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

特許第6099623号
(P6099623)

(45)発行日　平成29年3月22日(2017.3.22)　(24)登録日　平成29年3月3日(2017.3.3)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19	ZNA
C12P 7/04	(2006.01)	C12P	7/04	
C12P 7/16	(2006.01)	C12P	7/16	
C12N 9/90	(2006.01)	C12N	9/90	

請求項の数 14　(全 208 頁)

(21)出願番号　特願2014-501294 (P2014-501294)
(86)(22)出願日　平成24年3月23日 (2012.3.23)
(65)公表番号　特表2014-508541 (P2014-508541A)
(43)公表日　平成26年4月10日 (2014.4.10)
(86)国際出願番号　PCT/US2012/030479
(87)国際公開番号　WO2012/129555
(87)国際公開日　平成24年9月27日 (2012.9.27)
審査請求日　平成27年3月18日 (2015.3.18)
(31)優先権主張番号　61/467,261
(32)優先日　平成23年3月24日 (2011.3.24)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/467,271
(32)優先日　平成23年3月24日 (2011.3.24)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　310011310
ビュータマックス・アドバンスド・バイオフューエルズ・エルエルシー
アメリカ合衆国デラウェア州１９８８０．ウィルミントン．ビルディング３５６．デュポンイクスペリメンタルステーション．ルート１４１　アンド　ヘンリークレイ
(74)代理人　100127926
弁理士　結田　純次
(74)代理人　100140132
弁理士　竹林　則幸
(72)発明者　ラリー・キャメロン・アントニー
アメリカ合衆国ペンシルベニア州１９０１４．アストン．コーリーレーン５０１

最終頁に続く

(54)【発明の名称】イソブタノール生成のための宿主細胞及び方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
イソブタノール生成経路と、
ｉ．ケトール酸レダクトイソメラーゼ（ＫＡＲＩ）活性を有する異種ポリペプチドであって、
１．配列番号２７と少なくとも９０％の同一性を有し、かつ以下の位置の少なくとも１つの置換：
Y53に対応する位置の置換がA、E、F、L、P又はQ；
S56に対応する位置の置換がA、D、G、T又はV；
K57に対応する位置の置換がE；
S58に対応する位置の置換がD、E、H又はQ；
N87に対応する位置の置換がP
を有するポリペプチド；
２．配列番号２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１、４３、４５、４７、４９、５１、５３、５５、５７、５９、６１、６３、又は６５によって表わされるアミノ酸配列を含むポリペプチド
からなる群から選択される異種ポリペプチドか、又は
ｉｉ．上記ｉのＫＡＲＩ活性を有する異種ポリペプチドをコードする異種ポリヌクレオチドか
の少なくとも一方と

を含む組換え酵母宿主細胞。
【請求項２】
ＫＡＲＩ活性を有する異種ポリペプチドが、以下のアミノ酸の１つ以上の置換：
配列番号２７のI86に対応する位置の置換がTまたはV；
配列番号２７のT131に対応する位置の置換がA、C、L、M又はV；
配列番号２７のT191に対応する位置の置換がA、C、D、G又はS
をさらに含む、請求項１に記載の組換え酵母宿主細胞。
【請求項３】
ＫＡＲＩ活性を有する異種ポリペプチドが、以下のアミノ酸の１つ以上の置換：
配列番号２７のI84に対応する位置の置換がF、L又はV；
配列番号２７のK90に対応する位置の置換がE、L、M、N又はT；
配列番号２７のT93に対応する位置の置換がA、I又はS；
配列番号２７のM94に対応する位置の置換がI、L、R、T又はV；
配列番号２７のP135に対応する位置の置換がL、S又はT
をさらに含む、請求項１又は２に記載の組換え酵母宿主細胞。
【請求項４】
ＫＡＲＩ活性を有する異種ポリペプチドが、以下のアミノ酸の１つ以上の置換：
配列番号２７のA41に対応する位置の置換がV；
配列番号２７のG55に対応する位置の置換がC又はD；
配列番号２７のW59に対応する位置の置換がC又はR；
配列番号２７のF67に対応する位置の置換がI又はL；
配列番号２７のE74に対応する位置の置換がG；
配列番号２７のL85に対応する位置の置換がM；
配列番号２７のQ91に対応する位置の置換がL；
配列番号２７のN107に対応する位置の置換がS
をさらに含む、請求項１～３のいずれか一項に記載の組換え酵母宿主細胞。
【請求項５】
イソブタノール生成経路が、以下の基質から生成物への変換：
ａ．アセト乳酸シンターゼにより触媒されるピルベートからアセトラクテート；
ｂ．KARIにより触媒されるアセトラクテートから２，３－ジヒドロキシイソバレレート；
ｃ．ジヒドロキシ酸デヒドラターゼにより触媒される２，３－ジヒドロキシイソバレレートから２－ケトイソバレレート；
ｄ．分枝鎖２－ケト酸デカルボキシラーゼにより触媒される２－ケトイソバレレートからイソブチルアルデヒド；及び
ｅ．分枝鎖アルコールデヒドロゲナーゼにより触媒されるイソブチルアルデヒドからイソブタノール
を含み、
各酵素が、組換え酵母宿主細胞によって組換え発現される、請求項１～４のいずれか一項に記載の組換え酵母宿主細胞。
【請求項６】
組換え発現される酵素が、組換え酵母宿主細胞にとって異種である、請求項１～５のいずれか一項に記載の組換え酵母宿主細胞。
【請求項７】
組換え酵母宿主細胞が、アセトラクテートを２，３－ジヒドロキシ－２－メチルブチレートに変換する活性の低減、破壊又は除去；ピルビン酸デカルボキシラーゼ発現又は活性の低減、破壊又は除去；ＮＡＤ依存性グリセリン－３－リン酸デヒドロゲナーゼ発現又は活性の低減、破壊又は除去；ＦＲＡ２発現又は活性の低減、破壊又は除去；又はそれらの組み合わせを伴う、請求項１～６のいずれか一項に記載の組換え酵母宿主細胞。
【請求項８】

ピルビン酸デカルボキシラーゼ発現又は活性の低減、破壊又は除去が、PDC1、PDC5又はPDC6活性又はその組み合せの低減、破壊又は除去である、請求項７に記載の組換え酵母宿主細胞。

【請求項９】

組換え酵母宿主細胞が嫌気性条件下でイソブタノールを生成し、且つグリセリンに対するイソブタノールのモル比が１より大きい、請求項１～８のいずれか一項に記載の組換え酵母宿主細胞。

【請求項１０】

組換え酵母宿主細胞が、サッカロミセス属（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）、シゾサッカロミセス属（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）、ハンゼヌラ属（Ｈａｎｓｅｎｕｌａ）、カンジダ属（Ｃａｎｄｉｄａ）、クルイベロミセス属（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ）、ヤロウイア属（Ｙａｒｒｏｗｉａ）、イサチェンキア属（Ｉｓｓａｔｃｈｅｎｋｉａ）、又はピキア属（Ｐｉｃｈｉａ）から選択される、請求項１～９のいずれか一項に記載の組換え酵母宿主細胞。

【請求項１１】

イソブタノールの生成方法であって、

ａ．請求項１～１０のいずれか一項に記載の組換え酵母宿主細胞を提供するステップと、

ｂ．イソブタノールが生成される条件下でａ）の組換え酵母宿主細胞を炭素基質に接触させるステップと

を含む方法。

【請求項１２】

前記接触させるステップの少なくとも一部が嫌気性条件下で行われる、請求項１１に記載の方法。

【請求項１３】

工程ｂ）の後に生成されるグリセリンに対するイソブタノールのモル比が１より大きい、請求項１１又は１２に記載の方法。

【請求項１４】

配列番号２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１、４３、４５、４７、４９、５１、５３、５５、５７、５９、６１、６３、６５、４１７、４１９、４２１、４２３、４２５、４２７、４２９、４３１、４３３、４３４、４３５、４３６、４３７、４３８、４３９、４４０、４４１、４４２、４４３、４４４、４４５、４４６、４４７、４４８、４４９、４５０、４５１、４５２、４５３、４５４、４５５、４５６、４５７、４５８、４５９、４６０、４６１、４６２、４６３、４６４、４６５、４６６、４６７、４６８、４６９、４７０、４７１、４７２、４７３、４７４、４７５、４７６、４７７、４７８、４７９、４８０、４８１、４８２、４８３、４８４、４８５、４８６、４８７、４８８、４８９、４９０、４９１、４９２、４９３、４９４、４９５、４９６、４９７、４９８、４９９、５００、５０１、５０２、５０３、５０４、５０５、５０６、５０７、５０８、５０９、５１０、５１１、５１２、５１３、５１４、５１５、５１６、５１７、５１８、５１９、５２０、５２１、５２２、５２３、５２４、５２５、５２６、５２７、５２８、５２９、５３０、５３１、５３２、５３３、５３４、５３５、５３６、５３７、６２４、６２６、６２８、６３０、６３２によって表わされるアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、ケトール酸レダクトイソメラーゼ活性を有するポリペプチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

政府ライセンス権

本発明は、米国エネルギー省（Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ　ｏｆ　Ｅｎｅｒｇｙ）により交付された契約第ＤＥ－ＡＲ０００００００６号に基づく連邦政府の支援を受けて行われた。連邦政府は本発明に一定の権利を有する。

【０００２】
発明の分野
本発明は、イソブタノール発酵生成のための組換え宿主細胞及び方法に関する。
【０００３】
関連出願の相互参照
本願は、米国特許法第１１９（ｅ）条に基づき、米国仮特許出願第６１／４７２，４８４号明細書（２０１１年４月６日出願）、同第６１／４６７，２６１号明細書（２０１１年３月２４日出願）、同第６１／４７２，４８７号明細書（２０１１年４月６日出願）、同第６１／４６７，２７１号明細書（２０１１年３月２４日出願）、同第６１／５７０，５１３号明細書（２０１１年１２月１４日出願）、同第６１／４６７，２４９号明細書（２０１１年３月２４日出願）、同第６１／４７２，４９７号明細書（２０１１年４月６日出願）、及び同第６１／４７２，４７４号明細書（２０１１年４月６日出願）に対する優先権を主張し、これらの各々は、全体として参照により本明細書に援用される。
【０００４】
ＥＦＳ－ＷＥＢにより電子的に提出された配列表に関する記載
電子的に提出された配列表（名称：２０１２０３２３＿ＣＬ５３６７ＵＳＮＡ＿ＳＥＱＬＩＳＴ．ｔｘｔ；サイズ２，００３，８９３バイト；作成日２０１２年３月２３日）の内容は、全体として参照により本明細書に援用される。
【背景技術】
【０００５】
ブタノールは重要な工業用化学品であり、燃料添加剤として、プラスチック工業における原料化学品として、並びに食品及び香料工業における食品グレードの抽出剤として有用である。毎年１００～１２０億ポンドのブタノールが石油化学的手段によって生産され、この汎用化学品の需要は今後増加が見込まれる。
【０００６】
イソブタノールの化学合成方法は、オキソ合成、一酸化炭素の接触水素化（非特許文献１）及びメタノールとｎ－プロパノールとのゲルベ縮合（非特許文献２）など、公知である。これらの方法は石油化学品に由来する出発物質を使用し、概して高価で、環境に優しくない。植物由来原材料からのイソブタノール生成は、温室効果ガスの排出を最小限に抑え得るとともに、当該技術分野の進歩に相当し得る。
【０００７】
イソブタノールは、酵母発酵の副生成物として生物学的に生成される。イソブタノールは、真菌類による不完全なアミノ酸代謝の結果として形成される「フーゼル油」の一成分である。イソブタノールは、具体的にはＬ－バリンの異化作用から生成される。Ｌ－バリンのアミン基が窒素源として取り込まれた後、いわゆるエールリッヒ経路の酵素により、得られたα－ケト酸が脱カルボキシル化され、イソブタノールに還元される（非特許文献３）。
【先行技術文献】
【非特許文献】
【０００８】
【非特許文献１】Ｕｌｌｍａｎｎ’ｓ Ｅｎｃｙｃｌｏｐｅｄｉａ ｏｆ Ｉｎｄｕｓｔｒｉａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，６ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ，２００３，Ｗｉｌｅｙ－ＶＣＨ Ｖｅｒｌａｇ ＧｍｂＨ ａｎｄ Ｃｏ．，Ｗｅｉｎｈｅｉｍ，Ｇｅｒｍａｎｙ，Ｖｏｌ．５，ｐｐ．７１６－７１９
【非特許文献２】Ｃａｒｌｉｎｉ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌｅｃ．Ｃａｔａｌ．Ａ．Ｃｈｅｍ．２２０：２１５－２２０，２００４
【非特許文献３】Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７３：２５７５２－２５７５６，１９９８
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】

【０００９】
糖類から直接ブタノールを生合成する改良及び別法は、採算性を改善し得るとともに、当該技術分野の進歩に相当し得る。
【課題を解決するための手段】
【００１０】
本明細書には、イソブタノール生成のための組換え酵母宿主細胞及び方法が提供される。
【００１１】
一部の実施形態では、組換え宿主細胞は、操作されたイソブタノール生成経路と、（ａ）（ｉ）ケトール酸レダクトイソメラーゼ（ＫＡＲＩ）活性を有する異種ポリペプチドであって、（１）ビフィドバクテリウム・アンギュラツム（Ｂｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ａｎｇｕｌａｔｕｍ）、ビフィドバクテリウム・デンチウム（Ｂｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｄｅｎｔｉｕｍ）、ザイモモナス・モビリス（Ｚｙｍｏｍｏｎａｓ ｍｏｂｉｌｉｓ）、クロストリジウム・ベイジェリンキ（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｂｅｉｊｅｒｉｎｃｋｉｉ）又はアナエロスティペス・カカエ（Ａｎａｅｒｏｓｔｉｐｅｓ ｃａｃｃａｅ）に由来するＫＡＲＩ酵素、又はその活性断片と少なくとも約９０％の同一性を有するポリペプチド、（２）配列番号２７、２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１、４３、４５、４７、４９、５１、５３、５５、５７、５９、６１、６３、又は６５と少なくとも約９０％の同一性又は少なくとも約９５％の同一性を有するポリペプチド、からなる群から選択される異種ポリペプチドか；又は（ｉｉ）（ａ）のＫＡＲＩ活性を有する異種ポリペプチドをコードする異種ポリヌクレオチドかの少なくとも一方；及び（ｂ）操作されたイソブタノール生成経路の性能を増強する少なくとも１つの宿主細胞修飾とを含む。一部の実施形態では、（ａ）と（ｂ）との組み合わせにより、イソブタノール生成経路の性能が相乗的に高まる。
【００１２】
一部の実施形態では、組換え宿主細胞は、イソブタノール生合成経路と、（ａ）ケトール酸レダクトイソメラーゼ（ＫＡＲＩ）活性を有する異種ポリペプチドであって、（ｉ）ビフィドバクテリウム・アンギュラツム（Ｂｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ａｎｇｕｌａｔｕｍ）、ビフィドバクテリウム・デンチウム（Ｂｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｄｅｎｔｉｕｍ）、ザイモモナス・モビリス（Ｚｙｍｏｍｏｎａｓ ｍｏｂｉｌｉｓ）、クロストリジウム・ベイジェリンキ（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｂｅｉｊｅｒｉｎｃｋｉｉ）又はアナエロスティペス・カカエ（Ａｎａｅｒｏｓｔｉｐｅｓ ｃａｃｃａｅ）に由来するＫＡＲＩ酵素、又はその活性断片と少なくとも約９０％の同一性を有するポリペプチド、（ｉｉ）配列番号２７、２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１、４３、４５、４７、４９、５１、５３、５５、５７、５９、６１、６３、又は６５と少なくとも約９０％の同一性又は少なくとも約９５％の同一性を有するポリペプチド、（ｉｉｉ）ビフィドバクテリウム・アンギュラツム（Ｂｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ａｎｇｕｌａｔｕｍ）、ビフィドバクテリウム・デンチウム（Ｂｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｄｅｎｔｉｕｍ）、エンテロコッカス・ガリナルム（Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ ｇａｌｌｉｎａｒｕｍ）、ストレプトコッカス・サーモフィルス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｅｓ）、ザイモモナス・モビリス（Ｚｙｍｏｍｏｎａｓ ｍｏｂｉｌｉｓ）、クロストリジウム・ベイジェリンキ（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｂｅｉｊｅｒｉｎｃｋｉｉ）、アナエロスティペス・カカエ（Ａｎａｅｒｏｓｔｉｐｅｓ ｃａｃｃａｅ）、又はラクトコッカス・ラクチス亜種クレモリス（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ ｌａｃｔｉｓ ｓｕｂｓｐ．ｃｒｅｍｏｒｉｓ）ＭＧ１３６３に由来するＫＡＲＩ酵素又はその活性断片と少なくとも約９０％の同一性又は少なくとも約９５％の同一性を有するポリペプチドであって、約５０未満のＮＡＤＨに対するK_Mを有するポリペプチド、（ｉｖ）スタフィロコッカス・カピティス（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ｃａｐｉｔｉｓ）ＳＫ１４、表皮ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ｅｐｉｄｅｒｍｉｄｉｓ）Ｍ２３８６４－Ｗ１、スタフィロコッカス・ホミニス（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ｈｏｍｉｎｉ

s）ＳＫ１１９、黄色ブドウ球菌亜種アウレウス（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ ｓｕｂｓｐ．ａｕｒｅｕｓ）ＴＣＨ１３０、スタフィロコッカス・ワルネリ（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ｗａｒｎｅｒｉ）Ｌ３７６０３、表皮ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ｅｐｉｄｅｒｍｉｄｉｓ）Ｗ２３１４４、スタフィロコッカス・サプロフィチカス亜種サプロフィチカス（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ｓａｐｒｏｐｈｙｔｉｃｕｓ ｓｕｂｓｐ．ｓａｐｒｏｐｈｙｔｉｃｕｓ）ＡＴＣＣ１５３０５、スタフィロコッカス・カルノサス亜種カルノサス（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ｃａｒｎｏｓｕｓ ｓｕｂｓｐ．Ｃａｒｎｏｓｕｓ）ＴＭ３００、リステリア・モノサイトゲネス（Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｍｏｎｏｃｙｔｏｇｅｎｅｓ）ＥＧＤ－ｅ、リステリア・グレイ（Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｇｒａｙｉ）ＤＳＭ ２０６０１、エンテロコッカス・カセリフラブス（Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ ｃａｓｓｅｌｉｆｌａｖｕｓ）ＥＣ３０、エンテロコッカス・ガリナルム（Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ ｇａｌｌｉｎａｒｕｍ）ＥＧ２、マクロコッカス・カセオリチクス（Ｍａｃｒｏｃｏｃｃｕｓ ｃａｓｅｏｌｙｔｉｃｕｓ）ＪＣＳＣ５４０２、ストレプトコッカス・ベスチブラリス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｖｅｓｔｉｂｕｌａｒｉｓ）、ミュータンス菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｍｕｔａｎｓ）ＵＡ１５９、ストレプトコッカス・ゴルドニ（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｇｏｒｄｏｎｉｉ）株ｃｇａｋｋｕｓ亜株ＣＨ１（ｓｔｒ，ｃｇａｋｋｕｓ ｓｙｂｓｔｒ．ＣＨ１）、ストレプトコッカス・スイス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｓｕｉｓ）８９／１５９１、ストレプトコッカス・インファンタリウス亜種インファンタリウス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｉｎｆａｎｔａｒｉｕｓ ｓｕｂｓｐ．ｉｎｆａｎｔａｒｉｕｓ）ＡＴＣＣ ＢＡＡ－１０２、ラクトコッカス・ラクチス亜種クレモリス（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ ｌａｃｔｉｓ ｓｕｂｓｐ ｃｒｅｍｏｒｉｓ）ＭＧ１３６３、ラクトコッカス・ラクチス（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ ｌａｃｔｉｓ）、ロイコノストック・メセンテロイデス亜種メセンテロイデス（Ｌｅｕｃｏｎｏｓｔｏｃ ｍｅｓｅｎｔｅｒｏｉｄｅｓ ｓｕｂｓｐ ｍｅｓｅｎｔｅｒｏｉｄｅｓ）ＡＴＣＣ８２９３、ラクトバチルス・ブフネリ（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｂｕｃｈｎｅｒｉ）ＡＴＣＣ １１５７７、スタフィロコッカス・ヘモリチカス（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ｈａｅｍｏｌｙｔｉｃｕｓ）ＪＣＳＣ１４３５、表皮ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ｅｐｉｄｅｒｍｉｄｉｓ）ＡＴＣＣ１２２２８、肺炎レンサ球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）ＣＧＳＰ１４、肺炎レンサ球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）ＴＩＧＲ４、ストレプトコッカス・サングイニス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｓａｎｇｕｉｎｉｓ）ＳＫ３６、ストレプトコッカス・サリバリウス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｓａｌｉｖａｒｉｕｓ）ＳＫ１２６、ストレプトコッカス・サーモフィルス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）ＬＭＤ－９、肺炎レンサ球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）ＣＣＲＩ １９７４Ｍ２、ラクトコッカス・ラクチス亜種ラクチス（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ ｌａｃｔｉｓ ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ）Ｉｌ１４０３、ロイコノストック・メセンテロイデス亜種クレモリス（Ｌｅｕｃｏｎｏｓｔｏｃ ｍｅｓｅｎｔｅｒｏｉｄｅｓ ｓｕｂｓｐ ｃｒｅｍｏｒｉｓ）ＡＴＣＣ１９２５４、ロイコノストック・メセンテロイデス亜種クレモリス（Ｌｅｕｃｏｎｏｓｔｏｃ ｍｅｓｅｎｔｅｒｏｉｄｅｓ ｓｕｂｓｐ ｃｒｅｍｏｒｉｓ）、ラクトバチルス・ブレビス亜種グラベセンシス（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｂｒｅｖｉｓ ｓｕｂｓｐ．ｇｒａｖｅｓｅｎｓｉｓ）ＡＴＣＣ２７３０５、又はラクトコッカス・ラクチス亜種ラクチス（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ ｌａｃｔｉｓ ｓｕｂｓｐ ｌａｃｔｉｓ）ＮＣＤＯ２１１８に由来するＫＡＲＩ酵素又はその活性断片と少なくとも約９０％の同一性又は少なくとも約９５％の同一性を有するポリペプチドであって、約５０未満のＮＡＤＨに対するK_Mを有する異種ポリペプチド、（ｖ）配列番号６７、６９、７１、７３、７５、７７、７９、８１、８３、８５、８７、８９、９１、９３、９５、９７、９９、１０１、１０３、１０５、１０７、１０９、１１１、１１３、１１５、１１７、１１９、１２１、１２３、１２５、１２７、１２９、１３１、１３３、若しくは１３５又はその活性断片と少なくとも約９０％の同一性又は少なくとも約９５％の同

一性を有する、ＫＡＲＩ活性を有する異種ポリペプチドであって、約５０未満のＮＡＤＨに対するK_Mを有する異種ポリペプチド、からなる群から選択される異種ポリペプチド；（ｂ）（ａ）のＫＡＲＩ活性を有する異種ポリペプチドをコードする異種ポリヌクレオチド；（ｃ）低下又は消失したアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性；（ｄ）低下又は消失したアルデヒドオキシダーゼ活性；（ｅ）低下又は消失したアセト乳酸レダクターゼ活性；又は（ｆ）これらの組み合わせとを含む。

【００１３】

一実施形態において、組換え宿主細胞は、低下又は消失したアルデヒドデヒドロゲナーゼ発現活性と、低下又は消失したアセト乳酸レダクターゼ発現又は活性とを含む。

【００１４】

別の実施形態において、組換え宿主細胞は、（ｉ）低下若しくは消失したアルデヒドデヒドロゲナーゼ発現若しくは活性、又は低下若しくは消失したアセト乳酸レダクターゼ発現若しくは活性、及び（ｉｉ）ＫＡＲＩ活性と３００μＭ未満のＮＡＤＨに対するK_Mとを有するポリペプチドをコードする異種ポリヌクレオチドを含む。

【００１５】

別の実施形態（ｅｂｍｏｂｏｄｉｍｅｎｔ）において、組換え宿主は、配列番号２７、２９、１４１、１４３、２７５、又は２７７と少なくとも約９０％又は少なくとも約９５％の同一性を有するＫＡＲＩ活性を有する異種ポリペプチドを含む。

【００１６】

一部の実施形態では、組換え宿主細胞は、配列番号２７のＳ５６及びＳ５８に対応するアミノ酸に置換を含むＫＡＲＩ活性を有する異種ポリペプチドを含む。一部の実施形態では、ＫＡＲＩ活性を有するポリペプチドは、配列番号２７のＩ８６、Ｎ８７、Ｔ１３１、又はＴ１９１に対応するアミノ酸の１つ以上の置換をさらに含む。一部の実施形態では、配列番号３１、３３、３５、３７、３９、４１、４３、４５、４７、４９、５１、５３、５５、５７、５９、６１、６３、又は６５と少なくとも９０％の同一性又は少なくとも９５％の同一性を有する、ＫＡＲＩ活性を有するポリペプチド。

【００１７】

一部の実施形態では、組換え宿主細胞は、約４８時間後に（この４８時間のうち少なくとも最後の約２４時間は嫌気性条件下にある）細胞１グラムあたり少なくとも約３、少なくとも約４、又は少なくとも約５グラムの有効イソブタノール生成能力を有する。

【００１８】

一部の実施形態では、組換え宿主細胞は、ｐＨ６．８で約３５０μＭ未満、約１００μＭ未満、約５０μＭ未満、又は約１０μＭ未満のＮＡＤＨに対するK_Mを有するＫＡＲＩ活性を有する異種ポリペプチドを含む。

【００１９】

一部の実施形態では、組換え宿主細胞は、配列番号３７６、３８２、３７８、又は２７５と少なくとも約９０％の同一性又は少なくとも約９５％の同一性を有するＫＡＲＩ活性を有する異種ポリペプチドを含む。

【００２０】

一部の実施形態では、組換え宿主細胞は、アナエロスティペス・カカエ（Ａｎａｅｒｏｓｔｉｐｅｓ　ｃａｃｃａｅ）に由来するＫＡＲＩ酵素（配列番号２７）のアミノ酸Ａ４１、Ｓ５６、Ｓ５８、Ｉ８７、Ｔ１３１、Ｔ１９１、Ｒ２２７、又はＱ２４６に対応する位置の１つ以上にアミノ酸置換を含むＫＡＲＩ活性を有する異種ポリペプチドを含む。

【００２１】

一部の実施形態では、組換え宿主細胞は、配列番号３３若しくは配列番号３５又はその活性断片を含むＫＡＲＩ活性を有する異種ポリペプチドを含む。

【００２２】

別の実施形態において、組換え宿主細胞は、アルデヒド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内因性ポリヌクレオチドに欠失、突然変異、及び／又は置換を含む。一部の実施形態では、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドは、

イソブチルアルデヒドからイソ酪酸への変換を触媒する。一部の実施形態では、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドは、ＥＣ番号ＥＣ　１．２１．３、ＥＣ１．２．１．４、及び／又はＥＣ１．２．１．５に対応する。一部の実施形態では、宿主細胞はＳ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）であり、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドは、ＡＬＤ２、ＡＬＤ３、ＡＬＤ４、ＡＬＤ５、ＡＬＤ６又はその相同体である。一部の実施形態では、宿主細胞はＫ．ラクチス（Ｋ．ｌａｃｔｉｓ）であり、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドは、ＫＬＬＡ０Ｆ００４４０、ＫＬＬＡ０Ｅ２３０５７、ＫＬＬＡ０Ｄ１００２１、又はＫＬＬＡ０Ｄ０９９９９Ｇである。一部の実施形態では、宿主細胞はＰ．スチピチス（Ｐ．ｓｔｉｐｉｔｉｓ）であり、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドは、ＡＬＤ２、ＡＬＤ３、ＡＬＤ４、ＡＬＤ５、又はＡＬＤ７である。一部の実施形態では、宿主細胞はラクトバチルス・プランタルム（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｐｌａｎｔａｒｕｍ）であり、前記アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドはＡｌｄＨである。一部の実施形態では、宿主細胞は大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）であり、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドは、ａｌｄＡ、ａｌｄＢ、又はａｌｄＨである。

【００２３】

別の実施形態において、宿主細胞は、アルデヒドオキシダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする内因性ポリヌクレオチドに欠失、突然変異、及び／又は置換を含む。一部の実施形態では、アルデヒドオキシダーゼ活性を有するポリペプチドは、イソブチルアルデヒドからイソ酪酸への変換を触媒する。一部の実施形態では、アルデヒドオキシダーゼ活性を有するポリペプチドは、ＥＣ番号ＥＣ　１．２．３．１に対応する。一部の実施形態では、アルデヒドオキシダーゼ活性を有するポリペプチドは、ＡＯＸ１及び／又はＡＯＸ２である。

【００２４】

別の実施形態において、宿主細胞は、アセト乳酸レダクターゼ活性を有するポリペプチドをコードする内因性ポリヌクレオチドに欠失、突然変異、及び／又は置換を含む。一部の実施形態では、アセト乳酸レダクターゼ活性を有するポリペプチドは、配列番号６７６、配列番号６７８、配列番号６８０、配列番号６８２、配列番号６８４、配列番号６８６、配列番号６８８、配列番号６９０、配列番号６９２、配列番号６９４、配列番号６９６、配列番号７０２、配列番号７０４、配列番号７０６、配列番号７０８、配列番号７１０、配列番号７１２、配列番号７１４、配列番号７１６、配列番号７１８、配列番号７２０、配列番号７２２、配列番号７２４、配列番号７２６、配列番号７２８、及び配列番号７３０からなる群から選択されるポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドを含む。一部の実施形態では、アセト乳酸レダクターゼ活性を有するポリペプチドは、ＹＭＲ２２６Ｃである。

【００２５】

別の実施形態において、組換え宿主細胞は酵母宿主細胞である。一部の実施形態では、酵母は、サッカロミセス属（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）、シゾサッカロミセス属（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）、ハンゼヌラ属（Ｈａｎｓｅｎｕｌａ）、カンジダ属（Ｃａｎｄｉｄａ）、クルイベロミセス属（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ）、ヤロウイア属（Ｙａｒｒｏｗｉａ）、イサチェンキア属（Ｉｓｓａｔｃｈｅｎｋｉａ）、又はピキア属（Ｐｉｃｈｉａ）からなる群から選択される。一部の実施形態では、宿主細胞はサッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）である。

【００２６】

別の実施形態において、宿主細胞は細菌細胞である。一部の実施形態では、細菌細胞は、クロストリジウム属（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ）、ザイモモナス属（Ｚｙｍｏｍｏｎａｓ）、大腸菌属（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ）、サルモネラ属（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ）、ロドコッカス属（Ｒｈｏｄｏｃｏｃｃｕｓ）、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）、バチルス属（Ｂａｃｉｌｌｕｓ）、ラクトバチルス属（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕ

ｓ）、エンテロコッカス属（Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ）、ペディオコッカス属（Ｐｅｄｉｏｃｏｃｃｕｓ）、アルカリゲネス属（Ａｌｃａｌｉｇｅｎｅｓ）、クレブシエラ属（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ）、パエニバチルス属（Ｐａｅｎｉｂａｃｉｌｌｕｓ）、アルスロバクター属（Ａｒｔｈｒｏｂａｃｔｅｒ）、コリネバクテリウム属（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、ブレビバクテリウム属（Ｂｒｅｖｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、ラクトコッカス属（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ）、ロイコノストック属（Ｌｅｕｃｏｎｏｓｔｏｃ）、オエノコッカス属（Ｏｅｎｏｃｏｃｃｕｓ）、ペディオコッカス属（Ｐｅｄｉｏｃｏｃｃｕｓ）、又はストレプトコッカス属（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）細胞である。一部の実施形態では、細菌細胞は大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ではない。

【００２７】

一部の実施形態では、組換え宿主細胞の操作されたイソブタノール生成経路は、以下の基質から生成物への変換：（ａ）ピルベートからアセトラクテート、（ｂ）アセトラクテートから２，３－ジヒドロキシイソバレレート、（ｃ）２，３－ジヒドロキシイソバレレートから２－ケトイソバレレート、（ｄ）２－ケトイソバレレートからイソブチルアルデヒド、及び（ｅ）イソブチルアルデヒドからイソブタノールを含み、これらの基質から生成物への変換のうちの２つ以上が、宿主細胞にとって異種である酵素により触媒される。一部の実施形態では、これらの基質から生成物への変換の全てが、宿主細胞にとって異種の酵素により触媒される。一部の実施形態では、宿主細胞にとって異種の酵素をコードする少なくとも１つの異種ポリヌクレオチドが、宿主細胞の染色体に組み込まれる。一部の実施形態では、基質から生成物への変換は、実質的にサイトゾルに局在する酵素により触媒される。一部の実施形態では、イソブチルアルデヒドからイソブタノールへの基質から生成物への変換は、ＮＡＤＨを補因子として利用するアルコールデヒドロゲナーゼ酵素により触媒される。一部の実施形態では、アセトラクテートから２，３－ジヒドロキシイソバレレートへの変換（ｃｏｎｖｅｒｓｔｉｏｎ）は、ＮＡＤＨを補因子として使用することができるＫＡＲＩによって触媒される。

【００２８】

一部の実施形態では、宿主細胞は、プラスミドｐＬＨ７０２若しくはｐＬＨ７０１又は同じコード領域を有するプラスミドを含む。一部の実施形態では、宿主細胞は、プラスミドｐＢＰ９１５又は同じコード領域を有するプラスミドを含む。一部の実施形態では、宿主細胞は、プラスミドｐＹＺ０６７ΔｋｉｖＤΔｈＡＤＨ又は同じコード領域を有するプラスミドを含む。

【００２９】

一部の実施形態では、宿主細胞は、アセトラクテートを２，３－ジヒドロキシ－２－メチルブチレートに変換する能力の低下、破壊、又は消失を含む。

【００３０】

一部の実施形態では、宿主細胞は酵母であり、低下又は消失したピルビン酸デカルボキシラーゼ発現又は活性を有する。一部の実施形態では、宿主細胞は、低下又は消失したＰＤＣ１、ＰＤＣ５、又はＰＤＣ６活性又はそれらの組み合わせを有する。

【００３１】

一部の実施形態では、宿主細胞は、低下又は消失したＮＡＤ依存性グリセロール－３－リン酸デヒドロゲナーゼ発現又は活性を有する。一部の実施形態では、宿主細胞は、低下したＧＰＤ２活性を有する。

【００３２】

一部の実施形態（ｅｍｂｏｄｉｅｎｔｓ）では、宿主細胞は、低下又は消失したＦＲＡ２発現又は活性を有する。

【００３３】

一部の実施形態では、宿主細胞は嫌気性条件下でイソブタノールを生成し、且つグリセロールに対するイソブタノールのモル比が１より大きい。

【００３４】

一部の実施形態では、ケトール酸レダクトイソメラーゼ活性を有するポリペプチドは、

＜１０$^{-3}$のプロファイルＨＭＭ　Ｅ値を有する表Ｚに提供される与えられるプロファイルＨＭＭにマッチする。

【００３５】

一部の実施形態では、宿主細胞は、理論的収率の約２５％、約５０％、約７５％、又は約９０％より高い収率でイソブタノールを生成する。

【００３６】

一部の実施形態では、イソブタノール及びエタノールが生成される。

【００３７】

イソブタノールの生成方法は、上記に記載したとおりの組換え宿主細胞を提供するステップと、イソブタノールが生成される条件下で宿主細胞を炭素基質に接触させるステップとを含む方法を含む。一部の実施形態では、接触させるステップの少なくとも一部は嫌気性条件下で行われる。一部の実施形態では、接触させるステップは抽出剤の存在下で行われる。一部の実施形態では、接触させるステップは、水相と有機相とを含む二相系を形成するのに十分な量の有機抽出剤の存在下で行われる。一部の実施形態では、ＫＡＲＩ活性を有する異種ポリペプチド、ＫＡＲＩ活性を有するポリペプチドをコードする異種ポリヌクレオチド、低下又は消失したアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性、低下又は消失したアルデヒドオキシダーゼ活性、低下又は消失したアセト乳酸レダクターゼ活性、又はそれらの組み合わせを含まない組換え宿主細胞を使用する方法と比較したとき、イソブタノールの有効速度、有効力価、又は有効収率のうちの１つ以上が増加する。一部の実施形態では、（ｉ）ＫＡＲＩ活性を有する異種ポリペプチド又はＫＡＲＩ活性を有するポリペプチドをコードする異種ポリヌクレオチド、及び（ｉｉ）操作されたイソブタノール生成経路の性能を増強する少なくとも１つの修飾を含まない組換え宿主細胞を使用する方法と比較したとき、イソブタノールの有効速度、有効力価、又は有効収率のうちの１つ以上が増加する。一部の実施形態では、ＫＡＲＩ活性を有する異種ポリペプチド、ＫＡＲＩ活性を有するポリペプチドをコードする異種ポリヌクレオチド、低下又は消失したアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性、低下又は消失したアルデヒドオキシダーゼ活性、低下又は消失したアセト乳酸レダクターゼ活性、又はそれらの組み合わせを含まない組換え宿主細胞を使用する方法と比較したとき、ＤＨＭＢ生成、イソ酪酸生成、又は両方が低下する。一部の実施形態では、（ｉ）ＫＡＲＩ活性を有する異種ポリペプチド又はＫＡＲＩ活性を有するポリペプチドをコードする異種ポリヌクレオチド、及び（ｉｉ）操作されたイソブタノール生成経路の性能を増強する少なくとも１つの修飾を含まない組換え宿主細胞を使用する方法と比較したとき、ＤＨＭＢ生成、イソ酪酸生成、又は両方が低下する。一部の実施形態では、グリセロールに対するイソブタノールのモル比が１より大きい。

【００３８】

イソブタノールの生成方法はまた、イソブタノールを生成する組換え宿主細胞を提供するステップ、及びイソブタノールが生成される条件下で宿主細胞を炭素基質に接触させるステップも含み、ここで接触させるステップの少なくとも一部は嫌気性条件下で行われ、且つ生成されるグリセロールに対するイソブタノールの比は１より大きい。

【００３９】

イソブタノールの生成方法はまた、ブタノールが生成される条件下で、ピルベートからアセトラクテートへの変換が可能な生合成経路を含む組換え酵母を成長させるステップ、及び培養物からＤＨＭＢを除去するステップも含む。

【００４０】

かかる方法により生成される組成物もまた、本明細書に提供される。一部の実施形態では、この組成物は、イソブタノール及び上記に提供される組換え宿主細胞を含む。一部の実施形態では、この組成物は、ブタノール及び約０．５ｍＭ以下のＤＨＭＢを含む。

【００４１】

発酵組成物もまた、本明細書に提供される。一部の実施形態では、発酵組成物は、上記に提供される方法により生成される宿主細胞及びイソブタノールを含む。

【００４２】

ｉ）ブタノールの生成能を有する組換え酵母、ｉｉ）ブタノール、及びｉｉｉ）約０．５ｍＭ以下のＤＨＭＢを含む組成物もまた、提供される。

【００４３】

組換え宿主細胞の生成方法もまた提供される。かかる方法は、（ａ）アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性又はアルデヒドオキシダーゼ活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに修飾を含む組換え宿主細胞を提供するステップ；及び（ｂ）イソブタノール生合成経路のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドで宿主細胞を形質転換するステップを含むことができる。

【００４４】

イソブチルアルデヒド（ｉｓｂｕｔｙｒａｌｄｅｈｙｅ）からイソ酪酸への変換を低下又は消失させる方法もまた、提供される。かかる方法は、（ａ）請求項１～５２のいずれか一項に記載の組換え宿主細胞を提供するステップ；及び（ｂ）低下又は消失したアルデヒドデヒドロゲナーゼ及び／又はアルデヒドオキシダーゼ活性を含まない組換え宿主細胞を使用する方法と比較して、イソブチルアルデヒド（ｉｓｂｕｔｙｒａｌｄｅｈｙｅ）からイソ酪酸への変換が低下又は消失する条件に宿主細胞を供するステップを含むことができる。

【００４５】

特定のポリペプチドもまた、本明細書に提供される。一部の実施形態では、これらのポリペプチドは、配列番号２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１、４３、４５、４７、４９、５１、５３、５５、５７、５９、６１、６３、６５、４１７、４１９、４２１、４２３、４２５、４２７、４２９、４３１、４３３、４３４、４３５、４３６、４３７、４３８、４３９、４４０、４４１、４４２、４４３、４４４、４４５、４４６、４４７、４４８、４４９、４５０、４５１、４５２、４５３、４５４、４５５、４５６、４５７、４５８、４５９、４６０、４６１、４６２、４６３、４６４、４６５、４６６、４６７、４６８、４６９、４７０、４７１、４７２、４７３、４７４、４７５、４７６、４７７、４７８、４７９、４８０、４８１、４８２、４８３、４８４、４８５、４８６、４８７、４８８、４８９、４９０、４９１、４９２、４９３、４９４、４９５、４９６、４９７、４９８、４９９、５００、５０１、５０２、５０３、５０４、５０５、５０６、５０７、５０８、５０９、５１０、５１１、５１２、５１３、５１４、５１５、５１６、５１７、５１８、５１９、５２０、５２１、５２２、５２３、５２４、５２５、５２６、５２７、５２８、５２９、５３０、５３１、５３２、５３３、５３４、５３５、５３６、５３７、６２４、６２６、６２８、６３０、６３２又はその活性断片と少なくとも約９０％の同一性又は少なくとも約９５％の同一性又は少なくとも約９９％の同一性を含み、且つケトール酸レダクトイソメラーゼ活性を有する。一部の実施形態では、これらのポリペプチドは、配列番号４１７、４１９、４２１、４２３、４２５、若しくは４２７又はその活性断片と少なくとも約９０％の同一性又は少なくとも約９５％の同一性又は少なくとも約９９％の同一性を含み、且つケトール酸レダクトイソメラーゼ活性を有する。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号９２７、９２８、１９６、２６６、２６７、３８９、４０５、６３７、７８１、７８２、７８３、８３５、８５３、８５４、８５５、８５６、８５７、又は８５９と少なくとも約９０％の同一性、少なくとも約９５％の同一性、又は少なくとも約９９％の同一性を有する配列を含む。

【００４６】

かかるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド並びにかかるポリヌクレオチド及びポリペプチドを含む宿主細胞もまた、提供される。

【００４７】

アセトラクテートから２，３－ジヒドロキシイソバレレートへの変換方法もまた、提供される。例えば、かかる方法は、（ａ）上記に記載されるポリペプチドを提供するステップ、及び（ｂ）２，３－ジヒドロキシイソバレレートが生成される条件下でポリペプチドをアセトラクテートに接触させるステップを含むことができる。

【００４８】

組換え酵母細胞もまた、本明細書に提供される。一部の実施形態では、組換え酵母は、ピルベートからアセトラクテートへの変換が可能な生合成経路を含み、この酵母は、消費される糖１モルあたり０．０１モル未満の２，３－ジヒドロキシ－２－メチルブチレート（ＤＨＭＢ）を生成する。一部の実施形態では、組換え酵母は、ピルベートからアセトラクテートへの変換が可能なことを含み、この酵母は、約１．０ｍＭ／時間未満の速度でＤＨＭＢを生成する。一部の実施形態では、組換え酵母は、ピルベートからアセトラクテートへの変換が可能な生合成経路を含み、この酵母は、生成されるＤＨＭＢ量の少なくとも約１．５倍の量の２，３－ジヒドロキシ－３－イソバレレート（ＤＨＩＶ）を生成する。

【００４９】

ＤＨＭＢ生成に関与する遺伝子の同定方法もまた、提供される。一部の実施形態では、これらの方法は、（ｉ）少なくとも２つ以上の遺伝子欠失を含む酵母株のコレクションを提供するステップ；（ｉｉ）個々の酵母株が生成するＤＨＭＢの量を計測するステップ；（ｉｉｉ）約１．０ｍＭ以下のＤＨＭＢ／時間を生成する酵母株を選択するステップ；及び（ｉｖ）選択された酵母株において欠失する遺伝子を同定するステップを含む。一部の実施形態では、これらの方法は、（ｉ）少なくとも２つ以上の遺伝子を過剰発現する酵母株のコレクションを提供するステップ；（ｉｉ）個々の酵母株が生成するＤＨＭＢの量を計測するステップ；（ｉｉｉ）少なくとも約１．０ｍＭのＤＨＭＢを生成する酵母株を選択するステップ；及び（ｉｖ）選択された酵母株において過剰発現する遺伝子を同定するステップを含む。

【００５０】

ブタノールの生成方法もまた、提供される。一部の実施形態では、これらの方法は、（ａ）ブタノールが生成される条件下で、ピルベートからアセトラクテートへの変換が可能な生合成経路を含む組換え酵母を成長させるステップ；及びｂ）ＤＨＩＶ及び／又はＤＨＭＢ濃度を計測するステップを含む。一部の実施形態において、成長させるステップ及び計測するステップは、同時に実施しても、又は逐次的に且つ任意の順序で実施してもよい。一部の実施形態では、計測するステップは液体クロマトグラフィー質量分析を含む。

【００５１】

ケトール酸レダクトイソメラーゼ（ＫＡＲＩ）活性を増加させる方法もまた、提供される。一部の実施形態では、これらの方法は、（ａ）アセトラクテート、ＫＡＲＩ酵素、及びアセト乳酸レダクターゼ酵素を含む組成物を提供するステップ、及び（ｂ）ＤＨＭＢレベルを降下させるステップを含む。一部の実施形態では、ＤＨＭＢレベルを降下させるステップは、アセト乳酸レダクターゼ酵素活性を減少させることにより達成される。一部の実施形態では、ＤＨＭＢレベルを降下させるステップは、組成物からＤＨＭＢを除去することにより達成される。

【００５２】

一部の実施形態において、宿主細胞におけるＫＡＲＩ酵素生成能力を増加させることは、宿主細胞を培養するステップを含むことができ、この宿主細胞は、異種ＫＡＲＩ酵素と、アセト乳酸レダクターゼ発現又は活性を低下させ、破壊し、又は消失させる少なくとも１つの遺伝子修飾とを含み、且つＤＨＭＢの存在下でＫＡＲＩ酵素活性が減少する。一部の実施形態では、ＫＡＲＩは、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）又はＬ．ラクチス（Ｌ．ｌａｃｔｉｓ）ＫＡＲＩと少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、又は少なくとも約９９％の同一性を有する。一部の実施形態では、アセト乳酸レダクターゼ発現又は活性の低下、破壊、又は消失により、実質的にＤＨＭＢの存在が低下する。

【００５３】

ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ（ＤＨＡＤ）活性を増加させる方法もまた、提供される。一部の実施形態では、これらの方法は、（ａ）ジヒドロキシイソバレレート（ＤＨＩＶ）とＤＨＡＤ酵素とを含む組成物を提供するステップ、及び（ｂ）ＤＨＭＢレベルを降下させるステップを含む。

【００５４】

図面の簡単な説明、及び本明細書と共に電子的に提出された表の参照による援用

本発明は、本願の一部をなす以下の詳細な説明、図、及び添付の配列説明からより完全に理解することができる。

【図面の簡単な説明】

【００５５】

【図１】４つの異なるイソブタノール生合成経路を示す。「ａ」、「ｂ」、「ｃ」、「ｄ」、「ｅ」、「ｆ」、「ｇ」、「ｈ」、「ｉ」、「ｊ」及び「ｋ」と表示されるステップは、以下に記載する基質から生成物への変換を表す。

【図２】蛍光菌（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｓ）由来のＫＡＲＩ（「ＰＦ５」；配列番号５）とアナエロスティペス・カカエ（Ａｎａｅｒｏｓｔｉｐｅｓ　ｃａｃｃａｅ）由来のＫＡＲＩ（「Ｋ９」；配列番号２７）とのアミノ酸配列のアラインメントを示す。太字の位置が、本明細書に記載されるとおりの突然変異生成の標的となる。

【図３Ａ】ビフィドバクテリウム・アンギュラツム（Ｂｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ａｎｇｕｌａｔｕｍ）ＤＳＭ　２００９８（「Ｋ１」；配列番号１４１）、ビフィドバクテリウム・デンチウム（Ｂｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｄｅｎｔｉｕｍ）ＡＴＣＣ　２７６７８（「Ｋ２」；配列番号１４３）、クロストリジウム・ベイジェリンキ（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ　ｂｅｉｊｅｒｉｎｃｋｉｉ）ＮＣＩＭＢ　８０５２（「Ｋ７」；配列番号２７５）、アナエロスティペス・カカエ（Ａｎａｅｒｏｓｔｉｐｅｓ　ｃａｃｃａｅ）ＤＳＭ　１４６６２（「Ｋ９」；配列番号２７）、エンテロコッカス・ガリナルム（Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ　ｇａｌｌｉｎａｒｕｍ）ＥＧ２（「Ｋ２５」配列番号３７６）、ストレプトコッカス・サーモフィルス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）ＬＭＤ－９（「Ｋ２６」配列番号１２１）、ラクトコッカス・ラクチス亜種クレモリス（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｌａｃｔｉｓ　ｓｕｂｓｐ．ｃｒｅｍｏｒｉｓ）ＭＧ１３６３（「Ｋ２９」；配列番号３８２）、ザイモモナス・モビリス（Ｚｙｍｏｍｏｎａｓ　ｍｏｂｉｌｉｓ）（「Ｓ２」；配列番号２７７）、及びラクトコッカス・ラクチス（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｌａｃｔｉｓ）（「ＬＴＳ」；配列番号３８０）由来のＫＡＲＩ酵素のアミノ酸配列のアラインメントを示す。太字の位置が、本明細書に記載されるとおりの突然変異生成の標的となる。

