-8944である組換え微生物。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US08/33514

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: C12N 1/21(2006.01), 1/19(2006.01), 15/74(2006.01); C12P 7/02(2006.01), 7/06(2006.01) USPC: 435/252.3, 254.21, 254.23, 471, 161, 155 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S.: 435/252.3, 254.21, 254.23, 471, 161, 155 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EAST, STN files Medline, Caplus, Embase, Biosis		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	OLIVERIA et al., "The production of volatival compounds by yeasts isolated from small Brazilian cachaca distilleries", World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2005, Vol. 21, pages 1569-1576, see entire article	1-18, 24-47, 50-60, 63-93, 95, 97-100, 102-108
A	DICKINSON et al., "A ¹³ C Nuclear magnetic resonance investigation of the metabolism of leucine to isoamyl alcohol in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ", Journal of Biological Chemistry, 24 October 1997, Vol. 272, No. 43, pages 26871-26878, see entire article	1-18, 24-47, 50-60, 63-93, 95, 97-100, 102-108
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" Inter document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 28 August 2008 (28.08.2008)		Date of mailing of the international search report 12 SEP 2008
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer NANCY VOGEL Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US08/53514

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 3,48,49,61,62,94,96 and 101
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
The claims comprise blanks which are not filled in.
3. ☒ Claims Nos.: 19-23
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード (参考)
C 1 0 L 1/02 (2006.01) C 1 0 L 1/02

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

(74)代理人 100111741

弁理士 田中 夏夫

(72)発明者 リャオ, ジェームズ, シー.

アメリカ合衆国 9 0 0 2 4 カリフォルニア州, ロサンゼルス, ウェルワース アベニュー 1
0 5 7 3

(72)発明者 渥美 正太

アメリカ合衆国 9 0 0 3 4 カリフォルニア州, ロサンゼルス, ナンバー 7 2 0 2, オーバーラ
ンド ドライブ 3 2 1 9

(72)発明者 スミス, ケビン, エム.

アメリカ合衆国 9 0 0 3 4 カリフォルニア州, ロサンゼルス, ナンバー 1 0 4, エス. カンフ
ィールド アベニュー 3 3 4 4

(72)発明者 シェン, ロア プ, クレア

アメリカ合衆国 9 0 0 2 4 カリフォルニア州, ロサンゼルス, アpartment ナンバー 2 1
2, ベテラン アベニュー 1 3 7 0

(72)発明者 カン, アンソニー, エフ.

アメリカ合衆国 9 0 2 9 2 カリフォルニア州, マリーナ デル レイ, ナンバー 1 1 4, パラ
ワン 1 4 0 0 0

(72)発明者 コナー, マイケル, アール.

アメリカ合衆国 9 0 0 2 5 カリフォルニア州, ロサンゼルス, ナンバー 3, ウォールナット
レーン 1 1 9 8 0

F ターム(参考) 4B024 AA03 AA17 BA08 BA10 CA02 DA06 DA10

4B064 AC02 AC03 AC04 CA02 CA06 CB18 CC24 CD07 DA16

4B065 AA24Y AA26X AA29Y AA30Y AA40 AA46Y AA48Y AB01 AC14 BA02

BB08 CA05 CA06 CA27 CA28 CA29 CA60

4H013 BA01