【図３Ｂ】ビフィドバクテリウム・アンギュラツム（Ｂｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ａｎｇｕｌａｔｕｍ）ＤＳＭ　２００９８（「Ｋ１」；配列番号１４１）、ビフィドバクテリウム・デンチウム（Ｂｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｄｅｎｔｉｕｍ）ＡＴＣＣ　２７６７８（「Ｋ２」；配列番号１４３）、クロストリジウム・ベイジェリンキ（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ　ｂｅｉｊｅｒｉｎｃｋｉｉ）ＮＣＩＭＢ　８０５２（「Ｋ７」；配列番号２７５）、アナエロスティペス・カカエ（Ａｎａｅｒｏｓｔｉｐｅｓ　ｃａｃｃａｅ）ＤＳＭ　１４６６２（「Ｋ９」；配列番号２７）、エンテロコッカス・ガリナルム（Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ　ｇａｌｌｉｎａｒｕｍ）ＥＧ２（「Ｋ２５」配列番号３７６）、ストレプトコッカス・サーモフィルス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）ＬＭＤ－９（「Ｋ２６」配列番号１２１）、ラクトコッカス・ラクチス亜種クレモリス（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｌａｃｔｉｓ　ｓｕｂｓｐ．ｃｒｅｍｏｒｉｓ）ＭＧ１３６３（「Ｋ２９」；配列番号３８２）、ザイモモナス・モビリス（Ｚｙｍｏｍｏｎａｓ　ｍｏｂｉｌｉｓ）（「Ｓ２」；配列番号２７７）、及びラクトコッカス・ラクチス（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｌａｃｔｉｓ）（「ＬＴＳ」；配列番号３８０）由来のＫＡＲＩ酵素のアミノ酸配列のアラインメントを示す。太字の位置が、本明細書に記載されるとおりの突然変異生成の標的となる。

【図３Ｃ】ビフィドバクテリウム・アンギュラツム（Ｂｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ａｎｇｕｌａｔｕｍ）ＤＳＭ　２００９８（「Ｋ１」；配列番号１４１）、ビフィドバクテリウム・デンチウム（Ｂｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｄｅｎｔｉｕｍ）ＡＴＣＣ　２７６７８（「Ｋ２」；配列番号１４３）、クロストリジウム・ベイジェリンキ（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ　ｂｅｉｊｅｒｉｎｃｋｉｉ）ＮＣＩＭＢ　８０５２（「Ｋ７」；配列番号２７５）、アナエロスティペス・カカエ（Ａｎａｅｒｏｓｔｉｐｅｓ　ｃａｃｃａｅ

）ＤＳＭ　１４６６２（「Ｋ９」；配列番号２７）、エンテロコッカス・ガリナルム（Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ　ｇａｌｌｉｎａｒｕｍ）ＥＧ２（「Ｋ２５」配列番号３７６）、ストレプトコッカス・サーモフィルス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）ＬＭＤ－９（「Ｋ２６」配列番号１２１）、ラクトコッカス・ラクチス亜種クレモリス（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｌａｃｔｉｓ　ｓｕｂｓｐ．ｃｒｅｍｏｒｉｓ）ＭＧ１３６３（「Ｋ２９」；配列番号３８２）、ザイモモナス・モビリス（Ｚｙｍｏｍｏｎａｓ　ｍｏｂｉｌｉｓ）（「Ｓ２」；配列番号２７７）、及びラクトコッカス・ラクチス（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｌａｃｔｉｓ）（「ＬＴＳ」；配列番号３８０）由来のＫＡＲＩ酵素のアミノ酸配列のアラインメントを示す。太字の位置が、本明細書に記載されるとおりの突然変異生成の標的となる。

【図４】ｐＬＨ５５６（ｐＨＲ８１－ＰＩｌｖ５－Ｐｆ５．ＫＡＲＩ）ベクター（配列番号１３８）のプラスミドマップである。

【図５】２つの株ＰＮＹ１９１０及びＰＮＹ２２４２のイソブタノール生成の比速度Ｑｐを示す。

【図６】ＰＮＹ１９１０（三角形）及びＰＮＹ２２４２（菱形）での発酵時間の経過における培養上清中のＤＨＩＶ＋ＤＨＭＢの蓄積を示す（ＤＨＭＢとＤＨＩＶとは、用いられるＨＰＬＣ方法によっては区別されない）。

【図７】グリセロール、ピルビン酸、２，３－ブタンジオール（ＢＤＯ）、ＤＨＩＶ／ＤＨＭＢ、α－ケトイソバレレート（ａＫＩＶ）、及びイソ酪酸（ｉＢｕＡｃ）の収率を示す。ＤＨＩＶとＤＨＭＢとは、用いられるＨＰＬＣ方法によっては区別されないため、合わせて示す。

【図８】実施例１６に記載されるとおりのＫ９Ｇ９変異体のV_{max}／K_M値の要約を示す。

【図９Ａ】実施例１９に記載されるとおりのＫ９変異体のイソブタノール対グリセロールモル収率比、イソブタノールモル収率、及びイソブタノール力価を示す。

【図９Ｂ】実施例１９に記載されるとおりのＫ９変異体のイソブタノール対グリセロールモル収率比、イソブタノールモル収率、及びイソブタノール力価を示す。

【図９Ｃ】実施例１９に記載されるとおりのＫ９変異体のイソブタノール対グリセロールモル収率比、イソブタノールモル収率、及びイソブタノール力価を示す。

【図１０】イソブタノール生合成経路を示す。ステップ「ａ」は、ピルベートからアセトラクテートへの変換を表す。ステップ「ｂ」は、アセトラクテートからＤＨＩＶへの変換を表す。ステップ「ｃ」は、ＤＨＩＶからＫＩＶへの変換を表す。ステップ「ｄ」は、ＫＩＶからイソブチルアルデヒドへの変換を表す。ステップ「ｅ」は、イソブチルアルデヒドからイソブタノールへの変換を表す。ステップ「ｆ」は、アセトラクテートからＤＨＭＢへの変換を表す。

【図１１】子嚢菌酵母の種由来のＹＭＲ２２６ｃ相同体の系統樹（ｐｈｙｏｌｇｅｎｅｔｉｃ　ｔｒｅｅ）を示す。糸状菌類（アカパンカビ（Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ　ｃｒａｓｓａ））の配列を外群として含める。

【図１２－１】ＹＭＲ２２６Ｃとの相同性を有するＯＲＦのヌクレオチド配列の多重配列アラインメント（ＭＳＦフォーマット）を示す。示される遺伝子名は、表７に示す受託番号及び配列番号に対応する。このアラインメントはＡｌｉｇｎＸ（Ｖｅｃｔｏｒ　ＮＴＩ）により作成した。

【図１２－２】図１２－１の続きである。

【図１２－３】図１２－２の続きである。

【図１２－４】図１２－３の続きである。

【図１２－５】図１２－４の続きである。

【図１２－６】図１２－５の続きである。

【図１２－７】図１２－６の続きである。

【図１３】経時的なＤＨＭＢのモル収率のグラフを示す。

【図１４】酵母株ＮＹＬＡ８４におけるイソブタノール及びイソ酪酸の生成を示す。

【発明を実施するための形態】

【００５６】
表Ｚ－表１に掲載され、且つ米国特許出願公開第２０１０／０１９７５１９号明細書及び同第２００９／０１６３３７６号明細書（これらは全体として参照により本明細書に援用される）に記載されるとおりの、実験的に検証されたＫＡＲＩ酵素のプロファイルＨＭＭの表（本明細書と共に電子的に提出されたもので、参照によって援用される）である。
【００５７】
【表１】

表１．実験的に検証されたKARI酵素

GI番号	受託番号	配列番号	微生物
70732562	YP_262325.1	5	*蛍光菌(Pseudomonas fluorescens) Pf-5*
15897495	NP_342100.1	1	*スルホロブス・ソルファタリカス(Sulfolobus solfataricus) P2*
18313972	NP_560639.1	2	*ピロバキュラム・アエロフィラム(Pyrobaculum aerophilum)株 IM2*
76801743	YP_326751.1	7	*ナトロノモナス・ファラオニス(Natronomonas pharaonis) DSM 2160*
16079881	NP_390707.1	8	*枯草菌亜種スブチリス(Bacillus subtilis subsp. subtilis)株 168*
19552493	NP_600495.1	9	*コリネバクテリウム・グルタミカム (Corynebacterium glutamicum) ATCC 13032*
6225553	O32414	10	*ファエオスピリルム・モリスキアヌム (Phaeospririlum molischianum)*
17546794	NP_520196.1	3	*ラルストニア・ソラナセラム(Ralstonia solanacearum) GMI1000*
56552037	YP_162876.1	11	*ザイモモナス・モビリス亜種モビリス (Zymomonas mobilis subsp. mobilis) ZM4*
114319705	YP_741388.1	12	*アルカリリムニコラ・エールリケイ (Alkalilimnicola ehrlichei) MLHE-1*
57240359	ZP_00368308.1	13	*カンピロバクター・ラリ(Campylobacter lari) RM2100*
120553816	YP_958167.1	14	*マリノバクター・アクアエオレイ(Marinobacter aquaeolei) VT8*
71065099	YP_263826.1	15	*サイクロバクター・アルクチクス(Psychrobacter arcticus) 273-4*
83648555	YP_436990.1	16	*ハヘラ・チェジュエンシス(Hahella chejuensis) KCTC 2396*
74318007	YP_315747.1	17	*チオバチルス・デニトリフィカンス(Thiobacillus denitrificans) ATCC 25259*
67159493	ZP_00420011.1	18	*アゾトバクター・ビネランジイ(Azotobacter vinelandii) AvOP*
66044103	YP_233944.1	19	*シュードモナス・シリンゲ病原型シリンゲ (Pseudomonas syringae pv. syringae) B728a*
28868203	NP_790822.1	20	*シュードモナス・シリンゲ病原型トマト (Pseudomonas syringae pv. tomato)株 DC3000*
26991362	NP_746787.1	21	*シュードモナス・プチダ(Pseudomonas putida) KT2440*
104783656	YP_610154.1	22	*シュードモナス・エントモフィラ(Pseudomonas entomophila) L48*
146306044	YP_001186509.1	23	*シュードモナス・メンドシナ(Pseudomonas mendocina) ymp*
15599888	NP_253382.1	4	*シュードモナス・エルギノーサ(Pseudomonas aeruginosa) PAO1*
42780593	NP_977840.1	24	*セレウス菌(Bacillus cereus) ATCC 10987*
42781005	NP_978252.1	25	*セレウス菌(Bacillus cereus) ATCC 10987*
266346	Q01292	6	*ホウレンソウ(Spinacia oleracea)*

【００５８】
アラインメントにおける列に相当するプロファイルＨＭＭの１１の位置は、蛍光菌（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｓ）Ｐｆ－５　ＫＡＲＩにおける１１個の

補因子スイッチング位置に対応するもので、位置２４、３３、４７、５０、５２、５３、６１、８０、１１５、１５６、及び１７０として同定される。表Ｚは、本明細書と共に電子的に提出され、参照により本明細書に援用される。

【００５９】

本明細書と共に提出される配列表（名称：２０１２０３２３＿ＣＬ５３６７ＵＳＮＡ＿ＳＥＱＬＩＳＴ．ｔｘｔ；サイズ２，００３，８９３バイト；作成日２０１２年3月２３日）に提供される配列は、参照により本明細書に援用される。

【００６０】

世界知的所有権機関（Ｗｏｒｌｄ Ｉｎｔｅｌｌｅｃｔｕａｌ Ｐｒｏｐｅｒｔｙ Ｏｒｇａｎｉｚａｔｉｏｎ：ＷＩＰＯ）標準ＳＴ．２５（２００９）に従い、配列表及び本明細書に示す特定のプライマーは、Ｎを用いてヌクレオチドａ又はｇ又はｃ又はｔを表す。Ｋを用いてｇ又はｔを表す。Ｍを用いてａ又はｃを表す。

【００６１】

特に定義されない限り、本明細書で使用される全ての科学技術用語は、本発明が属する技術分野の当業者が一般的に理解するのと同じ意味を有する。矛盾がある場合、それらの定義を含む本願に従う。同様に、文脈上特に必要でない限り、単数形の用語は複数を含むものとし、複数形の用語は単数を含むものとする。本明細書で言及される全て刊行物、特許及び他の参考文献が、特許又は特許公開の特定の節のみを参照によって援用することが指示されない限り、個別の各刊行物又は特許出願が参照によって援用されると具体的且つ個別的に指示されたものとして、あらゆる目的から全体として参照により援用される。

【００６２】

本発明の実施又は試験では、本明細書に開示されるものと同様の又は等価な方法及び材料を用いることができるが、好適な方法及び材料を以下に開示する。材料、方法及び例は、あくまでも例示に過ぎず、限定する意図はない。本発明の他の特徴及び利点は、詳細な説明から、及び特許請求の範囲から、明らかとなるであろう。

【００６３】

ピルベート利用生合成経路によるイソブタノールの生合成の最後のステップは、イソブチルアルデヒドからイソブタノールへの変換である（図１）。この経路における副反応はイソブチルアルデヒドからイソ酪酸への変換であり、これは、イソブタノールへの変換に利用可能なイソブチルアルデヒドの量の低下、及びイソブタノール収率の低下をもたらす。効率的な生合成プロセスのためには、イソブチルアルデヒドからイソ酪酸への変換を防ぐことによってイソブタノールへの変換に利用可能なイソブチルアルデヒドの量を増加させ、イソブタノール収率を高める必要がある。

【００６４】

アルデヒドデヒドロゲナーゼは、アルデヒドの酸化（脱水素）を触媒する酵素のファミリーである（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．１８０：８２２－３０，１９９８；Ｎａｖａｒｒｏ－Ａｖｉｎｏ ｅｔ ａｌ．，Ｙｅａｓｔ １５：８２９－４２，１９９９；及びＳａｉｎｔ－Ｐｒｉｘ ｅｔ ａｌ．，Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ １５０：２２０９－２０，２００４）。イソブタノールへの変換に利用可能なイソブチルアルデヒドの量が増加してイソブタノール収率が高まるように、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性が低下又は消失するように修飾することができ、且つイソブチルアルデヒドからイソ酪酸への変換を低下又は消失させることができる好適なアルデヒドデヒドロゲナーゼを同定する必要がある。

【００６５】

アルデヒドオキシダーゼは、アルデヒドからのカルボン酸の生成を触媒する酵素のファミリーである（Ｎｏｍｕｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｓｃｉ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．６２：１１３４－７，１９９８；及びＪｏｈｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ １５１：１３７９－１３９１，１９９９）。イソブタノールへの変換に利用可能なイソブチルアルデヒドの量が増加してイソブタノール収率が高まるように、アルデヒドオキシダーゼ活性が低下又は消失するように修飾することができ、且つイソブチ

ルアルデヒドからイソ酪酸への変換を低下又は消失させることができる好適なアルデヒドオキシダーゼを同定する必要がある。

【００６６】

遺伝子操作された酵母におけるブタノール生成の生合成経路は、アセトラクテートから２，３－ジヒドロキシ－３－イソバレレート（ＤＨＩＶ）への変換を含み、ＤＨＩＶは続いてブタノールに変換される。図１０を参照のこと。しかしながら、この経路の副反応はアセトラクテートから２，３－ジヒドロキシ－２－メチルブチレート（ＤＨＭＢ）への変換であり、これはブタノール生成全体を減少させる。実際、本出願者らは、ＤＨＭＢがイソブタノール生成経路において酵素（ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ及びケトール酸レダクトイソメラーゼ）に対し阻害効果を有することを見出した。効率的な生合成プロセスのためには、アセトラクテートからＤＨＭＢへの変換を防ぐ必要がある。

【００６７】

本出願者らは、上述の問題を、イソブタノール生合成経路と；ｉ）低下又は消失したアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性；ｉｉ）低下又は消失したアルデヒドオキシダーゼ活性；ｉｉｉ）低下又は消失したアセト乳酸レダクターゼ活性；ｉｖ）ケトール酸レダクトイソメラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種ポリヌクレオチド；及びｖ）ケトール酸レダクトイソメラーゼ活性を有する異種ポリペプチドのうちの少なくとも１つとを含む組換え酵母宿主細胞を提供することによって解決した。さらに、本出願者らは、かかる宿主細胞を利用するブタノール生成方法を提供する。かかる組換え宿主細胞を用いると、生合成経路の生成物（例えば、イソブタノール、１－ブタノール、又は２－ブタノール）の生成を増加させ、及び／又は経路中間体から望ましくない副生成物への変換を低下又は消失させることができる。本出願者らはまた、様々な候補酵素の評価に好適なスクリーニング戦略も提供している。同定された酵素は、生合成経路の生成物（例えば、イソブタノール、１－ブタノール、又は２－ブタノール）の生成が増強され、及び／又は経路中間体から望ましくない副生成物への変換が低下又は消失するように改変することができる。

【００６８】

本発明をさらに定義するため、以下の用語、略語及び定義を提供する。

【００６９】

本明細書に開示されるポリペプチドに関連して「～に由来する」は、示される生物中に存在するＫＡＲＩのアミノ酸配列に基づき合成される配列、並びにその生物の遺伝物質から直接クローニングされる配列を包含することは理解されるであろう。

【００７０】

本明細書で使用されるとき、用語「～を含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」、「～を含んでいる（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」、「～を包含する（ｉｎｃｌｕｄｅｓ）」、「～を包含している（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」、「～を有する（ｈａｓ）」、「～を有している（ｈａｖｉｎｇ）」、「～を含有する（ｃｏｎｔａｉｎｓ）」又は「～を含有している（ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ）」、又はこれらの任意の他の変化形は、挙げられる完全体又は完全体群の包含を意味するが、しかし任意の他の完全体又は完全体群の排除を意味するものではないことが理解され、非排他的又は開放型であるものと意図される。例えば、要素のリストを含む組成物、混合物、プロセス、方法、物品、又は装置は、必ずしもそれらの要素のみに限られず、明示的には列挙されない、又はかかる組成物、混合物、プロセス、方法、物品、又は装置に固有の他の要素を包含し得る。さらに、反する旨が明記されない限り、「又は」は包含的な「又は」を指し、排他的な「又は」を指すものではない。例えば、条件Ａ又はＢでは、以下のいずれか一つが満たされる：Ａが真であり（又は存在し）且つＢが偽である（又は存在しない）、Ａが偽であり（又は存在せず）且つＢが真である（又は存在する）、並びにＡ及びＢの両方が真である（又は存在する）。

【００７１】

本明細書で使用されるとき、本明細書及び特許請求の範囲の全体を通して用いられるとおりの用語「～からなる（ｃｏｎｓｉｓｔｓ　ｏｆ）」、又は「～からなる（ｃｏｎｓｉｓｔ　ｏｆ）」若しくは「～からなっている（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｏｆ）」などの変

化形は、任意の記載される完全体又は完全体群の包含を示し、しかし特定される方法、構造、又は組成物にさらなる完全体又は完全体群を加えることはできないことを示す。

【００７２】

本明細書で使用されるとき、本明細書及び特許請求の範囲の全体を通して用いられるとおりの用語「～から本質的になる（ｃｏｎｓｉｓｔｓ　ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ　ｏｆ）」、又は「～から本質的になる（ｃｏｎｓｉｓｔ　ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ　ｏｆ）」若しくは「～から本質的になっている（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ　ｏｆ）」などの変化形は、任意の記載される完全体又は完全体群の包含、及び特定される方法、構造又は組成物の基本的な又は新規の特性を実質的に変化させることのない任意の記載される完全体又は完全体群の任意の包含を示す。特許審査便覧（Ｍ．Ｐ．Ｅ．Ｐ．）第２１１１．０３章を参照のこと。

【００７３】

また、本発明のエレメント又は構成要素に先行する不定冠詞「ａ」及び「ａｎ」は、インスタンスの数に関して、すなわちエレメント又は構成要素の出現に関して、非制限的なものであることが意図される。従って「ａ」又は「ａｎ」は、１つ又は少なくとも１つを含むものとして読まれなければならず、単数形の語形のエレメント又は構成要素はまた、数値が明らかに単数であることを意味しない限り、その複数形も含む。

【００７４】

用語「発明」又は「本発明」は、本明細書で使用されるとき、非制限的な用語であり、特定の発明のいかなる単一の実施形態も参照することを意図せず、しかし、提示されるとおりの、又は後に補正及び補足されるとおりの特許請求の範囲に記載され、又は本明細書に記載されるとおりの、あらゆる可能な実施形態を包含する。

【００７５】

本明細書で使用されるとき、用いられる本発明の成分又は反応物の量を修飾する用語「約」は、例えば、現実の世界で濃縮物の作製又は溶液のために用いられる典型的な計測及び液体操作の手順；それらの手順における不注意による誤り；組成物の作製又は方法の実行のために用いられる成分の製造、供給源、又は純度の違いなどを通じて生じ得る数量のばらつきを指す。用語「約」はまた、特定の初期混合物によってもたらされる組成物の平衡条件の違いに起因して異なる量も包含する。用語「約」によって修飾されるか否かにかかわらず、特許請求の範囲はそれらの量と等価な量を含む。一実施形態において、用語「約」は、報告される数値の１０％以内、又は報告される数値の５％以内を意味する。

【００７６】

本明細書で使用されるとき、「相乗的」は、組み合わせによって生じる相加を上回る効果（すなわち、個々の効果の合計より大きい効果）又は個々の効果が相加的ではないと予想されるときの相加効果を指す。この用語はまた、ある化合物を加える結果、必要とされる別の化合物が少なくなることも指す。

【００７７】

用語「ブタノール生合成経路」は、本明細書で使用されるとき、１－ブタノール、２－ブタノール、又はイソブタノールを生成する酵素経路を指す。例えば、イソブタノール生合成経路は、参照により本明細書に援用される米国特許出願公開第２００７／００９２９５７号明細書に開示される。

【００７８】

用語「イソブタノール生合成経路」は、イソブタノールを生成する酵素経路を指す。特定のイソブタノール生合成経路を図１に示し、本明細書に記載する。時に「イソブタノール生合成経路」は、「イソブタノール生成経路」と同義語として用いられる。

【００７９】

用語「ブタノール」は、本明細書で使用されるとき、２－ブタノール、１－ブタノール、イソブタノール又はそれらの混合物を指す。イソブタノールは２－メチル－１－プロパノールとしても知られる。

【００８０】

「操作されたアルコール生成経路」（操作されたブタノール又はイソブタノール生成経路など）を含む組換え宿主細胞は、宿主細胞に通常存在するものとは違う方法でアルコールを生成する修飾された経路を含む宿主細胞を指す。かかる違いには、その宿主細胞による生成が典型的でないアルコールの生成、又は増加した若しくはより効率的な生成が含まれる。

【００８１】

用語「異種生合成経路」は、本明細書で使用されるとき、生成物を生成する酵素経路であって、酵素の少なくとも１つが、その生合成経路を含む宿主細胞にとって内因性でない酵素経路を指す。

【００８２】

用語「抽出剤」は、本明細書で使用されるとき、発酵ブロスからブタノールを抽出するために用いることのできる１つ以上の有機溶媒を指す。

【００８３】

用語「有効イソブタノール生成能力」は、本明細書で使用されるとき、細胞１グラムあたりに生成されるイソブタノールのグラム単位での総量を指す。

【００８４】

用語「有効力価」は、本明細書で使用されるとき、発酵培地１リットルあたりの発酵によって生成される特定のアルコール（例えばブタノール）の総量を指す。ブタノールの総量には、以下が含まれる：（ｉ）発酵培地中のブタノールの量；（ｉｉ）有機抽出剤から回収されるブタノールの量；及び（ｉｉｉ）気相から回収されるブタノールの量（ガスストリッピングが用いられる場合）。

【００８５】

用語「有効速度」は、本明細書で使用されるとき、発酵１時間につき発酵培地１リットルあたりの発酵によって生成されるブタノールの総量を指す。

【００８６】

用語「有効収率」は、本明細書で使用されるとき、生体触媒によって消費される発酵性炭素基質１単位あたりに生成されるブタノールの量を指す。

【００８７】

用語「分離」は、本明細書で使用されるとき、「回収」と同義語であり、初期混合物から化学的化合物を除去して、初期混合物中の化合物の純度又は濃度と比べてより高純度で、又はより高濃度で化合物を得ることを指す。

【００８８】

用語「水相」は、本明細書で使用されるとき、発酵ブロスを水不混和性有機抽出剤と接触させることにより得られる二相混合物の水相を指す。本明細書に記載される方法の実施形態で発酵抽出を含むものでは、このとき用語「発酵ブロス」が、具体的には二相発酵抽出における水相を指す。

【００８９】

用語「有機相」は、本明細書で使用されるとき、発酵ブロスを水不混和性有機抽出剤と接触させることにより得られる二相混合物の非水相を指す。

【００９０】

用語「ＰＤＣ－」、「ＰＤＣノックアウト」、又は「ＰＤＣ－ＫＯ」は、本明細書で使用されるとき、ピルビン酸デカルボキシラーゼ（ＰＤＣ）をコードする遺伝子の発現を不活性化又は低下させて細胞からピルビン酸デカルボキシラーゼ酵素活性を実質的に又は完全に欠損させる遺伝子修飾を有する細胞を指す。細胞が２つ以上の発現した（活性な）ＰＤＣ遺伝子を有する場合、活性なＰＤＣ遺伝子の各々が不活性化されるか、又は最小限の発現を有し、これによりＰＤＣ－細胞が生じ得る。

【００９１】

用語「ポリヌクレオチド」は、単数の核酸並びに複数の核酸を包含することが意図され、核酸分子又はコンストラクト、例えばメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）又はプラスミドＤＮＡ（ｐＤＮＡ）を指す。ポリヌクレオチドは、完全長ｃＤＮＡ配列、又は非翻訳５

’及び３’配列及びコード配列を含むその断片のヌクレオチド配列を含むことができる。ポリヌクレオチドは、非修飾ＲＮＡ若しくはＤＮＡ又は修飾ＲＮＡ若しくはＤＮＡであってもよい任意のポリリボヌクレオチド又はポリデオキシリボヌクレオチドから構成され得る。例えば、ポリヌクレオチドは、一本鎖及び二本鎖ＤＮＡ、一本鎖及び二本鎖領域の混合物であるＤＮＡ、一本鎖及び二本鎖ＲＮＡ、並びに一本鎖及び二本鎖領域の混合物であるＲＮＡ、一本鎖であるか、又はより典型的には二本鎖又は一本鎖及び二本鎖領域の混合物であり得るＤＮＡ及びＲＮＡを含むハイブリッド分子から構成され得る。「ポリヌクレオチド」は、化学的、酵素的、又は代謝的に修飾された形態を包含する。

【００９２】

ポリヌクレオチド配列は「単離されている」と称されることもあり、そこではポリヌクレオチド配列は、その天然環境から取り出されている。例えば、ベクターに含まれる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又はポリペプチド断片をコードする異種ポリヌクレオチドは、本発明の目的上、単離されていると考えられる。単離されているポリヌクレオチドのさらなる例には、異種宿主細胞中に維持される組換えポリヌクレオチド又は溶液中の（部分的又は実質的に）精製されているポリヌクレオチドが含まれる。本発明に係る単離されているポリヌクレオチド又は核酸には、合成的に生成されるかかる分子がさらに含まれる。ＤＮＡポリマーの形態の単離されているポリヌクレオチド断片は、ｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡ又は合成ＤＮＡの１つ以上のセグメントから構成され得る。

【００９３】

用語「ＮＡＤ（Ｐ）Ｈ消費アッセイ」は、ＫＡＲＩ酵素の比活性を測定する酵素アッセイを指し、酵素反応からのＫＡＲＩ補因子ＮＡＤ（Ｐ）Ｈの消失の計測を伴う。かかるアッセイは、全体として参照により本明細書に援用されるＡｕｌａｂａｕｇｈ ａｎｄ Ｓｃｈｌｏｓｓ，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ２９：２８２４－２８３０，１９９０に記載されている。

【００９４】

用語「ＮＡＤ（Ｐ）Ｈ」は、ＮＡＤＨ又はＮＡＤＰＨのいずれかを指す。

【００９５】

「ＫＡＲＩ」は、酵素ケトール酸レダクトイソメラーゼの略記である。

【００９６】

ＮＡＤＰＨのアデノシル２’－リン酸に関連してＫＡＲＩ酵素の様々なアミノ酸残基の位置を参照するときの用語「近接性」は、酵素構造の三次元モデルにおいて、酵素に結合したＮＡＤＰＨのアデノシル２’－リン酸のリン原子の約４．５Å以内にあるアミノ酸を意味する。

【００９７】

用語「ケトール酸レダクトイソメラーゼ」（略記「ＫＡＲＩ」）、及び「アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ」は、同義的に使用され、ＥＣ番号ＥＣ １．１．１．８６（Ｅｎｚｙｍｅ Ｎｏｍｅｎｃｌａｔｕｒｅ １９９２，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ）に分類される（Ｓ）－アセトラクテートから２，３－ジヒドロキシイソバレレートへの反応の触媒能を有する酵素を指す。本明細書で使用されるとき、用語「クラスＩケトール酸レダクトイソメラーゼ酵素」は、典型的に３３０～３４０アミノ酸残基を有する短い形態を意味し、クラスＩＩと呼ばれる典型的に約４９０残基を有する長い形態とは異なる。これらの酵素は数多くの供給源から入手可能であり、限定はされないが、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）（アミノ酸配列番号９４２；ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＣ＿０００９１３ ＲＥＧＩＯＮ：３９５５９９３．３９５７４６８）、コレラ菌（Ｖｉｂｒｉｏ ｃｈｏｌｅｒａｅ）（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＣ＿００２５０５ ＲＥＧＩＯＮ：１５７４４１．１５８９２５）、緑膿菌（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）（ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＣ＿００２５１６、ＲＥＧＩＯＮ：５２７２４５５．５２７３４７１）、及び蛍光菌（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｓ）（アミノ酸配列番号９４３；ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＣ＿００４１２９ ＲＥＧＩＯＮ：６０１７３７９．６０１８３９５）が挙げられる。ＫＡＲＩ酵素は、例えば、米国特許

第７，９１０，３４２号明細書及び同第８，１２９，１６２号明細書及び米国特許出願公開第２０１０／０１９７５１９号明細書（これらは全て、全体として参照により本明細書に援用される）に記載される。

【００９８】

ＫＡＲＩは様々な生物に見られ、種間のアミノ酸配列の比較では、この酵素に２種類あることが明らかになっている：真菌及び多くの細菌に見られる短い形態（クラスＩ）、及び植物に典型的な長い形態（クラスＩＩ）。クラスＩ　ＫＡＲＩは、典型的には３３０～３４０アミノ酸残基を有する。長い形態のＫＡＲＩ酵素は約４９０アミノ酸残基を有する。しかしながら、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）などの一部の細菌は、そのアミノ酸配列が植物に見られるものと認識可能な程度に異なる長い形態を有する。ＫＡＲＩはｉｌｖＣ遺伝子によりコードされ、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）及び他の細菌が最少培地で成長するのに必須の酵素である。クラスＩＩ　ＫＡＲＩは、概して、２２５残基のＮ末端ドメインと２８７残基のＣ末端ドメインとからなる。ＮＡＤＰＨ結合部位が含まれるＮ末端ドメインはαβ構造を有し、他のピリジンヌクレオチド依存性オキシドレダクターゼに見られるドメインに似ている。Ｃ末端ドメインは、ほぼ全体がα－ヘリックスからなる。

【００９９】

ケトール酸レダクトイソメラーゼ（ＫＡＲＩ）酵素は、操作された微生物を用いるイソブタノール生成経路において有用である（米国特許第７，８５１，１８８号明細書及び同第７，９９３，８８９号明細書、参照によって本明細書に援用される）。

【０１００】

ＮＡＤＨを利用することができるＫＡＲＩは、最も一般的に用いられる微生物細胞における既存の解糖経路及び他の代謝経路により生成されるＮＡＤＨを活用することができ、イソブタノール生成の改善をもたらし得る。Ｒａｎｅ　ｅｔ　ａｌ．（Ａｒｃｈ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．，３３８：８３－８９，１９９７）が、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）から単離されたケトール酸レダクトイソメラーゼの補因子スイッチングを考察している。米国特許出願公開第２００９／０１６３３７６号明細書及び同第２０１０／０１９７５１９号明細書（これらの各々は、全体として参照により本明細書に援用される）は、ＮＡＤＨを用いることができるＫＡＲＩ酵素の生成について記載している。米国特許出願公開第２０１０／０１４３９９７号明細書（これは全体として参照により本明細書に援用される）は、ＮＡＤＨに対するK_M値が改善された大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）変異体について記載している。

【０１０１】

用語「ケトール酸レダクトイソメラーゼ活性」及び「ＫＡＲＩ活性」は、（Ｓ）－アセトラクテートから２，３－ジヒドロキシイソバレレートへの基質から生成物への変換を触媒する能力を指す。

【０１０２】

用語「アセト乳酸シンターゼ」は、ピルベートからアセトラクテート及びCO_2への変換を触媒する酵素を指す。アセトラクテートは２つの立体異性体（（Ｒ）及び（Ｓ））を有する；この酵素は、生体系によって作られる（Ｓ）－異性体を選好する。特定のアセト乳酸シンターゼは、ＥＣ番号２．２．１．６（Ｅｎｚｙｍｅ　Ｎｏｍｅｎｃｌａｔｕｒｅ　１９９２，Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ）により知られる。これらの酵素は数多くの供給源から入手可能であり、限定はされないが、枯草菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｕｂｔｉｌｉｓ）（ＧｅｎＢａｎｋ番号ＣＡＢ１５６１８、Ｚ９９１２２、それぞれ、ＮＣＢＩ（国立バイオテクノロジー情報センター（Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｃｅｎｔｅｒ　ｆｏｒ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ））アミノ酸配列、ＮＣＢＩヌクレオチド配列）、クレブシエラ・ニューモニエ（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ　ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）（ＧｅｎＢａｎｋ番号ＡＡＡ２５０７９、Ｍ７３８４２及びラクトコッカス・ラクチス（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｌａｃｔｉｓ）（ＧｅｎＢａｎｋ番号ＡＡＡ２５１６１、Ｌ１６９７５）が挙げられる。

【０１０３】
用語「アセトヒドロキシ酸デヒドラターゼ」は、２，３－ジヒドロキシイソバレレートからα－ケトイソバレレートへの変換を触媒する酵素を指す。特定のアセトヒドロキシ酸デヒドラターゼはＥＣ番号４．２．１．９により知られる。これらの酵素は無数の微生物から入手可能であり、限定はされないが、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）（ＧｅｎＢａｎｋ番号ＹＰ＿０２６２４８、ＮＣ＿０００９１３、Ｓ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）（ＧｅｎＢａｎｋ番号ＮＰ＿０１２５５０、ＮＣ＿００１１４２）、Ｍ．マリパルディス（Ｍ．ｍａｒｉｐａｌｕｄｉｓ）（ＧｅｎＢａｎｋ番号ＣＡＦ２９８７４、ＢＸ９５７２１９）、枯草菌（Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ）（ＧｅｎＢａｎｋ番号ＣＡＢ１４１０５、Ｚ９９１１５）、ラクトコッカス・ラクチス（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｌａｃｔｉｓ）（配列番号９２６）、及びミュータンス菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｍｕｔａｎｓ）（配列番号９３９）が挙げられる。

【０１０４】
用語「分枝鎖α－ケト酸デカルボキシラーゼ」は、α－ケトイソバレレートからイソブチルアルデヒド及びCO_2への変換を触媒する酵素を指す。特定の分枝鎖α－ケト酸デカルボキシラーゼはＥＣ番号４．１．１．７２により知られ、数多くの供給源から入手可能であり、限定はされないが、ラクトコッカス・ラクチス（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｌａｃｔｉｓ）（ＧｅｎＢａｎｋ番号ＡＡＳ４９１６６、ＡＹ５４８７６０；ＣＡＧ３４２２６、ＡＪ７４６３６４、ネズミチフス菌（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ　ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ）（ＧｅｎＢａｎｋ番号ＮＰ－４６１３４６、ＮＣ－００３１９７）、クロストリジウム・アセトブチリカム（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ　ａｃｅｔｏｂｕｔｙｌｉｃｕｍ）（ＧｅｎＢａｎｋ番号ＮＰ－１４９１８９、ＮＣ－００１９８８）、マクロコッカス・カセオリチクス（Ｍａｃｒｏｃｏｃｃｕｓ　ｃａｓｅｏｌｙｔｉｃｕｓ）（配列番号９４０）、及びリステリア・グレイ（Ｌｉｓｔｅｒｉａ　ｇｒａｙｉ）（配列番号９４１）が挙げられる。

【０１０５】
用語「分枝鎖アルコールデヒドロゲナーゼ」は、イソブチルアルデヒドからイソブタノールへの変換を触媒する酵素を指す。特定の分枝鎖アルコールデヒドロゲナーゼはＥＣ番号１．１．１．２６５により知られるが、他のアルコールデヒドロゲナーゼ（具体的には、ＥＣ　１．１．１．１又は１．１．１．２）に分類されることもある。これらの酵素はＮＡＤＨ（還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド）及び／又はＮＡＤＰＨを電子供与体として利用し、数多くの供給源から入手可能であり、限定はされないが、Ｓ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）（ＧｅｎＢａｎｋ番号ＮＰ＿０１０６５６、ＮＣ＿００１１３６；ＮＰ＿０１４０５１、ＮＣ＿００１１４５）、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）（ＧｅｎＢａｎｋ番号ＮＰ＿４１７４８４）、Ｃ．アセトブチリカム（Ｃ．ａｃｅｔｏｂｕｔｙｌｉｃｕｍ）（ＧｅｎＢａｎｋ番号ＮＰ＿３４９８９２、ＮＣ＿００３０３０）、Ｂ．インディカ（Ｂ．ｉｎｄｉｃａ）（アミノ酸配列番号９４５）、Ａ．キシロスオキシダンス（Ａ．ｘｙｌｏｓｏｘｉｄａｎｓ）（アミノ酸配列番号９４４）が挙げられる。

【０１０６】
用語「分枝鎖ケト酸デヒドロゲナーゼ」は、α－ケトイソバレレートからイソブチリル－ＣｏＡ（イソブチリル補因子Ａ）への変換を触媒する酵素を指し、これはNAD^+（ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド）を電子受容体として用いる。特定の分枝鎖ケト酸デヒドロゲナーゼはＥＣ番号１．２．４．４により知られる。これらの分枝鎖ケト酸デヒドロゲナーゼは４つのサブユニットを含み、いずれのサブユニットの配列も無数の微生物から入手可能であり、限定はされないが、枯草菌（Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ）（ＧｅｎＢａｎｋ番号ＣＡＢ１４３３６、Ｚ９９１１６；ＣＡＢ１４３３５、Ｚ９９１１６；ＣＡＢ１４３３４、Ｚ９９１１６；及びＣＡＢ１４３３７、Ｚ９９１１６）及びシュードモナス・プチダ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｐｕｔｉｄａ）（ＧｅｎＢａｎｋ番号ＡＡＡ６５６１４、Ｍ５７６１３；ＡＡＡ６５６１５、Ｍ５７６１３；ＡＡＡ６５６１７、Ｍ５７６１３；及びＡＡＡ６５６１８、Ｍ５７６１３）が挙げられる。

【０１０７】
本明細書で使用されるとき、「アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性」は、本明細書に提供される例を含め、アルデヒドデヒドロゲナーゼの生物学的機能を有する任意のポリペプチドを指す。かかるポリペプチドには、アルデヒドの酸化（脱水素）を触媒するポリペプチドが含まれる。かかるポリペプチドには、イソブチルアルデヒドからイソ酪酸への変換を触媒するポリペプチドが含まれる。かかるポリペプチドにはまた、ＥＣ番号ＥＣ　１．２．１．３、ＥＣ　１．２．１．４又はＥＣ　１．２．１．５に対応するポリペプチドも含まれる。かかるポリペプチドは、当該技術分野において公知の及び本明細書に開示される方法により決定することができる。

【０１０８】
本明細書で使用されるとき、「アルデヒドオキシダーゼ活性」は、本明細書に提供される例を含め、アルデヒドオキシダーゼの生物学的機能を有する任意のポリペプチドを指す。かかるポリペプチドには、アルデヒドからのカルボン酸を触媒するポリペプチドが含まれる。かかるポリペプチドには、イソブチルアルデヒドからイソ酪酸への変換を触媒するポリペプチドが含まれる。かかるポリペプチドにはまた、ＥＣ番号ＥＣ　１．２．３．１に対応するポリペプチドも含まれる。かかるポリペプチドは、当該技術分野において公知の及び本明細書に開示される方法により決定することができる。

【０１０９】
本明細書で使用されるとき、「ピルビン酸デカルボキシラーゼ活性」は、本明細書に提供される例を含め、ピルビン酸デカルボキシラーゼ酵素の生物学的機能を有する任意のポリペプチドの活性を指す。かかるポリペプチドには、ピルベートからアセトアルデヒドへの変換を触媒するポリペプチドが含まれる。かかるポリペプチドにはまた、ＥＣ番号４．１．１．１に対応するポリペプチドも含まれる。かかるポリペプチドは、当該技術分野において公知の及び本明細書に開示される方法により決定することができる。ピルビン酸デカルボキシラーゼ（ｐｙｒｕｖａｔｅ　ｄｅｃａｒｂｏｘｙｌａｔｅ）活性を有するポリペプチドは、例として、ＰＤＣ１、ＰＤＣ５、ＰＤＣ６、又はそれらの任意の組み合わせであってもよい。

【０１１０】
本明細書で使用されるとき、「アセト乳酸レダクターゼ活性」は、アセトラクテートからＤＨＭＢへの変換を触媒する能力を有する任意のポリペプチドの活性を指す。かかるポリペプチドは、当該技術分野において公知の及び本明細書に開示される方法により決定することができる。

【０１１１】
本明細書で使用されるとき、「ＤＨＭＢ」は、２，３－ジヒドロキシ－２－メチルブチレートを指す。ＤＨＭＢには、２Ｓ，３Ｓ配置を有する「ファストＤＨＭＢ」と、２Ｓ，３Ｒ配置を有する「スローＤＨＭＢ」とが含まれる。全体として参照により本明細書に援用されるＫａｎｅｋｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｈｙｔｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　３９：１１５－１２０（１９９５）を参照されたく、ファストＤＨＭＢはアングリセリン酸（ａｎｇｌｉｃｅｒｉｃ　ａｃｉｄ）、及びスローＤＨＭＢはチグリセリン酸（ｔｉｇｌｉｃｅｒｉｃ　ａｃｉｄ）と称される。

【０１１２】
本明細書で使用されるとき、「低下した活性」は、その活性の低下をもたらす変化が起こる以前のポリペプチドの同じ生物活性と比較したときの、ポリペプチドの既知の生物活性における任意の計測可能な減少を指す。かかる変化には、本明細書に記載されるとおりのポリペプチド又はポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの修飾が含まれ得る。本明細書に開示されるポリペプチドの活性の低下は、当該技術分野において公知の及び本明細書に開示される方法により決定することができる。

【０１１３】
本明細書で使用されるとき、「消失した活性」は、その活性の消失をもたらす変化が起こる以前のポリペプチドの同じ生物活性と比較したときの、ポリペプチドの既知の生物活

性が完全に消えることを指す。かかる変化には、本明細書に記載されるとおりのポリペプチド又はポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの修飾が含まれ得る。消失した活性には、その活性の消失をもたらす変化が起こる以前のポリペプチドの同じ生物活性と比較したときに計測できないポリペプチドの生物活性が含まれる。本明細書に開示されるポリペプチドの活性の消失は、当該技術分野において公知の及び本明細書に開示される方法により決定することができる。

【０１１４】

用語「炭素基質」又は「発酵性炭素基質」は、本発明の宿主生物により代謝されることが可能な炭素源、特に、単糖類、オリゴ糖類、多糖類、及び一炭素基質からなる群から選択される炭素源又はこれらの混合物を指す。炭素基質の非限定的な例は本明細書に提供され、限定はされないが、単糖類、オリゴ糖類、多糖類、エタノール、ラクテート、スクシネート、グリセロール、二酸化炭素、メタノール、グルコース、フルクトース、スクロース、キシロース、アラビノース、デキストロース、又はこれらの混合物が挙げられる。他の炭素基質としては、エタノール、ラクテート、スクシネート、又はグリセロールを挙げることができる。

【０１１５】

「発酵ブロス」は、本明細書で使用されるとき、水、糖類（発酵性炭素源）、溶解固形物（存在する場合）、アルコールを生成する微生物、生成物アルコール、及び存在する微生物により糖類がアルコール、水及び二酸化炭素（CO_2）になる反応によって生成物アルコールが作られる発酵槽中に保持される材料の他のあらゆる構成要素の混合物を意味する。時に、本明細書で使用されるとき用語「発酵培地」及び「発酵混合物」が、「発酵ブロス」と同義語として用いられ得る。

【０１１６】

「バイオマス」は、本明細書で使用されるとき、発酵性糖を提供する加水分解性デンプンを含有する天然生成物を指し、これには、セルロースを含み、場合によりヘミセルロース、リグニン、デンプン、オリゴ糖類、二糖類、及び／又は単糖類をさらに含む任意の１つ又は複数のセルロース系又はリグノセルロース系材料が含まれる。バイオマスはまた、タンパク質及び／又は脂質などのさらなる成分も含むことができる。バイオマスは単一の供給源に由来してもよく、又はバイオマスは、２つ以上の供給源に由来する混合物を含んでもよい。例えばバイオマスは、トウモロコシ穂軸とトウモロコシ茎葉との混合物、又は草と葉との混合物を含み得る。バイオマスとしては、限定はされないが、バイオエネルギー作物、農業残渣、都市固形廃棄物、産業固形廃棄物、製紙スラッジ、庭ごみ、木材、及び林業廃棄物が挙げられる。バイオマスの例としては、限定はされないが、トウモロコシ穀粒、トウモロコシ穂軸、トウモロコシ皮などの作物残渣、トウモロコシ茎葉、草類、小麦、ライ麦、小麦わら、大麦、大麦わら、乾草、稲わら、スイッチグラス、古紙、サトウキビバガス、モロコシ、大豆、穀粒の製粉から得られる成分、樹木、枝、根、葉、木材チップ、おがくず、低木及び潅木、野菜、果実、花、家畜糞尿、及びこれらの混合物が挙げられる。

【０１１７】

「供給原料」は、本明細書で使用されるとき、発酵性炭素源を含有する生成物を意味する。好適な供給原料としては、限定はされないが、ライ麦、小麦、トウモロコシ、サトウキビ、及びこれらの混合物が挙げられる。

【０１１８】

用語「好気性条件」は、本明細書で使用されるとき、酸素の存在下における成長条件を意味する。

【０１１９】

用語「微好気性条件」は、本明細書で使用されるとき、低レベルの酸素の（すなわち、通常の大気中酸素レベルより低い）成長条件を意味する。

【０１２０】

用語「嫌気性条件」は、本明細書で使用されるとき、酸素の非存在下における成長条件

を意味する。

【０１２１】

用語「比活性」は、本明細書で使用されるとき、所与の量のタンパク質における活性の単位として定義される。従って、比活性は直接計測されるものではなく、１）単位／ｍｌ酵素試料の活性を、２）当該試料中のタンパク質の濃度で除すことにより計算され、そのため比活性は単位／ｍｇで表され、ここで酵素単位は、形成される生成物のモル数／分として定義される。純粋な、完全な活性の酵素の試料の比活性は、当該の酵素に固有である。タンパク質の混合物の試料の比活性は、目的の活性酵素から構成される当該の試料中における相対的なタンパク質分率の尺度である。

【０１２２】

用語「k_{cat}」及び「K_M」は当業者に公知であり、Ｅｎｚｙｍｅ　Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ　ａｎｄ　Ｍｅｃｈａｎｉｓｍ，２nd　ｅｄ．（Ｆｅｒｓｔ；Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ　Ｐｒｅｓｓ，ＮＹ，１９８５；ｐｐ９８－１２０）に記載されている。ミカエリス定数K_Mは、最大速度の半値を与える基質の濃度である。多くの場合に「ターンオーバー数」と呼ばれる用語「k_{cat}」は、活性部位毎の単位時間あたりに生成物に変換される基質分子の最大数、又は単位時間あたりに酵素が代謝回転する回数として定義される。$k_{cat}=V_{max}$／［Ｅ］、式中［Ｅ］は酵素濃度である（Ｆｅｒｓｔ，前掲）。用語「総ターンオーバー」及び「総ターンオーバー数」は、本明細書では、ＫＡＲＩ酵素と基質との反応によって形成される生成物の量を指して使用される。

【０１２３】

用語「触媒効率」は、酵素の$k_{cat}／K_M$として定義される。触媒効率を使用することにより、基質に対する酵素の特異性が定量化される。

【０１２４】

用語「単離核酸分子」、「単離核酸断片」及び「遺伝子コンストラクト」は、同義的に使用することができ、場合により合成の、非天然の又は改変されたヌクレオチド塩基を含む一本鎖又は二本鎖のＲＮＡ又はＤＮＡのポリマーを意味し得る。ＤＮＡポリマーの形態の単離核酸断片は、ｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡ又は合成ＤＮＡの１つ以上のセグメントから構成され得る。

【０１２５】

用語「アミノ酸」は、タンパク質又はポリペプチドの基本的な化学構造単位を指す。本明細書では、特定のアミノ酸を識別するために以下の略号を用いる：

【０１２６】

【表２】

アミノ酸	三文字略号	一文字略号
アラニン	Ala	A
アルギニン	Arg	R
アスパラギン	Asn	N
アスパラギン酸	Asp	D
システイン	Cys	C
グルタミン	Gln	Q
グルタミン酸	Glu	E
グリシン	Gly	G
ヒスチジン	His	H
ロイシン	Leu	L
リジン	Lys	K
メチオニン	Met	M
フェニルアラニン	Phe	F
プロリン	Pro	P
セリン	Ser	S
スレオニン	Thr	T
トリプトファン	Trp	W
チロシン	Tyr	Y
バリン	Val	V

【０１２７】
用語「遺伝子」は、特定のタンパク質として発現する能力を有する核酸断片を指し、場合によりそのコード配列に先行する調節配列（５’非コード配列）及びその後続の調節配列（３’非コード配列）を含む。「天然遺伝子」は、その独自の調節配列を有して天然で見出されるとおりの遺伝子を指す。「キメラ遺伝子」は、天然遺伝子でない任意の遺伝子を指し、天然で同時に見出されることのない調節配列及びコード配列を含む。従って、キメラ遺伝子は、異なる供給源に由来する調節配列及びコード配列、又は同じ供給源に由来するが、天然で見出されるものとは異なる形で並んだ調節配列及びコード配列を含み得る。「内因性遺伝子」は、微生物のゲノムにおいてその天然の位置にある天然遺伝子を指す。「外来」遺伝子は、通常は宿主微生物に見出されないが、遺伝子移入によって宿主微生物に導入される遺伝子を指す。外来遺伝子は、非天然微生物に挿入された天然遺伝子、又はキメラ遺伝子を含み得る。「導入遺伝子」は、形質転換手順によってゲノムに導入された遺伝子である。
【０１２８】
本明細書で使用されるとき、「天然」は、自然の中で、存在する場合にはその独自の調節配列を備えて見出されるとおりの、ポリヌクレオチド、遺伝子、又はポリペプチドの形態を指す。
【０１２９】
本明細書で使用されるとき、用語「コード配列」又は「コード領域」は、特定のアミノ酸配列をコードするＤＮＡ配列を指す。「好適な調節配列」は、コード配列の上流（５’非コード配列）、その範囲内、又はその下流（３’非コード配列）に位置するヌクレオチド配列を指し、関連するコード配列の転写、ＲＮＡのプロセシング若しくは安定性、又は翻訳に影響を及ぼす。調節配列には、プロモーター、翻訳リーダー配列、イントロン、ポリアデニル化認識配列、ＲＮＡプロセシング部位、エフェクター結合部位及びステムループ構造が含まれ得る。
【０１３０】

本明細書で使用されるとき、「内因性」は、生物又は生物のゲノムにおいてその自然の位置にあるポリヌクレオチド、遺伝子又はポリペプチドの天然形態を指す。「内因性ポリヌクレオチド」は、生物のゲノムにおいてその自然の位置にある天然ポリヌクレオチドを含む。「内因性遺伝子」は、生物のゲノムにおいてその自然の位置にある天然遺伝子を含む。「内因性ポリペプチド」は、生物のゲノムにおいてその自然の位置にある天然ポリヌクレオチド又は遺伝子から転写及び翻訳される、生物においてその自然の位置にある天然ポリペプチドを含む。

【０１３１】

用語「異種」は、ポリヌクレオチド、遺伝子、又はポリペプチドに関連して使用されるとき、通常は宿主生物に見出されないポリヌクレオチド、遺伝子、又はポリペプチドを指す。「異種」はまた、対応する天然遺伝子と異なる形態で、例えば生物のゲノムにおけるその自然の位置以外で供給源生物に再導入される天然コード領域、又はその一部も含む。異種ポリヌクレオチド又は遺伝子は宿主生物に、例えば遺伝子移入によって導入することができる。異種遺伝子は、天然宿主に再導入される非天然調節領域を有する天然コード領域を含むことができる。例えば、異種遺伝子は、天然宿主に再導入される非天然調節領域を含むキメラ遺伝子の一部である天然コード領域を含むことができる。「異種ポリペプチド」は、対応する天然ポリペプチドと異なる形態で供給源生物に再導入される天然ポリペプチドを含む。

【０１３２】

「導入遺伝子」は、形質転換手順によってゲノムに導入された遺伝子である。

【０１３３】

本明細書で使用されるとき、用語「修飾」は、ポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドの活性の低下又は消失をもたらす本明細書に開示されるポリヌクレオチドの変化、並びにポリペプチドの活性の低下又は消失をもたらす本明細書に開示されるポリペプチドの変化を指す。かかる変化は、当該技術分野において公知の方法により生じさせることができ、限定はされないが、欠失、突然変異（例えば、自発的突然変異生成、ランダム突然変異生成、ミューテーター遺伝子により引き起こされる突然変異生成、又はトランスポゾン突然変異生成）、置換、挿入、下方制御、細胞位置の改変、ポリヌクレオチド又はポリペプチドの状態の改変（例えば、メチル化、リン酸化又はユビキチン化）、補因子の除去、アンチセンスＲＮＡ／ＤＮＡの導入、干渉ＲＮＡ／ＤＮＡの導入、化学修飾、共有結合修飾、紫外線又はＸ線の照射、相同組換え、有糸分裂組換え、プロモーター交換法、及び／又はこれらの組み合わせが挙げられる。どのヌクレオチド又はアミノ酸残基を修飾することができるかを決定する際の指針は、特定のポリヌクレオチド又はポリペプチドの配列を、例えば酵母又は細菌の、相同ポリヌクレオチド又はポリペプチド配列と比較し、且つ高度な相同性の領域（保存領域）又はコンセンサス配列に設ける修飾の数を最大化することにより見出すことができる。

【０１３４】

用語「組換え遺伝子発現エレメント」は、タンパク質コード配列の前（５’非コード配列）及びその後（３’終結配列）の調節配列を含む、１つ以上の特定のタンパク質を発現する核酸断片を指す。キメラ遺伝子は、組換え遺伝子発現エレメントである。オペロンのコード領域は、作動可能に連結されたプロモーター及び終結領域と共に、組換え遺伝子発現エレメントを形成することができる。

【０１３５】

「調節配列」は、コード配列の上流（５’非コード配列）、その範囲内、又はその下流（３’非コード配列）に位置するヌクレオチド配列を指し、関連するコード配列の転写、ＲＮＡプロセシング若しくは安定性、又は翻訳に影響を及ぼす。調節配列には、プロモーター、エンハンサー、オペレーター、リプレッサー、転写終結シグナル、翻訳リーダー配列、イントロン、ポリアデニル化認識配列、ＲＮＡプロセシング部位、エフェクター結合部位及びステム－ループ構造が含まれ得る。

【０１３６】

用語「プロモーター」は、コード配列又は機能的ＲＮＡの発現を制御する能力を有する核酸配列を指す。一般に、コード配列はプロモーター配列の３’側に位置する。プロモーターは全体として天然遺伝子に由来してもよく、又は天然に見出される異なるプロモーターに由来する異なるエレメントから構成されてもよく、又はさらには合成核酸セグメントを含んでもよい。当業者は、異なるプロモーターが遺伝子の発現を、異なる組織又は細胞型で、又は異なる発生段階で、又は異なる環境条件若しくは生理学的条件に応答して誘導し得ることを理解する。ほとんどの細胞型でほとんどの場合に遺伝子を発現させるプロモーターは、一般に「構成的プロモーター」と称される。他方で「誘導性プロモーター」は、そのプロモーターがプロモーター特異的シグナル又は分子により誘導又は惹起されると、遺伝子の発現を生じさせる。さらに、ほとんどの場合に調節配列の正確な境界は完全には定義されていないため、異なる長さのＤＮＡ断片が同じプロモーター活性を有し得ることが認識される。例えば、「ＦＢＡ１プロモーター」は、ＦＢＡ１遺伝子のプロモーター領域に由来する断片を指して使用され得ることは理解されるであろう。

【０１３７】

用語「ターミネーター」は、本明細書で使用されるとき、コード配列の下流に位置するＤＮＡ配列を指す。これには、ポリアデニル化認識配列及びｍＲＮＡプロセシング又は遺伝子発現に作用することが可能な調節シグナルをコードする他の配列が含まれる。ポリアデニル化シグナルは、通常は、ｍＲＮＡ前駆体の３’末端へのポリアデニル酸トラクトの付加に作用することによって特徴付けられる。３’領域は、関連するコード配列の転写、ＲＮＡプロセシング若しくは安定性、又は翻訳に影響を及ぼし得る。ほとんどの場合に調節配列の正確な境界は完全には定義されていないため、異なる長さのＤＮＡ断片が同じターミネーター活性を有し得ることが認識される。例えば、「ＣＹＣ１ターミネーター」は、ＣＹＣ１遺伝子のターミネーター領域に由来する断片を指して使用され得ることは理解されるであろう。

【０１３８】

用語「作動可能に連結された」は、単一の核酸断片上の核酸配列が、一方の機能が他方によって影響を受けるように関係付けられていることを指す。例えばプロモーターは、コード配列の発現が生じることが可能な場合、当該のコード配列と作動可能に連結されている（すなわち、そのコード配列はプロモーターの転写制御下にある）。コード配列は、センス方向又はアンチセンス方向で調節配列に作動可能に連結される。

【０１３９】

用語「発現」は、本明細書で使用されるとき、本発明の核酸断片に由来するセンス（ｍＲＮＡ）又はアンチセンスＲＮＡの転写及び安定した蓄積を指す。発現はまた、ｍＲＮＡのポリペプチドへの翻訳も指し得る。

【０１４０】

用語「過剰発現」は、本明細書で使用されるとき、同じ又は関連する遺伝子の内因性発現より高度な発現を指す。異種遺伝子は、その発現が同等の内因性遺伝子の発現より高度である場合、過剰発現する。用語の過剰発現は、宿主細胞における核酸又はタンパク質レベルの増加を指す。従って、過剰発現は、宿主細胞における内因性配列の転写又は翻訳レベルの増加によって生じ得るか、又は宿主細胞への異種配列の導入によって生じ得る。過剰発現はまた、核酸又はタンパク質配列の安定性の増加によっても生じ得る。

【０１４１】

本明細書で使用されるとき、用語「形質転換」は、核酸断片の宿主微生物のゲノムへの導入を指し、これにより遺伝的に安定な遺伝形質がもたらされる。形質転換された核酸断片を含む宿主微生物は、「トランスジェニック」又は「組換え」又は「形質転換」微生物と称される。

【０１４２】

用語「プラスミド」、「ベクター」及び「カセット」は、細胞の中央代謝の一部でない遺伝子を運び、且つ通常は環状二本鎖ＤＮＡ断片の形態である染色体外要素を指す。かかるエレメントは、任意の供給源に由来する、一本鎖又は二本鎖ＤＮＡ又はＲＮＡの、線状

又は環状の、自己複製配列、ゲノム組込み配列、ファージ又はヌクレオチド配列であって、多数のヌクレオチド配列がつなぎ合わされ、又は組み換えられることにより、選択された遺伝子産物のプロモーター断片及びＤＮＡ配列を適切な３’非翻訳配列と共に細胞に導入する能力を有する固有の構築物となった配列であり得る。「形質転換カセット」は、外来遺伝子を含み、且つその外来遺伝子に加えて、特定の宿主細胞の形質転換を促進するエレメントを有する特定のベクターを指す。「発現カセット」は、外来遺伝子を含み、且つその外来遺伝子に加えて、外来宿主における当該遺伝子の発現の亢進を可能にするエレメントを有する特定のベクターを指す。

【０１４３】

用語「部位飽和ライブラリ」は、一度に全２０個を含むそれ以下の可能なアミノ酸による特定のアミノ酸位置におけるランダム置換を含むライブラリを指す。

【０１４４】

用語「エラープローンＰＣＲ」は、不完全な又は「ずさんな（ｓｌｏｐｐｙ）」ＰＣＲ反応条件を課してランダムなコピーエラーを加えることを指し、これにより特定のヌクレオチド配列における突然変異のランダム化ライブラリが生じる。

【０１４５】

本明細書で使用されるとき、用語「コドン縮重」は、コードされるポリペプチド中のアミノ酸配列に影響を及ぼすことなくヌクレオチド配列の変動を許容する遺伝子コードの性質を指す。当業者は、所与のアミノ酸を特定するためのヌクレオチドコドンの利用において特定の宿主細胞により示される「コドンバイアス」を十分に理解している。従って、宿主細胞における発現を改良するために遺伝子を合成する場合、遺伝子のコドン使用頻度が宿主細胞の好ましいコドン使用頻度に近くなるように遺伝子を設計することが望ましい。

【０１４６】

用語「コドンが最適化された」は、それが様々な宿主を形質転換するための核酸分子の遺伝子又はコード領域に関連するとき、そのＤＮＡによりコードされるポリペプチドを改変することなく宿主生物の典型的なコドン使用を反映させるための、核酸分子の遺伝子又はコード領域におけるコドンの改変を指す。かかる最適化は、コドンのうちの少なくとも１つ、又は２つ以上、又は多数を、当該生物の遺伝子でより頻繁に使用される１つ又は複数のコドンに置き換えることを含む。

【０１４７】

任意のポリペプチド鎖のアミノ酸をコードするコドンを含むヌクレオチド配列の逸脱により、遺伝子をコードする配列の変化が可能となる。各コドンは３つのヌクレオチドからなり、且つＤＮＡを構成するヌクレオチドは４つの特定の塩基に限られるため、ヌクレオチドには６４通りの可能な組み合わせがあり、そのうちの６１通りがアミノ酸をコードする（残りの３つのコドンは、翻訳を終結させるシグナルをコードする）。どのコドンがどのアミノ酸をコードするかを示す「遺伝子コード」を、本明細書では表２Ａに再掲する。結果として、多くのアミノ酸が２つ以上のコドンによって指定される。例えば、アミノ酸アラニン及びプロリンは４つ、セリン及びアルギニンは６つのトリプレットによりコードされるが、一方トリプトファン及びメチオニンはただ１つのトリプレットによりコードされる。この縮重により、ＤＮＡベースの組成が、ＤＮＡによりコードされるタンパク質のアミノ酸配列を改変することなく、広い範囲にわたって変化を有することが可能となる。

【０１４８】

【表３】

表2A. 標準遺伝子コード

	T	C	A	G
T	TTT Phe (F) TTC " TTA Leu (L) TTG "	TCT Ser (S) TCC " TCA " TCG "	TAT Tyr (Y) TAC " TAA 終止 TAG 終止	TGT Cys (C) TGC TGA 終止 TGG Trp (W)
C	CTT Leu (L) CTC " CTA " CTG "	CCT Pro (P) CCC " CCA " CCG "	CAT His (H) CAC " CAA Gln (Q) CAG "	CGT Arg (R) CGC " CGA " CGG "
A	ATT Ile (I) ATC " ATA " **ATG** Met (M)	ACT Thr (T) ACC " ACA " ACG "	AAT Asn (N) AAC " AAA Lys (K) AAG "	AGT Ser (S) AGC " AGA Arg (R) AGG "
G	GTT Val (V) GTC " GTA " GTG "	GCT Ala (A) GCC " GCA " GCG "	GAT Asp (D) GAC " GAA Glu (E) GAG "	GGT Gly (G) GGC " GGA " GGG "

【０１４９】

多くの生物が、成長するペプチド鎖における特定のアミノ酸の挿入をコードするための特定のコドン使用に偏りを示す。コドン選択、又はコドンバイアスは、生物間でのコドン使用の違いであり、遺伝子コードの縮重により得られるもので、多くの生物間で十分に裏付けられている。コドンバイアスは、多くの場合にメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）の翻訳効率と相関し、この効率が次には、とりわけ、翻訳されるコドンの特性及び特定のトランスファーＲＮＡ（ｔＲＮＡ）分子の利用可能性に依存するものと考えられる。細胞において選択的ｔＲＮＡが優勢であることは、概して、ペプチド合成で最も高頻度に使用されるコドンの反映である。従って遺伝子は、コドン最適化に基づき、所与の生物において最適な遺伝子発現となるよう適合させることができる。

【０１５０】

幅広い動物種、植物種及び微生物種に利用可能な多数の遺伝子配列を所与として、相対的なコドン使用頻度を計算することが可能である。コドン使用頻度表は、例えば、ｗｗｗ．ｋａｚｕｓａ．ｏｒ．ｊｐ／ｃｏｄｏｎ／（２００８年３月２０日アクセス）で利用可能な「Ｃｏｄｏｎ　Ｕｓａｇｅ　Ｄａｔａｂａｓｅ」において容易に入手可能であり、これらの表は、多くの方法で応用することができる。Ｎａｋａｍｕｒａ，Ｙ．，ｅｔ　ａｌ．Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２８：２９２（２０００）を参照のこと。ＧｅｎＢａｎｋ　リリース１２８．０［２００２年２月１５日］から計算した酵母についてのコドン使用頻度表を、以下に表２Ｂとして再掲する。この表はｍＲＮＡ命名法を使用し、従ってこの表では、ＤＮＡに見られるチミン（Ｔ）の代わりに、ＲＮＡに見られるウラシル（Ｕ）を使用する。表２Ｂは、全６４個のコドンについてではなく、各アミノ酸についての頻度を計算するように編集している。

【０１５１】

【表４】

表 2B. *サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)*のコドン使用頻度表

アミノ酸	コドン	番号	頻度千分率
Phe	UUU	170666	26.1
Phe	UUC	120510	18.4
Leu	UUA	170884	26.2
Leu	UUG	177573	27.2
Leu	CUU	80076	12.3
Leu	CUC	35545	5.4
Leu	CUA	87619	13.4
Leu	CUG	68494	10.5
Ile	AUU	196893	30.1
Ile	AUC	112176	17.2
Ile	AUA	116254	17.8
Met	AUG	136805	20.9
Val	GUU	144243	22.1
Val	GUC	76947	11.8
Val	GUA	76927	11.8
Val	GUG	70337	10.8
Ser	UCU	153557	23.5
Ser	UCC	92923	14.2
Ser	UCA	122028	18.7
Ser	UCG	55951	8.6
Ser	AGU	92466	14.2
Ser	AGC	63726	9.8
Pro	CCU	88263	13.5
Pro	CCC	44309	6.8
Pro	CCA	119641	18.3
Pro	CCG	34597	5.3
Thr	ACU	132522	20.3
Thr	ACC	83207	12.7
Thr	ACA	116084	17.8
Thr	ACG	52045	8.0
Ala	GCU	138358	21.2
Ala	GCC	82357	12.6
Ala	GCA	105910	16.2
Ala	GCG	40358	6.2
Tyr	UAU	122728	18.8
Tyr	UAC	96596	14.8
His	CAU	89007	13.6
His	CAC	50785	7.8
Gln	CAA	178251	27.3
Gln	CAG	79121	12.1
Asn	AAU	233124	35.7
Asn	AAC	162199	24.8

【０１５２】

【表５】

アミノ酸	コドン	番号	頻度千分率
Lys	AAA	273618	41.9
Lys	AAG	201361	30.8
Asp	GAU	245641	37.6
Asp	GAC	132048	20.2
Glu	GAA	297944	45.6
Glu	GAG	125717	19.2
Cys	UGU	52903	8.1
Cys	UGC	31095	4.8
Trp	UGG	67789	10.4
Arg	CGU	41791	6.4
Arg	CGC	16993	2.6
Arg	CGA	19562	3.0
Arg	CGG	11351	1.7
Arg	AGA	139081	21.3
Arg	AGG	60289	9.2
Gly	GGU	156109	23.9
Gly	GGC	63903	9.8
Gly	GGA	71216	10.9
Gly	GGG	39359	6.0
終止	UAA	6913	1.1
終止	UAG	3312	0.5
終止	UGA	4447	0.7

【０１５３】

この又は同様の表を利用することにより、当業者は、任意の所与のポリペプチド配列にこれらの頻度を適用して、ポリペプチドをコードしながらも所与の種に最適なコドンを使用するコドン最適化コード領域の核酸断片を作製することができる。

【０１５４】

所与のポリペプチド配列をコードするための最適化された頻度でのコドンのランダムな割り当ては、アミノ酸毎にコドン頻度を計算し、次にポリペプチド配列にコドンをランダムに割り当てることにより、手動で行うことができる。加えて、様々なアルゴリズム及びコンピュータソフトウェアプログラムが、当業者には容易に利用可能である。例えば、ＤＮＡｓｔａｒ，Ｉｎｃ．，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩから入手可能なＬａｓｅｒｇｅｎｅパッケージの「ＥｄｉｔＳｅｑ」機能、ＩｎｆｏｒＭａｘ，Ｉｎｃ．，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤから入手可能なＶｅｃｔｏｒＮＴＩスイートのバックトランスレーション機能、及びＡｃｃｅｌｒｙｓ，Ｉｎｃ．，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡから入手可能なＧＣＧ－Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎパッケージの「バックトランスレート」機能。加えて、コード領域配列のコドン最適化のために様々なリソース、例えば、ｗｗｗ．ｅｎｔｅｌｅｃｈｏｎ．ｃｏｍ／ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ／ｂａｃｋｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎ．ｐｈｐ？ｌａｎｇ＝ｅｎｇ（２００８年４月１５日アクセス）の「バックトランスレーション」機能及びｈｔｔｐ：／／ｂｉｏｉｎｆｏ．ｐｂｉ．ｎｒｃ．ｃａ：８０９０／ＥＭＢＯＳＳ／ｉｎｄｅｘ．ｈｔｍｌ（２００２年７月９日アクセス）で利用可能な「ｂａｃｋｔｒａｎｓｅｑ」機能が、公的に利用可能である。所与の頻度に基づきコドンを割り当てる基本的なアルゴリズムの構築は、当業者により基礎的な数学関数を用いて容易に達成することもできる。

【０１５５】

コドン最適化コード領域は、「合成遺伝子デザイナー（ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ ｇｅｎｅ ｄｅｓｉｇｎｅｒ）」（ｕｓｅｒｐａｇｅｓ．ｕｍｂｃ．ｅｄｕ／～ｗｕｇ１／ｃｏｄｏｎ／ｓｇｄ／、２０１２年３月１９日アクセス）などのソフトウェアパッケージを含め、当業者に公知の様々な方法により設計することができる。

【０１５６】

ポリヌクレオチド又は核酸断片は、適切な温度及び溶液イオン強度条件下で一本鎖形態の核酸断片を他の核酸断片にアニールすることができる場合、ｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡ、又はＲＮＡ分子などの別の核酸断片と「ハイブリダイズ可能」である。ハイブリダイゼーション及び洗浄条件は公知であり、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｊ．，Ｆｒｉｔｓｃｈ，Ｅ．Ｆ．ａｎｄ Ｍａｎｉａｔｉｓ，Ｔ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，２nd ｅｄ．，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ：Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ（１９８９）、特にそのなかのＣｈａｐｔｅｒ １１及びＴａｂｌｅ １１．１（全体として参照により本明細書に援用される）に例示されている。温度及びイオン強度の条件により、ハイブリダイゼーションの「ストリンジェンシー」が決まる。ストリンジェンシー条件を調整することで、適度な類似性を有する断片（遠縁の生物由来の相同配列など）乃至高度な類似性を有する断片（近縁の生物由来の、機能的酵素を複製する遺伝子など）をスクリーニングすることができる。ハイブリダイゼーション後の洗浄により、ストリンジェンシー条件が決まる。ある一組の条件では、６×ＳＳＣ、０．５％ＳＤＳ、室温で１５分から開始し、次に２×ＳＳＣ、０．５％ＳＤＳ、４５℃で３０分を繰り返し、次に０．２×ＳＳＣ、０．５％ＳＤＳ、５０℃で３０分を２回繰り返す一連の洗浄が用いられる。別の一組のストリンジェントな条件では、より高温が用いられ、ここで洗浄は、最後の０．２×ＳＳＣ、０．５％ＳＤＳで３０分を２回の洗浄の温度を６０℃に上げることを除いては、上記と同じである。別の一組の高度にストリンジェントな条件では、０．１×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳ、６５℃で２回の最終洗浄が用いられる。さらなる一組のストリンジェントな条件には、例えば、０．１×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳ、６５℃でのハイブリダイゼーション、及び２×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳと、続く０．１×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳでの洗浄が含まれる。

【０１５７】

ハイブリダイゼーションでは２つの核酸が相補配列を含む必要があるものの、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーによっては、塩基間にミスマッチがあってもよい。核酸のハイブリダイゼーションに適切なストリンジェンシーは、当該技術分野において周知の変数である核酸の長さ及び相補性の程度に依存する。２つのヌクレオチド配列間の類似性又は相同性が高度であるほど、それらの配列を有する核酸のハイブリッドのＴｍの値が高くなる。核酸ハイブリダイゼーションの相対的な安定性（より高いＴｍに対応する）は、以下の順に低くなる：ＲＮＡ：ＲＮＡ、ＤＮＡ：ＲＮＡ、ＤＮＡ：ＤＮＡ。１００ヌクレオチド長より大きいハイブリッドについては、Ｔｍの計算式が導出されている（Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，前掲，９．５０～９．５１を参照のこと）。より短い核酸、すなわちオリゴヌクレオチドでのハイブリダイゼーションについては、ミスマッチの位置の重要性が高くなり、その特異性はオリゴヌクレオチドの長さによって決まる（Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，前掲，１１．７－１１．８を参照のこと）。一実施形態において、ハイブリダイズ可能な核酸の長さは少なくとも約１０ヌクレオチドである。一実施形態では、ハイブリダイズ可能な核酸の最小長さは少なくとも約１５ヌクレオチド、少なくとも約２０ヌクレオチド、又は少なくとも約３０ヌクレオチドの長さである。さらに、当業者は、プローブ長などの要素に従い必要に応じて温度及び洗浄溶液の塩濃度が調整され得ることを認識するであろう。

【０１５８】

本明細書で使用されるとき、用語「ポリペプチド」は、単数の「ポリペプチド」並びに複数の「ポリペプチド」を包含することを意図し、アミド結合（ペプチド結合としても知られる）によって線状に連結された単量体（アミノ酸）で構成される分子を指す。用語「

ポリペプチド」は、２つ以上のアミノ酸の任意の１つ又は複数の鎖を指し、生成物の特定の長さを指すものではない。従って、２つ以上のアミノ酸の１つ又は複数の鎖を指して用いられるペプチド、ジペプチド、トリペプチド、オリゴペプチド、「タンパク質」、「アミノ酸鎖」、又は任意の他の用語は、「ポリペプチド」の定義の範囲内に含まれ、及び用語「ポリペプチド」を、これらの用語のいずれかの代わりに、又はそのいずれかと同義的に使用することができる。ポリペプチドは、天然の生物学的供給源に由来しても、又は組換え技術によって生成されてもよいが、必ずしも示される核酸配列から翻訳されるとは限らない。ポリペプチドは、化学合成によることを含め、任意の方法で生成することができる。

【０１５９】

「単離されている」ポリペプチド又はその断片、変異体、若しくは誘導体とは、その自然環境にないポリペプチドが意図される。特定の精製レベルが必要とされるものではない。例えば、単離されているポリペプチドは、その天然の又は自然の環境から取り出すことができる。宿主細胞で発現する組換え産生されたポリペプチド及びタンパク質は、本発明の目的上、任意の好適な技法によって分離され、分画され、又は部分的若しくは実質的に精製されている天然又は組換えのポリペプチドと同様に、単離されていると考えられる。

【０１６０】

本明細書で使用されるとき、用語「変異体」及び「突然変異体」は同義語であり、具体的に記載されるポリペプチドと、例えば突然変異生成などの組換えＤＮＡ技法を用いて作られた１つ以上のアミノ酸の挿入、欠失、突然変異、及び置換だけ異なるポリペプチドを指す。目的の活性を失うことなしにどのアミノ酸残基を置換、付加、又は欠失させることができるかを決定する際の指針は、特定のポリペプチドの配列を、例えば酵母又は細菌の、相同ポリペプチド配列と比較し、高度な相同性の領域（保存領域）に生じるアミノ酸配列変化の数を最小限とすることによるか、又はアミノ酸をコンセンサス配列に置き換えることにより、見出すことができる。

【０１６１】

「操作されたポリペプチド」は、本明細書で使用されるとき、合成の、すなわち自然の中に見られるポリペプチドと何らかの形で異なるポリペプチドを指す。

【０１６２】

或いは、これらの同じ又は同様のポリペプチドをコードする組換えポリヌクレオチド変異体を、遺伝子コードの「冗長性」を利用して合成又は選択することができる。様々な制限部位を作り出すサイレントな変化など、様々なコドン置換を導入して、発現用のプラスミド又はウイルスベクターへのクローニングを最適化することができる。ポリヌクレオチド配列の突然変異をポリペプチド又はそのポリペプチドに加えられる他のペプチドのドメインに反映させて、ポリペプチドの任意の部分の特性を修飾することができる。例えば突然変異は、標的タンパク質の発現を低下又は消失させるために用いることができ、限定はされないが、遺伝子全体又は遺伝子の一部分の欠失、タンパク質を発現させないか、又はより低度に発現させるための遺伝子への（プロモーター又はコード領域のいずれかにおける）ＤＮＡ断片の挿入、機能タンパク質を発現させないための、終止コドン又はフレームシフトを加える突然変異のコード領域への導入、及び非機能性の又は酵素活性がより低いタンパク質が発現するようにアミノ酸を改変する１つ以上の突然変異のコード領域への導入が挙げられる。

【０１６３】

アミノ酸「置換」は、あるアミノ酸を、同様の構造的及び／又は化学的特性を有する別のアミノ酸に置き換えた結果、すなわち保存的アミノ酸置換であってもよく、又はアミノ酸「置換」は、あるアミノ酸を、異なる構造的及び／又は化学的特性を有するアミノ酸に置き換えた結果、すなわち非保存的アミノ酸置換であってもよい。「保存的」アミノ酸置換は、関与する残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性、又は両親媒性の性質の類似性に基づき作ることができる。例えば、非極性（疎水性）アミノ酸には、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、及びメチ

オニンが含まれ；極性中性アミノ酸には、グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、及びグルタミンが含まれ；正電荷（塩基性）アミノ酸には、アルギニン、リジン、及びヒスチジンが含まれ；及び負電荷（酸性）アミノ酸には、アスパラギン酸及びグルタミン酸が含まれる。或いは、これらのアミノ酸のいずれかの極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性、又は両親媒性の性質の違いを選択して、「非保存的」アミノ酸置換を作ることができる。「挿入」又は「欠失」は、組換えタンパク質によって構造的又は機能的に許容されるものとしての変化の範囲内であり得る。許容される変化は、組換えＤＮＡ技法を用いてポリペプチド分子にアミノ酸の挿入、欠失、又は置換を体系的に生じさせ、得られた組換え変異体を活性についてアッセイすることにより、実験的に決定することができる。

【０１６４】

アミノ酸配列又はヌクレオチド配列の「実質的な部分」は、当業者が配列を手作業で評価することによるか、或いはＢＬＡＳＴ（Ａｌｔｓｃｈｕｌ，Ｓ．Ｆ．ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２１５：４０３－４１０（１９９３））などのアルゴリズムを用いた、コンピュータによって自動化された配列比較及び同定より、ポリペプチド又は遺伝子を推定的に同定するのに十分なポリペプチドのアミノ酸配列又は遺伝子のヌクレオチド配列が含まれる部分である。一般に、ポリペプチド又は核酸配列を既知のタンパク質又は遺伝子と相同であると推定的に同定するには、１０個以上の連続したアミノ酸又は３０個以上のヌクレオチドの配列が必要である。さらに、ヌクレオチド配列に関しては、配列依存的な遺伝子同定方法（例えば、サザンハイブリダイゼーション）及び単離方法（例えば、細菌コロニー又はバクテリオファージプラークのインサイチュハイブリダイゼーション）において、２０～３０個の連続するヌクレオチドを含む遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプローブが使用され得る。加えて、プライマーを含む特定の核酸断片を得るため、１２～１５塩基の短いオリゴヌクレオチドがＰＣＲの増幅プライマーとして使用され得る。従って、ヌクレオチド配列の「実質的な部分」は、その配列を含む核酸断片を特異的に同定及び／又は単離するのに十分な配列を含む。本明細書は、特定のタンパク質をコードする完全なアミノ酸配列及びヌクレオチド配列を教示する。ここで当業者は、本明細書に報告されるとおりの配列の有益性により、開示される配列の全て又は実質的な部分を当業者に公知の目的のために使用し得る。従って、本発明は、添付の配列表に報告されるとおりの完全な配列、並びに上記に定義するとおりのそれらの配列の実質的な部分を含む。

【０１６５】

用語「相補的」は、互いにハイブリダイズすることが可能なヌクレオチド塩基間の関係を記載するために使用される。例えば、ＤＮＡに関して、アデニンはチミンと相補的であり、シトシンはグアニンと相補的であり、及びＲＮＡに関して、アデニンはウラシルと相補的であり、シトシンはグアニンと相補的である。

【０１６６】

用語「同一性パーセント」は、当該技術分野において公知のとおり、２つ以上のポリペプチド配列間又は２つ以上のポリヌクレオチド配列間における、それらの配列を比較して決定されるとおりの関係である。当該技術分野では、「同一性」はまた、ポリペプチド配列間又はポリヌクレオチド配列間における、場合によってはかかる配列のストリング間のマッチにより決定されるとおりの、配列の関連性の程度も意味する。「同一性」及び「類似度」は、限定はされないが、１．）Ｃｏｍｐｕｔａｔｉｏｎａｌ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ｌｅｓｋ，Ａ．Ｍ．，Ｅｄ．）Ｏｘｆｏｒｄ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ：ＮＹ（１９８８）；２．）Ｂｉｏｃｏｍｐｕｔｉｎｇ：　Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ　ａｎｄ　Ｇｅｎｏｍｅ　Ｐｒｏｊｅｃｔｓ（Ｓｍｉｔｈ，Ｄ．Ｗ．，Ｅｄ．）Ａｃａｄｅｍｉｃ：ＮＹ（１９９３）；３．）Ｃｏｍｐｕｔｅｒ　Ａｎａｌｙｓｉｓ　ｏｆ　Ｓｅｑｕｅｎｃｅ　Ｄａｔａ，Ｐａｒｔ　Ｉ（Ｇｒｉｆｆｉｎ，Ａ．Ｍ．，ａｎｄ　Ｇｒｉｆｆｉｎ，Ｈ．Ｇ．，Ｅｄｓ．）Ｈｕｍａｎｉａ：ＮＪ（１９９４）；４．）Ｓｅｑｕｅｎｃｅ　Ａｎａｌｙｓｉｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ（ｖｏｎ　Ｈｅｉｎｊｅ，Ｇ．，Ｅｄ．）Ａｃａｄｅｍｉｃ（１９８７）；及び５．）Ｓｅｑｕｅｎｃｅ　Ａｎ

ａｌｙｓｉｓ Ｐｒｉｍｅｒ（Ｇｒｉｂｓｋｏｖ，Ｍ．ａｎｄ Ｄｅｖｅｒｅｕｘ，Ｊ．，Ｅｄｓ．）Ｓｔｏｃｋｔｏｎ：ＮＹ（１９９１）に記載されるものを含め、公知の方法によって容易に計算することができる。

【０１６７】

同一性の好ましい方法は、試験する配列間のベストマッチをもたらすように設計される。同一性及び類似度の決定方法は、公的に利用可能なコンピュータプログラムにコードとして体系化されている。配列アラインメント及び同一性パーセント計算は、ＬＡＳＥＲＧＥＮＥバイオインフォマティクスコンピューティングスイート（ＤＮＡＳＴＡＲ Ｉｎｃ．，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）のＭｅｇＡｌｉｇｎ（商標）プログラムを用いて実行されてもよい。配列の多重アラインメントは、数種類のアルゴリズムを包含する「Ｃｌｕｓｔａｌアラインメント法」を用いて実行され、そのアルゴリズムには、Ｃｌｕｓｔａｌ Ｖという名称のアラインメント方法（ＨｉｇｇｉｎｓおよびＳｈａｒｐ，ＣＡＢＩＯＳ．５：１５１－１５３，（１９８９）；Ｈｉｇｇｉｎｓ，Ｄ．Ｇ．ｅｔ ａｌ．，Ｃｏｍｐｕｔ．Ａｐｐｌ．Ｂｉｏｓｃｉ．，８：１８９－１９１，（１９９２）により記載される）に対応し、且つＬＡＳＥＲＧＥＮＥバイオインフォマティクスコンピューティングスイート（ＤＮＡＳＴＡＲ Ｉｎｃ．）のＭｅｇＡｌｉｇｎ（商標）プログラムに含まれるＣｌｕｓｔａｌ Ｖアラインメント法」が含まれる。多重アラインメントについて、デフォルト値はギャップペナルティ＝１０及びギャップ長ペナルティ＝１０に対応する。Ｃｌｕｓｔａｌ法を用いたタンパク質配列のペアワイズアラインメント及び同一性パーセント計算のためのデフォルトパラメータは、Ｋタプル＝１、ギャップペナルティ＝３、ウィンドウ＝５及びダイアゴナル・セーブド＝５である。核酸についてのこれらのパラメータは、Ｋタプル＝２、ギャップペナルティ＝５、ウィンドウ＝４及びダイアゴナル・セーブド＝４である。Ｃｌｕｓｔａｌ Ｖプログラムを用いた配列アラインメントの後、同じプログラムの「配列距離」テーブルを見ることにより「同一性パーセント」を得ることが可能である。加えて、「Ｃｌｕｓｔａｌ Ｗアラインメント法」が利用可能であり、これはＣｌｕｓｔａｌ Ｗという名称のアラインメント方法に対応し（ＨｉｇｇｉｎｓおよびＳｈａｒｐ，ＣＡＢＩＯＳ．５：１５１－１５３（１９８９）；Ｈｉｇｇｉｎｓ，Ｄ．Ｇ．ｅｔ ａｌ．，Ｃｏｍｐｕｔ．Ａｐｐｌ．Ｂｉｏｓｃｉ．８：１８９－１９１（１９９２）により記載される）、ＬＡＳＥＲＧＥＮＥバイオインフォマティクスコンピューティングスイート（ＤＮＡＳＴＡＲ Ｉｎｃ．）のＭｅｇＡｌｉｇｎ（商標）ｖ６．１プログラムに含まれる。多重アラインメントのデフォルトパラメータ（ギャップペナルティ＝１０、ギャップ長ペナルティ＝０．２、ディレイディバージェント配列（Ｄｅｌａｙ Ｄｉｖｅｒｇｅｎ Ｓｅｑｓ）（％）＝３０、ＤＮＡトランジションウェイト＝０．５、タンパク質ウェイト行列＝Ｇｏｎｎｅｔシリーズ、ＤＮＡウェイト行列＝ＩＵＢ）。Ｃｌｕｓｔａｌ Ｗプログラムを用いた配列アラインメントの後、同じプログラムの「配列距離」テーブルを見ることにより「同一性パーセント」を得ることが可能である。

【０１６８】

当業者には、他の種由来などの、ポリペプチド（かかるポリペプチドは同じ又は同様の機能又は活性を有する）の同定、又は対応するポリヌクレオチドの記載において、多くの配列同一性レベルが有用であることが十分に理解される。パーセント同一性の有用な例としては、限定はされないが、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、又は９５％が挙げられ、又は本発明の記載においては５５％～１００％の任意の整数百分率、例えば、５５％、５６％、５７％、５８％、５９％、６０％、６１％、６２％、６３％、６４％、６５％、６６％、６７％、６８％、６９％、７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％又は９９％が有用であり得る。好適なポリヌクレオチド断片は上記の相同性を有するのみならず、典型的には少なくとも５０ヌクレオチド、少なくとも１００ヌクレオチド、少なくとも１５０ヌクレオチド、少なくとも２００ヌクレオチド、又は少なくとも２５０ヌクレオチドを有するポリヌクレオ

チドを含む。さらに、上記の相同性を有する好適なポリヌクレオチド断片は、少なくとも５０アミノ酸、少なくとも１００アミノ酸、少なくとも１５０アミノ酸、少なくとも２００アミノ酸、又は少なくとも２５０アミノ酸を有するポリペプチドをコードする。

【０１６９】

用語「配列分析ソフトウェア」は、ヌクレオチド配列又はアミノ酸配列の分析に有用な任意のコンピュータアルゴリズム又はソフトウェアプログラムを指す。「配列分析ソフトウェア」は市販のものであっても、又は独自に開発されてもよい。典型的な配列分析ソフトウェアとしては、限定はされないが：１．）ＧＣＧプログラムスイート（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｐａｃｋａｇｅ Ｖｅｒｓｉｏｎ ９．０，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ（ＧＣＧ），Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）；２．）ＢＬＡＳＴＰ、ＢＬＡＳＴＮ、ＢＬＡＳＴＸ（Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２１５：４０３－４１０（１９９０））；３．）ＤＮＡＳＴＡＲ（ＤＮＡＳＴＡＲ，Ｉｎｃ．Ｍａｄｉｓｏｎ、ＷＩ）；４．）Ｓｅｑｕｅｎｃｈｅｒ（Ｇｅｎｅ Ｃｏｄｅｓ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ａｎｎ Ａｒｂｏｒ，ＭＩ）；及び５．）スミス－ウォーターマンアルゴリズムを組み込んだＦＡＳＴＡプログラム（Ｗ．Ｒ．Ｐｅａｒｓｏｎ，Ｃｏｍｐｕｔ．Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｓ．，［Ｐｒｏｃ．Ｉｎｔ．Ｓｙｍｐ．］（１９９４），Ｍｅｅｔｉｎｇ Ｄａｔｅ １９９２，１１１－２０．Ｅｄｉｔｏｒ（ｓ）：Ｓｕｈａｉ，Ｓａｎｄｏｒ．Ｐｌｅｎｕｍ：Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ＮＹ）を挙げることができる。本願の文脈の範囲内で、分析に配列分析ソフトウェアが使用される場合、特記されない限り、分析の結果は参照されるプログラムの「デフォルト値」に基づき得ることは理解されるであろう。本明細書で使用されるとき「デフォルト値」は、初回の初期化時に最初にソフトウェアにロードされる任意の一組の値又はパラメータを意味するものとする。

【０１７０】

標準的な組換えＤＮＡ及び分子クローニング技術は当該技術分野において公知であり、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｊ．，Ｆｒｉｔｓｃｈ，Ｅ．Ｆ．ａｎｄ Ｍａｎｉａｔｉｓ，Ｔ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ（１９８９）（以下、「Ｍａｎｉａｔｉｓ」）により；及びＳｉｌｈａｖｙ，Ｔ．Ｊ．，Ｂｅｎｎａｎ，Ｍ．Ｌ．ａｎｄ Ｅｎｑｕｉｓｔ，Ｌ．Ｗ．，Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔｓ ｗｉｔｈ Ｇｅｎｅ Ｆｕｓｉｏｎｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ（１９８４）により；及びＡｕｓｕｂｅｌ，Ｆ．Ｍ．ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，刊行元Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ａｓｓｏｃ．ａｎｄ Ｗｉｌｅｙ－Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ（１９８７）により記載されている。本明細書で用いられるさらなる方法は、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌｕｍｅ １９４，Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｙｅａｓｔ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ａｎｄ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ｐａｒｔ Ａ，２００４，Ｃｈｒｉｓｔｉｎｅ Ｇｕｔｈｒｉｅ ａｎｄ Ｇｅｒａｌｄ Ｒ．Ｆｉｎｋ（Ｅｄｓ．），Ｅｌｓｅｖｉｅｒ Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）にある。他の分子ツール及び技法が当該技術分野において公知であり、それには、オーバーラップ伸長ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によるスプライシング（Ｙｕ，ｅｔ ａｌ．（２００４）Ｆｕｎｇａｌ Ｇｅｎｅｔ．Ｂｉｏｌ．４１：９７３－９８１）、サッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）のＵＲＡ３遺伝子座における突然変異のポジティブ選択（Ｂｏｅｋｅ，Ｊ．Ｄ．ｅｔ ａｌ．（１９８４）Ｍｏｌ．Ｇｅｎ．Ｇｅｎｅｔ．１９７，３４５－３４６；Ｍ Ａ Ｒｏｍａｎｏｓ，ｅｔ ａｌ．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１９９１ Ｊａｎｕａｒｙ １１；１９（１）：１８７）、ｃｒｅ－ｌｏｘ部位特異的組換え系並びに突然変異体ｌｏｘ部位及びＦＬＰ基質突然変異（Ｓａｕｅｒ，Ｂ．（１９８７）Ｍｏｌ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ ７：２０８７－２０９６；Ｓｅｎｅｃｏｆｆ，ｅｔ ａｌ．（１９８８）Ｊｏｕｒｎａｌ

ｏｆ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌｕｍｅ ２０１，Ｉｓｓｕｅ ２，Ｐａｇｅｓ ４０５－４２１；Ａｌｂｅｒｔ，ｅｔ ａｌ．（１９９５）Ｔｈｅ Ｐｌａｎｔ Ｊｏｕｒｎａｌ．Ｖｏｌｕｍｅ ７，Ｉｓｓｕｅ ４，６４９－６５９頁）、「シームレス」遺伝子欠失（Ａｋａｄａ，ｅｔ ａｌ．（２００６）Ｙｅａｓｔ；２３（５）：３９９－４０５）、及びギャップ修復方法論（Ｍａ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ５８：２０１－２１６；１９８１）が含まれる。

【０１７１】

本明細書に開示される組換え宿主細胞の遺伝子操作は、標準的な遺伝学的技法及びスクリーニングを用いて実施することができ、且つ遺伝子操作に好適な任意の宿主細胞で行うことができる（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｙｅａｓｔ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，２００５，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ，ｐｐ．２０１－２０２）。

【０１７２】

実施形態において、本明細書に開示される組換え宿主細胞は、表７など、本明細書の他の部分で言及される酵母を含め、遺伝子修飾及び組換え遺伝子発現に有用な任意の酵母又は真菌宿主であってよい。他の実施形態において、組換え宿主細胞は、イサチェンキア属（Ｉｓｓａｔｃｈｅｎｋｉａ）、ザイゴサッカロミセス属（Ｚｙｇｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）、シゾサッカロミセス属（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）、デッケラ属（Ｄｅｋｋｅｒａ）、トルロプシス属（Ｔｏｒｕｌｏｐｓｉｓ）、ブレタノミセス属（Ｂｒｅｔｔａｎｏｍｙｃｅｓ）、トルラスポラ属（Ｔｏｒｕｌａｓｐｏｒａ）、ハンセニアスポラ属（Ｈａｎｓｅｎｉａｓｐｏｒａ）、クルイベロミセス属（Ｋｌｕｖｅｒｏｍｙｃｅｓ）、ヤロウイア属（Ｙａｒｒｏｗｉａ）、及び一部のカンジダ属（Ｃａｎｄｉｄａ）の種のメンバーであってもよい。

【０１７３】

ＫＡＲＩ活性を有するポリペプチド

一部の実施形態では、本明細書に提供される組換え宿主細胞及び方法は、ＫＡＲＩ酵素が重要な役割を果たす微生物イソブタノール生成において生じる必要性に対処する。図１に示されるイソブタノール生合成経路では、アセトラクテートからジヒドロキシイソバレレート（ＤＨＩＶ）への基質から生成物への変換が、ＫＡＲＩ酵素によって触媒される。米国特許出願公開第２０１１／０２４４５３６号明細書には、ＫＡＲＩのＳＬＳＬクレードのメンバーであるケトール酸レダクトイソメラーゼ活性を有するポリペプチドが開示され、これを参照により援用する。ここに開示されるＫＡＲＩ活性を有するポリペプチドは、イソブタノール生成に有効であることが見出された。ＫＡＲＩのＳＬＳＬクレードには、表３に掲載するＫＡＲＩ酵素が含まれる。

【０１７４】

【表６】

表 3. 有効な KARI

説明	配列番号 核酸	配列番号 アミノ酸
スタフィロコッカス・カピティス (Staphylococcus capitis) SK14	66	67
表皮ブドウ球菌 (Staphylococcus epidermidis) M23864-W1	68	69
スタフィロコッカス・ホミニス (Staphylococcus hominis) SK119	134	135
黄色ブドウ球菌亜種アウレウス (Staphylococcus aureus subsp. aureus) TCH130	70	71
スタフィロコッカス・ワルネリ (Staphylococcus warneri) L37603	72	73
表皮ブドウ球菌 (Staphylococcus epidermidis) W23144	74	75
スタフィロコッカス・サプロフィチカス亜種サプロフィチカス (Staphylococcus saprophyticus subsp. saprophyticus) ATCC15305	76	77
スタフィロコッカス・カルノサス亜種カルノサス (Staphylococcus carnosus subsp. Carnosus) TM300	78	79
リステリア・モノサイトゲネス (Listeria monocytogenes) EGD-e	80	81
リステリア・グレイ (Listeria grayi) DSM 20601	82	83
エンテロコッカス・カセリフラブス (Enterococcus casseliflavus) EC30	84	85
エンテロコッカス・ガリナルム (Enterococcus gallinarum) EG2	86	87
マクロコッカス・カセオリチクス (Macrococcus caseolyticus) JCSC5402	88	89
ストレプトコッカス・ベスチブラリス (Streptococcus vestibularis)	90	91
ミュータンス菌 (Streptococcus mutans) UA159	92	93
ストレプトコッカス・ゴルドニ (Streptococcus gordonii str, cgakkus sybstr.)株 cgakkus 亜株 CH1 (str, cgakkus sybstr. CH1)	94	95
ストレプトコッカス・スイス (Streptococcus suis) 89/1591	96	97
ストレプトコッカス・インファンタリウス亜種インファンタリウス (Streptococcus infantarius subsp. infantarius) ATCC BAA-102	98	99
ラクトコッカス・ラクチス亜種クレモリス (Lactococcus lactis subsp cremoris) MG1363	100	101
ラクトコッカス・ラクチス (Lactococcus lactis)	102	103
ロイコノストック・メセンテロイデス亜種メセンテロイデス (Leuconostoc mesenteroides subsp mesenteroides) ATCC8293	104	105
ラクトバチルス・ブフネリ (Lactobacillus buchneri) ATCC 11577	106	107
スタフィロコッカス・ヘモリチカス (Staphylococcus haemolyticus) JCSC1435	108	109
表皮ブドウ球菌 (Staphylococcus epidermidis) ATCC12228	110	111
肺炎レンサ球菌 (Streptococcus pneumoniae) CGSP14	112	113

【０１７５】

【表７】

肺炎レンサ球菌 (Streptococcus pneumoniae) TIGR4	114	115
ストレプトコッカス・サングイニス (Streptococcus sanguinis) SK36	116	117
ストレプトコッカス・サリバリウス (Streptococcus salivarius) SK126	118	119
ストレプトコッカス・サーモフィルス (Streptococcus thermophilus) LMD-9	120	121
肺炎レンサ球菌 (Streptococcus pneumoniae) CCRI 1974M2	122	123
ラクトコッカス・ラクチス亜種ラクチス (Lactococcus lactis subsp. lactis) Il1403	124	125
ロイコノストック・メセンテロイデス亜種クレモリス (Leuconostoc mesenteroides subsp cremoris) ATCC19254	126	127
ロイコノストック・メセンテロイデス亜種クレモリス (Leuconostoc mesenteroides subsp cremoris)	128	129
ラクトバチルス・ブレビス亜種グラベセンシス (Lactobacillus brevis subsp. gravesensis) ATCC27305	130	131
ラクトコッカス・ラクチス亜種ラクチス (Lactococcus lactis subsp lactis) NCDO2118	132	133

【０１７６】

本明細書において説明及び実証するとおり、本出願者らは、ラクトコッカス・ラクチス（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｌａｃｔｉｓ）由来のＫＡＲＩで観察されるものと同程度の及び／又はそれを上回るイソブタノール生成をもたらすさらなるＫＡＲＩ酵素及びそのさらなるＫＡＲＩの変異体を発見した。かかるＫＡＲＩ酵素及び変異体は、同じ条件においてラクトコッカス・ラクチス（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｌａｃｔｉｓ）ＫＡＲＩで観察されるものと比較したとき、同程度の又はより高いイソブタノール力価及び／又はより高い有効イソブタノール生成能力をもたらす。従って、実施形態において、イソブタノール生成経路において機能するＫＡＲＩ活性を有するポリペプチドは、ラクトコッカス・ラクチス（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｌａｃｔｉｓ）ＫＡＲＩ（配列番号３８０）によるものと同程度の又はより良好なイソブタノール力価及び／又は有効イソブタノール生成能力を有する。

【０１７７】

従って、ＫＡＲＩ活性を有するかかるポリペプチドは、イソブタノール生成に好適であり得る。当該技術分野で利用可能な構造及び配列情報の組み合わせを用いて、ＫＡＲＩ活性を含み、且つ例示される配列と１００％未満の同一性を含むポリペプチドを構築し、イソブタノール生合成経路に使用し得ることは理解されるであろう。例えば、２．６Å分解能での大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ＫＡＲＩ酵素の結晶構造（Ｔｙａｇｉ，ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｃｉ．，１４：３０８９－３１００，２００５）が、Ｐ．エルギノーサ（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）ＫＡＲＩ（Ａｈｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，３２８：５０５－５１５，２００３）及びホウレンソウ由来のＫＡＲＩ酵素（Ｂｉｏｕ　Ｖ．，ｅｔ　ａｌ．Ｔｈｅ　ＥＭＢＯ　Ｊｏｕｒｎａｌ，１６：３４０５－３４１５，１９９７）の構造と同様に、解明されている。さらに、本明細書には、表１に概説するとおりの実験的に検証された機能を有する２５個のＫＡＲＩタンパク質のアミノ酸配列を使用して作成されるプロファイルＨＭＭ（本明細書に提供される；表Ｚ）が記載される。ＫＡＲＩは、蛍光菌（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｓ）Ｐｆ－５、スルホロブス・ソルファタリカス（Ｓｕｌｆｏｌｏｂｕｓ　ｓｏｌｆａｔａｒｉｃｕｓ）Ｐ２、ピロバキュラム・アエロフィラム（Ｐｙｒｏｂａｃｕｌｕｍ　ａｅｒｏｐｈｉｌｕｍ）株ＩＭ２、ナトロノモナス・ファラオニス（Ｎａｔｒｏｎｏｍｏｎａｓ　ｐｈａｒａｏ

ｎｉｓ）ＤＳＭ ２１６０、枯草菌亜種スブチリス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ ｓｕｂｓｐ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ）株１６８、コリネバクテリウム・グルタミカム（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｇｌｕｔａｍｉｃｕｍ）ＡＴＣＣ １３０３２、ファエオスピリルム・モリスキアヌム（Ｐｈａｅｏｓｐｒｉｒｉｌｕｍ ｍｏｌｉｓｃｈｉａｎｕｍ）、ソラナセラムラルストニア・ソラナセラム（Ｒａｌｓｔｏｎｉａ ｓｏｌａｎａｃｅａｒｕｍ）ＧＭＩ１０００、ザイモモナス・モビリス亜種モビリス（Ｚｙｍｏｍｏｎａｓ ｍｏｂｉｌｉｓ ｓｕｂｓｐ．ｍｏｂｉｌｉｓ）ＺＭ４、アルカリリムニコラ・エールリケイ（Ａｌｋａｌｉｌｉｍｎｉｃｏｌａ ｅｈｒｌｉｃｈｅｉ）ＭＬＨＥ－、カンピロバクター・ラリ（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ ｌａｒｉ）ＲＭ２１００、マリノバクター・アクアエオレイ（Ｍａｒｉｎｏｂａｃｔｅｒ ａｑｕａｅｏｌｅｉ）ＶＴ８、サイクロバクター・アルクチクス（Ｐｓｙｃｈｒｏｂａｃｔｅｒ ａｒｃｔｉｃｕｓ）２７３－４、ハヘラ・チェジュエンシス（Ｈａｈｅｌｌａ ｃｈｅｊｕｅｎｓｉｓ）ＫＣＴＣ ２３９６、チオバチルス・デニトリフィカンス（Ｔｈｉｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｄｅｎｉｔｒｉｆｉｃａｎｓ）ＡＴＣＣ ２５２５９、アゾトバクター・ビネランジイ（Ａｚｏｔｏｂａｃｔｅｒ ｖｉｎｅｌａｎｄｉｉ）ＡｖＯＰ、シュードモナス・シリンゲ病原型シリンゲ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｓｙｒｉｎｇａｅ ｐｖ．ｓｙｒｉｎｇａｅ）Ｂ７２８ａ、シュードモナス・シリンゲ病原型トマト（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｓｙｒｉｎｇａｅ ｐｖ．ｔｏｍａｔｏ）株ＤＣ３０００、シュードモナス・プチダ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｐｕｔｉｄａ）ＫＴ２４４０、シュードモナス・エントモフィラ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｅｎｔｏｍｏｐｈｉｌａ）Ｌ４８、シュードモナス・メンドシナ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｍｅｎｄｏｃｉｎａ）ｙｍｐ、緑膿菌（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）ＰＡＯ１、セレウス菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｃｅｒｅｕｓ）ＡＴＣＣ １０９８７、セレウス菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｃｅｒｅｕｓ）ＡＴＣＣ １０９８７、及びホウレンソウ（Ｓｐｉｎａｃｉａ ｏｌｅｒａｃｅａ）に由来した。ＨＭＭＥＲパッケージのｈｍｍｓｅａｒｃｈプログラムを使用してＥ値が＜10^{-3}のプロファイルＨＭＭにマッチする任意のタンパク質は、機能性ＫＡＲＩと予想される。

【０１７８】

イソブタノールの生成は、宿主微生物に存在する解糖経路を利用するものと考えられる。解糖中にグルコースから２つのピルベート分子が生成される間、正味として、グリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼ反応によりＮＡＤ＋から２つのＮＡＤＨ分子が生成される。さらに、２つのピルベート分子から１つのイソブタノール分子が生成される間、正味として、ＫＡＲＩ反応により１つのＮＡＤ（Ｐ）Ｈ分子が消費され、及びイソブタノールデヒドロゲナーゼ反応により１つのＮＡＤ（Ｐ）Ｈ分子が消費される。ＮＡＤＨとＮＡＤＰＨとの相互変換は、概して酵母においては低速で非効率である；従って、消費されるＮＡＤＰＨは代謝により（例えば、ペントースリン酸経路により）生成され、この過程で基質が消費される。その間、細胞はＮＡＤ＋／ＮＡＤＨ比の恒常性を維持しようと努め、これによりイソブタノール生成において生成される過剰なＮＡＤＨが、他の代謝中間体の無駄な還元において；例えばグリセロールの生成により、消費される（Ｂａｋｋｅｒ，ｅｔ ａｌ．，２００１．Ｓｔｏｉｃｈｉｏｍｅｔｒｙ ａｎｄ ｃｏｍｐａｒｔｍｅｎｔａｔｉｏｎ ｏｆ ＮＡＤＨ ｍｅｔａｂｏｌｉｓｍ ｉｎ Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ．ＦＥＭＳ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｒｅｖ．２５：１５－３７）。このように、イソブタノール経路によって生成されるＮＡＤＨと消費されるＮＡＤＰＨとの不均衡は、グルコースから生成されるイソブタノールのモル収率の低下を２つの形で引き起こし得る：１）ＮＡＤＰＨを生成するための不必要な代謝作業、及び２）ＮＡＤ＋／ＮＡＤＨ恒常性を維持するための代謝中間体の無駄な反応。イソブタノール経路で良好に機能し、且つＮＡＤＨに対するK_Mが低いＫＡＲＩ活性を有するポリペプチドを用いることにより、イソブタノール生成を改善することができる。

【０１７９】

また、本明細書には、補因子としてのＮＡＤＨの様々な利用能を有する変異体を生成するための、表３及び表１０に提供されるＫＡＲＩ酵素配列に対する置換も開示される。か

かる変異体は、ＫＡＲＩを利用する生合成経路、例えばイソブタノール生合成経路の効率を特定の生成条件に対して最適化するために用い得る別法を提供する。実施例では、種々のＮＡＤＨ利用能を有するアナエロスティペス・カカエ（Ａｎａｅｒｏｓｔｉｐｅｓ ｃａｃｃａｅ）に由来するＫ９ ＫＡＲＩ酵素の変異体について、好気性から嫌気性に切り換える条件下でのイソブタノール生成を実証する。従って、この開示を与えられることにより、当業者は、ある範囲の生成条件に適したＳＬＳＬクレードのＫＡＲＩ酵素、又はエンテロコッカス・ガリナルム（Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ ｇａｌｌｉｎａｒｕｍ）、ストレプトコッカス・サーモフィルス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）、ラクトコッカス・ラクチス亜種クレモリス（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ ｌａｃｔｉｓ ｓｕｂｓｐ．ｃｒｅｍｏｒｉｓ）ＭＧ１３６３、ビフィドバクテリウム・アンギュラツム（Ｂｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ａｎｇｕｌａｔｕｍ）、ビフィドバクテリウム・デンチウム（Ｂｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｄｅｎｔｉｕｍ）、又はアナエロスティペス・カカエ（Ａｎａｅｒｏｓｔｉｐｅｓ ｃａｃｃａｅ）、ラクトコッカス・ラクチス（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ ｌａｃｔｉｓ）ＫＡＲＩ酵素又はその変異体若しくは活性断片を含む組換え宿主細胞を生成することが可能となる。

【０１８０】

一部の実施形態では、本明細書には、ＫＡＲＩ活性を有し、且つ表３若しくは表１０、又は実施例１６、１７、２１のＫＡＲＩ酵素と少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９８％、又は少なくとも約９９％の同一性を有し、且つＮＡＤＨに対するK_Mが約３００μＭ、１００μＭ、５０μＭ、２０μＭ、１０μＭ、又は５μＭ未満であるポリペプチドが提供される。一部の実施形態では、本明細書には、ＫＡＲＩ活性を有し、且つ表３、表１０又は実施例１６、１７、２１のＫＡＲＩ酵素と少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９８％、又は少なくとも約９９％の同一性を有する、操作されたポリペプチドが提供される。一部の実施形態では、かかるポリペプチドは、ＮＡＤＨに対するK_Mが、対応する天然酵素のK_M未満である。一部の実施形態では、ＮＡＰＤＨに対するK_Mに対してのＮＡＤＨに対するK_Mの比は、０．１未満、一部の実施形態では１未満、一部の実施形態では２未満、一部の実施形態では、４未満である。

【０１８１】

ＫＡＲＩ酵素及びその変異体は、イソブタノール生成に特に好適であり、限定はされないが、ＮＡＤＨに対するK_Mが天然酵素（配列番号６４３）のK_Mより低い、アナエロスティペス・カカエ（Ａｎａｅｒｏｓｔｉｐｅｓ ｃａｃｃａｅ）ＤＳＭ １４６６２由来のケトール酸レダクトイソメラーゼ（配列番号６４３）の変異体：「Ｋ９Ｇ９」（配列番号６４４）及び「Ｋ９Ｄ３」（配列番号６４５）が挙げられる。

【０１８２】

本明細書に提供される宿主細胞は、ケトール酸レダクトイソメラーゼ活性を有するポリペプチドを含み得る。実施形態において、かかるポリペプチドは、配列番号６４３、その活性変異体；又はアナエロスティペス・カカエ（Ａｎａｅｒｏｓｔｉｐｅｓ ｃａｃｃａｅ）ＤＳＭ １４６６２に由来するＫＡＲＩ、又はその活性変異体と少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９８％、又は少なくとも約９９％の同一性を有する。実施形態において、ポリペプチドは、配列番号６４５又は６４４と少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９８％、又は少なくとも約９９％の同一性を有する。実施形態において、ポリペプチドは、配列番号６４５又は６４４を含む。

【０１８３】

一部の実施形態では、ＫＡＲＩ活性を有するポリペプチドは、配列番号４１９［ＪＢ４Ｐ］、４２７［ＳＢ２］、並びに表２５及び表２６に掲載するあらゆる変異体のアミノ酸配列と少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９８％、又は少なくとも約９９％の同一性を含む。かかる変異体は、イソブタノール生合成経路の効率を特定の生成条件に最適化するための別法を提供する。

実施例では、諸条件下でのイソブタノール生成を実証する。

【０１８４】

ＫＡＲＩ活性を有するさらなるポリペプチドの同定

実施例１では、様々な細菌種及び真菌種由来のＫＡＲＩをコードする遺伝子の生物多様性スクリーンを記載し、これによりイソブタノール生成に好適なＫＡＲＩを明らかにした。この開示を与えられることにより、当業者は、ＫＡＲＩ活性を有するさらなる好適なポリペプチドを同定することが容易に可能となる。

【０１８５】

文献及び当業者に周知されているバイオインフォマティクスデータベースにおいて、本明細書に開示される配列及び当該技術分野で利用可能な配列を使用して、他のポリヌクレオチド、遺伝子及び／又はポリペプチドの配列を同定することができる。例えば、かかる配列は、本明細書に提供されるポリヌクレオチド又はポリペプチド配列による公的に利用可能なデータベースのＢＬＡＳＴ検索により同定することができる。かかる方法では、同一性は、ギャップペナルティ＝１０、ギャップ長ペナルティ＝０．１、及びＧｏｎｎｅｔ２５０シリーズのタンパク質重み行列のデフォルトパラメータを使用するＣｌｕｓｔａｌ Ｗアラインメント法に基づき得る。

【０１８６】

加えて、本明細書に開示されるポリヌクレオチド又はポリペプチド配列を使用して、自然中の他のＫＡＲＩ相同体を同定することができる。例えば、本明細書に開示されるＫＡＲＩをコードする核酸断片の各々を使用して、相同タンパク質をコードする遺伝子を単離することができる。配列依存性プロトコルを用いた相同遺伝子の単離は、当該技術分野において公知である。配列依存性プロトコルの例としては、限定はされないが、（１）核酸ハイブリダイゼーションの方法；（２）核酸増幅技術［例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）、Ｍｕｌｌｉｓ ｅｔ ａｌ．，米国特許第４，６８３，２０２号明細書；リガーゼ連鎖反応（ＬＣＲ）、Ｔａｂｏｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８２：１０７４（１９８５）；又は鎖置換増幅（ＳＤＡ）、Ｗａｌｋｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８９：３９２（１９９２）］の様々な使用によって例示されるとおりの、ＤＮＡ及びＲＮＡ増幅の方法；及び（３）ライブラリ構築及び相補性によるスクリーニングの方法が挙げられる。

【０１８７】

当業者が、この開示を与えられることで、本明細書に提供されるポリペプチドの活性断片を、例えば配列アラインメントに基づき本明細書に提供されるポリペプチドをＮ末端で切断してＫＡＲＩ活性を確認することにより作成し得ることは理解されるであろう。実施形態において、本明細書に提供されるアナエロスティペス・カカエ（Ａｎａｅｒｏｓｔｉｐｅｓ ｃａｃｃａｅ）ＫＡＲＩ及びその変異体は、Ｎ末端で切断される。一実施形態では、本明細書に提供されるポリペプチドから、最初の５個を含むそれ以下のアミノ酸が切断される。実施形態において、ポリペプチドは配列番号２７又はその変異体である。一実施形態において、ＫＡＲＩ活性を有するポリペプチドは、配列番号６３５、６３７（それぞれ配列番号６３６及び６３８のポリヌクレオチド配列によりコードされる）、Ｋ９＿Ａｎｎａｂｅｌ＿ＳＨ（配列番号８６２、タンパク質配列番号８６３）及びＫ９＿Ｚｅｋｅ＿ＳＨ（配列番号８６０、タンパク質配列番号８６１）、又は表４０に掲載される任意の変異体を含む。

【０１８８】

ＮＡＤＨに対するK_Mの低下

図２及び実施例に示されるとおり、アナエロスティペス・カカエ（Ａｎａｅｒｏｓｔｉｐｅｓ ｃａｃｃａｅ）由来のＫＡＲＩ酵素における蛍光菌（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｓ）ＫＡＲＩの５０、５２及び５３、及び場合により４７に対応する位置の突然変異は、野生型と比較したときＮＡＤＨに対するK_Mが低下したＫＡＲＩをもたらし、これらの位置における突然変異が高度に有効なＫＡＲＩのＮＡＤＨ受容変異体を作り出すことが確認される。アナエロスティペス・カカエ（Ａｎａｅｒｏｓｔｉｐｅｓ

ｃａｃｃａｅ）ＫＡＲＩのさらなる突然変異から、ＮＡＤＨに対するK_Mをさらに低下させる位置が明らかとなった。

【０１８９】

本明細書において実証されるとおり（実施例を参照）、リン酸結合領域、特にＰＦ５ＫＡＲＩ（配列番号５）の４７位、５０位、５２位、及び５３位に対応する２つ以上の位置におけるアミノ酸の置換は、ＮＡＤＨに対するK_Mの低下をもたらす。従って、本明細書には、ＫＡＲＩ活性を有し、且つ天然アミノ酸配列と比較したとき、ＰＦ５　ＫＡＲＩの４７位、５０位、５２位、及び５３位に対応する４つの位置のうち少なくとも２つに置換を含む、本明細書、例えば表３及び表１０に列挙される生物に由来するポリペプチドが提供される。本明細書には、ＫＡＲＩ活性を有し、且つリン酸結合領域に置換を含むポリペプチドが提供される。本明細書には、ＫＡＲＩ活性を有し、且つＫ９　ＫＡＲＩ（配列番号２７）のＳ５６及びＳ５８に対応する位置に置換を含むポリペプチドが提供される。一部の実施形態では、Ｓ５６に対応する位置の置換はＡである。一部の実施形態では、Ｓ５８に対応する位置の置換はＤ又はＥである。一部の実施形態では、Ｓ５３に対応する位置の置換は、Ｑ、Ｅ、Ｐ、又はＡである。一部の実施形態では、Ｓ５６に対応する位置の置換はＶ又はＤである。一部の実施形態では、Ｓ５８に対応する位置の置換はＤ又はＱである。実施形態において、ポリペプチドは、Ｋ９　ＫＡＲＩ（配列番号２７）のＩ８６、Ｎ８７、Ｎ１０７、Ｔ１３１、又はＴ１９１に対応する１つ以上の位置に置換をさらに含む。一部の実施形態では、ポリペプチドは、示される位置の少なくとも２つ、少なくとも３つ、少なくとも４つ、又は全てに置換を含む。一部の実施形態では、Ｉ８６に対応する位置の置換はＴ又はＶである。一部の実施形態では、Ｎ８７に対応する位置の置換はＰである。一部の実施形態では、Ｎ１０７に対応する位置の置換はＳである。一部の実施形態では、Ｔ１３１に対応する位置の置換は、Ｃ、Ｌ、Ａ、Ｍ又はＶである。一部の実施形態では、Ｔ１９１に対応する位置の置換は、Ａ、Ｓ、Ｄ、Ｃ、又はＧである。

【０１９０】

実施形態において、ポリペプチドは、野生型配列に対して、１０、１５、又は２０個より少ない置換を含む。実施形態において、ポリペプチドは、実験的に検証されたＫＡＲＩに基づいた、且つ$<10^{-3}$未満のＥ値の表Ｚに提供されるプロファイルＨＭＭにマッチする。配列は、ｈｍｍｓｅａｒｃｈ（Ｊａｎｅｌｉａ　Ｆａｒｍ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｃａｍｐｕｓ，Ａｓｈｂｕｒｎ，ＶＡから入手可能なＨＭＭＥＲソフトウェアパッケージ）を使用して、表Ｚに提供されるプロファイルＨＭＭと比較することができる。

【０１９１】

ＫＡＲＩ活性を有し、且つＮＡＤＨに対するK_Mが低下したさらなるポリペプチドを、本明細書に説明及び実証する方法を用いて得ることができる。例えば、ＫＡＲＩ活性を有するポリペプチドを、本明細書に記載されるとおりの部位飽和遺伝子ライブラリの構築において用いることができる。かかる遺伝子ライブラリの構築キットは、市販されている（例えば、ＵＳＢ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｃｌｅｖｅｌａｎｄ，ＯＨから、番号７８４８０）。部位特異的突然変異誘発もまた、市販のキット（例えば、ＱｕｉｃｋＣｈａｎｇｅ　ＩＩ　ＸＬ部位特異的突然変異誘発キット、カタログ番号２００５２４、Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ，Ｌａ　Ｊｏｌｌａ，ＣＡ）を使用して実施することができる。突然変異誘発用の標的部位のプライマー設計は、当該技術分野において公知であり、標的部位を同定するための多重配列アラインメントも同様に公知である。

【０１９２】

変異体が生成されると、ＮＡＤＨ又はＮＡＤＰＨでのＫＡＲＩ活性を、当該技術分野において公知の及び／又は本明細書に開示される方法を用いて容易に評価することができる。例えば、ＫＡＲＩ活性は、反応からのＮＡＤＰＨ又はＮＡＤＨの消失を３４０ｎｍで計測することによるか、又はＨＰＬＣ／ＭＳを用いた２，３－ジヒドロキシイソバレレート形成の計測によってミカエリス定数を決定することにより、決定することができる。同様に、変異体を含む株からのイソブタノール生成を確認することができる。

【０１９３】

補因子特異性

補因子特異性を決定するため、飽和アセトラクテートにおける各補因子のV_{max}／K_M比を計算することができる；ＮＡＤＨに対して高い比を有する変異体ほど、等モル濃度の２つの補因子及び飽和アセトラクテートの条件下において、ＮＡＤＰＨと比べてＮＡＤＨでより速い速度で反応する。ＮＡＤＨ及びＮＡＤＰＨに対するV_{max}値及びK_M値は、当該技術分野において公知の及び／又は本明細書に提供される方法を用いて決定することができる（実施例１６を参照）。例えば、ＮＡＤＨ及びＮＡＤＰＨに対するV_{max}値及びK_M値を決定するため、部分的に精製されたタンパク質を、様々な濃度のＮＡＤＨ及びＮＡＤＰＨでアッセイすることができる。

【０１９４】

本明細書において実証されるとおり（実施例１６及び１８並びに図８を参照）、Ｋ９Ｇ９におけるさらなるアミノ酸の置換により、ＮＡＤＨに対する特異性が増加した変異体が得られる。従って、本明細書には、Ｋ９　ＫＡＲＩ（配列番号２７）のＫ５７、Ｙ５３、及びＥ７４に対応する位置の１つ以上又は全てに置換を含むポリペプチドが提供される。また、本明細書には、Ｙ５３、Ｋ５７、Ｅ７４、Ｎ８７及びＫ９０に対応する位置の１つ以上又は全てに置換を含むポリペプチドも提供される。実施形態において、Ｙ５３に対応する位置の置換は、Ｆである。実施形態において、Ｋ５７に対応する位置の置換は、Ｅである。実施形態において、Ｅ７４に対応する位置の置換は、Ｇである。実施形態において、Ｎ８７に対応する位置の置換は、Ｐである。実施形態において、Ｋ９０に対応する位置の置換は、Ｍ又はＬである。実施形態において、変異体は、配列番号２７のＳ５６又はＳ５８に対応する少なくとも１つの位置の置換を含み、本明細書に特定される配列番号２７の位置に対応する少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも３つ、又は４つ以上のさらなる１つ又は複数の置換をさらに含む。

【０１９５】

実施形態において、ポリペプチドは、野生型配列に対して、２個、３個、４個、５個、１０個、１５個、又は２０個未満の置換を含む。実施形態において、ポリペプチドは、実験的に検証されたＫＡＲＩに基づく、且つ＜１０^{-3}未満のＥ値の表Ｚに提供されるプロファイルＨＭＭにマッチする。

【０１９６】

実施例に実証するとおり、Ｋ９ＳＢ２（配列番号４２７）の変異体を作成し、ＮＡＤＰＨ親和性が低下した変異体についてスクリーニングしたところ、さらなる置換位置が明らかとなった。従って実施形態において、ポリペプチドは、配列番号４２７のＦ５３、Ｇ５５、Ａ５６、Ｗ５９、Ｆ６７、Ｉ８４、Ｌ８５、Ｑ９１、Ｍ９４、及びＰ１３５に対応する１つ以上の位置に置換をさらに含む。実施形態において、Ｇ５５位の置換はＤ又はＣであり、Ｑ９１位の置換はＬであり、Ａ５６位の置換はＴ又はＶであり、Ｐ１３５の置換はＳであり、Ｆ５３位の置換はＬであり、Ｍ９４位の置換はＩであり、Ｆ６７位の置換はＬ又はＩであり、Ｗ５９位の置換はＣであり、Ｉ８４位の置換はＬであり、及びＬ８５位の置換はＭである。

【０１９７】

ＫＡＲＩ構造

ＫＡＲＩ活性を有するポリペプチドの同定及び修飾において有用な構造情報は、当該技術分野において、例えばここに記載する文献、並びに本明細書と共に表Ｚに提供されるプロファイルＨＭＭ、及び参照により本明細書に援用される米国特許出願公開第２０１００１９７５１９号明細書及び同第２００９０１６３３７６号明細書に提供されている。

【０１９８】

ＮＡＤＰＨのリン酸ｐ２’酸素原子がホウレンソウＫＡＲＩのＡｒｇ１６２、Ｓｅｒ１６５及びＳｅｒ１６７の側鎖と水素結合を形成することが報告された（Ｂｉｏｕ　Ｖ．，ｅｔ　ａｌ．Ｔｈｅ　ＥＭＢＯ　Ｊｏｕｒｎａｌ，１６：３４０５－３４１５，１９９７）。Ａｈｎ　ｅｔ　ａｌ．，（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，３２８：５０５－５１５，２００３）による研究は、緑膿菌（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）（ＰＡ

Ｏ－ＫＡＲＩ）について、その構造をホウレンソウＫＡＲＩの構造と比較した後に、３つのＮＡＤＰＨリン酸結合部位（Ａｒｇ４７、Ｓｅｒ５０及びＴｈｒ５２）を同定している。ＮＡＤＰＨ、アセトラクテート及びマグネシウムイオンが結合したＰＦ５－ＫＡＲＩの構造を、ＰＦ５　ＫＡＲＩと９２％のアミノ酸配列相同性を有するＰ．エルギノーサ（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）ＰＡＯ１－ＫＡＲＩ（ＰＤＢ　ＩＤ　１ＮＰ３，Ａｈｎ　Ｈ．Ｊ．ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，３２８：５０５－５１５，２００３）の結晶構造に基づき構築した。ＰＡＯ１－ＫＡＲＩの構造はホモ十二量体であり、各十二量体は、広範囲の二量体界面を有する６つのホモ二量体からなる。ＫＡＲＩの活性部位はこの二量体界面に位置する。この生物学的構築物は、四面体の辺に位置する６つのホモ二量によって形成され、２３点群対称の高度に対称な十二量体をもたらす。

【０１９９】

ＰＡＯ１－ＫＡＲＩの単量体Ａ及び単量体Ｂの座標並びにＰＦ５－ＫＡＲＩの配列に基づき、ＤｅｅｐＶｉｅｗ／Ｓｗｉｓｓ　ＰＤＢ　ｖｉｅｗｅｒを用いてＰＦ５－ＫＡＲＩ二量体のモデルを構築した（Ｇｕｅｘ，Ｎ．ａｎｄ　Ｐｅｉｔｓｃｈ，Ｍ．Ｃ．，Ｅｌｅｃｔｒｏｐｈｏｒｅｓｉｓ，１８：２７１４－２７２３，１９９７）。次にこのモデルを、さらなる改良のため、Ｓｉｌｉｃｏｎ　ＧｒａｐｈｉｃｓシステムのプログラムＯにインポートした（Ｊｏｎｅｓ，Ｔ．Ａ．ｅｔ　ａｌ，Ａｃｔａ　Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒ．Ａ　４７：１１０－１１９，１９９１）。

【０２００】

ＰＡＯ１－ＫＡＲＩの構造は、活性部位にＮＡＤＰＨ、基質若しくは阻害剤又はマグネシウムを有しない。従って、アセトラクテート（ａｃｅｔｏｌａｃａｔｅ）結合部位にマグネシウムイオン、ＮＡＤＰＨ及び阻害剤（Ｎ－ヒドロキシ－Ｎ－イソプロピルオキサメート）を有するホウレンソウＫＡＲＩ構造（ＰＤＢ　ＩＤ　１ｙｖｅ，Ｂｉｏｕ　Ｖ．ｅｔ　ａｌ．，Ｔｈｅ　ＥＭＢＯ　Ｊｏｕｒｎａｌ，１６：３４０５－３４１５，１９９７）を使用して、活性部位におけるこれらの分子をモデル化した。植物ＫＡＲＩは、ＰＦ５－ＫＡＲＩとも、又はＰＡＯ１　ＫＡＲＩとも、ほとんど配列相同性を有しない（＜２０％アミノ酸同一性）が、しかしながらこれらの２つのＫＡＲＩ酵素の活性部位領域における構造は、極めて類似している。これらの２つのＫＡＲＩ構造の活性部位を重ね合わせるため、プログラムＯのコマンドＬＳＱ＿ｅｘｔ、ＬＳＱ＿ｉｍｐｒｏｖｅ、ＬＳＱ＿ｍｏｌを使用して、ホウレンソウＫＡＲＩの単量体Ａの活性部位をＰＦ５　ＫＡＲＩモデルの単量体Ａと整列させた。ホウレンソウＫＡＲＩの活性部位において結合するＮＡＤＰＨ、２個のマグネシウムイオン及び阻害剤の座標を抽出し、ＰＦ５　ＫＡＲＩの分子Ａに組み込んだ。プログラムによって計算される単量体Ａから単量体Ｂへの変換演算子を適用することにより、ＰＦ５　ＫＡＲＩの単量体Ｂ用のこれらの分子の座標セットを作成した。

【０２０１】

ＰＡＯ１　ＫＡＲＩ結晶構造の活性部位にはＮＡＤＰＨがないため、ＮＡＤＰＨ結合部位におけるリン酸結合ループ領域（ＰＡＯ１　ＫＡＲＩの残基４４～４５、ホウレンソウＫＡＲＩの１５７～１７０）の構造は、両者間で極めて異なる。ＮＡＤＰＨ結合形態をモデル化するため、ＰＦ５－ＫＡＲＩリン酸結合ループ（４４～５５）のモデルを１ｙｖｅ（１５７～１７０）のモデルに置き換えた。これら両者間における側鎖の不一致は全て、プログラムＯのｍｕｔａｔｅ＿ｒｅｐｌａｃｅコマンドを使用してＰＦ５－ＫＡＲＩ配列の側鎖に変換し、置き換えられた側鎖の立体配座は手動で調整した。ＮＡＤＰＨ／Ｍｇ／阻害剤が結合した二量体ＰＦ５－ＫＡＲＩモデルの全体を、プログラムＣＮＸ（ＡＣＣＥＬＲＹＳ　Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ　ＣＡ，Ｂｕｒｎｇｅｒ，Ａ．Ｔ．ａｎｄ　Ｗａｒｒｅｎ，Ｇ．Ｌ．，Ａｃｔａ　Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒ．，Ｄ　５４：９０５－９２１，１９９８）を使用して１ラウンドのエネルギー最小化にかけ、その後、モデルにおいて、阻害剤を基質のアセトラクテート（ＡＬ）に置き換えた。

【０２０２】

イソブタノール生成

本明細書に提供される宿主細胞は、ケトール酸レダクトイソメラーゼ活性を有するポリ

ペプチドを含むことができる。本明細書において説明及び実証するとおり、本出願者らは、ラクトコッカス・ラクチス（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｌａｃｔｉｓ）由来のＫＡＲＩで観察されるものと同程度の及び／又はそれを上回るイソブタノール生成をもたらすさらなるＫＡＲＩ酵素及びそのさらなるＫＡＲＩの変異体を発見した（実施例を参照）。従って、実施形態において、イソブタノール生成経路において機能するＫＡＲＩ活性を有するポリペプチドは、有効イソブタノール生成能力を有し、及び／又はラクトコッカス・ラクチス（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｌａｃｔｉｓ）ＫＡＲＩ（配列番号３８０）による力価と同等か、又はそれより良好な力価でイソブタノールを生成する。従ってかかるポリペプチドは、特に本明細書に記載されるイソブタノール生成経路を含む細胞におけるイソブタノールの生成に有用であると考えられる。実施形態において、本明細書に提供されるポリペプチドは、有効イソブタノール生成能力を有し、及び／又は同じ条件下のラクトコッカス・ラクチス（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｌａｃｔｉｓ）ＫＡＲＩ（配列番号３８０）で観察される力価より高いか、又はそれとほぼ等しい力価でイソブタノールを生成する。実施形態において、本明細書に提供されるポリペプチドは、約４８時間後に（この４８時間のうち少なくとも最後の約２４時間は嫌気性条件下にある）細胞１グラムあたり約３グラム超、細胞１グラムあたり約４グラム超、約５グラム超、又は約６グラム超の有効イソブタノール生成能力を有する。

【０２０３】

さらに、本出願者らは、上記に記載されるＫＡＲＩ活性を有するポリペプチドの変異体が、非置換ポリペプチドと比べてＮＡＤＨに対するK_Mが低いものを含め、嫌気性条件下でのイソブタノール生成に利点を提供することを見出した。理論によって拘束されることは望まないが、かかる変異体は、還元当量としてのＮＡＤＨをより有効に使用するため、イソブタノール生成の改良をもたらすと考えられる。実施形態において、かかる変異体を用いるイソブタノール生成は、グリセロール蓄積の低下を提供する。実施形態において、ＮＡＤＨに対するK_Mが非置換ポリペプチドより低い、上記に記載されるＫＡＲＩ活性を有するポリペプチドの変異体は、グリセロールに対するイソブタノールのモル比が増加する。実施形態において、グリセロールに対するイソブタノールのモル比は１より大きい。実施形態において、グリセロールに対するイソブタノールのモル比は２より大きい。実施形態において、モル比は３より大きい。実施形態において、モル比は４より大きく、５より大きく、６より大きく、７より大きく、８より大きく、９より大きく、１０より大きく、１２より大きく、又は１４より大きい。実施形態において、モル比は、約１～５、約１～１０、約２～８、約５～１０、約５～１５　約１０～１５又は約１２～１５の範囲である。

【０２０４】

本明細書の実施例で実証するとおり、（ＮＡＤＨ　V_{max}／K_M）／（ＮＡＤＰＨ　V_{max}／K_M）により定義されるとおりのＮＡＤＨ補因子に対する生化学的特異性が増加するに従い、イソブタノール／グリセロール比が増加することが観察され、改変された補因子特異性がＮＡＤＰＨ利用及び副生成物形成の減少をもたらしたことが示唆される。

【０２０５】

アルデヒドデヒドロゲナーゼの修飾

本発明の実施形態において、組換え宿主細胞は、低下又は消失したアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性とイソブタノール生合成経路とを含むことができ、ここで宿主細胞はブタノールを生成する。他の実施形態において、組換え宿主細胞は、本明細書にさらに記載されるとおりのイソブタノール又は１－ブタノール生合成経路を含むことができる。他の実施形態において、イソブタノール生合成経路は、以下からなる群から選択される基質から生成物への変換を触媒するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むことができる：（ａ）ピルベートからアセトラクテート；（ｂ）アセトラクテートから２，３－ジヒドロキシイソバレレート；（ｃ）２，３－ジヒドロキシイソバレレートから２－ケトイソバレレート；（ｄ）２－ケトイソバレレートからイソブチルアルデヒド；及び（ｅ）イソブチルアルデヒドからイソブタノール。他の実施形態において、イソブタノール生合成経路

は、アセト乳酸シンターゼ、ケト酸レダクトイソメラーゼ、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ、ケトイソ吉草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活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むことができる。他の実施形態において、組換え細胞は、１－ブタノール生合成経路を含む。他の実施形態において、１－ブタノール生合成経路は、以下からなる群から選択される基質から生成物への変換を触媒するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む：（ａ）アセチル－ＣｏＡからアセトアセチル－ＣｏＡ；（ｂ）アセトアセチル－ＣｏＡから３－ヒドロキシブチリル－ＣｏＡ；（ｃ）３－ヒドロキシブチリル－ＣｏＡからクロトニル－ＣｏＡ；（ｄ）クロトニル－ＣｏＡからブチリル－ＣｏＡ；（ｅ）ブチリル－ＣｏＡからブチルアルデヒド；（ｆ）ブチルアルデヒドから１－ブタノール。他の実施形態において、１－ブタノール生合成経路は、活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むことができる。

【０２０６】

本発明の実施形態において、組換え宿主細胞は、アルデヒド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ポリヌクレオチド若しくは遺伝子の修飾若しくは破壊、又はアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドの修飾若しくは破壊を含むことができる。標的遺伝子の遺伝子修飾及び破壊により発現を低下又は消失させる多くの方法が当業者に公知であり、本明細書に開示される組換え宿主細胞を作成するために用いることができる。他の実施形態において、組換え宿主細胞は、アルデヒド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内因性ポリヌクレオチド若しくは遺伝子に、又はアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有する内因性ポリペプチドに、欠失、突然変異、及び／又は置換を含むことができる。かかる修飾、破壊、欠失、突然変異、及び／又は置換により、低下又は消失したアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性をもたらすことができる。用い得る修飾としては、限定はされないが、アルデヒドデヒドロゲナーゼタンパク質をコードする遺伝子全体又は遺伝子の一部分の欠失、タンパク質を発現させないか、又はより低度に発現させるためのコード遺伝子への（プロモーター又はコード領域のいずれかにおける）ＤＮＡ断片の挿入、機能タンパク質を発現させないための、終止コドン又はフレームシフトを加える突然変異のコード領域への導入、及び非機能性の又は活性がより低いタンパク質が発現するようにアミノ酸を改変する１つ以上の突然変異のコード領域への導入が挙げられる。他の実施形態において、標的遺伝子の発現は、アンチセンスＲＮＡ又は干渉ＲＮＡの発現により阻害することができ、及び同時抑制をもたらすコンストラクトを導入することもできる。他の実施形態において、転写物の合成又は安定性を突然変異によって減少させることができる。実施形態において、ｍＲＮＡからのタンパク質の翻訳効率を突然変異によって調節することができる。これらの方法は全て、当業者により、既知の又は同定される標的タンパク質コード配列を利用して容易に実施され得る。

【０２０７】

他の実施形態において、標的アルデヒドデヒドロゲナーゼコード配列を取り囲むＤＮＡ配列もまた、一部の修飾手順において有用であり、例えばサッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）などの酵母について、ＮＣＢＩ（国立バイオテクノロジー情報センター（Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｃｅｎｔｅｒ　ｆｏｒ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ））が取りまとめるゲノムプロジェクト（Ｇｅｎｏｍｅ　Ｐｒｏｊｅｃｔ）のＧｅｎｏｍｅ　Ｐｒｏｊｅｃｔ　ＩＤ９５１８により取りまとめられた完全ゲノム配列において、ＧＯＰＩＤ番号１３８３８を特定して、利用可能である。酵母ゲノム配列のさらなる非限定的な例は、カンジダ・アルビカンス（Ｃａｎｄｉｄａ　ａｌｂｉｃａｎｓ）の配列であり、これはＧＰＩＤ番号１０７７１、１０７０１及び１６３７３に含まれる。他の酵母ゲノム配列を、当業者は公的に利用可能なデータベースにおいて容易に見出すことができる。

【０２０８】

他の実施形態において、標的アルデヒドデヒドロゲナーゼコード配列を取り囲むＤＮＡ配列は、相同組換えを用いる修飾方法に有用であり得る。この方法の非限定的な例では、アルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子隣接配列を、選択可能なマーカー遺伝子を囲んで配置

することにより、マーカー遺伝子がアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子を置き換える相同組換えが媒介され得る。別の非限定的な例では、部分的なアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子配列及び選択可能なマーカー遺伝子を囲むアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子隣接配列を使用して、マーカー遺伝子が標的アルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子の一部分を置き換える相同組換えが媒介され得る。実施形態において、選択可能なマーカーは部位特異的な組換え部位によって囲まれてもよく、従って対応する部位特異的リコンビナーゼの発現後、アルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子を再活性化することなしに、耐性遺伝子がアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子から切り出される。実施形態において、部位特異的組換えにより、後には組換え部位が残り、これはアルデヒドデヒドロゲナーゼタンパク質の発現を破壊する。他の実施形態では、当業者に周知されるとおり、選択可能なマーカーの切り出し後にアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子に同様に欠失を残す相同組換えベクターを構築することができる。

【０２０９】

他の実施形態において、Ｗａｃｈ　ｅｔ　ａｌ．（Ｙｅａｓｔ，１０：１７９３－１８０８；１９９４）により記載されるとおりの有糸分裂組換えを用いて、アルデヒドデヒドロゲナーゼ標的遺伝子に対して欠失を作ることができる。かかる方法は、２０ｂｐほどの短さであってよい、且つ標的ＤＮＡ配列を囲むゲノム領域間に選択可能なマーカーを含むＤＮＡ断片を調製することを伴い得る。他の実施形態において、このＤＮＡ断片は、選択可能なマーカー遺伝子のＰＣＲ増幅によって、マーカー遺伝子の末端にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドであって、酵母ゲノムと組み換えることができるゲノム領域を含むオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて調製することができる。実施形態において、線状ＤＮＡ断片は、酵母に効率的に形質転換してゲノムに組み換え、標的ＤＮＡ配列の欠失によるものを含めた遺伝子置換を生じさせることができる（（（例えば、Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌｕｍｅ　１９４，Ｇｕｉｄｅ　ｔｏ　Ｙｅａｓｔ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　ａｎｄ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ａｎｄ　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ｐａｒｔ　Ａ，２００４，Ｃｈｒｉｓｔｉｎｅ　Ｇｕｔｈｒｉｅ　ａｎｄ　Ｇｅｒａｌｄ　Ｒ．Ｆｉｎｋ（Ｅｄｓ．），Ｅｌｓｅｖｉｅｒ　Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）に開示されるとおり）。

【０２１０】

さらに、プロモーター置換方法を用いて内因性転写制御エレメントを交換してもよく、Ｍｎａｉｍｎｅｈ　ｅｔ　ａｌ．，（（２００４）Ｃｅｌｌ　１１８（１）：３１－４４）により記載されるものなどの、発現を調節する別の手段が可能となる。

【０２１１】

他の実施形態において、アルデヒドデヒドロゲナーゼ標的遺伝子がコードする活性を、ランダム突然変異誘発を用いて破壊することができ、この次に、続いてスクリーニングを行い、活性が低下した又は実質的に消失した株を同定することができる。この種の方法では、標的遺伝子のコード領域、又は成長に対する炭素基質依存性に影響を及ぼすゲノムの任意の他の領域のＤＮＡ配列は、既知である必要はない。実施形態において、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性が低下した細胞、又は低下したアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有する他の突然変異体の選別は、本発明の組換え宿主細胞に有用であり得る。

【０２１２】

遺伝子突然変異の作成方法は、当該技術分野において一般的で周知されており、突然変異体の作成の実施に応用することができる。一般的に用いられるランダム遺伝子修飾方法（Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｙｅａｓｔ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，２００５，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹに概説されている）には、自発的突然変異生成、ミューテーター遺伝子により引き起こされる突然変異生成、化学的突然変異生成、紫外線若しくはＸ線の照射、又はトランスポゾン突然変異生成が含まれる。

【０２１３】

宿主細胞の化学的突然変異生成は、限定はされないが、以下のＤＮＡ突然変異原のうち

の一つによる処理を含み得る：メタンスルホン酸エチル（ＥＭＳ）、亜硝酸、硫酸ジエチル、又はＮ－メチル－Ｎ’－ニトロ－Ｎ－ニトロソ－グアニジン（ＭＮＮＧ）。かかる突然変異生成方法は、Ｓｐｅｎｃｅｒ ｅｔ ａｌ．（Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ ｉｎ Ｙｅａｓｔ，１９９６，Ｙｅａｓｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ：Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｃｅｌｌ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ．Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ，Ｔｏｔｏｗａ，ＮＪ）に概説されている。実施形態において、ＥＭＳによる化学的突然変異生成を、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｙｅａｓｔ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，２００５，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹに開示されるとおり実施することができる。また、紫外線（ＵＶ）又はＸ線の照射を用いて、酵母細胞にランダム突然変異誘発を生じさせることもできる。紫外線照射による突然変異生成の主要な効果は、ＤＮＡ複製の忠実度を破壊するピリミジン二量体の形成である。酵母の紫外線突然変異生成プロトコルは、Ｓｐｅｎｃｅｒ ｅｔ ａｌ．（Ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ ｉｎ Ｙｅａｓｔ，１９９６，Ｙｅａｓｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ：Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｃｅｌｌ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ．Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ，Ｔｏｔｏｗａ，ＮＪ）に見出すことができる。実施形態において、ミューテーター表現型の導入を用いることで、宿主細胞にランダムな染色体突然変異を生じさせることもできる。実施形態において、一般的なミューテーター表現型は、以下の遺伝子うちの１つ以上を破壊することによって達成できる：ＰＭＳ１、ＭＡＧ１、ＲＡＤ１８又はＲＡＤ５１。他の実施形態では、野生型対立遺伝子の挿入により、非ミューテーター表現型の修復を達成することができる。他の実施形態では、これらの又は他の公知のランダム突然変異誘発法のいずれかから生成された修飾細胞のコレクションを、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性の低下又は消失についてスクリーニングすることができる。

【０２１４】

以下の酵母株は、ゲノムが完全に配列決定されてアノテートされており、公的に利用可能である：アシュビア・ゴッシピイ（Ａｓｈｂｙａ ｇｏｓｓｙｐｉｉ）ＡＴＣＣ １０８９５、カンジダ・グラブラタ（Ｃａｎｄｉｄａ ｇｌａｂｒａｔａ）ＣＢＳ １３８、クルイベロミセス・ラクチス（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ ｌａｃｔｉｓ）ＮＲＲＬ Ｙ－１１４０、ピキア・スチピチス（Ｐｉｃｈｉａ ｓｔｉｐｉｔｉｓ）ＣＢＳ ６０５４、サッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）Ｓ２８８ｃ、シゾサッカロミセス・ポンベ（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｐｏｍｂｅ）９７２ｈ－、及びヤロウイア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）ＣＬＩＢ１２２。典型的には、本明細書に提供されるものなどの、既知のアルデヒドデヒドロゲナーゼポリヌクレオチド又はポリペプチド配列による公的に利用可能なデータベースのＢＬＡＳＴ（上記に記載される）検索を用いることにより、酵母細胞などの他の宿主細胞のアルデヒドデヒドロゲナーゼコード配列が同定される。

【０２１５】

他の実施形態において、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドは、イソブチルアルデヒドからイソ酪酸への変換を触媒することができる。他の実施形態において、組換え宿主細胞におけるイソブチルアルデヒドからイソ酪酸への変換は、低下又は消失する。さらに他の実施形態において、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するポリヌクレオチド、遺伝子又はポリペプチドは、ＥＣ番号ＥＣ １．２．１．３、ＥＣ １．２．１．４、及び／又はＥＣ １．２．１．５に対応し得る。

【０２１６】

実施形態において、本発明の組換え宿主細胞はＳ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）であってよく、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドは、ＡＬＤ２、ＡＬＤ３、ＡＬＤ４、ＡＬＤ５、ＡＬＤ６、又はそれらの組み合わせであり得る。他の実施形態において、組換え宿主細胞はクルイベロミセス・ラクチス（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ ｌａｃｔｉｓ）であってよく、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドは、ＫＬＬＡ０Ｆ００４４０、ＫＬＬＡ０Ｅ２３０５７、ＫＬＬＡ０Ｄ１００

２１、ＫＬＬＡ０Ｄ０９９９９Ｇ、又はそれらの組み合わせであり得る。他の実施形態において、組換え宿主細胞はピキア・スチピチス（Ｐｉｃｈｉａ　ｓｔｉｐｉｔｉｓ）であってよく、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドは、ＡＬＤ２、ＡＬＤ３、ＡＬＤ４、ＡＬＤ５、ＡＬＤ７、又はそれらの組み合わせであり得る。他の実施形態において、組換え宿主細胞はラクトバチルス・プランタルム（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｐｌａｎｔａｒｕｍ）であってよく、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドはＡｌｄＨであり得る。他の実施形態において、組換え宿主細胞は大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）であってよく、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドは、ａｌｄＡ、ａｌｄＢ、ａｌｄＨ、又はそれらの組み合わせであり得る。

【０２１７】

本発明の実施形態において、組換え宿主細胞はＳ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）であってよく、アルデヒド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内因性ポリヌクレオチド又は遺伝子は、ＡＬＤ２、ＡＬＤ３、ＡＬＤ４、ＡＬＤ５、ＡＬＤ６、又はそれらの組み合わせであり得る。本発明の実施形態において、組換え宿主細胞はＳ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）であってよく、アルデヒド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内因性ポリヌクレオチド又は遺伝子は、ＡＬＤ６であり得る。他の実施形態において、組換え宿主細胞はクルイベロミセス・ラクチス（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ　ｌａｃｔｉｓ）であってよく、アルデヒド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内因性ポリヌクレオチド又は遺伝子は、ＫＬＬＡ０Ｆ００４４０、ＫＬＬＡ０Ｅ２３０５７、ＫＬＬＡ０Ｄ１００２１、ＫＬＬＡ０Ｄ０９９９９Ｇ、又はそれらの組み合わせであり得る。他の実施形態において、組換え宿主細胞はピキア・スチピチス（Ｐｉｃｈｉａ　ｓｔｉｐｉｔｉｓ）であってよく、アルデヒド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内因性ポリヌクレオチド又は遺伝子は、ＡＬＤ２、ＡＬＤ３、ＡＬＤ４、ＡＬＤ５、ＡＬＤ７、又はそれらの組み合わせであり得る。実施形態において、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドは、サッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）由来のＡＬＤ６の相同体である。ｋａｎＭＸカセットを有するアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子欠失を含むＳ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）欠失株が、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ）［カタログ番号４０００７５３］から市販されている。

【０２１８】

他の実施形態において、組換え宿主細胞はラクトバチルス・プランタルム（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｐｌａｎｔａｒｕｍ）であってよく、アルデヒド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内因性ポリヌクレオチドは、ＡｌｄＨであり得る。他の実施形態において、組換え宿主細胞は大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）であってよく、アルデヒド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内因性ポリヌクレオチドは、ａｌｄＡ、ａｌｄＢ、ａｌｄＨ、又はそれらの組み合わせであり得る。

【０２１９】

本明細書に開示される組換え宿主細胞における修飾又は不活性化の標的とし得るアルデヒドデヒドロゲナーゼポリヌクレオチド、遺伝子及びポリペプチドの例としては、限定はされないが、以下の表４のものが挙げられる。

【０２２０】

【表８】

表４．アルデヒドデヒドロゲナーゼ標的遺伝子コード領域及びタンパク質

	核酸配列番号	アミノ酸配列番号
*S.セレビシエ(S. cerevisiae)*由来のALD2	732	733
*S.セレビシエ(S. cerevisiae)*由来のALD3	734	735
*S.セレビシエ(S. cerevisiae)*由来のALD4	736	737
*S.セレビシエ(S. cerevisiae)*由来のALD5	738	739
*S.セレビシエ(S. cerevisiae)*由来のALD6	740	741
*クルイベロミセス・ラクチス(Kluyveromyces lactis)*由来のKLLA0F00440	742	743
*クルイベロミセス・ラクチス(Kluyveromyces lactis)*由来のKLLA0E23057	744	745
*クルイベロミセス・ラクチス(Kluyveromyces lactis)*由来のKLLA0D10021	746	747
*クルイベロミセス・ラクチス(Kluyveromyces lactis)*由来のKLLA0D09999	748	749
*ピキア・スチピチス(Pichia stipits)*由来のALD2	750	751
*ピキア・スチピチス(Pichia stipitis)*由来のALD3	752	753
*ピキア・スチピチス(Pichia stipitis)*由来のALD4	754	755
*ピキア・スチピチス(Pichia stipitis)*由来のALD5	756	757
*ピキア・スチピチス(Pichia stipitis)*由来のALD7	758	759
*大腸菌(E.coli)*由来のaldA	760	761
*大腸菌(E.coli)*由来のaldB	762	763
*大腸菌(E.coli)*由来のaldH(puuC)	764	765

【０２２１】

本明細書に開示される組換え宿主細胞における修飾又は不活性化の標的とし得るアルデヒドデヒドロゲナーゼポリヌクレオチド、遺伝子及びポリペプチドの他の例としては、限定はされないが、表４の配列のいずれか一つと少なくとも約７０％～約７５％、約７５％～約８０％、約８０％～約８５％、約８５％～約９０％、約９０％～約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、又は約９９％の配列同一性を有するアルデヒドデヒドロゲナーゼポリヌクレオチド、遺伝子及び／又はポリペプチドが挙げられ、ここでかかるポリヌクレオチド又は遺伝子はアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性をコードし、又はかかるポリペプチドはアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有する。本明細書に開示される組換え宿主細胞における修飾又は不活性化の標的とし得るアルデヒドデヒドロゲナーゼポリヌクレオチド、遺伝子及びポリペプチドのさらに他の例としては、限定はされないが、表４の配列のいずれか一つの活性変異体、断片又は誘導体が挙げられ、ここでかかるポリヌクレオチド又は遺伝子はアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性をコードし、又はかかるポリペプチドはアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有する。

【０２２２】

実施形態において、他のアルデヒドデヒドロゲナーゼポリヌクレオチド、遺伝子及び／又はポリペプチドの配列を、文献及び当業者に周知されているバイオインフォマティクスデータベースにおいて、本明細書に開示される配列及び当該技術分野で利用可能な配列を使用して同定することができる。例えば、かかる配列は、アルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする既知のポリヌクレオチド又はポリペプチド配列による公的に利用可能なデータベースのＢＬＡＳＴ検索によって同定することができる。このような方法において、同一性は、ギャップペナルティ＝１０、ギャップ長ペナルティ＝０．１、及びＧｏｎｎｅｔ２５０シリーズのタンパク質重み行列のデフォルトパラメータを使用するＣｌｕｓｔａｌ Ｗアラインメント法に基づき得る。

【０２２３】

加えて、本明細書に開示される、又は当該技術分野で公知のアルデヒドデヒドロゲナーゼポリヌクレオチド又はポリペプチド配列を使用して、自然中の他のアルデヒドデヒドロゲナーゼ相同体を同定することができる。例えば、本明細書に開示されるアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする核酸断片の各々を使用して、相同タンパク質をコードする遺伝子を単離することができる。配列依存性プロトコルを用いた相同遺伝子の単離は、当該技術分野において公知である。配列依存性プロトコルの例としては、限定はされないが、（１）核酸ハイブリダイゼーションの方法；（２）核酸増幅技術［例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）、Ｍｕｌｌｉｓ ｅｔ ａｌ．，米国特許第４，６８３，２０２号明細書；リガーゼ連鎖反応（ＬＣＲ）、Ｔａｂｏｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８２：１０７４（１９８５）；又は鎖置換増幅（ＳＤＡ）、Ｗａｌｋｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８９：３９２（１９９２）］の様々な使用によって例示されるとおりの、ＤＮＡ及びＲＮＡ増幅の方法；及び（３）ライブラリ構築及び相補性によるスクリーニングの方法が挙げられる。

【０２２４】

従って、本明細書に開示されるアルデヒドデヒドロゲナーゼポリヌクレオチド又はポリペプチド（例えば、表４の配列番号７３２～７６５）のいずれかと少なくとも約７０％～約７５％、約７５％～約８０％、約８０％～約８５％、約８５％～約９０％、約９０％～約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、又は約９９％の配列同一性を有するアルデヒドデヒドロゲナーゼポリヌクレオチド、遺伝子及びポリペプチドを提供することは、本発明の範囲内である。同一性は、ギャップペナルティ＝１０、ギャップ長ペナルティ＝０．１、及びＧｏｎｎｅｔ ２５０シリーズのタンパク質重み行列のデフォルトパラメータを使用するＣｌｕｓｔａｌ Ｗアラインメント法に基づく。

【０２２５】

アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を低下又は消失させるための本明細書に開示される組換え宿主細胞におけるアルデヒドデヒドロゲナーゼの修飾は、当該技術分野において公知の方法を用いて確認することができる。例えば、特定のアルデヒドデヒドロゲナーゼの破壊は、アルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子に対して内部及び外部のプライマーを使用するＰＣＲスクリーニングで、又はアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子配列に対して設計されたプローブを使用するサザンブロットにより、確認してもよい。或いは、ガスクロマトグラフィー質量分析法又は液体クロマトグラフィーを利用して、イソブチルアルデヒドに曝露された株をイソ酪酸形成の減少についてスクリーニングすることもできる。従って、本明細書には、イソ酪酸形成が減少した株のスクリーニング方法が提供され、この方法は、ａ）アルデヒド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ポリヌクレオチドの修飾及び／又はアルデヒドオキシダーゼ活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの修飾を含む株を提供するステップ；ｂ）細胞をイソブチルアルデヒドに接触させるステップ；及びｃ）イソ酪酸形成を計測するステップを含み；ここでイソ酪酸形成は、修飾を含まない対照株と比較したとき低下する。一部の実施形態では、修飾は、欠失、突然変異、及び／又は置換である。一部の実施形態では、計測するステップは、ガスクロマトグラフィー質量分析法を用いて行われる。一部の実施形態では、イソ酪酸は、少なくとも約１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくと

も５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、又は少なくとも９０％低下する。一部の実施形態では、イソ酪酸形成は実質的に消失する。

【０２２６】

アルデヒドオキシダーゼの修飾

本発明の実施形態において、本明細書に開示される組換え宿主細胞は、アルデヒドオキシダーゼをコードするポリヌクレオチド、遺伝子又はポリペプチドの修飾又は破壊を有し得る。実施形態において、組換え宿主細胞は、アルデヒドオキシダーゼ活性を有するポリペプチドをコードする内因性ポリヌクレオチド又は遺伝子に、又はアルデヒドオキシダーゼ活性を有する内因性ポリペプチドに、欠失、突然変異、及び／又は置換を含む。かかる修飾、破壊、欠失、突然変異、及び／又は置換により、低下又は消失したアルデヒドオキシダーゼ活性がもたらされ得る。

【０２２７】

本発明の実施形態において、アルデヒドオキシダーゼ活性を有するポリペプチドは、イソブチルアルデヒドからイソ酪酸への変換を触媒することができる。他の実施形態において、組換え宿主細胞におけるイソブチルアルデヒドからイソ酪酸への変換は、低下又は消失する。他の実施形態において、アルデヒドオキシダーゼ活性を有するポリヌクレオチド、遺伝子又はポリペプチドは、ＥＣ番号ＥＣ　１．２．３．１に対応し得る。

【０２２８】

実施形態において、本発明の組換え宿主細胞はピキア・スチピチス（Ｐｉｃｈｉａ　ｓｔｉｐｉｔｉｓ）であってよく、アルデヒドオキシダーゼ活性を有するポリヌクレオチド、遺伝子又はポリペプチドはＡＯＸ１及び／又はＡＯＸ２であり得る。

【０２２９】

本明細書に開示される組換え宿主細胞における修飾又は不活性化の標的とし得るアルデヒドオキシダーゼポリヌクレオチド、遺伝子及びポリペプチドの例としては、限定はされないが、以下の表５のものが挙げられる。

【０２３０】

【表９】

表 5. アルデヒドオキシダーゼ標的遺伝子コード領域及びタンパク質

	核酸配列番号	アミノ酸配列番号
ピキア・スチピチス(Pichia stipitis) 由来の AOX1	864	866
ピキア・スチピチス(Pichia stipitis) 由来の AOX2	867	868

【０２３１】

本明細書に開示される組換え宿主細胞における修飾又は不活性化の標的とし得るアルデヒドオキシダーゼポリヌクレオチド、遺伝子及びポリペプチドの他の例としては、限定はされないが、表５の配列のいずれか一つと少なくとも約７０％～約７５％、約７５％～約８０％、約８０％～約８５％、約８５％～約９０％、約９０％～約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、又は約９９％の配列同一性を有するアルデヒドオキシダーゼポリヌクレオチド、遺伝子及び／又はポリペプチドが挙げられ、ここでかかるポリヌクレオチド又は遺伝子は、アルデヒドオキシダーゼ活性を有するポリペプチドをコードし、又はかかるポリペプチドはアルデヒドオキシダーゼ活性を有する。本明細書に開示される組換え宿主細胞における修飾又は不活性化の標的とし得るアルデヒドオキシダーゼポリヌクレオチド、遺伝子及びポリペプチドのさらに他の例としては、限定はされないが、表５の配列のいずれか一つの活性変異体、断片又は誘導体が挙げられ、ここでかかるポリヌクレオチド又は遺伝子はアルデヒドオキシダーゼ活性をコードし、又はかかるポリペプチドはアルデヒドオキシダーゼ活性を有する。

【０２３２】

実施形態において、本明細書に開示される又は当該技術分野において公知のアルデヒドオキシダーゼ配列をコードするポリヌクレオチド、遺伝子及び／又はポリペプチドは、アセト乳酸レダクターゼ又はアルデヒドデヒドロゲナーゼについて上記に開示されるとおり修飾することができる。他の実施形態において、アルデヒドデヒドロゲナーゼについて上記に開示されるとおり、アルデヒドオキシダーゼをコードするポリヌクレオチド、遺伝子及び／又はポリペプチドを使用して別のアルデヒドオキシダーゼポリヌクレオチド、遺伝子及び／又はポリペプチド配列を同定することができ、及び／又はそれを使用して、他の細胞におけるアルデヒドオキシダーゼ相同体を同定することができる。かかるアルデヒドオキシダーゼコード配列は、例えば、文献及び／又は当業者に周知されているバイオインフォマティクスデータベースにおいて同定することができる。例えば、バイオインフォマティクスを用いた別の細胞型におけるアルデヒドオキシダーゼコード配列の同定は、本明細書に提供されるもののいずれかなど、既知のヘキソースキナーゼコードＤＮＡ及びポリペプチド配列による公的に利用可能なデータベースのＢＬＡＳＴ（上記に開示されるとおり）検索により達成することができる。同一性は、ギャップペナルティ＝１０、ギャップ長ペナルティ＝０．１、及びＧｏｎｎｅｔ　２５０シリーズのタンパク質重み行列のデフォルトパラメータを使用するＣｌｕｓｔａｌ　Ｗアラインメント法に基づく。

【０２３３】

アルデヒドオキシダーゼ活性を低下又は消失させるための本明細書に開示される組換え宿主細胞におけるアルデヒドオキシダーゼの修飾は、当該技術分野において公知の方法を用いて確認することができる。例えば、特定のアルデヒドオキシダーゼの破壊は、アルデヒドオキシダーゼ遺伝子に対して内部及び外部のプライマーを使用するＰＣＲスクリーニングで、又はアルデヒドオキシダーゼ遺伝子配列に対して設計されたプローブを使用するサザンブロットにより、確認してもよい。或いは、ガスクロマトグラフィー又は他の分析方法を利用して、イソブチルアルデヒドに曝露された株をイソ酪酸形成の減少についてスクリーニングすることもできる（実施例において説明及び実証するとおり）。一部の実施形態では、イソ酪酸は、少なくとも約１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、又は少なくとも９０％低下する。一部の実施形態では、イソ酪酸形成は実質的に消失する。

【０２３４】

本出願者らは、低下又は消失したアルデヒドデヒドロゲナーゼ及び／又はアルデヒドオキシダーゼ活性を含む組換え宿主細胞を提供した。実施形態において、本明細書に開示される組換え宿主細胞は、ピルビン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ポリヌクレオチドの修飾及び／又はヘキソキナーゼ２活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの修飾をさらに含むことができる。実施形態において、本発明の組換え宿主細胞は、生合成経路の生成物（例えばイソブタノール）を生成することができ、以下からなる群から選択される基質から生成物への変換を触媒するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み得る：（ａ）ピルベートからアセトラクテート；（ｂ）アセトラクテートから２，３－ジヒドロキシイソバレレート；（ｃ）２，３－ジヒドロキシイソバレレートから２－ケトイソバレレート；（ｄ）２－ケトイソバレレートからイソブチルアルデヒド；及び（ｅ）イソブチルアルデヒドからイソブタノール。他の実施形態において、かかる組換え宿主細胞は、低下又は消失したアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性及び／又はアルデヒドオキシダーゼ活性を含まない組換え宿主細胞により生成される同じ生成物の収率又は量と比べてより高収率で又はより多量に生合成経路の生成物（例えばイソブタノール）を生成することができる。他の実施形態において、本発明の組換え宿主細胞は、イソブチルアルデヒドからイソ酪酸への変換を低下又は消失させることができ、アルデヒドデヒドロゲナーゼ及び／又はアルデヒドオキシダーゼ活性を有する候補ポリペプチドのスクリーニングに使用することができる。このように、本出願者らはまた、生合成経路の生成物（例えばイソブタノール）の収率又は力価を増加させる方法、イソブチルアルデヒドからイソ酪酸への変換を低下又は消失させる方法、及びアルデヒドデヒドロゲ

ナーゼ及び／又はアルデヒドオキシダーゼ活性を有する候補ポリペプチドをスクリーニングする方法も提供している。

【０２３５】

本発明の実施形態において、組換え宿主細胞の生成方法が提供され、この方法は、（ａ）本明細書に開示される組換え宿主細胞を提供するステップと；（ｂ）生合成経路（例えばイソブタノール生合成経路）のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドで前記宿主細胞を形質転換するステップとを含む。他の実施形態において、組換え宿主細胞の生成方法が提供され、この方法は、（ａ）アルデヒド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ポリヌクレオチド、又はアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドに修飾を含む組換え宿主細胞を提供するステップと；（ｂ）生合成経路（例えばイソブタノール生合成経路）のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドにより前記宿主細胞を形質転換するステップとを含む。他の実施形態において、組換え宿主細胞の生成方法が提供され、この方法は、（ａ）アルデヒドオキシダーゼ活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、又はアルデヒドオキシダーゼ活性を有するポリペプチドに修飾を含む組換え宿主細胞を提供するステップと；（ｂ）イソブタノール生合成経路のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドで前記宿主細胞を形質転換するステップとを含む。

【０２３６】

実施形態において、イソブチルアルデヒドからイソ酪酸への変換を低下又は消失させる方法が提供され、この方法は、（ａ）本明細書に開示される組換え宿主細胞を提供するステップと；（ｂ）低下又は消失したアルデヒドデヒドロゲナーゼ及び／又はアルデヒドオキシダーゼ活性を含まない組換え宿主細胞と比較して、イソブチルアルデヒドからイソ酪酸への変換が低下又は消失する条件下で、前記宿主細胞を成長させるステップとを含む。本明細書に開示される組換え宿主細胞のイソブチルアルデヒドからイソ酪酸への変換は、当該技術分野において公知の方法（例えば、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｙｅａｓｔ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，２００５，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ，ｐｐ．２０１－２０２を参照のこと）及び／又は本明細書に記載される方法により計測することができる。

【０２３７】

ＤＨＭＢの低減

イソブタノール生合成経路を含む宿主細胞におけるＤＨＭＢの生成は、経路基質の全てが所望の生成物に変換されていないことを示している。従って、収率は低くなる。加えて、ＤＨＭＢは生成物の生成に対して阻害効果を有し得る。例えば、ＤＨＭＢは生合成経路における酵素の活性を減少させ、又は発酵中の酵母の成長及び／又は生成能力に対して他の阻害効果を有し得る。従って、本明細書に記載される方法は、発酵中におけるＤＨＭＢの低減方法を提供する。このような方法には、ＤＨＭＢの生成を減少させる方法及び発酵組成物からＤＨＭＢを除去する方法の双方が含まれる。

【０２３８】

ＤＨＭＢ生成を減少させる

本明細書に記載される一部の実施形態において、組換え宿主細胞は、アセトラクテートからＤＨＭＢに変換する能力の低下又は消失を含むことができる。アセトラクテートからＤＨＭＢに変換する宿主細胞の能力は、例えば、アセト乳酸レダクターゼ活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド若しくは遺伝子の修飾若しくは破壊、又はアセト乳酸レダクターゼ活性を有するポリペプチドの修飾若しくは破壊により、低下又は消失させることができる。他の実施形態において、組換え宿主細胞は、アセト乳酸レダクターゼ活性を有するポリペプチドをコードする内因性ポリヌクレオチド若しくは遺伝子に、又はアセト乳酸レダクターゼを有する内因性ポリペプチドに、欠失、突然変異、及び／又は置換を含むことができる。かかる修飾、破壊、欠失、突然変異、及び／又は置換により、低下した、実質的に消失した、又は消失したアセト乳酸レダクターゼ活性がもたらされ得る。本発明の一部の実施形態では、生合成経路の生成物は、アセトラクテートからＤＨＭ

Ｂに変換する能力の低下又は消失を含まない組換え宿主細胞における同じ生成物の生成と比較してより高収率で又はより多量に生成される。

【０２３９】

従って、生成物は、ＤＨＭＢを実質的に含まない、又はＤＨＭＢを含まないブタノールを含む組成物であってよい。一部の実施形態では、ブタノールを含む組成物は、約５ｍＭ、約４ｍＭ、約３ｍＭ、約２ｍＭ、約１ｍＭ、約０．５ｍＭ、約０．４ｍＭ、約０．３ｍＭ以下のＤＨＭＢ、又は約０．２ｍＭのＤＨＭＢを含有する。

【０２４０】

生成物はまた、ＤＨＭＢを実質的に含まない、又はＤＨＭＢを含まない２，３－ブタンジオール（ＢＤＯ）を含む組成物であってよい。一部の実施形態では、ＢＤＯを含む組成物は、約５ｍＭ、約４ｍＭ、約３ｍＭ、約２ｍＭ、約１ｍＭ、約０．５ｍＭ、約０．４ｍＭ、約０．３ｍＭ以下のＤＨＭＢ、又は約０．２ｍＭのＤＨＭＢを含有する。

【０２４１】

アセト乳酸レダクターゼ活性の記載される修飾を有する本明細書に開示される組換え宿主細胞においては、アセトラクテートからＤＨＭＢ以外の基質への変換が関与する生合成経路の任意の生成物がより高い有効性で生成され得る。かかる生成物としては、限定はされないが、ブタノール、例えば、イソブタノール、２－ブタノール、及びＢＤＯ、並びに分枝鎖アミノ酸が挙げられる。

【０２４２】

一部の実施形態では、宿主細胞は、アセト乳酸レダクターゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも１つの内因性ポリヌクレオチドに、少なくとも１つの欠失、突然変異、及び／又は置換を含む。一部の実施形態では、宿主細胞は、アセト乳酸レダクターゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも２つの内因性ポリヌクレオチドの各々に、少なくとも１つの欠失、突然変異、及び／又は置換を含む。

【０２４３】

一部の実施形態では、アセト乳酸レダクターゼ活性を有するポリペプチドは、アセトラクテートからＤＨＭＢへの変換を触媒することができる。一部の実施形態では、アセト乳酸レダクターゼ活性を有するポリペプチドは、アセトラクテートから２Ｓ，３Ｓ－ＤＨＭＢ（ファストＤＨＭＢ）及び／又は２Ｓ，３Ｒ－ＤＨＭＢ（スローＤＨＭＢ）への還元の触媒能を有する。

【０２４４】

【表１０】

表６

*サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)*における
アセト乳酸レダクターゼ活性を有するポリペプチド及びポリヌクレオチド

遺伝子	配列番号 (核酸、アミノ酸)
YMR226C	676, 677
YIL074C (Chr 9)	678, 679
YIR036C (Chr 9)	680, 681
YPL061W (ALD6) (Chr 16)	682, 683
YPL088W (Chr 16)	684, 685
YCR105W (ADH7) (Chr 3)	686, 687
YDR541C (Chr 4)	688, 689
YER081 (SER3) (Chr 5)	690, 691
YPL275W (FDH2) (Chr 16)	692, 693
YBR006W (UGA5) (Chr2)	694, 695
YOL059W (Chr 15)	696, 697
YER081W (Chr 5)	869, 870
YOR375C (Chr 15)	871, 872

【０２４５】
一部の実施形態では、組換え宿主細胞におけるアセトラクテートからＤＨＭＢへの変換が低下し、実質的に消失し、又は消失する。一部の実施形態では、アセト乳酸レダクターゼ活性を有するポリペプチドは、以下からなる群から選択される：ＹＭＲ２２６Ｃ、ＹＥＲ０８１Ｗ、ＹＩＬ０７４Ｃ、ＹＢＲ００６Ｗ、ＹＰＬ２７５Ｗ、ＹＯＬ０５９Ｗ、ＹＩＲ０３６Ｃ、ＹＰＬ０６１Ｗ、ＹＰＬ０８８Ｗ、ＹＣＲ１０５Ｗ、ＹＯＲ３７５Ｃ、及びＹＤＲ５４１Ｃ。一部の実施形態では、アセト乳酸レダクターゼ活性を有するポリペプチドは、表６に掲載される配列又は表６に掲載されるポリペプチド配列と少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、又は少なくとも約９９％同一の配列を含むポリペプチドである。一部の実施形態では、アセト乳酸レダクターゼ（ｒｅｄｕｃａｔａｓｅ）活性を有するポリペプチドは、表６に掲載されるポリヌクレオチド配列又は表６に掲載されるポリヌクレオチド配列と少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、又は少なくとも約９９％同一の配列によりコードされるポリペプチドである。
【０２４６】

【表１１】

表 7: 例示的 YMR226C 酵母相同体

種	受託番号	配列番号 (核酸、アミノ酸)
サッカロミセス・パラドクサス (Saccharomyces paradoxus)	AABY01000127	698, 699
サッカロミセス・バヤヌス (Saccharomyces bayanus)	AACA01000631	700, 701 MSQGRKAAERLANKTVLITGASAGI GKATALEYLEASNGNMKLILAARRL EKLEELKKTIDEEFPNAKVHVGQLDI TQAEKIKPFIENLPEAFKDIDILINNAG KALGSERVGEIATQDIQDVFDTNVT ALINVTQAVLPIFQAKNSGDIVNLGL GGRQRRIPHRLHLLCFQVCRRCVH* QFEKGTDQHEDQSYLDRAGAG*DR VLTGQIQR**GTS*KRLQGHYAVDGR RRG*LNRIFHFQKAEHRGCRHPDLP HQPSLALPHLSRL* (配列番号 701) この配列は、7 倍カバレッジの「ドラフト」ゲノム配列を使用した比較ゲノム研究から得られた (Kellis et al, Nature 423:241-254 (2003))。
サッカロミセス・カステリイ (Saccharomyces castellii)	AACF01000116	702, 703
サッカロミセス・ミカタエ (Saccharomyces mikatae)	AACH01000019	704, 705
アシュビア・ゴッシピイ (Ashbya gossypii)	AE016819	706, 707
カンジダ・グラブラタ (Candida glabrata)	CR380959	708,709
デバリオミセス・ハンセニイ (Debaryomyces hansenii)	CR382139	710, 711
シェフェルソミセス・スチピチス (Scheffersomyces stipitis) (旧ピキア・スチピチス (Pichia stipitis))	XM_001387479	712, 713
マイヤロジマ・ギリエルモンディイ (Meyerozyma guilliermondii) (旧ピキア・ギリエルモンディイ (Pichia guilliermondii))	XM_001482184	714, 715
バンデルワルトジマ・ポリスポラ (Vanderwaltozyma polyspora) (旧クルイベロミセス・ポリスポルス (Kluyveromyces polysporus))	XM_001645671	716, 717
カンジダ・デュブリニエンシス (Candida dubliniensis)	XM_002419771	718, 719
ザイゴサッカロミセス・ロウキシイ (Zygosaccharomyces rouxii)	XM_002494574	720, 721
ラカンセア・サーモトレランス (Lachancea thermotolerans) (旧クルイベロミセス・サーモトレランス (Kluyveromyces thermotolerans))	XM_002553230	722, 723
クルイベロミセス・ラクチス (Kluyveromyces lactis)	XM_451902	724, 725
サッカロミセス・クルイベリ (Saccharomyces kluyveri)	SAKL0H04730	726, 727
ヤロウイア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica)	XM_501554	728, 729
シゾサッカロミセス・ポンベ (Schizosaccharomyces pombe)	NM_001018495	730, 731

【０２４７】

一部の実施形態では、アセト乳酸レダクターゼ活性を有するポリペプチドは、ＹＭＲ２２６Ｃ又はＹＭＲ２２６Ｃの相同体である。従って、一部の実施形態では、アセト乳酸レダクターゼ（ｒｅｄｕｃａｔａｓｅ）活性を有するポリペプチドは、表７に掲載される配

列又は表７に掲載されるポリペプチド配列と少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、又は少なくとも約９９％同一の配列を含むポリペプチドである。一部の実施形態では、アセト乳酸レダクターゼ（ｒｅｄｕｃａｔａｓｅ）活性を有するポリペプチドは、表７に掲載されるポリヌクレオチド配列又は表７に掲載されるポリヌクレオチド配列と少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、又は少なくとも約９９％同一の配列によりコードされるポリペプチドである。アセトラクテートからＤＨＭＢへの変換能を有するアセト乳酸レダクターゼは、例えば遺伝子改変された酵母を、アセトラクテート消費の変化、ＤＨＭＢ生成の変化、ＤＨＩＶ生成の変化、又は他の下流生成物（例えば、ブタノール）の生成の変化についてスクリーニングすることにより、同定することができる。

【０２４８】

ＤＨＭＢ生成に関与する遺伝子を同定する一つの方法は、酵母ノックアウトライブラリの個々の酵母株が生成するＤＨＭＢの量を計測することを含む。ノックアウトライブラリは、例えばＯｐｅｎ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ（登録商標）（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡの一部門）から入手可能である。この方法では、ＤＨＭＢ生成が減少すると、そのノックアウトされている遺伝子がＤＨＭＢ生成を増加させるように機能することを示し、及びＤＨＭＢ生成が増加すると、そのノックアウトされている遺伝子がＤＨＭＢ生成を減少させるように機能することを示す。

【０２４９】

ノックアウト（「ＫＯ」）ライブラリを使用して、ＤＨＭＢ合成への関与についての候補遺伝子を同定し得る２つの方法として、以下が挙げられる：（１）内因性基質（アセトラクテート及びＮＡＤＰＨ又はＮＡＤＨ）から成長中に培養物に蓄積するＤＨＭＢ及びＤＨＩＶを、培養物からの試料において分析することができる。これらの試料を熱湯浴（８０～１００℃）中に１０～２０分間置くか、又は細胞を死滅させて透過処理し得る２％ギ酸などの溶液中に希釈することができる。いずれかの処理の後、遠心（５分、１１００×ｇ）すると、上清に小分子が認められ得る。対照株（例えばＢＹ４７４３）のＤＨＭＢ／ＤＨＩＶ比を種々のＫＯ誘導体と比較することができ、ＤＨＭＢ／ＤＨＩＶ比が非常に低い任意の１つ又は複数の株に欠損している１つ又は複数の遺伝子が、アセト乳酸レダクターゼ（ＡＬＲ）をコードし得る。（２）外因性基質（アセトラクテート及びＮＡＤＨ及び／又はＮＡＤＰＨ）からのインビトロでのＤＨＭＢ及び／又はＤＨＩＶ形成速度を、透過処理した細胞の懸濁液から取り、且つ上記に記載される方法のいずれかで不活性化した所定時間の試料において計測することができる。ＤＨＭＢ及びＤＨＩＶ合成の基質は同じであるため、これにより試料のＡＬＲ及びＫＡＲＩ活性の相対レベルを計測することが可能である。

【０２５０】

ＤＨＭＢ生成に関与する遺伝子を同定する別の方法は、酵母過剰発現ライブラリの個々の酵母株が生成するＤＨＭＢの量を計測することを含む。過剰発現ライブラリは、例えば、Ｏｐｅｎ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ（登録商標）（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡの一部門）から入手可能である。この方法では、ＤＨＭＢ生成が減少すると、その過剰発現した遺伝子がＤＨＭＢ生成を減少させるように機能することを示し、及びＤＨＭＢ生成が増加すると、その過剰発現した遺伝子がＤＨＭＢ生成を増加させるように機能することを示す。

【０２５１】

ＤＨＭＢ生成に関与する遺伝子を同定する別の方法は、ＤＨＭＢ生成酵母株を生化学的に分析することである。例えば、ＤＨＭＢ生成細胞を破壊することができる。この破壊は、低ｐＨ及び低温で実施することができる。細胞溶解物を、例えば硫酸アンモニウムを添加するか、又は当業者に公知の他の技法により画分に分離することができ、得られた画分を酵素活性についてアッセイすることができる。例えば、画分は、アセトラクテートをＤＨＭＢに変換する能力についてアッセイすることができる。酵素活性を含む画分を当該技

術分野において公知の方法により処理し、酵素を精製及び濃縮することができる（例えば、透析及びクロマトグラフ分離）。十分な純度及び濃度が達成されると、酵素を配列決定することができ、アセトラクテートからＤＨＭＢへの変換能を有する対応するアセト乳酸レダクターゼコード遺伝子を同定することができる。

【０２５２】

さらに、酵母ではアセトラクテートからＤＨＭＢへの還元が起こるものの、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）で同程度に起こることはないため、酵母では発現するが、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）では発現しないアセト乳酸レダクターゼをスクリーニング用に選択することができる。選択された酵素は、酵母又は他のタンパク質発現系で発現させて、アセトラクテートをＤＨＭＢに変換する能力についてスクリーニングすることができる。

【０２５３】

アセトラクテートからＤＨＭＢへの変換の触媒能を有する酵素は、アセトラクテートレベルをアッセイすることによるか、ＤＨＭＢレベルをアッセイすることによるか、ＤＨＩＶレベルをアッセイすることによるか、又はイソブタノールを含め、ＤＨＩＶからブタノールへの変換における下流生成物のいずれかをアッセイすることにより、スクリーニングすることができる。

【０２５４】

ＤＨＭＢは、当業者に公知の任意の技法を用いて計測することができる。例えば、当業者に公知の方法及び本明細書に提供される実施例に記載される技法により、ＤＨＭＢを分離して定量化することができる。例えば、液体クロマトグラフィー質量分析、液体クロマトグラフィー核磁気共鳴（ＮＭＲ）、薄層クロマトグラフィー、及び／又はＵＶ／Ｖｉｓ検出を伴うＨＰＬＣを用いて、ＤＨＭＢを分離して定量化することができる。

【０２５５】

実施形態において、本明細書に開示される選択されたアセト乳酸レダクターゼポリヌクレオチド、遺伝子及び／又はポリペプチドは、修飾又は破壊することができる。多くの好適な方法が当業者に公知であり、アルデヒドデヒドロゲナーゼについて記載される方法（上記）が含まれる。

【０２５６】

アセト乳酸レダクターゼ活性を低下又は消失させるための本明細書に開示される組換え宿主細胞におけるアセト乳酸レダクターゼの修飾は、当該技術分野において公知の方法を用いて確認することができる。例えば、アセト乳酸レダクターゼをコードするポリヌクレオチド配列の存在又は非存在を、ＰＣＲスクリーニングを用いて決定することができる。アセト乳酸レダクターゼ活性の減少もまた、アセトラクテートからＤＨＭＢへの変換の低下に基づき決定することができる。アセト乳酸レダクターゼ活性の減少はまた、ＤＨＭＢ生成の低下に基づき決定することもできる。アセト乳酸レダクターゼ活性の減少はまた、ブタノール生成の増加に基づき決定することもできる。

【０２５７】

従って、一部の実施形態では、ブタノール生成能を有する酵母は、約５ｍＭ、約４ｍＭ、約３ｍＭ、約２ｍＭ、約１ｍＭ、約０．９ｍＭ、約０．８ｍＭ、約０．７ｍＭ、約０．６ｍＭ、約０．５ｍＭ、約０．４ｍＭ又は約０．３ｍＭ以下のＤＨＭＢを生成する。一部の実施形態では、ブタノールを生成する酵母は、約５ｍＭ、約４ｍＭ、約３ｍＭ、約２ｍＭ、約１ｍＭ、約０．９ｍＭ、約０．８ｍＭ、約０．７ｍＭ、約０．６ｍＭ、約０．５ｍＭ、約０．４ｍＭ又は約０．３ｍＭ以下のＤＨＭＢを生成する。一部の実施形態では、ブタノールを生成する酵母は、約０．２ｍＭ以下又は０．２ｍＭのＤＨＭＢを生成する。

【０２５８】

一部の実施形態では、ブタノールの生成能を有する酵母は、少なくとも約５０時間にわたり発酵条件下で培養したとき約１０ｍＭ以下のＤＨＭＢを生成する。一部の実施形態では、ブタノールの生成能を有する酵母は、少なくとも約２０時間、少なくとも約２５時間、少なくとも約３０時間、少なくとも約３５時間、少なくとも約４０時間、少なくとも約４５時間、又は少なくとも約５０時間にわたり発酵条件下で培養したとき、約５ｍＭ以下

のＤＨＭＢを生成する。一部の実施形態では、ブタノールの生成能を有する酵母は、少なくとも約５時間、少なくとも約１０時間、少なくとも約１５時間、少なくとも約２０時間、少なくとも約２５時間、少なくとも約３０時間、少なくとも約３５時間、少なくとも約４０時間、少なくとも約４５時間、又は少なくとも約５０時間にわたり発酵条件下で培養したとき、約３ｍＭ以下のＤＨＭＢを生成した。一部の実施形態では、ブタノールの生成能を有する酵母は、少なくとも約１時間、少なくとも約５時間、少なくとも約１０時間、少なくとも約１５時間、少なくとも約２０時間、少なくとも約２５時間、少なくとも約３０時間、少なくとも約３５時間、少なくとも約４０時間、少なくとも約４５時間、又は少なくとも約５０時間にわたり発酵条件下で培養したとき、約１ｍＭ以下のＤＨＭＢを生成した。一部の実施形態では、ブタノールの生成能を有する酵母は、少なくとも約１時間、少なくとも約５時間、少なくとも約１０時間、少なくとも約１５時間、少なくとも約２０時間、少なくとも約２５時間、少なくとも約３０時間、少なくとも約３５時間、少なくとも約４０時間、少なくとも約４５時間、又は少なくとも約５０時間にわたり発酵条件下で培養したとき、約０．５ｍＭ以下のＤＨＭＢを生成した。

【０２５９】

一部の実施形態では、アセト乳酸レダクターゼをコードする内因性ポリヌクレオチドに少なくとも１つの欠失、突然変異、及び／又は置換を含む酵母は、同じ時間にわたり発酵条件下で培養したとき、アセト乳酸レダクターゼ（ａｃｅｌｏｔａｃａｔａｔｅ　ｒｅｄｕｃｔａｓｅ）をコードする内因性ポリヌクレオチドを含む酵母により生成されるＤＨＭＢの量の約０．５倍、約０．４倍、約０．３倍、約０．２倍、約０．１倍、約０．０５倍以下を生成する。一部の実施形態では、ブタノール生成能を有する酵母は、少なくとも約５ｍＭ、少なくとも約６ｍＭ、少なくとも約７ｍＭ、少なくとも約８ｍＭ、少なくとも約９ｍＭ、又は少なくとも約１０ｍＭの量のＤＨＩＶを生成する。

【０２６０】

一部の実施形態では、ブタノール生成能を有する酵母は、少なくともほぼＤＨＭＢの生成量である量のＤＨＩＶを生成する。一部の実施形態では、ブタノール生成能を有する酵母は、ＤＨＭＢの生成量の少なくとも約２倍、約３倍、約５倍、約１０倍、約１５倍、約２０倍、約２５倍、約３０倍、約３５倍、約４０倍、約４５倍、又は約５０倍の量のＤＨＩＶを生成する。一部の実施形態では、ブタノール生成能を有する酵母は、ＤＨＭＢの生成速度と少なくともほぼ等しい速度でＤＨＩＶを生成する。一部の実施形態では、ブタノール生成能を有する酵母は、ＤＨＭＢの生成速度の少なくとも約２倍、約３倍、約５倍、約１０倍、約１５倍、約２０倍、約２５倍、約３０倍、約３５倍、約４０倍、約４５倍、又は約５０倍の速度でＤＨＩＶを生成する。

【０２６１】

一部の実施形態では、ブタノール生成能を有する酵母は、消費されるグルコース１モルあたり０．０１０モル未満のＤＨＭＢを生成する。一部の実施形態では、酵母は、消費されるグルコース１モルあたり約０．００９モル未満、約０．００８モル未満、約０．００７モル未満、約０．００６モル未満、又は約０．００５モル未満のＤＨＭＢを生成する。一部の実施形態では、酵母は、消費されるグルコース１モルあたり約０．００４モル未満、約０．００３モル未満、約０．００２モル未満、又は約０．００１モル未満のＤＨＭＢを生成する。

【０２６２】

一部の実施形態では、アセト乳酸レダクターゼ活性は化学的手段により阻害される。例えば、アセト乳酸レダクターゼは、Ｌ－セリン、Ｄ－セリン、２－メチル－ＤＬ－セリン、Ｄ－スレオニン、Ｌ－アロスレオニン、Ｌ－３－ヒドロキシイソブチレート、Ｄ－３－ヒドロキシイソブチレート、３－ヒドロキシプロピオネート、Ｌ－３－ヒドロキシブチレート、及びＤ－３－ヒドロキシブチレートを含むＦｕｊｉｓａｗａ　ｅｔ　ａｌ．が列挙するものなどの、他の公知の基質を使用して阻害することができる。Ｂｉｏｃｈｉｍｉｃａ　ｅｔ　Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａ　Ａｃｔａ　１６４５：８９－９４（２００３）、これは全体として参照により本明細書に援用される。

【０２６３】
ＤＨＭＢの除去
本明細書に記載される他の実施形態において、発酵からＤＨＭＢを除去することにより、ＤＨＭＢの低減を実現することができる。従って、ＤＨＭＢ濃度が低下した発酵もまた、本明細書に記載される。ＤＨＭＢの除去により、例えば、より高純度の生成物、又は所望の純度を達成するのに必要な処理がより少ない生成物を得ることができる。従って、高い純度を有するエタノール又はブタノールなどの生合成経路の生成物を含む組成物もまた、提供される。
【０２６４】
ＤＨＭＢは、発酵プロセスの最中又はその後に除去することができ、当該技術分野において公知の任意の手段により除去することができる。ＤＨＭＢは、例えば、有機相中への抽出又は反応抽出により除去することができる。
【０２６５】
一部の実施形態では、発酵ブロスは、約０．５ｍＭ未満のＤＨＭＢを含む。一部の実施形態では、発酵ブロスは、約５時間、約１０時間、約１５時間、約２０時間、約２５時間、約３０時間、約３５時間、約４０時間、約４５時間、又は約５０時間の発酵後に約１．０ｍＭ未満のＤＨＭＢを含む。一部の実施形態では、発酵ブロスは、約２０時間、約２５時間、約３０時間、約３５時間、約４０時間、約４５時間、又は約５０時間の発酵後に約５．０ｍＭ未満のＤＨＭＢを含む。
【０２６６】
ブタノール生合成経路
特定の好適なイソブタノール生合成経路が、米国特許第７，８５１，１８８号明細書及び同第７，９９３，８８９号明細書（その各々が参照により本明細書に援用される）に開示される。開示されるイソブタノール生合成経路の図を、図１に提供する。米国特許第７，８５１，１８８号明細書に記載されるとおり、例示的なイソブタノール生合成経路のステップには、以下の変換が含まれる：
－例えばアセト乳酸シンターゼ（ＡＬＳ）により触媒されるとおりの、ピルベートからアセトラクテートへの変換（図１を参照、そのなかの経路ステップａ）、
－例えばアセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ（ＫＡＲＩ）により触媒されるとおりのアセトラクテートから２，３－ジヒドロキシイソバレレートへの変換（図１を参照、そのなかの経路ステップｂ）；
－例えばジヒドロキシ酸デヒドラターゼ（ＤＨＡＤ）とも称されるアセトヒドロキシ酸デヒドラターゼにより触媒されるとおりの、２，３－ジヒドロキシイソバレレートから２－ケトイソバレレートへの変換（図１を参照、そのなかの経路ステップｃ）；
－例えば分枝鎖２－ケト酸デカルボキシラーゼにより触媒されるとおりの２－ケトイソバレレートからイソブチルアルデヒドへの変換（図１を参照、そのなかの経路ステップｄ）；及び
－例えば分枝鎖アルコールデヒドロゲナーゼにより触媒されるとおりのイソブチルアルデヒドからイソブタノールへの変換（図１を参照、そのなかの経路ステップｅ）。
【０２６７】
別の実施形態において、イソブタノール生合成経路は、以下の基質から生成物への変換を含む：
－ピルベートからアセトラクテートへの変換、これは例えば、アセト乳酸シンターゼにより触媒され得る；
－アセトラクテートから２，３－ジヒドロキシイソバレレートへの変換、これは例えば、ケトール酸レダクトイソメラーゼにより触媒され得る；
－２，３－ジヒドロキシイソバレレートからａ－ケトイソバレレートへの変換、これは例えば、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼにより触媒され得る；
－α－ケトイソバレレートからバリンへの変換、これは例えば、トランスアミナーゼ又はバリンデヒドロゲナーゼにより触媒され得る；

－バリンからイソブチルアミンへの変換、これは例えば、バリンデカルボキシラーゼにより触媒され得る；
－イソブチルアミンからイソブチルアルデヒドへの変換、これは例えば、ωトランスアミナーゼにより触媒され得る；及び、
－イソブチルアルデヒドからイソブタノールへの変換、これは例えば、分枝鎖アルコールデヒドロゲナーゼにより触媒され得る。

【０２６８】

別の実施形態において、イソブタノール生合成経路は、以下の基質から生成物への変換を含む：
－ピルベートからアセトラクテートへの変換、これは例えば、アセト乳酸シンターゼにより触媒され得る；
－アセトラクテートから２，３－ジヒドロキシイソバレレートへの変換、これは例えば、アセトヒドロキシ酸レダクトイソメラーゼにより触媒され得る；
－２，３－ジヒドロキシイソバレレートからα－ケトイソバレレートへの変換、これは例えば、アセトヒドロキシ酸デヒドラターゼにより触媒され得る；
－α－ケトイソバレレートからイソブチリル－ＣｏＡへの変換、これは例えば、分枝鎖ケト酸デヒドロゲナーゼにより触媒され得る；
－イソブチリル－ＣｏＡからイソブチルアルデヒドへの変換、これは例えば、アセチル化（ａｃｅｌｙｌａｔｉｎｇ）アルデヒドデヒドロゲナーゼにより触媒され得る；及び、
－イソブチルアルデヒドからイソブタノールへの変換、これは例えば、分枝鎖アルコールデヒドロゲナーゼにより触媒され得る。

【０２６９】

別の実施形態において、イソブタノール生合成経路は、図１にステップｋ、ｇ、及びｅとして示される基質から生成物への変換を含む。

【０２７０】

上記に記載される基質から生成物への変換に使用することのできる遺伝子及びポリペプチド並びにさらなるイソブタノール経路用のそれらが、米国特許出願公開第２００７／００９２９５７号明細書及び国際公開第２０１１／０１９８９４号パンフレット（双方とも参照によって本明細書に援用される）に記載される。米国特許出願公開第２０１１／０１９８９４号明細書、同第２００７／００９２９５７号明細書、同第２０１０／００８１１５４号明細書（これらは参照により本明細書に援用される）は、ラクトコッカス・ラクチス（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｌａｃｔｉｓ）及びミュータンス菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｍｕｔａｎｓ）由来のものを含め、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼについて記載している。ケトイソ吉草酸デカルボキシラーゼには、ラクトコッカス・ラクチス（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｌａｃｔｉｓ）、マクロコッカス・カセオリチクス（Ｍａｃｒｏｃｏｃｃｕｓ　ｃａｓｅｏｌｙｔｉｃｕｓ）（配列番号５４２）及びリステリア・グレイ（Ｌｉｓｔｅｒｉａ　ｇｒａｙｉ）（配列番号５４３）に由来するものが含まれる。参照によって援用される米国特許出願公開第２００９／０２６９８２３号明細書及び米国特許出願公開第２０１１／０２６９１９９号明細書は、ＮＡＤＨを補因子として利用するものを含め、アルコールデヒドロゲナーゼについて記載している。アルコールデヒドロゲナーゼには、アクロモバクター・キシロスオキシダンス（Ａｃｈｒｏｍｏｂａｃｔｅｒ　ｘｙｌｏｓｏｘｉｄａｎｓ）由来のＳａｄＢが含まれる。さらなるアルコールデヒドロゲナーゼには、ウマ肝臓ＡＤＨ及びベイジェリンキア・インディカ（Ｂｅｉｊｅｒｉｎｋｉａ　ｉｎｄｉｃａ）ＡＤＨが含まれる。アルコールデヒドロゲナーゼには、ＮＡＤＨを補因子として利用するものが含まれる。一実施形態においてブタノール生合成経路は、ａ）約３００μＭ未満、約１００μＭ未満、約５０μＭ未満、約２０μＭ未満又は約１０μＭ未満のＮＡＤＨに対するＫＭを有するケトール酸レダクトイソメラーゼ；ｂ）ＮＡＤＨを補因子として利用するアルコールデヒドロゲナーゼ；又はｃ）ａ）とｂ）との両方を含む。

【０２７１】

国際公開第２０１１／０１９８９４号パンフレット及び米国特許出願公開第２０１１／

０１９８９４号明細書、同第２００７／００９２９５７号明細書、同第２０１０／００８１１５４号明細書（これらは全体として参照により本明細書に援用される）は、好適なジヒドロキシ酸デヒドラターゼを記載している。ＤＨＡＤ活性を増加させる方法が、例えば、米国特許出願公開第２０１０／００８１１７３号明細書及び２０１１年２月１７日に出願された米国特許出願第１３／０２９，５５８号明細書（これらは全体として参照により本明細書に援用される）に記載される。

【０２７２】

好適なケトール酸レダクトイソメラーゼ（ＫＡＲＩ）酵素が、米国特許出願公開第２００８／０２６１２３０　Ａ１号明細書、同第２００９／０１６３３７６号明細書、同第２０１０／０１９７５１９号明細書、同第２０１０／０１４３９９７号明細書及び同第２０１１／０２４４５３６号明細書（これらは全体として参照により本明細書に援用される）に記載される。これらに開示されるＫＡＲＩの例は、コレラ菌（Ｖｉｂｒｉｏ　ｃｈｏｌｅｒａｅ）、緑膿菌（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）ＰＡＯ１、及び蛍光菌（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｓ）ＰＦ５由来のものである。一部の実施形態では、ＫＡＲＩ酵素は、少なくとも約０．１マイクロモル／分／ｍｇ、少なくとも約０．２マイクロモル／分／ｍｇ、少なくとも約０．３マイクロモル／分／ｍｇ、少なくとも約０．４マイクロモル／分／ｍｇ、少なくとも約０．５マイクロモル／分／ｍｇ、少なくとも約０．６マイクロモル／分／ｍｇ、少なくとも約０．７マイクロモル／分／ｍｇ、少なくとも約０．８マイクロモル／分／ｍｇ、少なくとも約０．９マイクロモル／分／ｍｇ、少なくとも約１．０マイクロモル／分／ｍｇ、又は少なくとも約１．１マイクロモル／分／ｍｇの比活性を有する。アセトラクテートから２，３－ジヒドロキシイソバレレートへの基質から生成物への変換を触媒するのに好適なポリペプチドには、約３００μＭ未満、約１００μＭ未満、約５０μＭ未満、約２５μＭ未満又は約１０μＭ未満のＮＡＤＨに対するK_Mを有するものが含まれる。

【０２７３】

一部の実施形態では、ＫＡＲＩはＮＡＤＰＨを利用する。ＮＡＤＰＨ消費を計測する方法は、当該技術分野において公知である。例えば、米国特許出願公開第２００８／０２６１２３０号明細書（これは全体として参照により本明細書に援用される）が、ＮＡＤＰＨ消費の計測方法を提供している。一部の実施形態では、ＮＡＤＰＨ消費アッセイは、アセトラクテートからα－β－ジヒドロキシ－イソバレレートへの酵素変換中における補因子ＮＡＤＰＨの消失を３４０ｎｍで計測する方法である。活性は、ＮＡＤＰＨについて６２２０$M^{-1}cm^{-1}$のモル吸光係数を用いて計算され、細胞抽出物における総タンパク量１ｍｇあたりに毎分消費されるＮＡＤＰＨのμモル数として報告される（Ａｕｌａｂａｕｇｈ　ａｎｄ　Ｓｃｈｌｏｓｓ，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　２９：２８２４－２８３０，１９９０を参照）。

【０２７４】

一部の実施形態では、ＫＡＲＩはＮＡＤＨの利用能を有する。一部の実施形態では、ＫＡＲＩは、嫌気性条件下でＮＡＤＨの利用能を有する。ＮＡＤＨを使用するＫＡＲＩ酵素については、例えば、米国特許出願公開第２００９／０１６３３７６号明細書（これは全体として参照により本明細書に援用される）に記載される。

【０２７５】

使用することのできるさらなる遺伝子が、当業者により、バイオインフォマティクスによって、又は当該技術分野で公知の方法を用いて同定され得る。

【０２７６】

さらに、参照により本明細書に援用される米国特許出願公開第２００７／００９２９５７　Ａ１号明細書には、キメラ遺伝子の構築並びに開示される生合成経路を用いたイソブタノール生成のための細菌及び酵母の遺伝子操作が記載される。

【０２７７】

用いられ得る１－ブタノール生成の生合成経路には、米国特許出願公開第２００８／０１８２３０８号明細書（これは参照により本明細書に援用される）に記載されるものが含

まれる。一実施形態において、１－ブタノール生合成経路は、以下の基質から生成物への変換を含む：
－ａ）アセチル－ＣｏＡからアセトアセチル－ＣｏＡへの変換、これは例えば、アセチル－ＣｏＡアセチルトランスフェラーゼにより触媒され得る；
－ｂ）アセトアセチル－ＣｏＡから３－ヒドロキシブチリル－ＣｏＡへの変換、これは例えば、３－ヒドロキシブチリル－ＣｏＡデヒドロゲナーゼにより触媒され得る；
－ｃ）３－ヒドロキシブチリル－ＣｏＡからクロトニル－ＣｏＡへの変換、これは例えば、クロトナーゼにより触媒され得る；
－ｄ）クロトニル－ＣｏＡからブチリル－ＣｏＡへの変換、これは例えば、ブチリル－ＣｏＡデヒドロゲナーゼにより触媒され得る；
－ｅ）ブチリル－ＣｏＡからブチルアルデヒドへの変換、これは例えば、ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼにより触媒され得る；及び、
－ｆ）ブチルアルデヒドから１－ブタノールへの変換、これは例えば、ブタノールデヒドロゲナーゼにより触媒され得る。

【０２７８】

用いられ得る２－ブタノール生成の生合成経路には、米国特許出願公開第２００７／０２５９４１０号明細書及び米国特許出願公開第２００９／０１５５８７０号明細書（これらは参照により本明細書に援用される）に記載されるものが含まれる。一実施形態において、２－ブタノール生合成経路は、以下の基質から生成物への変換を含む：
－ａ）ピルベートからα－アセトラクテートへの変換、これは例えば、アセト乳酸シンターゼにより触媒され得る；
－ｂ）α－アセトラクテートからアセトインへの変換、これは例えば、アセト乳酸デカルボキシラーゼにより触媒され得る；
－ｃ）アセトインから３－アミノ－２－ブタノールへの変換、これは例えば、アセトインアミナーゼ（ａｃｅｔｏｎｉｎ　ａｍｉｎａｓｅ）により触媒され得る；
－ｄ）３－アミノ－２－ブタノールから３－アミノ－２－ブタノールホスフェートへの変換、これは例えば、アミノブタノールキナーゼにより触媒され得る；
－ｅ）３－アミノ－２－ブタノールホスフェートから２－ブタノンへの変換、これは例えば、アミノブタノールリン酸ホスホリラーゼにより触媒され得る；及び、
－ｆ）２－ブタノンから２－ブタノールへの変換、これは例えば、ブタノールデヒドロゲナーゼにより触媒され得る。

【０２７９】

別の実施形態において、２－ブタノール生合成経路は、以下の基質から生成物への変換を含む：
－ａ）ピルベートからα－アセトラクテートへの変換、これは例えば、アセト乳酸シンターゼにより触媒され得る；
－ｂ）α－アセトラクテートからアセトインへの変換、これは例えば、アセト乳酸デカルボキシラーゼにより触媒され得る；
－ｃ）アセトインから２，３－ブタンジオールへの変換、これは例えば、ブタンジオールデヒドロゲナーゼにより触媒され得る；
－ｄ）２，３－ブタンジオールから２－ブタノンへの変換、これは例えば、ジオールデヒドラターゼ（ｄｉａｌ　ｄｅｈｙｄｒａｔａｓｅ）により触媒され得る；及び、
－ｅ）２－ブタノンから２－ブタノールへの変換、これは例えば、ブタノールデヒドロゲナーゼにより触媒され得る。

【０２８０】

本発明の一部の実施形態では、組換え宿主細胞は生合成経路を含む。生合成経路は、低下又は消失したアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性と、イソブタノール又は１－ブタノール生合成経路とを含むことができ、ここでこの経路は、ピルベートからアセトラクテートへの基質から生成物への変換を含む。一部の実施形態では、ピルベート（ｐｙｕｒｖａｔｅ）からアセトラクテート（ａｃｅｔｏｌａｃａｔａｔｅ）への変換能を有する生合成経路

を含む宿主細胞は、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ポリヌクレオチドを含む。例えば、生合成経路は、ブタノール生成経路又はブタンジオール生成経路であってもよい。生合成経路はまた、分枝鎖アミノ酸（例えば、ロイシン、イソロイシン、バリン）生成経路であってもよい。

【０２８１】

他の実施形態において、組換え宿主細胞は、本明細書に記載されるとおりのイソブタノール、１－ブタノール、又は２－ブタノール生合成経路を含むことができる。一部の実施形態では、ブタノール生合成経路はイソブタノール生合成経路である。本明細書に開示される組換え宿主細胞におけるイソブタノール又は２－ブタノールの生成は、アセト乳酸レダクターゼ活性の低下、実質的な消失又は消失によって利益を受け得る。

【０２８２】

修飾

ピルビン酸デカルボキシラーゼ遺伝子の機能欠失を用いることで、生合成生成物経路に利用されるピルベートの利用可能性が高められている。例えば、米国特許出願公開第２００７／００３１９５０　Ａ１号明細書（これは全体として参照により本明細書に援用される）は、１つ以上のピルビン酸デカルボキシラーゼ遺伝子の破壊及びＤ－乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の発現を含む酵母株を開示し、この酵母株はＤ－乳酸の生成に用いられる。米国特許出願公開第２００５／００５９１３６　Ａ１号明細書（これは全体として参照により本明細書に援用される）は、ピルビン酸デカルボキシラーゼ活性を有しないグルコース耐性二炭素源非依存性（ＧＣＳＩ）酵母株を開示し、この酵母株は外因性乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を有し得る。Ｎｅｖｏｉｇｔ　ａｎｄ　Ｓｔａｈｌ（Ｙｅａｓｔ　１２：１３３１－１３３７（１９９６））は、サッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）におけるピルビン酸デカルボキシラーゼの減少及びＮＡＤ依存性グリセロール－３－リン酸デヒドロゲナーゼの増加がグリセロール収率に及ぼす影響について記載している。米国特許出願公開第２００９／０３０５３６３号明細書（これは全体として参照により本明細書に援用される）は、サイトゾルに局在するアセト乳酸シンターゼが発現し、且つピルビン酸デカルボキシラーゼ活性が実質的に消失するように酵母を操作することによるピルベートからアセトラクテートへの変換の増加を開示している。

【０２８３】

本発明の実施形態において、本明細書に開示される組換え宿主細胞は、ピルビン酸デカルボキシラーゼ（ＰＤＣ）活性を有するポリペプチドをコードする内因性ポリヌクレオチドにおける修飾又はＰＤＣ活性を有する内因性ポリペプチドにおける修飾を含むことができる。実施形態において、本明細書に開示される組換え宿主細胞は、ＰＤＣをコードするポリヌクレオチド、遺伝子及び／又はポリペプチドの修飾又は破壊を有することができる。実施形態において、組換え宿主細胞は、ＰＤＣ活性を有するポリペプチドをコードする内因性ポリヌクレオチド若しくは遺伝子、又はＰＤＣ活性を有する内因性ポリペプチドに、欠失、突然変異、及び／又は置換を含む。かかる修飾、破壊、欠失、突然変異、及び／又は置換により、低下又は消失したＰＤＣ活性がもたらされ、それにより例えば、ＰＤＣノックアウト（ＰＤＣ－ＫＯ）表現型が引き起こされ得る。

【０２８４】

本発明の実施形態において、本明細書に開示される組換え宿主細胞の内因性ピルビン酸デカルボキシラーゼ活性は、ピルベートをアセトアルデヒドに変換し、アセトアルデヒドは次に、アセテートを経てエタノール又はアセチル－ＣｏＡに変換され得る。他の実施形態において、組換え宿主細胞は、ピルビン酸デカルボキシラーゼをコードする１つの遺伝子を含むクルイベロミセス・ラクチス（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ　ｌａｃｔｉｓ）、ピルビン酸デカルボキシラーゼをコードする１つの遺伝子を含むカンジダ・グラブラタ（Ｃａｎｄｉｄａ　ｇｌａｂｒａｔａ）、又はピルビン酸デカルボキシラーゼをコードする１つの遺伝子を含むシゾサッカロミセス・ポンベ（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｐｏｍｂｅ）である。

【０２８５】
他の実施形態において、組換え宿主細胞は、ＰＤＣ１、ＰＤＣ５、及びＰＤＣ６遺伝子によりコードされるピルビン酸デカルボキシラーゼの３つのアイソザイム、並びにピルビン酸デカルボキシラーゼ調節遺伝子ＰＤＣ２を含むサッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）である。Ｓ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）における非限定的な例では、ＰＤＣ１及びＰＤＣ５遺伝子、又はＰＤＣ１、ＰＤＣ５、及びＰＤＣ６遺伝子が、破壊される。Ｓ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）における別の非限定的な例では、ＰＤＣ２調節遺伝子を破壊することによりピルビン酸デカルボキシラーゼ活性を低下させ得る。Ｓ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）における別の非限定的な例では、ＰＤＣ１、ＰＤＣ２、ＰＤＣ５及び／又はＰＤＣ６と約７０％～約７５％、約７５％～約８０％、約８０％～約８５％、約８５％～約９０％、約９０％～約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、又は約９９％の配列同一性を有するものなどのピルビン酸デカルボキシラーゼタンパク質をコードするポリヌクレオチド又は遺伝子を破壊することができる。

【０２８６】
実施形態において、ＰＤＣ活性を有するポリペプチド、又はＰＤＣ活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド若しくは遺伝子は、ＥＣ番号ＥＣ　４．１．１．１に対応する。他の実施形態において、本明細書に開示される組換え宿主細胞のＰＤＣ遺伝子は、用いられる発酵条件下で不活性であり、従ってかかる遺伝子は修飾又は不活性化する必要がない。

【０２８７】
ピルビン酸デカルボキシラーゼコード遺伝子の破壊によってピルビン酸デカルボキシラーゼ活性が低下した組換え宿主細胞の例が、例えば、サッカロミセス属（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）についてＦｌｉｋｗｅｅｒｔ　ｅｔ　ａｌ．（Ｙｅａｓｔ（１９９６）１２：２４７－２５７）に、クルイベロミセス属（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ）についてＢｉａｎｃｈｉ　ｅｔ　ａｌ．（Ｍｏｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．（１９９６）１９（１）：２７－３６）に、及び調節遺伝子の破壊がＨｏｈｍａｎｎ（Ｍｏｌ．Ｇｅｎ．Ｇｅｎｅｔ．（１９９３）２４１：６５７－６６６）に報告されている。ピルビン酸デカルボキシラーゼ活性を有しないサッカロミセス属（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）の株は、ＡＴＣＣから受託番号２０００２７及び２０００２８により入手可能である。本明細書に開示される組換え宿主細胞における修飾又は不活性化の標的とし得るＰＤＣポリヌクレオチド、遺伝子及び／又はポリペプチドの例としては、限定はされないが、以下の表８のものが挙げられる。

【０２８８】

【表１２】

表 8. ピルビン酸デカルボキシラーゼ標的遺伝子コード領域及びタンパク質

説明	配列番号 核酸	配列番号 アミノ酸
*サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)*由来の *PDC1* ピルビン酸デカルボキシラーゼ	648	649
*サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)*由来の *PDC5* ピルビン酸デカルボキシラーゼ	650	651
*サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)*由来の *PDC6* ピルビン酸デカルボキシラーゼ	652	653
*カンジダ・グラブラタ (Candida glabrata)*由来のピルビン酸デカルボキシラーゼ	654	655
*ピキア・スチピチス (Pichia stipitis)*由来の *PDC1* ピルビン酸デカルボキシラーゼ	656	657
*ピキア・スチピチス (Pichia stipitis)*由来の *PDC2* ピルビン酸デカルボキシラーゼ	658	659
*クルイベロミセス・ラクチス (Kluyveromyces lactis)*由来のピルビン酸デカルボキシラーゼ	660	661
*ヤロウイア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica)*由来のピルビン酸デカルボキシラーゼ	662	663
*シゾサッカロミセス・ポンベ (Schizosaccharomyces pombe)*由来の ピルビン酸デカルボキシラーゼ	664	665
*ザイゴサッカロミセス・ロウキシイ (Zygosaccharomyces rouxii)*由来の ピルビン酸デカルボキシラーゼ	666	667

【０２８９】

本明細書に開示される組換え宿主細胞における修飾又は不活性化の標的とし得るＰＤＣポリヌクレオチド、遺伝子及びポリペプチドの他の例としては、限定はされないが、表８の配列のいずれか一つと少なくとも約７０％～約７５％、約７５％～約８０％、約８０％～約８５％、約８５％～約９０％、約９０％～約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、又は約９９％の配列同一性を有するＰＤＣポリヌクレオチド、遺伝子及び／又はポリペプチドが挙げられ、ここでかかるポリヌクレオチド又は遺伝子はＰＤＣ活性をコードし、又はかかるポリペプチドはＰＤＣ活性を有する。本明細書に開示される組換え宿主細胞における修飾又は不活性化の標的とし得るＰＤＣポリヌクレオチド、遺伝子及びポリペプチドのさらに他の例としては、限定はされないが、表８の配列のいずれか一つの活性変異体、断片又は誘導体が挙げられ、ここでかかるポリヌクレオチド又は遺伝子はＰＤＣ活性をコードし、又はかかるポリペプチドはＰＤＣ活性を有する。

【０２９０】

実施形態において、本明細書に開示される又は当該技術分野において公知のＰＤＣ配列をコードするポリヌクレオチド、遺伝子及び／又はポリペプチドは、アルデヒドデヒドロゲナーゼについて上記に開示されるとおり修飾することができる。他の実施形態において、ＰＤＣをコードするポリヌクレオチド、遺伝子及び／又はポリペプチドを使用して、アセト乳酸デヒドロゲナーゼについて上記に開示されるとおり、別のＰＤＣポリヌクレオチド、遺伝子及び／又はポリペプチド配列を同定し、又は他の細胞におけるＰＤＣ相同体を同定することができる。かかるＰＤＣコード配列は、例えば、文献及び／又は当業者に公知のバイオインフォマティクスデータベースにおいて同定することができる。例えば、バイオインフォマティクスを用いた他の細胞型におけるＰＤＣコード配列の同定は、本明細書に提供されるものなどの、既知のＰＤＣコードＤＮＡ及びポリペプチド配列による公的に利用可能なデータベースのＢＬＡＳＴ（上記に記載したとおり）検索によって達成することができる。同一性は、ギャップペナルティ＝１０、ギャップ長ペナルティ＝０．１、及びＧｏｎｎｅｔ　２５０シリーズのタンパク質重み行列のデフォルトパラメータを使用するＣｌｕｓｔａｌ　Ｗアラインメント法に基づく。

【０２９１】

ＰＤＣ活性を低下又は消失させるための本明細書に開示される組換え宿主細胞におけるＰＤＣの修飾は、当該技術分野において公知の方法を用いて確認することができる。例えば、特定のピルビン酸デカルボキシラーゼの破壊は、遺伝子配列に対して外部のプライマーを使用するＰＣＲスクリーニングで、又はピルビン酸デカルボキシラーゼ遺伝子配列に対して設計されたプローブを使用するサザンブロットにより、確認してもよい。或いは、ガスクロマトグラフィー又はＨＰＬＣなどの分析方法を利用して、アセトアルデヒド及び／又はエタノール生成の減少又は消失について株をスクリーニングすることもできる。

【０２９２】

ヘキソキナーゼ２遺伝子の機能欠失を用いることで、グルコース抑制が低減し、生合成経路に利用されるピルベートの利用可能性が高められている。例えば、国際公開第２０００／０６１７２２　Ａ１号パンフレット（これは全体として参照により本明細書に援用される）は、１つ以上の機能を欠失させたヘキソキナーゼ２遺伝子又は類似体を有する好気的に成長する酵母による酵母バイオマスの生成を開示している。加えて、Ｒｏｓｓｅｌｌ　ｅｔ　ａｌ．（Ｙｅａｓｔ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　８：１５５－１６４（２００８））は、ヘキソキナーゼ２遺伝子が欠失したサッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）が、糖過剰及び嫌気性条件下における二酸化炭素生成の比速度として定義される発酵能の７５％の低下を示したことを見出した。飢餓後、発酵能はヘキソキナーゼ２遺伝子欠失を有しない株と同様であった。Ｄｉｄｅｒｉｃｈ　ｅｔ　ａｌ．（Ａｐｐｌｉｅｄ　ａｎｄ　Ｅｎｖｉｒｏｎｍｅｎｔａｌ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ　６７：１５８７－１５９３（２００１））は、ヘキソキナーゼ２遺伝子が欠失したＳ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）ではピルビン酸デカルボキシラーゼ活性が低下したことを見出した。

【０２９３】

実施形態において、本明細書に開示される組換え宿主細胞は、ヘキソキナーゼ２活性を有するポリペプチドをコードする内因性ポリヌクレオチドの修飾及び／又はヘキソキナーゼ２活性を有するポリペプチドの修飾を含むことができる。実施形態において、本明細書に開示される組換え宿主細胞は、ヘキソキナーゼ２をコードするポリヌクレオチド、遺伝子又はポリペプチドの修飾又は破壊を有し得る。実施形態において、組換え宿主細胞は、ヘキソキナーゼ２活性を有するポリペプチドをコードする内因性ポリヌクレオチド又は遺伝子に、又はヘキソキナーゼ２活性を有する内因性ポリペプチドに、欠失、突然変異、及び／又は置換を含む。かかる修飾、破壊、欠失、突然変異、及び／又は置換により、低下又は消失したヘキソキナーゼ２活性がもたらされ、それにより例えば、ヘキソキナーゼ２ノックアウト（ＨＸＫ２－ＫＯ）表現型もたらされ得る。実施形態において、宿主細胞は、米国特許出願公開第２０１１／０１２４０６０　Ａ１号明細書又は同第２０１２／００１５４１６　Ａ１号明細書（これらは全体として参照により本明細書に援用される）に記載されるとおりの修飾を含む。

【０２９４】

実施形態において、ヘキソキナーゼ２活性を有するポリペプチドは、ヘキソースからヘキソース－６－ホスフェートへの変換を触媒することができ、及び／又はＤ－グルコースからＤ－グルコース６－ホスフェート、Ｄ－フルクトースからフルクトース６－ホスフェート、及び／又はＤ－マンノースからＤ－マンノース６－ホスフェートへの変換を触媒することができる。他の実施形態において、ヘキソキナーゼ２活性を有するポリヌクレオチド、遺伝子又はポリペプチドは、ＥＣ番号ＥＣ　２．７．１．１に対応し得る。

【０２９５】

本発明の実施形態において、組換え宿主細胞はＳ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）であってよく、ヘキソキナーゼ２活性を有するポリヌクレオチド、遺伝子又はポリペプチドはＨＸＫ２であり得る。他の実施形態において、組換え宿主細胞はＫ．ラクチス（Ｋ．ｌａｃｔｉｓ）であってよく、ヘキソキナーゼ２活性を有するポリヌクレオチド、遺伝子又はポリペプチドはＲＡＧ５であり得る。他の実施形態において、組換え宿主細胞はＨ．ポリモルファ（Ｈ．ｐｏｌｙｍｏｒｐｈａ）であってよく、ヘキソキナーゼ２活性

を有するポリヌクレオチド、遺伝子又はポリペプチドはＨＰＧＬＫ１であり得る。他の実施形態において、組換え宿主細胞はＳ．ポンベ（Ｓ．ｐｏｍｂｅ）であってよく、ヘキソキナーゼ２活性を有するポリヌクレオチド、遺伝子又はポリペプチドはＨＸＫ２であり得る。

【０２９６】

本明細書に開示される組換え宿主細胞における修飾又は不活性化の標的とし得るヘキソキナーゼ２ポリヌクレオチド、遺伝子及びポリペプチドの例としては、限定はされないが、以下の表９のものが挙げられる。

【０２９７】

【表１３】

表 9. ヘキソキナーゼ 2 標的遺伝子コード領域及びタンパク質

S.セレビシエ (S. cerevisiae) 由来の *HXK2*	核酸 (配列番号 668)
	アミノ酸 (配列番号 669)
K.ラクチス (K. lactis) 由来の *RAG5*	核酸 (配列番号 670):
	アミノ酸 (配列番号 671):
H.ポリモルファ (H. polymorpha) 由来の *HPGLK1*	核酸 (配列番号 672)
	アミノ酸 (配列番号 673)
S.ポンベ (S. pombe) 由来の *HXK2*	核酸 (配列番号 674):
	アミノ酸 (配列番号 675):

【０２９８】

本明細書に開示される組換え宿主細胞における修飾又は不活性化の標的とし得るヘキソキナーゼ２ポリヌクレオチド、遺伝子及びポリペプチドの他の例としては、限定はされないが、表９の配列のいずれか一つと少なくとも約７０％～約７５％、約７５％～約８０％、約８０％～約８５％、約８５％～約９０％、約９０％～約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、又は約９９％の配列同一性を有するヘキソキナーゼ２ポリヌクレオチド、遺伝子及び／又はポリペプチドが挙げられ、ここでかかるポリヌクレオチド又は遺伝子はヘキソキナーゼ２活性をコードし、又はかかるポリペプチドはヘキソキナーゼ２活性を有する。本明細書に開示される組換え宿主細胞における修飾又は不活性化の標的とし得るヘキソキナーゼ２ポリヌクレオチド、遺伝子及びポリペプチドのさらに他の例としては、限定はされないが、表９の配列のいずれか一つの活性変異体、断片又は誘導体が挙げられ、ここでかかるポリヌクレオチド又は遺伝子はヘキソキナーゼ２活性をコードし、又はかかるポリペプチドはヘキソキナーゼ２活性を有する。

【０２９９】

実施形態において、本明細書に開示される又は当該技術分野において公知のヘキソキナーゼ２配列をコードするポリヌクレオチド、遺伝子及び／又はポリペプチドは、アルデヒドデヒドロゲナーゼについて上記に開示されるとおり、修飾又は破壊することができる。他の実施形態において、ヘキソキナーゼ２をコードするポリヌクレオチド、遺伝子及び／又はポリペプチドを使用して、アルデヒドデヒドロゲナーゼについて上記に開示されるとおり、別のヘキソキナーゼ２ポリヌクレオチド、遺伝子及び／又はポリペプチド配列を同定し、又は他の細胞におけるヘキソキナーゼ２相同体を同定することができる。かかるヘキソキナーゼ２コード配列は、例えば、文献及び／又は当業者に公知のバイオインフォマティクスデータベースにおいて同定することができる。例えば、バイオインフォマティク

スを用いた他の細胞型におけるヘキソキナーゼ２コード配列の同定は、本明細書に提供されるものなどの、既知のヘキソキナーゼ２コードＤＮＡ及びポリペプチド配列により公的に利用可能なデータベースのＢＬＡＳＴ（上記に記載したとおり）検索によって達成することができる。同一性は、ギャップペナルティ＝１０、ギャップ長ペナルティ＝０．１、及びＧｏｎｎｅｔ　２５０シリーズのタンパク質重み行列のデフォルトパラメータを使用するＣｌｕｓｔａｌ　Ｗアラインメント法に基づく。

【０３００】

ヘキソキナーゼ２活性を低下又は消失させるための本明細書に開示される組換え宿主細胞におけるヘキソキナーゼ２の修飾は、当該技術分野において公知の方法を用いて確認することができる。例えば、ヘキソキナーゼ２の破壊は、ヘキソキナーゼ２遺伝子に対して外部のプライマーを使用するＰＣＲスクリーニングで、又はヘキソキナーゼ２遺伝子配列に対して設計されたプローブを使用するサザンブロットにより、確認してもよい。或いは、推定ヘキソキナーゼ２ノックアウト株を、グルコース含有培地でのバイオマス収率の増加について調べることもできる。

【０３０１】

本明細書に提供される細胞において有用であり得るさらなる修飾の例には、米国特許出願公開第２００９／０３０５３６３号明細書（参照により本明細書に援用される）に記載されるとおりの、グリセロール－３－リン酸デヒドロゲナーゼ活性を低下させる修飾及び／又はピルビン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少なくとも１つの遺伝子における破壊若しくはピルビン酸デカルボキシラーゼ遺伝子発現を制御する調節エレメントをコードする少なくとも１つの遺伝子における破壊、米国特許出願公開第２０１０／０１２０１０５号明細書（参照により本明細書に援用される）に記載されるとおりの、エントナードウドロフ経路を通る炭素フラックスの増加又は還元当量バランスを提供する宿主細胞に対する修飾が含まれる。他の修飾には、国際公開第２０１２／０３３８３２号パンフレット（これは全体として参照により本明細書に援用される）に記載されるピルベート利用生合成経路におけるステップを触媒するポリペプチドをコードする少なくとも１つのポリヌクレオチドの組み込みが含まれる。酵母生成宿主細胞がｐｄｃ－であるグルコース抑制の低減効果を有する遺伝子修飾が、米国特許出願公開第２０１１／０１２４０６０号明細書（これは全体として参照により本明細書に援用される）に記載される。

【０３０２】

米国特許出願公開第２０１２００６４５６１Ａ１号明細書（これは参照により本明細書に援用される）は、（ａ）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少なくとも１つの異種ポリヌクレオチド；及び（ｂ）（ｉ）Ｆｅ－Ｓクラスター生合成に影響を与えるポリペプチドをコードする内因性遺伝子における少なくとも１つの欠失、突然変異、及び／又は置換；及び／又は（ｉｉ）Ｆｅ－Ｓクラスター生合成に影響を与えるポリペプチドをコードする少なくとも１つの異種ポリヌクレオチドを含む組換え宿主細胞を開示している。実施形態において、Ｆｅ－Ｓクラスター生合成に影響を与えるポリペプチドは、ＡＦＴ１、ＡＦＴ２、ＦＲＡ２、ＧＲＸ３、又はＣＣＣ１によりコードされる。実施形態において、Ｆｅ－Ｓクラスター生合成に影響を与えるポリペプチドは、構成的突然変異体ＡＦＴ１　Ｌ９９Ａ、ＡＦＴ１　Ｌ１０２Ａ、ＡＦＴ１　Ｃ２９１Ｆ、又はＡＦＴ１　Ｃ２９３Ｆである。

【０３０３】

加えて、宿主細胞は、ホスホケトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種ポリヌクレオチド及び／又はホスホトランスアセチラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種ポリヌクレオチド、例えば、配列番号９６２及び９６３によりコードされる異種ポリペプチド、及び国際公開第２０１１／１５９８５３号パンフレット（これは全体として参照により本明細書に援用される）に記載されるとおりの異種ポリペプチドなどを含むことができる。

【０３０４】

イソブタノール及び他の生成物

本発明の実施形態では、生合成経路の生成物の生成方法が提供され、この方法は、（ａ）本明細書に開示される組換え宿主細胞を提供するステップと；（ｂ）生合成経路の生成物が生成される条件下で宿主細胞を成長させるステップとを含む。他の実施形態において、生成物は、エタノールと共に同時生成物として生成される。さらに他の実施形態において、生合成経路の生成物はイソブタノールである。

【０３０５】

本発明の他の実施形態において、生合成経路の生成物は、低下又は消失したアルデヒドデヒドロゲナーゼ及び／又はアルデヒドオキシダーゼ活性及び／又はアセト乳酸レダクターゼ活性を含まない組換え宿主細胞における同じ生成物の生成と比較してより高収率で又はより多量に生成される。実施形態において、収率は、少なくとも約２％、少なくとも約５％又は少なくとも約１０％増加する。実施形態において、このより高い収率は、理論値の約１０％より高い収率、理論値の約２０％より高い収率、理論値の約２５％より高い収率、理論値の約３０％より高い収率、理論値の約４０％より高い収率、理論値の約５０％より高い収率、理論値の約６０％より高い収率、理論値の約７０％より高い収率、理論値の約７５％より高い収率、理論値の約８０％より高い収率、理論値の約８５％より高い収率、理論値の約９０％より高い収率、理論値の約９５％より高い収率、理論値の約９６％より高い収率、理論値の約９７％より高い収率、理論値の約９８％より高い収率、理論値の約９９％より高い収率、又は理論値の約１００％の収率での生成を含む。他の実施形態において、生成物は、エタノールと共に同時生成物として生成される。さらに他の実施形態において、生合成経路の生成物はイソブタノールである。

【０３０６】

アルデヒドデヒドロゲナーゼ及び／又はアルデヒドオキシダーゼ活性の記載される修飾を有する本明細書に開示される組換え宿主細胞では、イソブチルアルデヒドからイソ酪酸への変換を有する生合成経路の経路副生成物としての任意の生成物がより高い有効性で生成され得る。かかる生成物のリストには、限定はされないが、イソブタノールが含まれる。

【０３０７】

イソブタノール生成用の微生物宿主

イソブタノール生成用の微生物宿主は、細菌、シアノバクテリア、糸状菌及び酵母から選択することができる。ブタノール生成に用いられる微生物宿主は、収率がブタノール毒性によって制限されることのないように、イソブタノールに耐性を有しなければならない。ブタノール耐性突然変異体がソルベント生成クロストリジウムから単離されているが、他の潜在的に有用な細菌株のブタノール耐性に関しては、利用可能な情報はほとんどない。細菌におけるアルコール耐性の比較に関する研究の多くが、ブタノールの毒性がエタノールより高いことを示唆しており（ｄｅ Ｃａｖａｌｈｏ，ｅｔ ａｌ．，Ｍｉｃｒｏｓｃ．Ｒｅｓ．Ｔｅｃｈ．，６４：２１５－２２，２００４）及び（Ｋａｂｅｌｉｔｚ，ｅｔ ａｌ．，ＦＥＭＳ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｌｅｔｔ．，２２０：２２３－２２７，２００３、Ｔｏｍａｓ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．，１８６：２００６－２０１８，２００４）は、クロストリジウム・アセトブチリカム（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ａｃｅｔｏｂｕｔｙｌｉｃｕｍ）における発酵中の１－ブタノールの収率が１－ブタノールの毒性によって制限され得ることを報告している。クロストリジウム・アセトブチリカム（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ａｃｅｔｏｂｕｔｙｌｉｃｕｍ）に対する１－ブタノールの一次的な効果は、膜機能の破壊である（Ｈｅｒｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ａｐｐｌ．Ｅｎｖｉｒｏｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，５０：１２３８－１２４３，１９８５）。

【０３０８】

イソブタノールの生成用に選択する微生物宿主は、イソブタノールに耐性を有しなければならず、且つ炭水化物をイソブタノールに変換する能力を有しなければならない。好適な微生物宿主の選択基準としては、以下が挙げられる：イソブタノールに対する固有の耐性、高いグルコース利用率、遺伝子操作用の遺伝学的ツールの利用可能性、及び安定な染

色体改変を生じる能力。

【０３０９】

イソブタノール耐性を有する好適な宿主株は、株の固有の耐性に基づきスクリーニングすることによって同定することができる。イソブタノールに対する微生物の固有の耐性は、最少培地で成長させたとき成長速度の５０％の阻害をもたらすイソブタノールの濃度（IC_{50}）を決定することによって計測できる。IC_{50}値は、当該技術分野において公知の方法を用いて決定することができる。例えば、目的の微生物を様々な量のイソブタノールの存在下で成長させ、６００ナノメートルでの光学濃度を計測して成長速度をモニタしてもよい。成長曲線の対数期部分から倍加時間を計算し、それを成長速度の尺度として用いることができる。イソブタノール濃度に対する成長阻害率のグラフから、５０％の成長阻害を生じるイソブタノールの濃度を決定することができる。一実施形態において、宿主株は約０．５％より高いイソブタノールに対するIC_{50}を有する。

【０３１０】

イソブタノール生成用の微生物宿主はまた、グルコースを高率で利用しなければならない。多くの微生物が炭水化物の代謝能を有する。しかしながら、特定の環境微生物は炭水化物を高い効率まで代謝することができず、従って好適な宿主ではない。

【０３１１】

宿主を遺伝子修飾する能力は、任意の組換え微生物の産生に必須である。遺伝子移入技術の方式は、電気穿孔、接合、形質導入又は自然形質転換によってもよい。広範な宿主接合性プラスミド及び薬剤耐性マーカーが利用可能である。クローニングベクターは、宿主微生物に対して、当該の宿主で機能し得る抗生物質耐性マーカーの性質に基づき適合される。

【０３１２】

微生物宿主はまた、炭素フローが競合する経路を不活性化するために、様々な遺伝子を欠失させて操作される必要がある。これには、不活性化を誘導するためのトランスポゾン又は染色体組込みベクターのいずれかを利用可能であることが必要である。加えて、生成宿主は、固有のイソブタノール耐性を改良する突然変異を達成することができるように、化学的突然変異生成を起こし易いものでなければならない。

【０３１３】

上記に記載される基準に基づけば、イソブタノールの生成に好適な微生物宿主としては、限定はされないが、クロストリジウム属（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ）、ザイモモナス属（Ｚｙｍｏｍｏｎａｓ）、大腸菌属（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ）、サルモネラ属（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ）、ロドコッカス属（Ｒｈｏｄｏｃｏｃｃｕｓ）、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）、バチルス属（Ｂａｃｉｌｌｕｓ）、ビブリオ属（Ｖｉｂｒｉｏ）、ラクトバチルス属（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ）、エンテロコッカス属（Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ）、アルカリゲネス属（Ａｌｃａｌｉｇｅｎｅｓ）、クレブシエラ属（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ）、パエニバチルス属（Ｐａｅｎｉｂａｃｉｌｌｕｓ）、アルスロバクター属（Ａｒｔｈｒｏｂａｃｔｅｒ）、コリネバクテリウム属（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、ブレビバクテリウム属（Ｂｒｅｖｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ）、ピキア属（Ｐｉｃｈｉａ）、カンジダ属（Ｃａｎｄｉｄａ）、イサチェンキア属（Ｉｓｓａｔｃｈｅｎｋｉａ）、ハンゼヌラ属（Ｈａｎｓｅｎｕｌａ）、クルイベロミセス属（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ）、及びサッカロミセス属（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）のメンバーが挙げられる。好適な宿主としては、以下が挙げられる：大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）、アルカリゲネス・ユートロフス（Ａｌｃａｌｉｇｅｎｅｓ ｅｕｔｒｏｐｈｕｓ）、バチルス・リケニホルミス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓ）、パエニバチルス・マセランス（Ｐａｅｎｉｂａｃｉｌｌｕｓ ｍａｃｅｒａｎｓ）、ロドコッカス・エリスロポリス（Ｒｈｏｄｏｃｏｃｃｕｓ ｅｒｙｔｈｒｏｐｏｌｉｓ）、シュードモナス・プチダ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｐｕｔｉｄａ）、ラクトバチルス・プランタルム（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｐｌａｎｔａｒｕｍ）、エンテロコッカス・フェシウム（Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ ｆａｅｃｉｕｍ）、エンテロコッカス・ガ

リナルム（Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ ｇａｌｌｉｎａｒｉｕｍ）、エンテロコッカス・フェカリス（Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ ｆａｅｃａｌｉｓ）、枯草菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ）及びサッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）。一部の実施形態では、宿主細胞はサッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）である。Ｓ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）酵母は、当該技術分野において周知されており、限定はされないが、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ）（Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤ）、Ｃｅｎｔｒａａｌｂｕｒｅａｕ ｖｏｏｒ Ｓｃｈｉｍｍｅｌｃｕｌｔｕｒｅｓ（ＣＢＳ）Ｆｕｎｇａｌ Ｂｉｏｄｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｃｅｎｔｒｅ、ＬｅＳａｆｆｒｅ、Ｇｅｒｔ Ｓｔｒａｎｄ ＡＢ、Ｆｅｒｍ Ｓｏｌｕｔｉｏｎｓ、Ｎｏｒｔｈ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｂｉｏｐｒｏｄｕｃｔｓ、Ｍａｒｔｒｅｘ、及びＬａｌｌｅｍａｎｄを含む様々なソースから利用可能である。Ｓ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）としては、限定はされないが、ＢＹ４７４１、ＣＥＮ．ＰＫ １１３－７Ｄ、Ｅｔｈａｎｏｌ Ｒｅｄ（登録商標）酵母、Ｆｅｒｍ Ｐｒｏ（商標）酵母、Ｂｉｏ－Ｆｅｒｍ（登録商標）ＸＲ酵母、Ｇｅｒｔ Ｓｔｒａｎｄ Ｐｒｅｓｔｉｇｅ Ｂａｔｃｈ Ｔｕｒｂｏアルコール酵母、Ｇｅｒｔ Ｓｔｒａｎｄ Ｐｏｔ Ｄｉｓｔｉｌｌｅｒｓ酵母、Ｇｅｒｔ Ｓｔｒａｎｄ Ｄｉｓｔｉｌｌｅｒｓ Ｔｕｒｂｏ酵母、ＦｅｒＭａｘ（商標）Ｇｒｅｅｎ酵母、ＦｅｒＭａｘ（商標）Ｇｏｌｄ酵母、Ｔｈｅｒｍｏｓａｃｃ（登録商標）酵母、ＢＧ－１、ＰＥ－２、ＣＡＴ－１、ＣＢＳ７９５９、ＣＢＳ７９６０、及びＣＢＳ７９６１が挙げられる。

【０３１４】

生成宿主の構築

発酵性炭素基質をブタノールに変換する酵素経路をコードし得る必要な遺伝子を含む組換え微生物を、当該技術分野において公知の技法を用いて構築することができる。本発明では、本発明のイソブタノール生合成経路の一つの酵素、例えば、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、アセトヒドロキシ酸デヒドラターゼ、分枝鎖α－ケト酸デカルボキシラーゼ、及び分枝鎖アルコールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を、上記に記載したとおり、様々な供給源から単離することができる。

【０３１５】

ゲノムから所望の遺伝子を得る方法は、分子生物学分野において一般的で、周知されている。例えば、遺伝子の配列が分かっている場合、制限エンドヌクレアーゼ消化により好適なゲノムライブラリを作成することができ、所望の遺伝子配列と相補的なプローブでスクリーニングすることができる。配列が単離されると、ポリメラーゼ連鎖反応（米国特許第４，６８３，２０２号明細書）などの標準的なプライマー誘導増幅法を用いてＤＮＡを増幅することにより、適切なベクターを使用する形質転換に好適な量のＤＮＡを得ることができる。異種宿主における発現のためのコドン最適化ツールは、容易に利用可能である。一部のコドン最適化ツールは、宿主微生物のＧＣ含量に基づき利用可能である。

【０３１６】

関連する経路遺伝子が同定され、単離された後、それらの遺伝子は、当該技術分野において公知の手段によって好適な発現宿主に形質転換することができる。様々な宿主細胞の形質転換に有用なベクター又はカセットは一般的であり、ＥＰＩＣＥＮＴＲＥ（登録商標）（Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐ．（Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）、Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ（Ｌａ Ｊｏｌｌａ，ＣＡ）、及びＮｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ ＢｉｏＬａｂｓ，Ｉｎｃ．（Ｂｅｖｅｒｌｙ，ＭＡ）などの会社から市販されている。典型的にはベクター又はカセットは、関連する遺伝子の転写及び翻訳を誘導する配列、選択可能なマーカー、及び自己複製又は染色体への組込みを可能にする配列を含む。好適なベクターは、転写開始制御を含む遺伝子の領域５’及び転写終結を制御するＤＮＡ断片の領域３’を含む。いずれの制御領域も形質転換宿主細胞と相同の遺伝子に由来し得るが、かかる制御領域はまた、生成宿主として選択される特定の種にとって天然でない遺伝子に由来してもよいことが理解されるべきである。

【０３１７】
所望の宿主細胞において関連する経路コード領域の発現を駆動するのに有用な開始制御領域又はプロモーターは多数あり、当業者は精通している。事実上、これらの遺伝エレメントを駆動することが可能な任意のプロモーターが、本実施例で用いるものを含め、本発明に好適であり、限定はされないが、ＣＹＣ１、ＨＩＳ３、ＧＡＬ１、ＧＡＬ１０、ＡＤＨ１、ＰＧＫ、ＰＨＯ５、ＧＡＰＤＨ、ＡＤＣ１、ＴＲＰ１、ＵＲＡ３、ＬＥＵ２、ＥＮＯ、ＴＰＩ（サッカロミセス属（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）における発現に有用）；ＡＯＸ１（ピキア属（Ｐｉｃｈｉａ）における発現に有用）；及びｌａｃ、ａｒａ、ｔｅｔ、ｔｒｐ、lP_L、lP_R、Ｔ７、ｔａｃ、及びｔｒｃ（大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）、アルカリゲネス属（Ａｌｃａｌｉｇｅｎｅｓ）、及びシュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）における発現に有用）並びに枯草菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｕｂｔｉｌｉｓ）、バチルス・リケニホルミス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓ）、及びパエニバチルス・マセランス（Ｐａｅｎｉｂａｃｉｌｌｕｓ　ｍａｃｅｒａｎｓ）における発現に有用なａｍｙ、ａｐｒ、ｎｐｒプロモーター及び様々なファージプロモーターが挙げられる。酵母組換え宿主細胞には、遺伝子用の発現カセットの構築に数多くのプロモーターを使用することができ、限定はされないが、酵母における使用に好適な以下の構成的プロモーター：ＦＢＡ１、ＴＤＨ３（ＧＰＤ）、ＡＤＨ１、ＩＬＶ５、及びＧＰＭ１；及び酵母における使用に好適な以下の誘導性プロモーター：ＧＡＬ１、ＧＡＬ１０、ＯＬＥ１、及びＣＵＰ１が挙げられる。他の酵母プロモーターとしては、ハイブリッドプロモーターＵＡＳ（ＰＧＫ１）－ＦＢＡ１ｐ（配列番号４０６）、ＵＡＳ（ＰＧＫ１）－ＥＮＯ２ｐ（配列番号５３８）、ＵＡＳ（ＦＢＡ１）－ＰＤＣ１ｐ（配列番号５３９）、ＵＡＳ（ＰＧＫ１）－ＰＤＣ１ｐ（配列番号５４０）、及びＵＡＳ（ＰＧＫ）－ＯＬＥ１ｐ（配列番号５４１）が挙げられる。

【０３１８】
プロモーター、転写ターミネーター、及びコード領域は、酵母２ミクロンプラスミドにクローニングし、酵母細胞に形質転換することができる（Ｌｕｄｗｉｇ，ｅｔ　ａｌ．Ｇｅｎｅ，１３２：３３－４０，１９９３；米国特許出願公開第２００８０２６１８６１Ａ１号明細書）。

【０３１９】
所与の宿主における遺伝子発現量の調整は、天然又は人工プロモーターの選択によるなど、転写レベルを変化させることで達成し得る。加えて、プロモーターライブラリを使用して所望の遺伝子転写レベルを達成するなどの技法が、当該技術分野において公知である。かかるライブラリは、当該技術分野において公知の技法を用いて、例えば、遺伝子カセットの前にランダムなｃＤＮＡ断片をクローニングすることによるか（Ｇｏｈ　ｅｔ　ａｌ．（２００２）ＡＥＭ　９９，１７０２５）、プロモーター内に存在する調節配列を調節することによるか（Ｌｉｇｒ　ｅｔ　ａｌ．（２００６）Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　１７２，２１１３）、又は既知のプロモーター配列の突然変異生成により（Ａｌｐｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（２００５）ＰＮＡＳ，１２６７８；Ｎｅｖｏｉｇｔ　ｅｔ　ａｌ．（２００６）ＡＥＭ　７２，５２６６）、作成することができる。

【０３２０】
終結制御領域もまた、宿主にとって天然の様々な遺伝子に由来し得る。場合により、終結部位は不要であることもあり、又は含まれることもある。

【０３２１】
特定のベクターは、広範な宿主細菌における複製能を有し、且つ接合によって移すことができる。ｐＲＫ４０４の完全なアノテートされた配列並びに３つの関連するベクターｐＲＫ４３７、ｐＲＫ４４２、及びｐＲＫ４４２（Ｈ）が利用可能である。これらの誘導体は、グラム陰性菌における遺伝子操作に有益なツールであることが分かっている（Ｓｃｏｔｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｌａｓｍｉｄ，５０：７４－７９，２００３）。広宿主域のＩｎｃ　Ｐ４プラスミドＲＳＦ１０１０のいくつかのプラスミド誘導体もまた、様々なグラム陰性菌において機能し得るプロモーターを伴い利用可能である。プラスミドｐＡＹＣ３６

及びｐＡＹＣ３７は、グラム陰性菌における異種遺伝子発現を可能にする多重クローニング部位と共に活性プロモーターを有する。

【０３２２】

染色体遺伝子置換ツールもまた広く利用可能である。例えば、広宿主域レプリコンｐＷＶ１０１の温度感受性変異体を修飾することによりプラスミドｐＶＥ６００２が構築されており、これを用いると、様々なグラム陽性菌に遺伝子置換を生じさせることができる（Ｍａｇｕｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．，１７４：５６３３－５６３８，１９９２）。加えて、インビトロのトランスポソーム（ｔｒａｎｓｐｏｓｏｍｅ）が、ＥＰＩＣＥＮＴＲＥ（登録商標）などの商業的供給元から様々なゲノムにおけるランダム突然変異の作成に利用可能である。

【０３２３】

様々な微生物宿主におけるブタノール生合成経路の発現を、以下にさらに詳細に記載する。

【０３２４】

大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）におけるブタノール生合成経路の発現

大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）の形質転換に有用なベクター又はカセットは一般的であり、上記に列挙した会社から市販されている。例えば、イソブタノール生合成経路の遺伝子は、様々な供給源から単離し、修飾ｐＵＣ１９ベクターにクローニングして、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ＮＭ５２２に形質転換することができる。

【０３２５】

ロドコッカス・エリスロポリス（Ｒｈｏｄｏｃｏｃｃｕｓ　ｅｒｙｔｈｒｏｐｏｌｉｓ）におけるブタノール生合成経路の発現

一連の大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）－ロドコッカス属（Ｒｈｏｄｏｃｏｃｃｕｓ）シャトルベクターが、Ｒ．エリスロポリス（Ｒ．ｅｒｙｔｈｒｏｐｏｌｉｓ）における発現に利用可能であり、限定はされないが、ｐＲｈＢＲ１７及びｐＤＡ７１（Ｋｏｓｔｉｃｈｋａ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｐｐｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，６２：６１－６８，２００３）が挙げられる。加えて、一連のプロモーターが、Ｒ．エリスロポリス（Ｒ．ｅｒｙｔｈｒｏｐｏｌｉｓ）における異種遺伝子発現に利用可能である（Ｎａｋａｓｈｉｍａ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｐｐｌ．Ｅｎｖｉｒｏｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，７０：５５５７－５５６８，２００４及びＴａｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｐｐｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，６８：３４６－３５４，２００５）。Ｒ．エリスロポリス（Ｒ．ｅｒｙｔｈｒｏｐｏｌｉｓ）における染色体遺伝子の標的遺伝子破壊を、Ｔａｏ　ｅｔ　ａｌ．，、前掲、及びＢｒａｎｓ　ｅｔ　ａｌ．（Ａｐｐｌ．Ｅｎｖｉｒｏｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，６６：２０２９－２０３６，２０００）により記載される方法を用いて作成することができる。

【０３２６】

上記に記載したとおりの、イソブタノールの生成に必要な異種遺伝子を、最初にｐＤＡ７１又はｐＲｈＢＲ７１にクローニングし、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）に形質転換することができる。次にこのベクターを、Ｋｏｓｔｉｃｈｋａ　ｅｔ　ａｌ．，、前掲により記載されるとおり、電気穿孔によってＲ．エリスロポリス（Ｒ．ｅｒｙｔｈｒｏｐｏｌｉｓ）に形質転換することができる。組換え体を、グルコースを含有する合成培地で成長させることができ、当該技術分野において公知の方法を用いてイソブタノールの生成を追跡することができる。

【０３２７】

枯草菌（Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ）におけるブタノール生合成経路の発現

枯草菌（Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ）における遺伝子発現及び突然変異の作成の方法もまた、当該技術分野において公知である。例えば、イソブタノール生合成経路の遺伝子を様々な供給源から単離し、修飾ｐＵＣ１９ベクターにクローニングして、枯草菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｕｂｔｉｌｉｓ）ＢＥ１０１０に形質転換することができる。加えて、イソブタノール生合成経路の５つの遺伝子を、発現用に２つのオペロンに分割することができる

。経路の３つの遺伝子（ｂｕｂＢ、ｉｌｖＤ、及びｋｉｖＤ）は、枯草菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｕｂｔｉｌｉｓ）ＢＥ１０１０の染色体に組み込むことができる（Ｐａｙｎｅ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．，１７３，２２７８－２２８２，１９９１）。残りの２つの遺伝子（ｉｌｖＣ及びｂｄｈＢ）は発現ベクターにクローニングして、組み込まれたイソブタノール遺伝子を有するバチルス属（Ｂａｃｉｌｌｕｓ）株に形質転換することができる。

【０３２８】

Ｂ．リケニフォルミス（Ｂ．ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓ）におけるブタノール生合成経路の発現

枯草菌（Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ）で複製するプラスミド及びシャトルベクターの多くは、プロトプラスト形質転換又は電気穿孔のいずれかによるＢ．リケニフォルミス（Ｂ．ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓ）の形質転換に用いることができる。イソブタノールの生成に必要な遺伝子を、プラスミドｐＢＥ２０又はｐＢＥ６０誘導体にクローニングすることができる（Ｎａｇａｒａｊａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅ，１１４：１２１－１２６，１９９２）。Ｂ．リケニフォルミス（Ｂ．ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓ）を形質転換する方法は、当該技術分野において公知である（Ｆｌｅｍｉｎｇ　ｅｔ　ａｌ．Ａｐｐｌ．Ｅｎｖｉｒｏｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，６１：３７７５－３７８０，１９９５）。枯草菌（Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ）での発現用に構築されたプラスミドをＢ．リケニフォルミス（Ｂ．ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓ）に形質転換することにより、イソブタノールを生成する組換え微生物宿主を作製することができる。

【０３２９】

パエニバチルス・マセランス（Ｐａｅｎｉｂａｃｉｌｌｕｓ　ｍａｃｅｒａｎｓ）におけるブタノール生合成経路の発現

枯草菌（Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ）における発現について上記に記載したとおりプラスミドを構築し、それを使用してプロトプラスト形質転換によりパエニバチルス・マセランス（Ｐａｅｎｉｂａｃｉｌｌｕｓ　ｍａｃｅｒａｎｓ）を形質転換することにより、イソブタノールを生成する組換え微生物宿主を作製することができる。

【０３３０】

アルカリゲネス（ラルストニア）・ユートロフス（Ａｌｃａｌｉｇｅｎｅｓ（Ｒａｌｓｔｏｎｉａ）　ｅｕｔｒｏｐｈｕｓ）におけるブタノール生合成経路の発現

アルカリゲネス・ユートロフス（Ａｌｃａｌｉｇｅｎｅｓ　ｅｕｔｒｏｐｈｕｓ）における遺伝子発現及び突然変異の作成の方法は、当該技術分野において公知である（Ｔａｇｈａｖｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｐｐｌ．Ｅｎｖｉｒｏｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，６０：３５８５－３５９１，１９９４）。イソブタノール生合成経路の遺伝子を上記に記載される広宿主域ベクターのいずれかにクローニングし、電気穿孔により、イソブタノールを生成する組換え体を生じさせることができる。アルカリゲネス属（Ａｌｃａｌｉｇｅｎｅｓ）におけるポリ（ヒドロキシブチレート）経路については詳細な記載がなされており、アルカリゲネス・ユートロフス（Ａｌｃａｌｉｇｅｎｅｓ　ｅｕｔｒｏｐｈｕｓ）ゲノムを修飾する様々な遺伝学的技法が公知であり、それらのツールをイソブタノール生合成経路の操作に適用することができる。

【０３３１】

シュードモナス・プチダ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｐｕｔｉｄａ）におけるブタノール生合成経路の発現

シュードモナス・プチダ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｐｕｔｉｄａ）における遺伝子発現方法は、当該技術分野において公知である（例えば、Ｂｅｎ－Ｂａｓｓａｔ　ｅｔ　ａｌ．，米国特許第６，５８６，２２９号明細書（これは参照により本明細書に援用される）を参照）。ブタノール経路遺伝子をｐＰＣＵ１８に挿入することができ、このライゲートされたＤＮＡをエレクトロコンピテントなシュードモナス・プチダ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｐｕｔｉｄａ）ＤＯＴ－Ｔ１　Ｃ５ａＡＲ１細胞に電気穿孔することにより、イソブタノールを生成する組換え体を生じさせることができる。

【０３３２】
サッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）におけるブタノール生合成経路の発現
サッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）における遺伝子発現方法は、当該技術分野において公知である（例えば、Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌｕｍｅ　１９４，Ｇｕｉｄｅ　ｔｏ　Ｙｅａｓｔ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　ａｎｄ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ａｎｄ　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｐａｒｔ　Ａ，２００４，Ｃｈｒｉｓｔｉｎｅ　Ｇｕｔｈｒｉｅ　ａｎｄ　Ｇｅｒａｌｄ　Ｒ．Ｆｉｎｋ，ｅｄｓ．，Ｅｌｓｅｖｉｅｒ　Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）。酵母における遺伝子の発現には、典型的にはプロモーターが必要であり、続いて目的の遺伝子、及び転写ターミネーターが必要である。本明細書の実施例で使用されるものを含めて、数多くの酵母プロモーターを、イソブタノール生合成経路をコードする遺伝子用の発現カセットの構築に使用することができ、限定はされないが、構成的プロモーターＦＢＡ、ＧＰＤ、ＡＤＨ１、及びＧＰＭ、並びに誘導性プロモーターＧＡＬ１、ＧＡＬ１０、及びＣＵＰ１が挙げられる。好適な転写ターミネーターとしては、限定はされないが、ＦＢＡｔ、ＧＰＤｔ、ＧＰＭｔ、ＥＲＧ１０ｔ、ＧＡＬ１ｔ、ＣＹＣ１、及びＡＤＨ１が挙げられる。例えば、イソブタノール生合成経路の好適なプロモーター、転写ターミネーター、及び遺伝子を、米国特許出願公開第２０１００１２９８８６号明細書に記載されるとおり、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）－酵母シャトルベクターにクローニングし、酵母細胞に形質転換することができる。これらのベクターは、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）株及び酵母株のいずれにおける株増殖も可能にする。典型的には、ベクターは、選択可能なマーカーと、所望の宿主における自己複製又は染色体への組込みを可能にする配列とを含む。酵母で典型的に用いられるプラスミドは、シャトルベクターｐＲＳ４２３、ｐＲＳ４２４、ｐＲＳ４２５、及びｐＲＳ４２６（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ，Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤ）であり、これらは、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）複製起点（例えば、ｐＭＢ１）、酵母２μ複製起点、及び栄養選択用マーカーを含む。これらの４つのベクターの選択マーカーは、Ｈｉｓ３（ベクターｐＲＳ４２３）、Ｔｒｐ１（ベクターｐＲＳ４２４）、Ｌｅｕ２（ベクターｐＲＳ４２５）及びＵｒａ３（ベクターｐＲＳ４２６）である。対象のポリペプチドをコードする遺伝子を含む発現ベクターの構築は、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）における標準的な分子クローニング技術によるか、或いは酵母におけるギャップ修復組換え法により行うことができる。
【０３３３】
ギャップ修復クローニング手法は、酵母における高度に効率的な相同組換えを利用する。典型的には、酵母ベクターＤＮＡが消化され（例えばその多重クローニング部位において）、その配列に「ギャップ」が作り出される。目的のインサートＤＮＡが複数産生され、これらのインサートＤＮＡは、５’末端及び３’末端の両方に、互いに及びベクターＤＮＡの５’末端及び３’末端と連続的に重複する≧２１ｂｐ配列を含む。例えば、「遺伝子Ｘ」の酵母発現ベクターを構築するには、発現カセット用に酵母プロモーター及び酵母ターミネーターが選択される。このプロモーター及びターミネーターは酵母ゲノムＤＮＡから増幅され、及び遺伝子Ｘは、その供給源生物からＰＣＲ増幅されるか、或いは遺伝子Ｘ配列を含むクローニングベクターから得られるかのいずれかである。直鎖化されたベクターの５’末端とプロモーター配列との間、プロモーターと遺伝子Ｘとの間、遺伝子Ｘとターミネーター配列との間、及びターミネーターと直鎖化されたベクターの３’末端との間に、少なくとも２１ｂｐの重複配列が存在する。次に「ギャップ含有（ｇａｐｐｅｄ）」ベクター及びインサートＤＮＡが酵母株に同時形質転換され、プラスミド上の栄養選択マーカーの相補性を許容する適切な化合物混合物を含有する培地に播かれる。正しいインサートの組み合わせの存在は、ＰＣＲマッピングにより、選択した細胞から調製されたプラスミドＤＮＡを用いて確認することができる。次に、酵母から単離されたプラスミドＤＮＡ（通常は濃度が低い）を大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）株、例えばＴＯＰ１０に形質転換し、続いてミニプレップ及び制限マッピングによってプラスミドコンストラクトをさらに確

認することができる。最後にコンストラクトを配列分析によって確認することができる。

【０３３４】

ギャップ修復技法と同様に、酵母ゲノムへの組込みもまた、酵母の相同組換えシステムを利用する。典型的には、コード領域と、さらに制御エレメント（プロモーター及びターミネーター）及び栄養要求マーカーを含むカセットが、カセットとハイブリダイズし、且つ挿入が所望されるゲノム範囲の５’側及び３’側領域と配列相同性を有する４０～７０塩基対を含むプライマーを使用して、高忠実度ＤＮＡポリメラーゼでＰＣＲ増幅される。次にＰＣＲ産物が酵母に形質転換され、組み込まれた栄養要求マーカーの選択を可能にする適切な化合物混合物を含有する培地に播かれる。例えば、「遺伝子Ｘ」を染色体位置「Ｙ」に組み込むため、プロモーター－コード領域Ｘ－ターミネーターコンストラクトがプラスミドＤＮＡコンストラクトからＰＣＲ増幅され、ＳＯＥ　ＰＣＲによるか、或いは一般的な制限消化及びクローニングによって、独立栄養マーカー（ＵＲＡ３など）とつなぎ合わされる。プロモーター－コード領域Ｘ－ターミネーター－ＵＲＡ３領域を含む完全なカセットが、酵母染色体上の位置「Ｙ」の５’側及び３’側領域と相同性を有する４０～７０ｂｐを含むプライマー配列と共にＰＣＲ増幅される。ＰＣＲ産物は酵母に形質転換され、ウラシル不含の成長培地で選択される。形質転換体は、コロニーＰＣＲによるか、或いは染色体ＤＮＡのダイレクトシーケンシングによって確認することができる。

【０３３５】

ラクトバチルス・プランタルム（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｐｌａｎｔａｒｕｍ）におけるブタノール生合成経路の発現

ラクトバチルス属（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ）はラクトバチルス目（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌａｌｅｓ）のファミリーに属し、枯草菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｕｂｔｉｌｉｓ）及びストレプトコッカス属（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）の形質転換に用いられる多くのプラスミド及びベクターをラクトバチルス属（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ）に使用することができる。好適なベクターの非限定的な例としては、ｐＡＭβ１及びその誘導体（Ｒｅｎａｕｌｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅ　１８３：１７５－１８２，１９９６）；及び（Ｏ’Ｓｕｌｌｉｖａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅ，１３７：２２７－２３１，１９９３）；ｐＭＢＢ１、及びｐＭＢＢ１の誘導体であるｐＨＷ８００（Ｗｙｃｋｏｆｆ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｐｐｌ．Ｅｎｖｉｒｏｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，６２：１４８１－１４８６，１９９６）；接合性プラスミドであるｐＭＧ１（Ｔａｎｉｍｏｔｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．，１８４：５８００－５８０４，２００２）；ｐＮＺ９５２０（Ｋｌｅｅｒｅｂｅｚｅｍ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｐｐｌ．Ｅｎｖｉｒｏｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，６３：４５８１－４５８４，１９９７）；ｐＡＭ４０１（Ｆｕｊｉｍｏｔｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｐｐｌ．Ｅｎｖｉｒｏｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，６７：１２６２－１２６７，２００１）；及びｐＡＴ３９２（Ａｒｔｈｕｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂ．Ａｇｅｎｔｓ　Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒ．，３８：１８９９－１９０３，１９９４）が挙げられる。ラクトバチルス・プランタルム（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｐｌａｎｔａｒｕｍ）由来のいくつかのプラスミドもまた報告されている（ｖａｎ　Ｋｒａｎｅｎｂｕｒｇ　Ｒ，ｅｔ　ａｌ．　Ａｐｐｌ．Ｅｎｖｉｒｏｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，７１：１２２３－１２３０，２００５）。

【０３３６】

様々なエンテロコッカス属（Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ）の種（Ｅ．フェシウム（Ｅ．ｆａｅｃｉｕｍ）、Ｅ．ガリナルム（Ｅ．ｇａｌｌｉｎａｒｉｕｍ）、及びＥ．フェカリス（Ｅ．ｆａｅｃａｌｉｓ））におけるブタノール生合成経路の発現

エンテロコッカス属（Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ）はラクトバチルス目（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌａｌｅｓ）のファミリーに属し、乳酸菌種、桿菌種及びレンサ球菌種の形質転換に用いられる多くのプラスミド及びベクターを、エンテロコッカス属（Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ）の種に使用することができる。好適なベクターの非限定的な例としては、ｐＡＭβ１及びその誘導体（Ｒｅｎａｕｌｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅ，１８３：１７５－１８２，１９９６）；及び（Ｏ’Ｓｕｌｌｉｖａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅ，１３７：

２２７－２３１，１９９３）；ｐＭＢＢ１、及びｐＭＢＢ１の誘導体であるｐＨＷ８００（Ｗｙｃｋｏｆｆ ｅｔ ａｌ．Ａｐｐｌ．Ｅｎｖｉｒｏｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，６２：１４８１－１４８６，１９９６）；接合性プラスミドであるｐＭＧ１（Ｔａｎｉｍｏｔｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．，１８４：５８００－５８０４，２００２）；ｐＮＺ９５２０（Ｋｌｅｅｒｅｂｅｚｅｍ ｅｔ ａｌ．，Ａｐｐｌ．Ｅｎｖｉｒｏｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，６３：４５８１－４５８４，１９９７）；ｐＡＭ４０１（Ｆｕｊｉｍｏｔｏ ｅｔ ａｌ．，Ａｐｐｌ．Ｅｎｖｉｒｏｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，６７：１２６２－１２６７，２００１）；及びｐＡＴ３９２（Ａｒｔｈｕｒ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂ．Ａｇｅｎｔｓ Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒ．，３８：，１８９９－１９０３，１９９４）が挙げられる。ラクトコッカス属（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ）由来のｎｉｓＡ遺伝子を使用するＥ．フェカリス（Ｅ．ｆａｅｃａｌｉｓ）の発現ベクターもまた、使用することができる（Ｅｉｃｈｅｎｂａｕｍ ｅｔ ａｌ．，Ａｐｐｌ．Ｅｎｖｉｒｏｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，６４：２７６３－２７６９，１９９８）。加えて、Ｅ．フェシウム（Ｅ．ｆａｅｃｉｕｍ）染色体における遺伝子置換用のベクターを使用することができる（Ｎａｌｌａａｐａｒｅｄｄｙ ｅｔ ａｌ．，Ａｐｐｌ．Ｅｎｖｉｒｏｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，７２：３３４－３４５，２００６）。

【０３３７】

発酵培地

本発明における発酵培地は、好適な炭素基質を含有しなければならない。好適な基質としては、限定はされないが、グルコース及びフルクトースなどの単糖類、ラクトース、マルトース、ガラクトース、スクロースなどのオリゴ糖類、デンプン又はセルロースなどの多糖類又はこれらの混合物、並びにチーズホエー透過液、コーンスティープリカー、シュガービート廃糖蜜、及び大麦モルトなどの再生可能原料からの未精製混合物を挙げることができる。さらに、炭素基質はまた、二酸化炭素、又は主要な生化学的中間体への代謝変換が実証されているメタノールなどの、一炭素基質であってもよい。一炭素及び二炭素基質に加え、メチロトローフ微生物はまた、メチルアミン、グルコサミン及び様々なアミノ酸などの数多くの他の炭素含有化合物を代謝活性に利用することが知られている。例えば、メチロトローフ酵母は、メチルアミンからの炭素を利用してトレハロース又はグリセロールを形成することが知られている（Ｂｅｌｌｉｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｉｃｒｏｂ．Ｇｒｏｗｔｈ Ｃ１ Ｃｏｍｐｄ．，［Ｉｎｔ．Ｓｙｍｐ．］，７ｔｈ（１９９３），４１５－３２．（ｅｄｓ）： Ｍｕｒｒｅｌｌ，Ｊ．Ｃｏｌｌｉｎ；Ｋｅｌｌｙ，Ｄｏｎ Ｐ．Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒ： Ｉｎｔｅｒｃｅｐｔ，Ａｎｄｏｖｅｒ，英国）。同様に、カンジダ属（Ｃａｎｄｉｄａ）の様々な種が、アラニン又はオレイン酸を代謝し得る（Ｓｕｌｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ａｒｃｈ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，１５３：４８５－４８９，１９９０）。従って、本発明において利用される炭素供給源は多種多様な炭素含有基質を包含し、微生物の選択によってのみ制限されることが企図される。

【０３３８】

上述の炭素基質及びそれらの混合物は全て、本発明に好適であると考えられるが、一部の実施形態では、炭素基質は、グルコース、フルクトース、及びスクロースであり、又はＣ５糖類を使用するように修飾された酵母細胞に対して、これらとキシロース及び／又はアラビノースなどのＣ５糖類との混合物である。スクロースは、サトウキビ、サトウダイコン、キャッサバ、スイートソルガム、及びこれらの混合物などの再生可能な糖類供給源に由来することができる。グルコース及びデキストロースは、トウモロコシ、小麦、ライ麦、大麦、燕麦、及びこれらの混合物などの穀粒を含むデンプンベースの供給原料の糖化を介して、再生可能な穀粒供給源から誘導することができる。加えて発酵性糖類は、例えば米国特許出願公開第２００７／００３１９１８　Ａ１号明細書（これは全体として参照により本明細書に援用される）に記載されるとおり、前処理及び糖化の過程を介して再生可能なセルロース系又はリグノセルロース系バイオマスから誘導することができる。バイオマスは、任意のセルロース系又はリグノセルロース系材料を指し、セルロースを含み、場合によりヘミセルロース、リグニン、デンプン、オリゴ糖類及び／又は単糖類をさらに

含む材料を含む。バイオマスはまた、タンパク質及び／又は脂質などのさらなる成分も含み得る。バイオマスは単一供給源に由来してもよく、又はバイオマスは、２つ以上の供給源に由来する混合物を含んでもよい；例えばバイオマスは、トウモロコシ穂軸とトウモロコシ茎葉との混合物、又は草と葉との混合物を含み得る。バイオマスとしては、限定はされないが、バイオエネルギー作物、農業残渣、都市固形廃棄物、産業固形廃棄物、製紙スラッジ、庭ごみ、木材及び林業廃棄物が挙げられる。バイオマスの例としては、限定はされないが、トウモロコシ穀粒、トウモロコシ穂軸、トウモロコシ皮などの作物残渣、トウモロコシ茎葉、草類、小麦、小麦わら、大麦、大麦わら、乾草、稲わら、スイッチグラス、古紙、サトウキビバガス、モロコシ、大豆、穀粒の製粉から得られる成分、樹木、枝、根、葉、木材チップ、おがくず、低木及び潅木、野菜、果実、花、家畜糞尿、及びこれらの混合物が挙げられる。

【０３３９】

適切な炭素源に加え、発酵培地は、好適なミネラル、塩、補因子、緩衝剤、並びに当業者に公知の、本明細書に記載されるブタノール生成に必要な培養物の成長及び酵素経路の促進に好適な他の成分を含有しなければならない。

【０３４０】

培養条件

典型的には細胞は、適切な培地において約２０℃～約４０℃の範囲の温度で成長させる。本発明における好適な成長培地は、ルリア－ベルターニ（ＬＢ）ブロス、サブローデキストロース（ＳＤ）ブロス若しくは酵母培地（ＹＭ）ブロス、又は酵母窒素原基礎培地、硫酸アンモニウム、及びデキストロース（炭素／エネルギー源として）又はＹＰＤ培地、ほとんどのサッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）株の成長に最適な比率のペプトン、酵母エキス、及びデキストロースの配合物を含むブロスなどの、一般的な商業的に調製された培地である。他の限定又は合成成長培地もまた使用することができ、特定の微生物の成長に適切な培地は、微生物学又は発酵科学分野の当業者に周知されている。カタボライト抑制を直接的又は間接的に調節することが知られる薬剤、例えば、環状アデノシン２’，３’－一リン酸（ｃＡＭＰ）の使用もまた、発酵培地に取り入れることができる。

【０３４１】

発酵に好適なｐＨ範囲はｐＨ５．０～ｐＨ９．０であり、初期条件にはｐＨ６．０～ｐＨ８．０が好ましい。酵母の発酵に好適なｐＨ範囲は、典型的には約ｐＨ３．０～約ｐＨ９．０である。一実施形態において、初期条件には約ｐＨ５．０～約ｐＨ８．０が用いられる。他の微生物の発酵に好適なｐＨ範囲は、約ｐＨ３．０～約ｐＨ７．５である。一実施形態において、初期条件には約ｐＨ４．５～約ｐＨ６．５が用いられる。

【０３４２】

発酵は、好気性条件下又は嫌気性条件下で実施することができる。一実施形態において、嫌気性条件又は微好気性条件が発酵に用いられる。

【０３４３】

工業用バッチ及び連続発酵

本方法は、バッチ発酵方法を用い得る。古典的なバッチ発酵は、培地の組成が発酵開始時に設定され、発酵中に人為的な改変を受けない閉鎖系である。従って、発酵開始時、培地に所望の１つ又は複数の微生物を接種し、その系に何も加えることなく発酵を生じさせる。しかしながら、典型的には「バッチ」発酵は、炭素源の添加に関するバッチであり、多くの場合にｐＨ及び酸素濃度などの要素の制御が試みられる。バッチ系では、その系の代謝産物及びバイオマス組成物が、発酵の停止時まで絶えず変化する。バッチ培養物内では、細胞は静止遅滞期を通じて調節され、高成長の対数期に至り、最終的に定常期に至って、そこで成長速度が低下し又は停止する。処理されない場合、定常期の細胞は最終的には死滅し得る。対数期の細胞は、概して最終生成物又は中間体の生成のバルクに関与する。

【０３４４】

標準的なバッチ系の変種がフェドバッチ系である。フェドバッチ発酵プロセスもまた本発明に好適であり、発酵の進行に伴い基質が徐々に添加される点を除いては、典型的なバッチ系を含む。フェドバッチ系は、カタボライト抑制が細胞の代謝を阻害する傾向があるとき、及び培地中に限られた量の基質を有することが望ましい場合に有用である。フェドバッチ系における実際の基質濃度の計測は困難であり、従ってｐＨ、溶存酸素及びCO_2などの廃ガスの分圧など、計測可能な因子の変化に基づき推定される。バッチ発酵及びフェドバッチ発酵は一般的で、当該技術分野において公知であり、参照により本明細書に援用されるＴｈｏｍａｓ Ｄ．Ｂｒｏｃｋ ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ａ Ｔｅｘｔｂｏｏｋ ｏｆ Ｉｎｄｕｓｔｒｉａｌ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ，Ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ（１９８９）Ｓｉｎａｕｅｒ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ，Ｉｎｃ．，Ｓｕｎｄｅｒｌａｎｄ，ＭＡ．、又はＤｅｓｈｐａｎｄｅ，Ｍｕｋｕｎｄ（Ａｐｐｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，３６：２２７，１９９２）に例を見ることができる。

【０３４５】

本発明はバッチ式で実施されるが、本方法を連続発酵法に適合させ得ることが企図される。連続発酵は開放系であり、ここでは限定発酵培地がバイオリアクターに連続的に添加され、同時に等量の馴化培地が処理のため取り除かれる。概して連続発酵は培養物を、細胞が主に対数期で成長している一定の高密度に維持する。

【０３４６】

連続発酵により、細胞成長又は最終生成物濃度に影響を及ぼす１つの要因又は任意の数の要因を調節することが可能となる。例えば、一つの方法では、炭素源又は窒素レベルなどの制限栄養素が一定の率に維持され、且つ他のパラメータは全て調節可能とされる。他の系では、培地の濁度により計測される細胞濃度を一定に保ちながら、成長に影響を及ぼす多数の要因を連続的に変更することができる。連続系は定常状態の成長条件の維持を図り、従って培地の抜き取りによる細胞損失が、発酵における細胞成長速度と釣り合わなければならない。連続発酵プロセスの栄養素及び成長因子を調節する方法、並びに生成物形成速度を最大化する技法は、工業微生物学の技術分野において公知であり、様々な方法が、Ｂｒｏｃｋ，前掲により詳述されている。

【０３４７】

本発明は、バッチ、フェドバッチ又は連続プロセスのいずれを用いても実施することができ、任意の公知の発酵方式が好適であり得ることが企図される。加えて、細胞が全細胞触媒として基板上に固定化され、イソブタノール生成用の発酵条件に供され得ることが企図される。

【０３４８】

発酵培地からのブタノール単離方法

生物学的に生成されたブタノールは、ＡＢＥ発酵の技術分野において公知の方法を用いて発酵培地から単離することができる（例えば、Ｄｕｒｒｅ，Ａｐｐｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．４９：６３９－６４８（１９９８）、Ｇｒｏｏｔ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃｅｓｓ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２７：６１－７５（１９９２）、及びこれらの中の参考文献を参照）。例えば、発酵培地から遠心、ろ過、デカンテーションなどによって固形物を取り除くことができる。次に、蒸留、共沸蒸留、液液抽出、吸着、ガスストリッピング、膜蒸発、又はパーベーパレイションなどの方法を用いて、ブタノールを発酵培地から単離することができる。

【０３４９】

ブタノールは、低沸点の、水との共沸混合物を形成するため、蒸留を用いて、当該の混合物をその共沸組成まで分離し得る。蒸留を別の分離方法と組み合わせて用いると、共沸近傍の分離を達成することができる。ブタノールの単離及び精製のために蒸留と組み合わせて用いることのできる方法としては、限定はされないが、デカンテーション、液液抽出、吸着、及び膜ベースの技法が挙げられる。加えて、ブタノールは、共留剤を使用する共沸蒸留を用いて単離することができる（例えば、Ｄｏｈｅｒｔｙ ａｎｄ Ｍａｌｏｎｅ

，Ｃｏｎｃｅｐｔｕａｌ Ｄｅｓｉｇｎ ｏｆ Ｄｉｓｔｉｌｌａｔｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍｓ，ＭｃＧｒａｗ Ｈｉｌｌ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，２００１を参照のこと）。

【０３５０】

ブタノール－水混合物は不均一な共沸混合物を形成するため、蒸留をデカンテーションと組み合わせて用いることで、ブタノールを単離及び精製することができる。この方法では、ブタノールを含有する発酵ブロスが、共沸組成近くまで蒸留される。次に、共沸混合物が凝縮され、ブタノールがデカンテーションによって発酵培地から分離される。デカントされた水相は、還流として最初の蒸留カラムに戻されてもよい。デカントされたブタノールリッチな有機相は、第２の蒸留カラムで蒸留によりさらに精製され得る。

【０３５１】

ブタノールはまた、液液抽出を蒸留との組み合わせで用いても、発酵培地から単離することができる。この方法では、ブタノールは、好適な溶媒による液液抽出を用いて発酵ブロスから抽出される。次にブタノール含有有機相を蒸留して、溶媒からブタノールが分離される。

【０３５２】

また、蒸留を吸着と組み合わせて用いてもまた、発酵培地からブタノールを単離することができる。この方法では、ブタノールを含有する発酵ブロスが共沸組成近くまで蒸留され、次に分子篩などの吸着剤を使用することにより、残りの水が除去される（Ａｄｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｌｉｇｎｏｃｅｌｌｕｌｏｓｉｃ Ｂｉｏｍａｓｓ ｔｏ Ｅｔｈａｎｏｌ Ｐｒｏｃｅｓｓ Ｄｅｓｉｇｎ ａｎｄ Ｅｃｏｎｏｍｉｃｓ Ｕｔｉｌｉｚｉｎｇ Ｃｏ－Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｄｉｌｕｔｅ Ａｃｉｄ Ｐｒｅｈｙｄｒｏｌｙｓｉｓ ａｎｄ Ｅｎｚｙｍａｔｉｃ Ｈｙｄｒｏｌｙｓｉｓ ｆｏｒ Ｃｏｒｎ Ｓｔｏｖｅｒ，Ｒｅｐｏｒｔ ＮＲＥＬ／ＴＰ－５１０－３２４３８，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｒｅｎｅｗａｂｌｅ Ｅｎｅｒｇｙ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｊｕｎｅ ２００２）。

【０３５３】

加えて、蒸留をパーベーパレイションと組み合わせて用いて、ブタノールなどの生成物を発酵培地から単離及び精製することができる。この方法では、ブタノールを含有する発酵ブロスが共沸組成近くまで蒸留され、次に、親水性の膜によるパーベーパレイションにより、残りの水が除去される（Ｇｕｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｅｍｂｒ．Ｓｃｉ．２４５：１９９－２１０（２００４））。

【０３５４】

原位置生成物除去（ＩＳＰＲ）（抽出発酵とも称される）を用いてブタノール（又は他の発酵アルコール）を、それが生成される発酵槽から除去することができ、これにより微生物は、ブタノールを高収率で生成することが可能となる。当該技術分野で記載がなされている、発酵アルコールを除去するための一つのＩＳＰＲ方法は、液液抽出である。一般にブタノール発酵に関しては、例えば、ブタノール濃度が毒性レベルに達するより前の時点で、微生物を含む発酵培地を有機抽出剤と接触させる。有機抽出剤及び発酵培地は二相混合物を形成する。ブタノールは有機抽出剤相に分配され、微生物を含有する水相の濃度が低下するため、阻害性のブタノールに対する微生物の曝露が制限される。

【０３５５】

液液抽出は、例えば、米国特許出願公開第２００９／０３０５３７０号明細書（この開示は全体として本明細書により援用される）に記載される方法に従い実施することができる。米国特許出願公開第２００９／０３０５３７０号明細書は、液液抽出を用いた発酵ブロスからのブタノールの生成及び回収方法について記載し、これらの方法は、発酵ブロスを水不混和性抽出剤と接触させて、水相と有機相とを含む二相混合物を形成するステップを含む。典型的には、抽出剤は、飽和、一不飽和、多価不飽和（及びこれらの混合の）C_{12}～C_{22}脂肪アルコール、C_{12}～C_{22}脂肪酸、C_{12}～C_{22}脂肪酸のエステル、C_{12}～C_{22}脂肪アルデヒド、及びこれらの混合物からなる群から選択される有機抽出剤であってもよい。ＩＳＰＲ用の１つ又は複数の抽出剤は、非アルコール抽出剤であってもよい。ＩＳＰＲ抽出剤は、オレイルアルコール、ベヘニルアルコール、セチルアルコール、ラウリルア

ルコール、ミリスチルアルコール、ステアリルアルコール、１－ウンデカノール、オレイン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、ステアリン酸、ミリスチン酸メチル、オレイン酸メチル、ウンデカナール、ラウリンアルデヒド、２０－メチルウンデカナール、及びこれらの混合物などの外因性の有機抽出剤であってもよい。

【０３５６】

一部の実施形態では、エステルは、国際公開第２０１１／１５９９９８号パンフレット（これは全体として参照により本明細書に援用される）に記載されるとおり、発酵培地中のアルコールを、カルボン酸（例えば脂肪酸）及びアルコールをカルボン酸とエステル化させる能力を有する触媒と接触させることにより形成することができる。かかる実施形態において、カルボン酸はＩＳＰＲ抽出剤として働くことができ、そこにアルコールエステルが分配される。カルボン酸は発酵槽に供給されてもよく、及び／又は発酵槽に送り込まれるバイオマスが供給する発酵性炭素に由来してもよい。供給原料中に存在する脂質はカルボン酸に触媒的に加水分解されることができ、同じ触媒（例えば酵素）がカルボン酸をアルコールとエステル化することができる。触媒は発酵前に供給原料に供給してもよく、又は供給原料の供給前若しくはその供給と同時に発酵槽に供給してもよい。触媒が発酵槽に供給されると、脂質のカルボン酸への加水分解及び実質的に同時の、カルボン酸と発酵槽に存在するブタノールとのエステル化により、アルコールエステルが得られ得る。供給原料に由来しないカルボン酸及び／又は天然の油もまた発酵槽に送り込むことができ、天然の油はカルボン酸に加水分解される。アルコールとエステル化されないカルボン酸は全て、ＩＳＰＲ抽出剤の一部として働き得る。アルコールエステルを含有する抽出剤は、発酵培地から分離することができ、その抽出剤からアルコールを回収することができる。抽出剤は発酵槽に再循環され得る。従って、ブタノール生成の場合、例えば、ブタノールからエステルへの変換は、発酵培地中の遊離ブタノール濃度を低下させることができ、増加するブタノール濃度の毒性作用から微生物を遮蔽する。加えて、脂質はカルボン酸に触媒的に加水分解され、それによりＩＳＰＲ抽出剤における脂質の蓄積速度を減少させることができるため、未分画の穀粒を、その脂質を分離することなしに供給原料として使用することができる。

【０３５７】

原位置生成物除去は、バッチ式又は連続式で実行することができる。連続式の原位置生成物除去では、生成物は反応器から連続的に除去される。バッチ式の原位置生成物除去では、ある容積の有機抽出剤が発酵槽に加えられ、その抽出剤はプロセス中には除去されない。原位置生成物除去について、有機抽出剤は発酵の開始時に発酵培地と接触させることで、二相性発酵培地が形成される。或いは、有機抽出剤は、微生物が所望の量の成長（これは培養物の光学濃度を計測して決定することができる）を達成した後に、発酵培地に接触させることができる。さらに、有機抽出剤は、発酵培地の生成物アルコールレベルが所定レベルに達した時点で、発酵培地に接触させることができる。本発明の一部の実施形態に係るブタノール生成の場合、ブタノール濃度が毒性レベルに達するより前の時点でカルボン酸抽出剤を発酵培地に接触させることができ、それによりブタノールをカルボン酸とエステル化させてブタノールエステルを生成し、結果的に発酵槽のブタノール濃度を低下させてもよい。次に、所望の有効ブタノールエステル力価に達した後、エステル含有有機相を発酵槽から除去する（及び水相を構成する発酵ブロスから分離する）ことができる。一部の実施形態では、発酵槽中の利用可能な発酵性糖の発酵が実質的に完了した後、エステル含有有機相が水相から分離される。

【実施例】

【０３５８】

本発明は、以下の実施例においてさらに定義される。これらの実施例は、本発明の好ましい実施形態を示しているが、例示として提供されるに過ぎないことが理解されなければならない。上記の考察及びこれらの実施例から、当業者は、本発明の本質的な特徴を把握することができ、及びその趣旨及び精神から逸脱することなく、本発明を様々な使用及び条件に適合させるため本発明の様々な変更及び改良を行うことができる。

【０３５９】
一般的方法：
本実施例で用いられる標準的な組換えＤＮＡ及び分子クローニング技術は、当該技術分野において公知であり、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｊ．，Ｆｒｉｔｓｃｈ，Ｅ．Ｆ．ａｎｄ Ｍａｎｉａｔｉｓ，Ｔ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．，１９８９、Ｔ．Ｊ．Ｓｉｌｈａｖｙ，Ｍ．Ｌ．Ｂｅｎｎａｎ，ａｎｄ Ｌ．Ｗ．Ｅｎｑｕｉｓｔ，Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔｓ ｗｉｔｈ Ｇｅｎｅ Ｆｕｓｉｏｎｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．，１９８４、及びＡｕｓｕｂｅｌ，Ｆ．Ｍ．ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ａｓｓｏｃ．ａｎｄ Ｗｉｌｅｙ－Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ，Ｎ．Ｙ．，１９８７により記載される。
【０３６０】
細菌培養物の維持及び成長に好適な材料及び方法もまた、当該技術分野において公知である。以下の実施例で用いられる好適な技法は、Ｍａｎｕａｌ ｏｆ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ Ｇｅｎｅｒａｌ Ｂａｃｔｅｒｉｏｌｏｇｙ，Ｐｈｉｌｌｉｐｐ Ｇｅｒｈａｒｄｔ，Ｒ．Ｇ．Ｅ．Ｍｕｒｒａｙ，Ｒａｌｐｈ Ｎ．Ｃｏｓｔｉｌｏｗ，Ｅｕｇｅｎｅ Ｗ．Ｎｅｓｔｅｒ，Ｗｉｌｌｉｓ Ａ．Ｗｏｏｄ，Ｎｏｅｌ Ｒ．Ｋｒｉｅｇ ａｎｄ Ｇ．Ｂｒｉｇｇｓ Ｐｈｉｌｌｉｐｓ，ｅｄｓ．，Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｓｏｃｉｅｔｙ ｆｏｒ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ，Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ，ＤＣ．，１９９４、又はＴｈｏｍａｓ Ｄ．ＢｒｏｃｋによるＢｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ａ Ｔｅｘｔｂｏｏｋ ｏｆ Ｉｎｄｕｓｔｒｉａｌ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ，Ｓｅｃｏｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｓｉｎａｕｅｒ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ，Ｉｎｃ．，Ｓｕｎｄｅｒｌａｎｄ，ＭＡ，１９８９に見出すことができる。細菌細胞の成長及び維持に用いられる全ての試薬、制限酵素及び材料は、特記されない限り、Ａｌｄｒｉｃｈ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ（Ｍｉｌｗａｕｋｅｅ，ＷＩ）、ＢＤ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃ Ｓｙｓｔｅｍｓ（Ｓｐａｒｋｓ，ＭＤ）、Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤ）、又はＳｉｇｍａ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏｍｐａｎｙ（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）から入手した。
【０３６１】
用いられる略語の意味は、以下のとおりである：「Å」はオングストロームを意味し、「ｍｉｎ」は分を意味し、「ｈ」は時間を意味し、「μｌ」はマイクロリットルを意味し、「ｎｇ／μｌ」はナノグラム毎マイクロリットルを意味し、「ｐｍｏｌ／μｌ」はピコモル毎マイクロリットルを意味し、「ｍｌ」はミリリットルを意味し、「Ｌ」はリットルを意味し、「ｇ／Ｌ」はグラム毎リットルを意味し、「ｎｇ」はナノグラムを意味し、「ｓｅｃ」は秒を意味し、「ｍｌ／分」はミリリットル毎分を意味し、「ｗ／ｖ」は体積あたり重量を意味し、「ｖ／ｖ」は体積あたり体積を意味し、「ｎｍ」はナノメートルを意味し、「ｍｍ」はミリメートルを意味し、「ｃｍ」はセンチメートルを意味し、「ｍＭ」はミリモル濃度を意味し、「Ｍ」はモル濃度を意味し、「ｇ」はグラムを意味し、「μｇ」はマイクログラムを意味し、「ｍｇ」はミリグラムを意味し、「ｇ」は重力定数を意味し、「ｒｐｍ」は毎分回転数を意味し、「ＨＰＬＣ」は高速液体クロマトグラフィーを意味し、「ＭＳ」は質量分析法を意味し、「ＨＰＬＣ／ＭＳ」は高速液体クロマトグラフィー／質量分析法を意味し、「ＥＤＴＡ」はエチレンジアミン四酢酸を意味し、「ｄＮＴＰ」はデオキシヌクレオチド三リン酸を意味し、「℃」はセルシウス度を意味し、及び「Ｖ」はボルト数を意味する。
【０３６２】
遺伝子ライブラリのハイスループットスクリーニングアッセイ
突然変異体ＫＡＲＩ酵素の遺伝子ライブラリのハイスループットスクリーニングを、本明細書に記載するとおり実施した（但し、実施例１６及び２１を除く）：５５４．４ｇ／

Ｌグリセロール、６８ｍＭの（NH_4）$_2SO_4$、４ｍＭ　ＭｇＳＯ$_4$、１７ｍＭ　クエン酸ナトリウム、１３２ｍＭ　KH_2PO_4、３６ｍＭ　K_2HPO_4を含有する１０×凍結用培地を、分子的に純粋な水で調製し、ろ過滅菌した。この１０×凍結用培地をＬＢ培地で希釈することにより、凍結用培地を調製した。９６ウェルアーカイブプレート（カタログ番号３３７０、Ｃｏｒｎｉｎｇ　Ｉｎｃ．Ｃｏｒｎｉｎｇ，ＮＹ）の各ウェルに、凍結用培地のアリコート（２００μｌ）を使用した。

【０３６３】

ＬＢ寒天プレートからクローンを選択して、凍結用培地が入った９６ウェルアーカイブプレートに接種し、振盪なしに３７℃で一晩成長させた。次にアーカイブプレートを－８０℃で保存した。陰性対照としては、ｐＢＡＤ－ＨｉｓＢ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）で形質転換した大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）株Ｂｗ２５１１３を常に使用した。実施例３、４、及び５におけるライブラリの陽性対照は、それぞれ、野生型Ｋ９－ＫＡＲＩ、ＡＢ１Ｄ３、ＡＢ１Ｄ３である。

【０３６４】

アーカイブプレートからのクローンを９６ディープウェルプレートに接種した。各ウェルは、解凍したアーカイブプレートからの細胞３．０μｌ、１００μｇ／ｍｌのアンピシリン及び誘導物質として０．０２％（ｗ／ｖ）のアラビノースを含有するＬＢ培地２００μｌを含んだ。細胞を、振盪（９００ｒｐｍ）しながら８０％湿度、３７℃で一晩成長させ、遠心（４０００ｒｐｍ、２５℃で５分）（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ遠心機、Ｂｒｉｎｋｍａｎｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｉｎｃ．Ｗｅｓｔｂｕｒｙ，ＮＹ）により回収し、後の分析のため、細胞ペレットを－２０℃で保存した。アッセイ基質（Ｒ，Ｓ）－アセトラクテートを、Ａｕｌａｂａｕｇｈ　ａｎｄ　Ｓｃｈｌｏｓｓ（Ａｕｌａｂａｕｇｈ　ａｎｄ　Ｓｃｈｌｏｓｓ，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，２９：２８２４－２８３０，１９９０）により記載されるとおり合成した。このアッセイで使用した他の化学物質は全て、Ｓｉｇｍａから購入した。

【０３６５】

ＫＡＲＩによるアセトラクテートからα，β－ジヒドロキシ－イソバレレートの酵素変換を、プレートリーダー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅ，Ｓｕｎｎｙｖａｌｅ，ＣＡ）を使用して３４０ｎｍで、反応からの補因子ＮＡＤＰＨ又はＮＡＤＨの消失を計測することにより追跡した。活性は、ＮＡＤＰＨ又はＮＡＤＨのいずれかについての６２２０$M^{-1}cm^{-1}$のモル吸光係数を使用して計算した。ストック溶液は以下を使用した：K_2HPO_4（０．２Ｍ）；KH_2PO_4（０．２Ｍ）；ＥＤＴＡ（０．５Ｍ）；$MgCl_2$（１．０Ｍ）；ＮＡＤＰＨ（２．０ｍＭ）；ＮＡＤＨ（２．０ｍＭ）及びアセトラクテート（４５ｍＭ）。２．０ｍｌ　K_2HPO_4、３．０ｍｌ　KH_2PO_4、４．０ｍｌ　$MgCl_2$、０．１ｍｌ　ＥＤＴＡ及び９０．９ｍｌ　水を含有する１００ｍｌの反応緩衝液（ｐＨ６．８）を調製した。

【０３６６】

ディープウェルプレート中の凍結細胞ペレット及びＢｕｇＢｕｓｔｅｒを、同時に室温で３０分間加温した。９６ウェルアッセイプレートの各ウェルに、１２０μｌの反応緩衝液及び２０μｌのＮＡＤＨ（２．０ｍＭ）を充填した。３０分間加温した後、７５μｌの５０％ＢｕｇＢｕｓｔｅｒ（ｖ／ｖ水中）を各ウェルに添加し、プレートシェーカーを使用して細胞を懸濁した。プレートを室温で２０分間インキュベートした。細胞溶解物のアリコート（予想される活性に応じて１５～２５μｌ）を９６ウェルアッセイプレートの各ウェルに移した。３４０ｎｍの吸光度をバックグラウンドとして記録し、１６μｌのアセトラクテート（４．５ｍＭ、反応緩衝液で希釈）を各ウェルに添加して、プレートリーダーで振盪しながら混合した。基質添加後に予想される活性に応じて、０分、及び１０～３０分で３４０ｎｍの吸光度を記録した。吸光度の差（基質添加前及び添加後）を用いて突然変異体の活性を決定した。陽性対照と比較して高いＫＡＲＩ活性を有する突然変異体を、再スクリーニング用に選択した。

【０３６７】

実施例１、２及び３のライブラリについてスクリーニングしたクローンの数は、それぞれ約１２，０００個、１２，０００個及び９２個であった。各ライブラリの上位の成績のものを、二次アッセイとして以下に記載される再スクリーニングにかけた。

【０３６８】

活性突然変異体の二次アッセイ

ハイスループットスクリーニング（上記）により同定された、選択された突然変異体を含む細胞を、１００μｇ／ｍｌアンピシリン及び誘導物質として０．０２５％（ｗ／ｖ）アラビノースを含有する３．０ｍｌのＬＢ培地において、２５０ｒｐｍで振盪しながら３７℃で一晩成長させた。次に細胞を９６ディープウェルプレートにアリコートに分け（２００μｌ／ウェル）、室温で５分間、４，０００×ｇで遠心することにより回収した。７５μｌの５０％ＢｕｇＢｕｓｔｅｒ（ｖ／ｖ水中）を各ウェルに添加し、プレートシェーカーを使用して細胞を懸濁した。プレートを室温で２０分間インキュベートした。細胞溶解物のアリコート（予想される活性に応じて１５～２５μｌ）を、ウェルあたり１２０μｌの反応緩衝液及び２０μｌのＮＡＤＨ（２．０ｍＭ）が入った９６ウェルアッセイプレートの各ウェルに移した。３４０ｎｍの吸光度をバックグラウンドとして記録し、１６μｌのアセトラクテート（４．５ｍＭ、反応緩衝液で希釈）を各ウェルに添加して、プレートリーダーで振盪しながら混合した。基質添加後に予想される活性に応じて、０分、及び５～１０分で３４０ｎｍの吸光度を記録した。吸光度の差（基質添加前及び添加後）を用いて突然変異体の活性を決定した。陽性対照と比較して高いＫＡＲＩ活性を有する突然変異体を、さらなる特性決定用に選択した。

【０３６９】

ＮＡＤＨ及びＮＡＤＰＨミカエリス定数の計測

ＫＡＲＩ酵素活性は、上記に記載したとおりＮＡＤＨ又はＮＡＤＰＨ酸化によりルーチン的に計測し得るが、しかしながらこれらのピリジンヌクレオチドのミカエリス定数（K_M）を計測するため、ＨＰＬＣ／ＭＳを用いて２，３－ジヒドロキシイソバレレート生成物の形成を直接計測した。

【０３７０】

Ｂｕｇｂｕｓｔｅｒ溶解細胞からの粗細胞抽出物（上記に記載したとおり）のタンパク質濃度を、ＢｉｏＲａｄタンパク質アッセイ試薬（ＢｉｏＲａｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｉｎｃ．，Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，ＣＡ　９４５４７）を使用して計測した。０．２～１．０マイクログラムの粗抽出物タンパク質を、１００ｍＭ　ＭＯＰＳ　ＫＯＨ、ｐＨ６．８、１０ｍＭ　$MgCl_2$、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、１ｍＭ　グルコース－６－ホスフェート（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、０．２単位のロイコノストック・メセンテロイデス（Ｌｅｕｃｏｎｏｓｔｏｃ　ｍｅｓｅｎｔｅｒｏｉｄｅｓ）グルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、及び様々な濃度のＮＡＤＨ又はＮＡＤＰＨからなる反応緩衝液に、９０μＬの容積になるように添加した。最終濃度が２．５ｍＭ及び最終容積が１００μＬになるように１０μＬの［Ｓ］－アセトラクテートを添加することにより、反応を開始した。３０℃で１０分間インキュベートした後、５０μＬの反応混合物を抜き出し、それを１５０μＬの０．１％ギ酸に添加することにより、反応をクエンチした。ＮＡＤＨ及びＮＡＤＰＨのK_Mの計測に用いた濃度は、０．０００３、０．０００１、０．０００３、０．００１、０．００３、０．０１、０．０３、０．１、０．３及び１ｍＭであった。

【０３７１】

２，３－ジヒドロキシイソバレレートについて分析するため、２μＬのギ酸でクエンチした反応混合物を、Ｗａｔｅｒｓ　ＳＱＤ質量分析器（Ｗａｔｅｒｓ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｍｉｌｆｏｒｄ，ＭＡ）を備えたＷａｔｅｒｓ　Ａｃｑｕｉｔｙ　ＨＰＬＣに注入した。クロマトグラフィー条件は、以下とした：Ｗａｔｅｒｓ　Ａｃｑｕｉｔｙ　ＨＳＳ　Ｔ３カラム（２．１ｍｍ直径、１００ｍｍ長さ）で流量（０．５ｍｌ／分）。緩衝液Ａは水中０．１％（ｖ／ｖ）からなり、緩衝液Ｂはアセトニトリル中０．１％ギ酸であった。１分間にわたる１％緩衝液Ｂ（緩衝液Ａ中）、続いて１分の１％緩衝液Ｂから１．５分の７５％緩衝液Ｂまでの直線勾配を使用して試料を分析した。エレクトロスプレーイオ

ン化法（ｅｌｅｃｔｒｏｓｐａｙ　ｉｏｎｉｚａｔｉｏｎ）－３０Ｖコーン電圧を用いて、ｍ／ｚ＝１３３におけるイオン化により反応生成物の２，３－ジヒドロキシイソバレレートを検出した。真正の標準物質と比較することにより、生成物２，３－ジヒドロキシイソバレレートの量を計算した。

【０３７２】

ＮＡＤＨ及びＮＡＤＰＨに対するK_Mを計算するため、アッセイにおいて一定濃度のＳ－アセトラクテート（２．５ｍＭ）で計測したＤＨＩＶ形成の速度データを、Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ　Ｅｘｃｅｌにおいて最小二乗回帰を用いて、飽和アセトラクテート濃度を仮定して単一基質のミカエリス・メンテン式にフィッティングした。

【０３７３】

プラスミドｐＹＺ０５８、ｐＬＨ５５０、ｐＬＨ５５６、及びｐＬＨ７０２の構築

ｐＹＺ０５８（ｐＨＲ８１－P_{CUP1}－ＡｌｓＳ－P_{ILV5}－酵母ＫＡＲＩ；配列番号１７６）は、ｐＹＺ０９０（ｐＨＲ８１－P_{CUP1}－ＡｌｓＳ－P_{ILV5}－ラクチスＫＡＲＩ；配列番号１９５）から誘導した。ｐＹＺ０９０をＰｍｅＩ及びＳｆｉＩ酵素で切断し、酵母ＫＡＲＩのＰＣＲ産物とライゲートした。ＰＣＲ産物を、サッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）ＢＹ４７４１（Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　Ｉｎｃ．）株のゲノムＤＮＡから、上流プライマー５’－ｃａｔｃａｔｃａｃａｇｔｔｔａａａｃａｇｔａｔｇｔｔｇａａｇｃａａａｔｃａａｃｔｔｃｇｇｔｇｇ－３’（配列番号２７２）及び下流プライマー５’－ｇｇａｃｇｇｇｃｃｃｔｇｃａｇｇｃｃｔｔａｔｔｇｇｔｔｔｔｃｔｇｇｔｃｔｃａａｃｔｔｔｃｔｇａｃ－３’（配列番号２７３）を使用して増幅し、ＰｍｅＩ及びＳｆｉＩ酵素で消化した。ｐＹＺ０５８を配列決定により確認した。

【０３７４】

ｐＬＨ５５０（ｐＨＲ８１－ＰＣＵＰ１－ＡｌｓＳ－ＰＩＬＶ５－Ｐｆ５．ＫＡＲＩ、配列番号１７５）は、ｐＹＺ０５８（配列番号１７６）から誘導した。野生型Ｐｆ５．ＫＡＲＩ遺伝子をＯＴ１３４９（５’－ｃａｔｃａｔｃａｃａｇｔｔｔａａａｃａｇｔａｔｇａａａｇｔｔｔｔｃｔａｃｇａｔａａａｇａｃｔｇｃｇａｃｃ－３’；配列番号１７７）及びＯＴ１３１８（５’－ｇｃａｃｔｔｇａｔａｇｇｃｃｔｇｃａｇｇｇｃｃｔｔａｇｔｔｃｔｔｇｇｃｔｔｔｇｔｃｇａｃｇａｔｔｔｔｇ－３’；配列番号１７８）でＰＣＲ増幅し、ＰｍｅＩ及びＳｆｉＩ酵素で消化して、ＰｍｅＩ及びＳｆｉＩで切断したｐＹＺ０５８ベクターとライゲートした。生じたベクターｐＬＨ５５０を配列決定により確認した。

【０３７５】

ｐＬＨ５５６（配列番号１３８；図４）はｐＬＨ５５０から誘導し、これは、このベクターをＳｐｅＩ及びＮｏｔＩ酵素で消化して、且つＳｐｅＩ及びＮｏｔＩ部位のオーバーハング配列を含むＯＴ１３８３（５’－ｃｔａｇｔｃａｃｃｇｇｔｇｇｃ－３’、配列番号１７９）及びＯＴ１３８４（５’－ｇｇｃｃｇｃｃａｃｃｇｇｔｇａ－３’、配列番号１８０）からアニーリングしたリンカーとライゲートすることによった。このクローニングステップでは、ＡｌｓＳ遺伝子とＰＣＵＰ１プロモーターの大型断片とが除かれ、１６０ｂｐの残る上流配列は機能しない。ｐＬＨ５５６を配列決定により確認した。

【０３７６】

ｐＨＲ８１：：ＩＬＶ５ｐ－Ｋ９Ｄ３（ｐＬＨ７０２、配列番号１８１）は、ｐＬＨ５５６から誘導した。Ｋ９Ｄ３突然変異ＫＡＲＩ遺伝子を、ＰｍｅＩ及びＳｆｉＩ酵素を使用してベクターｐＢＡＤ－Ｋ９Ｄ３から切り出し、ＰｍｅＩ及びＳｆｉＩ部位でｐＬＨ５５６とライゲートして、Ｐｆ５．ＫＡＲＩ遺伝子をＫ９Ｄ３遺伝子に置き換えた。構築したベクターを配列決定により確認した。

【０３７７】

実施例１

様々なＫＡＲＩ遺伝子を含む酵母イソブタノール経路株の構築

酵母イソブタノール生成におけるＫＡＲＩ活性を有するポリペプチド及び性能を同定す

るため、様々な細菌種及び真菌種由来のＫＡＲＩコード遺伝子の生物多様性スクリーニングを実施した。ＫＡＲＩ遺伝子は、表１０に示すサッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）遺伝子のコドン選択に基づきコドン最適化した。各ＫＡＲＩ遺伝子について、ＰｍｅＩ制限部位及びさらなる３ｂｐ（ＡＧＴ）を、ＡＴＧ開始コドンの前に配列５’－ＧＴＴＴＡＡＡＣＡＧＴ－３’（配列番号１３６）で５’末端に付加し、ＳｆｉＩ制限部位を５’－ＧＧＣＣＣＴＧＣＡＧＧＣＣ－３’（配列番号１３７）で３’末端に付加した。ＫＡＲＩ遺伝子は全て、ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ　ＵＳＡ　Ｉｎｃ．（Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）により合成された。各ＫＡＲＩ遺伝子をｐＨＲ８１－P_{CUP1}－ＡｌｓＳ－P_{ILV5}－Ｐｆ５．Ｉｌｖ５ベクター（配列番号１７５）に、ＰｍｅＩ及びＳｆｉＩ部位を介してサブクローニングした（Ｉｌｖ５は酵母ケトール酸レダクトイソメラーゼをコードする）。このベクターは２つの発現カセットを含む：酵母ＣＵＰ１プロモーター下の枯草菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｕｂｔｉｌｉｓ）アセト乳酸シンターゼ（ＡｌｓＳ）遺伝子、及びＩｌｖ５プロモーターにより制御される酵母Ｉｌｖ５遺伝子。配列分析を実施してＫＡＲＩ遺伝子配列を確認した。

【０３７８】

ＫＡＲＩ遺伝子を有するｐＨＲ８１－ＰＣＵＰ１－ＡｌｓＳ－PI_{LV5}－ＫＡＲＩベクターを、ｐＬＨ４６８（ｐＲＳ４２３－P_{FBA1}－ＤＨＡＤ－P_{TDH3}－ｋｉｖＤ－P_{GPM1}－ｈＡＤＨ１；配列番号１３９）と共に、宿主株ＢＰ１１３５（ＰＮＹ１５０５；実施例８）（ＣＥＮ．ｐｋ　１１３－７Ｄ　Δｕｒａ３：：ｌｏｘＰ　Δｈｉｓ３　Δｐｄｃ６　Δｐｄｃ１：：ｉｌｖＤ．Ｓｍ　Δｐｄｃ５：：ｓａｄＢ　Δｇｐｄ２：：ｌｏｘＰ　Δｆｒａ２）に同時形質転換した。酵母形質転換体を最少ドロップアウト培地プレート（ＳＥ－Ｕｒａ－Ｈｉｓ、２％エタノール）において３０℃で５～７日後に選択し、ＳＥ－Ｕｒａ－Ｈｉｓに再ストリークして、さらに３日間インキュベートした後に細胞パッチを得た。この細胞パッチを振盪フラスコの接種に使用した。

【０３７９】

実施例２

イソブタノール生成についてのＫＡＲＩ多様性コレクションのスクリーニング

様々なＫＡＲＩ遺伝子を、酵母におけるそれらの「有効生成能力」に基づき評価した。有効生成能力は、漸次酸素を制限する条件下で一定期間（例えば４８時間）成長させた後に決定した。酵母バイオマスは、酵母細胞の$1OD_{600}$が０．３ｇ／Ｌに相当すると仮定して計算した。

【０３８０】

様々なＫＡＲＩ遺伝子を有する酵母イソブタノール経路株を、０．２％グルコース及び０．２％エタノールを含む１０ｍＬ　ＳＥＧ－Ｕｒａ，Ｈｉｓ培地に接種し、好気的に３０℃で一晩、約２ＯＤまで成長させた。培養物を遠心し、細胞の一部をＳＥＧ－Ｕｒａ，Ｈｉｓ（２％グルコース、１％エタノール）に、１２５ｍＬ振盪フラスコ中２５ｍＬの総容積において初期OD_{600}が０．４になるまで再懸濁した。振盪フラスコをねじ式の硬質プラスチック（ｐｌａｓｔｉｄ）キャップで封鎖し、空気及び酸素の外部環境との交換を最小限としてフラスコにおいて漸次酸素を制限する条件下で培養物を成長させた。３０℃、２５０ＲＰＭで４８時間インキュベートした後、培養物を取り出して、OD_{600}計測及びＨＰＬＣ分析によりイソブタノール生成を計測した。

【０３８１】

以下に示すとおりの、スクリーニングしたＫＡＲＩ遺伝子からは、複数が、ラクトコッカス・ラクチス（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｌａｃｔｉｓ）ＫＡＲＩと同等か又はそれより良好なイソブタノール力価を有した。特に、Ｋ９（アナエロスティペス・カカエ（Ａｎａｅｒｏｓｔｉｐｅｓ　ｃａｃｃａｅ）ＤＳＭ　１４６６２）ＫＡＲＩクローンは、漸次酸素を制限する条件下で４８時間成長させた後に計測したとき、高いイソブタノール力価及び有効イソブタノール生成能力を示した（表１０）。

【０３８２】

【表１４】

表 10. 30℃の振盪フラスコにおいて漸次酸素を制限する条件下で48時間成長させた後に計測された様々なKARI遺伝子を有する酵母イソブタノール生成株のイソブタノール力価及び有効生成能力

KARIクローン	配列番号(核酸、アミノ酸) *LTSを除く全ての核酸配列、S2はコドン最適化した	イソブタノール力価 (g/L)	有効イソブタノール生成能 (g/g)	供給源生物
B3K01 ("K1")	140, 141	2.6	4.1	*ビフィドバクテリウム・アンギュラツム (Bifidobacterium angulatum)* DSM 20098
B3K02 ("K2")	142, 143	3.5	3.7	*ビフィドバクテリウム・デンチウム (Bifidobacterium dentium)* ATCC 27678
B3K09 ("K9")	26, 27	4.3	5.2	*アナエロスティペス・カカエ (Anaerostipes caccae)* DSM 14662
B3K25 ("K25")	375, 376	3.6	4.4	*エンテロコッカス・ガリナルム (Enterococcus gallinarum)* EG2
B3K26 ("K26")	381, 382	4.4	3.2	*ストレプトコッカス・サーモフィルス (Streptococcus thermophilus)* LMD-9
B3K29 ("K29")	377, 378	4.1	3.3	*ラクトコッカス・ラクチス亜種クレモリス (Lactococcus lactis subsp.cremoris)* MG1363
LTS	379, 380	2.7	3.1	*ラクトコッカス・ラクチス (Lactococcus lactis)*
B3K07 ("K7")	274, 275	3.7	2.8	*クロストリジウム・ベイジェリンキ (Clostridium beijerinckii)* NCIMB 8052
S2	276, 277	3.6	1.5	*ザイモモナス・モビリス (Zymomonas mobilis)*

【０３８３】

実施例３

酵母イソブタノール経路株のＫＡＲＩ酵素分析

ＩｐＯＨＡ（Ｎ－イソプロピルオキサリルヒドロキサム酸）は、ＫＡＲＩ酵素により触媒される反応の反応中間体の模倣物である。これは、ＫＡＲＩ酵素の活性部位に結合するタイト結合阻害剤である。ＩｐＯＨＡの合成及び大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）由来のＫＡＲＩに対するそのタイト結合については、文献に記載されている（Ａ．Ａｕｌａｂａｕｇｈ ａｎｄ Ｊ．Ｖ．Ｓｃｈｌｏｓｓ，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，１９９０，２９，２８２４－２８３０）。活性部位の力価測定へのその使用は、これまで報告されていない。文献に従い、［^{14}Ｃ］－シュウ酸塩からＩｐＯＨＡを合成した。

【０３８４】

実施例２の酵母培養物を回収し、ＫＡＲＩ酵素活性について分析した。２５ｍＬの培養

物をペレット化し、１０ｍＬの５０ｍＭトリス－ＨＣｌ、ｐＨ７．５に再懸濁した。細胞を再び遠心して緩衝液を除去し、細胞ペレットを－７０℃で保存した。細胞ペレットを１ｍＬの５０ｍＭトリス－ＨＣｌ　ｐＨ７．５に再懸濁し、超音波処理した。可溶性の粗細胞抽出物を使用して酵素アッセイを実施した。酵素の一部をモル過剰の［^{14}Ｃ］－ＩｐＯＨＡ、飽和濃度のＮＡＤ（Ｐ）Ｈ及びＭｇ$^{2+}$とインキュベートした。可逆性の希釈感受性複合体が最初に形成されるため、抽出濃度を高く保って複合体化に好都合となるようにし、ひいてはタイトな複合体の形成にかかる時間を短縮した。各ＫＡＲＩがタイトな複合体を形成するのにどの程度の時間がかかるかについて先験的な知識がなかったため、各試料につき２つの時点をとり、結果が一致することを確認した。インキュベーション時間の終了時、Ｍｉｃｒｏｃｏｎ（登録商標）（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ｉｎｃ．，Ｂｉｌｌｅｒｉｃａ，ＭＡ）を使用する限外ろ過によってタンパク質分子から小分子を分離し、高分子量画分をカウントした。μＭ又はｍｇ／ｍｌのいずれかでの試料中のＫＡＲＩの濃度を、^{14}Ｃ　ｄｐｍ、容積、及びＫＡＲＩサブユニット分子量から逆算した。固定時間酵素アッセイを同時に実行し、そのデータを使用してＵ／ｍｌを計算した。所与の試料についてＵ／ｍｌをｍｇ／ｍｌで除すことにより、比活性を計算した。完全な活性とＩｐＯＨＡに結合する能力とは厳密に相関するものと仮定した。このように計測したＫＡＲＩ酵素の比活性を表１１に掲載する。「ｍｇあたりの単位」でのＫＡＲＩ活性は、ＩｐＯＨＡアッセイを用いて定量化したときのＫＡＲＩ酵素１ミリグラムあたりの活性を表す。総タンパク質濃度をブラッドフォード法により決定した。ＫＡＲＩの発現レベルは、ＫＡＲＩ酵素の量を総可溶性細胞タンパク質量で除すことにより計算する。

【０３８５】

【表１５】

表 11. IPOHA アッセイにより計測した KARI 酵素活性

KARI クローン	KARI 活性 U/mg	KARI %総タンパク質	生物
B3K01	0.56	21	*ビフィドバクテリウム・アンギュラツム (Bifidobacterium angulatum)* DSM 20098
B3K02	0.44	28	*ビフィドバクテリウム・デンチウム (Bifidobacterium dentium)* ATCC 27678
B3K09	2.4	15	*アナエロスティペス・カカエ (Anaerostipes caccae)* DSM 14662
B3K25	1.3	21	*エンテロコッカス・ガリナルム (Enterococcus gallinarum)* EG2
B3K26	1.5	17	*ストレプトコッカス・サーモフィルス (Streptococcus thermophilus)* LMD-9
B3K29	1.6	14	*ラクトコッカス・ラクチス亜種クレモリス (Lactococcus lactis subsp.cremoris)* MG1363
LTS	0.8	23.0	*ラクトコッカス・ラクチス (Lactococcus lactis)*

【０３８６】

実施例４

K_Mが野生型より低いＮＡＤＨを利用する変異体を同定するための部位飽和遺伝子ライブラリの構築

Ｋ９　ＫＡＲＩ用のｐＢＡＤベースの細菌発現ベクターを構築するため、Ｋ９　ＫＡＲＩ遺伝子（Ｇｅｎｓｃｒｉｐｔ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪにより合成された）を、ＰｍｅＩ及びＳｆｉＩ部位を介してｐＢＡＤ－ｐｓ－ＪＥＡ１ベクター（配列番号９０５）にサブクローニングした。ライブラリ構築には、アナエロスティペス・カカエ（Ａｎａｅｒｏｓｔｉｐｅｓ　ｃａｃｃａｅ）由来のケトール酸レダクトイソメラーゼ（ＫＡＲＩ）（Ｋ９－ＫＡＲＩと呼ばれる）を使用した。市販のキットであるＴ４ポリヌクレオチドキナーゼ（ＰＮＫ）（ＵＳＢ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｃｌｅｖｅｌａｎｄ，Ｏｈｉｏ、

番号７００３１Ｚ）及びＣｈａｎｇ＿ＩＴ多重変異部位特異的突然変異誘発キット（ＵＳＢ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｃｌｅｖｅｌａｎｄ，Ｏｈｉｏ、番号７８４８０）を使用して、一つの遺伝子ライブラリを構築した。

【０３８７】

オリゴヌクレオチド（Ｋ９＿５６＿５８＿０６０２１０ｆ：ＧＡＡＧＧＡＮＮＫＡＡＡＮＮＫＴＧＧＡＡＧＡＧＡＧＣ、配列番号１４４；及びＫ９＿５６＿５８＿０６０２１０ｒ：ＧＣＴＣＴＣＴＴＣＣＡＭＮＮＴＴＴＭＮＮＴＣＣＴＴＣ、配列番号１４５）は、Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ ＤＮＡ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ（Ｃｏｒａｌｖｉｌｌｅ ＩＡ）により合成された。これらを初めにＴ４ ＰＮＫによってリン酸化した。簡潔に言えば、３０μｌの反応混合物は以下を含んだ：キットと共に提供された３．０μｌの１０×Ｔ４ ＰＮＫ緩衝液、４．０μｌのプライマー（約３５μＭ）、０．８μｌの１００ｍＭ ＡＴＰ混合物、０．６μｌ Ｔ４ ＰＮＫ及び２２μｌの水。反応混合物を３７℃で１．０時間インキュベートし、次にＴ４ ＰＮＫを６５℃で２０分間不活性化した。

【０３８８】

次にリン酸化したプライマーを続くＰＣＲ反応に直接使用し、キットを使用してＫ９ＫＡＲＩ野生型の２つの部位に突然変異を導入した。簡潔に言えば、３０μｌの反応混合物は以下を含んだ：キットと共に提供された３．０μｌの１０×反応緩衝液、３．０μｌのリン酸化したフォワードプライマー及びリバースプライマー、２．０μｌのＫ９ ＫＡＲＩ野生型（５０ｎｇ／μｌ）、１．２μｌ Ｃｈａｎｇ＿ＩＴ酵素及び１７．８μｌの水。この反応混合物を薄型ウェル２００μｌ容量ＰＣＲチューブに入れ、ＰＣＲには以下のＰＣＲ反応プログラムを用いた：開始温度は９５℃で２分間、続いて３０回の加熱／冷却サイクルであった。各サイクルは、９５℃で３０秒間、５５℃で３０秒間、及び６８℃で２０分間からなった。温度サイクルの完了時に試料をさらに２５分間６８℃に保ち、次に以降の処理については４℃に維持した。Ｚｙｍｏ ＤＮＡクリーンアップキット（Ｚｙｍｏ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｏｒａｎｇｅ ＣＡ、番号Ｄ４００４）を使用してＰＣＲ反応物をクリーンアップした。８４μｌの水を使用して膜からＤＮＡを溶出させた。ＤＮＡ鋳型を、Ｄｐｎ Ｉ（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ ＷＩ、番号Ｒ６２３１）により３７℃で３時間にわたり除去した（反応混合物：１０μｌの１０×反応緩衝液、１．０μｌ ＢＳＡ、６．０μｌのＤｐｎ Ｉ及び８３μｌのクリーンにしたＰＣＲ ＤＮＡ）。Ｄｐｎ Ｉ消化ＤＮＡを再びＺｙｍｏ ＤＮＡクリーンアップキットでクリーンアップし、Ｄｐｎ Ｉで再び消化して、ＤＮＡ鋳型を完全に除去した（反応混合物：１．５μｌの１０×反応緩衝液、０．１５μｌ ＢＳＡ、０．８５μｌのＤｐｎ Ｉ及び８３μｌのクリーンにしたＰＣＲ ＤＮＡ）。この反応混合物を直接用いることにより、ＢｉｏＲａｄ Ｇｅｎｅ Ｐｕｌｓｅｒ ＩＩ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ Ｉｎｃ．，Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，ＣＡ）を使用して、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）のエレクトロコンピテント株Ｂｗ２５１１３（ΔｉｌｖＣ）（米国特許第８，１２９，１６２号明細書（これは全体として参照により本明細書に援用される）に記載される）を形質転換した。形質転換したクローンを、ＬＢ培地及び１００μｇ／ｍｌアンピシリンを含有する寒天プレート（カタログ番号Ｌ１００４、Ｔｅｋｎｏｖａ Ｉｎｃ．Ｈｏｌｌｉｓｔｅｒ，ＣＡ）にストリークし、３７℃で一晩インキュベートした。クローンを、ＮＡＤＨを使用する活性についてスクリーニングした。変異体のK_Mを計測した（表１２）。

【０３８９】

【表１６】

表12

DHIV 形成アッセイによって決定したときの*大腸菌 (E. coli)*抽出物における K9 KARI 変異体の動態値

突然変異体	配列番号 (核酸、アミノ酸)	突然変異	K_M (μM) (NADH)	K_M (μM) (NADPH)
K9 Wt	26, 27		326	0.2
AB1D1	28, 29	S56A	164	1
495B5	30, 31	S56A/S58H	44	4
AB1D3 ("K9D3"とも称される)	32, 33	S56A/S58D	38	9
AB1G9 ("K9G9"とも称される)	34, 35	S56AS58E	47	23

【０３９０】

実施例５

ＮＡＤＨに対するK_Mを低下させる部位飽和遺伝子ライブラリの構築

蛍光菌（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｓ）ＫＡＲＩ（ＰＦ５－ＫＡＲＩ）での研究に基づき、２４位、３３位、６１位、８０位、１５６位及び１７０位を、Ｋ９　ＫＡＲＩの突然変異生成標的として標的化した。ＰＦ５－ＫＡＲＩとＫ９　ＫＡＲＩとの間の多重配列アラインメント（ＭＳＡ）（図２）から、対応する位置は、３０位、３９位、６７位、８６位、１６２位、及び１７６位である。

【０３９１】

より多くの突然変異生成標的を同定するため、ブタノール生成株においてイソブタノールを生成すると決定された（他の例を参照）既存のＫＡＲＩ酵素（Ｋ１、Ｋ２、Ｋ７、Ｋ９、Ｋ２５、Ｋ２６、Ｌ．ラクチス（Ｌ．ｌａｃｔｉｓ）及びＳ２）のＭＳＡを使用して、より多くの突然変異生成標的を同定した。４１位、８７位、１３１位、１９１位、２２７位、及び２４６位を突然変異生成標的として選択した。

【０３９２】

３０位、３９位、４１位、６７位、８６位、８７位、１３１位、１６２位、１７６位、１９１位、２２７位、及び２４６位を標的化するオリゴヌクレオチドは、商業的に、Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ（ＣｏｒａｌｖｉｌｌｅＩＡ）により合成された（表１３）。３０位、６７位、１３１位、１６２位、１７６位、１９１位、２２７位、及び２４６位を標的化する８対のオリゴヌクレオチドを用いることにより、ＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎのＳｕｐｅｒｍｉｘ（カタログ番号１０５７２－０１４、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）を使用してメガプライマーを作成した。ＰＣＲ反応毎に、これらの８対のオリゴヌクレオチドからの異なる位置をコードする１つのフォワードプライマーと１つのリバースプライマーとの任意の組み合わせ（例えばＫ９＿３０＿１０１１１０ｆ及びＫ９＿６７＿１０１１１０ｒ）である一対のプライマーを使用した。合計

【数１】

$$P_8^2$$

、すなわち５６通りの組み合わせがある。２５μｌの反応混合物は以下を含んだ：２２．５μｌのＳｕｐｅｒｍｉｘ溶液、１．０μｌのフォワードプライマー及び１．０μｌのリ

バースプライマー、０．５μｌのＡＢ１Ｄ３　ＤＮＡ鋳型（５０ｎｇ／μｌ）。Ｍａｓｔｅｒｃｙｃｌｅｒ　ｇｒａｄｉｅｎｔ機器（Ｂｒｉｎｋｍａｎｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｉｎｃ．Ｗｅｓｔｂｕｒｙ，ＮＹ）でのＰＣＲ反応のため、この混合物を薄型ウェル２００μｌチューブに入れた。ＰＣＲ反応には以下の条件を用いた：開始温度は９５℃で１．０分間、続いて３５回の加熱／冷却サイクルであった。各サイクルは、９５℃で２０秒間、５５℃で２０秒間、及び７２℃で１．０分間からなった。温度サイクルの完了時に試料をさらに２．０分間７２℃に保ち、次に４℃に維持して試料の回復を待った。製造者の推奨どおりＤＮＡクリーニングキット（カタログ番号Ｄ４００３、Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｏｒａｎｇｅ，ＣＡ）を使用して、ＰＣＲ産物をクリーンアップした。

【０３９３】

次に、ＱｕｉｃｋＣｈａｎｇｅ　ＩＩ　ＸＬ部位特異的突然変異誘発キット（カタログ番号２００５２４、Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ，Ｌａ　Ｊｏｌｌａ　ＣＡ）を使用して、メガプライマーを用いることにより遺伝子ライブラリを作成した。２５μｌの反応混合物は以下を含んだ：２．５μｌの１０×反応緩衝液、１．０μｌの５０ｎｇ／μｌ鋳型、２０．５μｌのメガプライマー、０．５μｌの４０ｍＭ　ｄＮＴＰ混合物、０．５μｌ　ｐｆｕ－ｕｌｔｒａ　ＤＮＡポリメラーゼ。メガプライマー及び鋳型を除き、ここで使用した全ての試薬は、上記に指示するキットと共に提供された。この反応混合物を薄型ウェル２００μｌ容量ＰＣＲチューブに入れ、ＰＣＲには以下の反応を用いた：開始温度は９５℃で３０秒間、続いて２５回の加熱／冷却サイクルであった。各サイクルは、９５℃で３０秒間、５５℃で１分間、及び６８℃で６分間からなった。温度サイクルの完了時に試料をさらに８分間６８℃に保ち、次に以降の処理については４℃に維持した。ＰＣＲ反応混合物を、実施例４で用いたものと同じＤｐｎ　Ｉ制限酵素で処理した。

【０３９４】

次に、オリゴヌクレオチドＫ９＿３７＆３９＿１０１１１０ｆ、Ｋ９＿３７＆３９＿１０１１１０ｒ及びＫ９＿８６＆８７＿１０１１１０ｆ、Ｋ９＿８６＆８７＿１０１１１０ｒを直接用いることにより、ＱｕｉｃｋＣｈａｎｇｅ　ＩＩ　ＸＬ部位特異的突然変異誘発キットを使用して遺伝子ライブラリを作成した。２つのオリゴヌクレオチドセットの２つの２５μｌ反応混合物で、各２５μｌの反応混合物は以下を含んだ：２．５μｌの１０×反応緩衝液、１．０μｌの５０ｎｇ／μｌ鋳型、１．０μｌのフォワードプライマー、１．０μｌリバースプライマー、０．５μｌの４０ｍＭ　ｄＮＴＰ混合物、０．５μｌ　ｐｆｕ－ｕｌｔｒａ　ＤＮＡポリメラーゼ及び１８．５μｌの水。ＰＣＲプログラム及び続くＤｐｎ　Ｉ処理は同じである。

【０３９５】

Ｄｐｎ　Ｉ処理したＤＮＡ混合物を、製造者のプロトコルに従いＺｙｍｏ　ＤＮＡクリーンアップキットを使用してクリーンアップした。クリーンアップしたＤＮＡを用いることにより、ＢｉｏＲａｄ　Ｇｅｎｅ　Ｐｕｌｓｅｒ　ＩＩ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ　Ｉｎｃ．，Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，ＣＡ）を使用して大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）のエレクトロコンピテント株Ｂｗ２５１１３（ΔｉｌｖＣ）を形質転換した。形質転換したクローンを、ＬＢ培地及び１００μｇ／ｍｌアンピシリンを含有する寒天プレート（カタログ番号Ｌ１００４、Ｔｅｋｎｏｖａ　Ｉｎｃ．Ｈｏｌｌｉｓｔｅｒ，ＣＡ）にストリークし、３７℃で一晩インキュベートした。ＮＡＤＨを使用する活性の向上についてクローンをスクリーニングした。向上した突然変異体のK_Mを計測した（表１４）。

【０３９６】

【表１７】

表 13: プライマー

K9-KARI の 標的位置	プライマー
30	K9_30_101110f:gactatcgccgttatcggtNNKggttctcaaggtcac 配列番号 146 K9_30_101110r:GTGACCTTGAGAACCMNNACCGATAACGGCGATAGTC 配列番号 147
67	K9_67_101110f:gagctgaagaacaaggtNNKgaagtctacaccgctgc 配列番号 148 K9_67_101110r:GCAGCGGTGTAGACTTCMNNACCTTGTTCTTCAGCTC 配列番号 149
131	K9_131_101110f:caaaggacgttgatgtcNNKatgatcgctccaaag 配列番号 150 K9_131_101110r:CTTTGGAGCGATCATMNNGACATCAACGTCCTTT 配列番号 151
162	K9_162_101110f:gctgtcgaacaagacNNKactggcaaggctttg 配列番号 152 K9_162_101110r:CAAAGCCTTGCCAGTMNNGTCTTGTTCGACAGC 配列番号 153
176	K9_176_101110f:gctttggcctacgctttaNNKatcggtggtgctagagc 配列番号 154 K9_176_101110r:GCTCTAGCACCACCGATMNNTAAAGCGTAGGCCAAAGC 配列番号 155
191	K9_191_101110f:gaaactaccttcagaNNKgaaactgaaaccgac 配列番号 156 K9_191_101110r:GTCGGTTTCAGTTTCMNNTCTGAAGGTAGTTTC 配列番号 157
227	K9_227_101110f:gccggttacgacccaNNKaacgcttacttcgaatg 配列番号 158 K9_227_101110r:CATTCGAAGTAAGCGTTMNNTGGGTCGTAACCGGC 配列番号 159
246	K9_246_101110f:gttgacttgatctacNNKtctggtttctccggtatgc 配列番号 160 K9_246_101110r:GCATACCGGAGAAACCAGAMNNGTAGATCAAGTCAAC 配列番号 161
39, 41	K9_37&39_101110f:gttctcaaggtcacgctNNKgccNNKaatgctaaggaatcc 配列番号 162 K9_37&39_101110r:GGATTCCTTAGCATTMNNGGCMNNAGCGTGACCTTGAGAAC 配列番号 163
86, 87	K9_86&87_101110f:gacatcattatgatcttgNNKNNKgatgaaaagcaggc 配列番号 164 K9_86&87_101110r:GCCTGCTTTTCATCMNNMNNCAAGATCATAATGATGTC 配列番号 165

【０３９７】

【表１８】

表 14

K_M 計測値を含む一部の突然変異体のリスト

突然変異体	配列番号 (核酸、アミノ酸)	突然変異	K_M (μM) (NADH)	K_M (μM) (NADPH)
AO7A9	38, 39	S56A/S58D/I86T/N87P	15	7
AO7B5	36, 37	S56A/S58D/I86V/N87P	8	4
AO7H8	40, 41	S56A/S58D/N87P	8	6
AO7D8	42, 43	S56A/S58D/T131C/T191S	26	6
AO7F7	44, 45	S56A/S58D/T131V/T191A	28	7
AO7H7	46, 47	S56A/S58D/T191S	29	8

【０３９８】

実施例６

ＮＡＤＨに対するK_Mを低下させるコンビナトリアルライブラリの構築

突然変異生成の結果（実施例４）に基づけば、Ｔ１３１Ｌ、Ｔ１３１Ａ、Ｔ１３１Ｖ、Ｔ１３１Ｍ、Ｔ１３１Ｃ、Ｔ１９１Ｄ、Ｔ１９１Ｃ、Ｔ１９１Ｓ、及びＴ１９１Ｇが、ＮＡＤＨに対するK_Mの改善に有益な突然変異であると考えられる。これらの有益な突然変異をＡＯ７Ｂ５に導入するコンビナトリアルライブラリを作製した。

【０３９９】

全てのオリゴヌクレオチド（ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｄｉｅ）は、Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ ＤＮＡ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ（Ｃｏｒａｌｖｉｌｌｅ ＩＡ）によ

り合成された。これらを初めにＴ４　ＰＮＫによってリン酸化した。簡潔に言えば、２０μｌの反応混合物は以下を含んだ：キットと共に提供された２．０μｌの１０×Ｔ４　ＰＮＫ緩衝液、２．８５μｌのプライマー（約３５μＭ、０．６μｌの１００ｍＭ　ＡＴＰ混合物、０．４μｌ　Ｔ４　ＰＮＫ及び１４．１５μｌの水。反応混合物を３７℃で１．０時間インキュベートし、次にＴ４　ＰＮＫを６５℃で２０分間不活性化した。

【０４００】

次に、リン酸化したプライマーを続くＰＣＲ反応に直接用いることにより、キットを使用してＡＯ７Ｂ５の２つの部位に突然変異を導入した。簡潔に言えば、５０μｌの反応混合物は以下を含んだ：キットと共に提供された５．０μｌの１０×反応緩衝液、２．５μｌのリン酸化したフォワードプライマー（０．５μｌの表１５に示す各フォワードプライマー）、２．５μｌリバースプライマー（０．６２５μｌの表１５に示す各フォワードプライマー）、２．５μｌのＡＯ７Ｂ５（５０ｎｇ／μｌ）、２．５μｌ　Ｃｈａｎｇ＿ＩＴ酵素及び３５μｌの水。この反応混合物を薄型ウェル２００μｌ容量ＰＣＲチューブに入れ、ＰＣＲには以下のＰＣＲ反応プログラムを用いた：開始温度は９５℃で２分間、続いて３０回の加熱／冷却サイクルであった。各サイクルは、９５℃で３０秒間、５５℃で３０秒間、及び６８℃で２０分間からなった。温度サイクルの完了時に試料をさらに２５分間６８℃に保ち、次に以降の処理については４℃に維持した。Ｚｙｍｏ　ＤＮＡクリーンアップキット（Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｏｒａｎｇｅ　ＣＡ、番号Ｄ４００４）を使用してＰＣＲ反応物をクリーンアップした。８４μｌの水を使用して膜からＤＮＡを溶出させた。ＤＮＡ鋳型を、Ｄｐｎ　Ｉ（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ　ＷＩ、番号Ｒ６２３１）により３７℃で3時間にわたり除去した（反応混合物：１０μｌの１０×反応緩衝液、１．０μｌ　ＢＳＡ、６．０μｌのＤｐｎ　Ｉ及び８３μｌのクリーンにしたＰＣＲ　ＤＮＡ）。Ｄｐｎ　Ｉ消化ＤＮＡを再びＺｙｍｏ　ＤＮＡクリーンアップキットでクリーンアップし、Ｄｐｎ　Ｉで再び消化して、ＤＮＡ鋳型を完全に除去した（反応混合物：１．５μｌの１０×反応緩衝液、０．１５μｌ　ＢＳＡ、０．８５μｌのＤｐｎ　Ｉ及び８３μｌのクリーンにしたＰＣＲ　ＤＮＡ）。

【０４０１】

Ｄｐｎ　Ｉ処理したＤＮＡ混合物を、製造者のプロトコルに従いＺｙｍｏ　ＤＮＡクリーンアップキットを使用してクリーンアップした。クリーンアップしたＤＮＡを用いることにより、ＢｉｏＲａｄ　Ｇｅｎｅ　Ｐｕｌｓｅｒ　ＩＩ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ　Ｉｎｃ．，Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，ＣＡ）を使用して大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）のエレクトロコンピテント株Ｂｗ２５１１３（ΔｉｌｖＣ）を形質転換した。形質転換したクローンを、ＬＢ培地及び１００μｇ／ｍｌアンピシリンを含有する寒天プレート（カタログ番号Ｌ１００４、Ｔｅｋｎｏｖａ　Ｉｎｃ．Ｈｏｌｌｉｓｔｅｒ，ＣＡ）にストリークし、３７℃で一晩インキュベートした。ＮＡＤＨを使用する活性の向上についてクローンをスクリーニングした。向上した突然変異体のK_Mを計測した（表１６）。

【０４０２】

【表１９】

表 15: 実施例 6 のプライマー

K9-KARI の標的位置	プライマー	
131	K9_131L_112210f:ggacgttgatgtcTTGatgatcgctcc	配列番号 166
	K9_131A_112210f:ggacgttgatgtcGCAatgatcgctcc	配列番号 167
	K9_131V_112210f:ggacgttgatgtcGTTatgatcgctcc	配列番号 168
	K9_131M_112210f:ggacgttgatgtcATGatgatcgctcc	配列番号 169
	K9_131C_112210f:ggacgttgatgtcTGAatgatcgctcc	配列番号 170
191	K9_191D_112210r:GGTTTCAGTTTCGTCTCTGAAGGTAGTTTC	配列番号 171
	K9_191C_112210r:GGTTTCAGTTTCGCATCTGAAGGTAGTTTC	配列番号 172
	K9_191S_112210r:GGTTTCAGTTTCCGATCTGAAGGTAGTTTC	配列番号 173
	K9_191G_112210r:GGTTTCAGTTTCGCCTCTGAAGGTAGTTTC	配列番号 174

【０４０３】

【表２０】

表 16

K_M 計測値を含む一部の突然変異体のリスト

突然変異体	配列番号 (核酸、アミノ酸)	突然変異	K_M (μM) (NADH)	K_M (μM) (NADPH)
AWB9	52, 53	S56A/S58D/I86V/N87P/T131A	10	4
AWC1	54, 55	S56A/S58D/I86V/N87P/T131V	9	3
AWD6	62, 63	S56A/S58D/I86V/N87P/T131V/T191S	5	2
AWD10	64, 65	S56A/S58D/I86V/N87P/T131A/T191C	8	3
AWF4	56, 57	S56A/S58D/I86V/N87P/N107S/T131V	7	3
AWF6	58, 59	S56A/S58D/I86V/N87P/T131V/T191D	7	2
AWG4	50, 51	S56A/S58D/I86V/N87P/T131M	7	3
AWH3	60, 61	S56A/S58D/I86V/N87P/T131V/T191G	6	2
AS6F1	48, 49	S56A/S58D/I86V/N87P/T131M/T191G	4	1

【０４０４】

実施例７

Ｋ９　ＫＡＲＩ変異体からのイソブタノール生成

以下のＫ９　ＫＡＲＩ変異体を、上記に記載したとおり作成した。

【０４０５】

【表２１】

表 17.

KARI 変異体及び対応する酵母発現ベクター

クローン名	酵母ベクター名	ヌクレオチド点突然変異位置					アミノ酸突然変異位置
		166	168	172	173	174	
WT K9 KARI	pHR81-PIlv5-KARI-K9	T	T	T	C	C	S56, S58
AB1G9	pHR81-PIlv5-KARI-K9.G9	G	G	G	A	G	S56A, S58E
495B5	pHR81-PIlv5-KARI-K9.B5	G	T	C	A	T	S56A, S58H
AB1D3	pHR81-PIlv5-KARI-K9.D3	G	T	G	A	T	S56A, S58D
AB1D1	pHR81-PIlv5-KARI-K9.D1	G	T	T	C	C	S56A

【０４０６】

大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ベクター（ｐＢＡＤ．ＫＡＲＩ）由来の変異ＫＡＲＩ遺伝子を、ｐＨＲ８１－ＰＩｌｖ５－Ｐｆ５．ＫＡＲＩベクターｐＬＨ５５６（図４、配列番号１３８）にＰｍｅＩ及びＳｆｉＩ部位でサブクローニングすることにより、酵母発現プラスミドを作製した。ＰＮＹ２２０４宿主（ＭＡＴａ　ｕｒａ３Δ：：ｌｏｘＰ　ｈｉｓ３Δ　ｐｄｃ６Δ　ｐｄｃ１Δ：：Ｐ［ＰＤＣ１］－ＤＨＡＤ｜ｉｌｖＤ＿Ｓｍ－ＰＤＣ１ｔ－ｐＵＣ１９－ｌｏｘＰ－ｋａｎＭＸ－ｌｏｘＰ－Ｐ［ＦＢＡ１］－ＡＬＳ｜ａｌｓＳ＿Ｂｓ－ＣＹＣ１ｔ　ｐｄｃ５Δ：：Ｐ［ＰＤＣ５］－ＡＤＨ｜ｓａｄＢ＿Ａｘ－ＰＤＣ５ｔ　ｇｐｄ２Δ：：ｌｏｘＰ　ｆｒａ２Δ　ａｄｈ１Δ：：ＵＡＳ（ＰＧＫ１）Ｐ［ＦＢＡ１］－ｋｉｖＤ＿Ｌｌ（ｙ）－ＡＤＨ１ｔ；実施例１３）において、経路プラスミド＃１としてのＫＡＲＩベクター、及び経路プラスミド＃２としてのｐＢＰ９１５（ｐＲＳ４２３－P_{FBA1}－ＤＨＡＤ－P_{GPM1}－ｈＡＤＨ１；配列番号１８２）を同時形質転換することにより、酵母経路株を作製した。形質転換体を、２％グルコース及び０．１％エタノールを炭素源として含有する同じ培地にパッチした。血清バイアル中における微好気性条件下でのイソブタノール生成について、３つのパッチを試験した。Ｋ９Ｄ３を発現するｐＢＰ９１５及びｐＬＨ７０２プラスミドで形質転換したクローンを、ＰＮＹ１９１０と命名した。

【０４０７】

ＳＥ－Ｕｒａ－Ｈｉｓプレート上の形質転換からの酵母コロニーが、５～７日後に現れた。コロニーを新鮮なＳＥ－Ｕｒａ－Ｈｉｓプレートにパッチし、３０℃で３日間インキュベートした。パッチした細胞を、０．２％グルコースと０．２％エタノールとを含む２５ｍＬのＳＥＧ－Ｕｒａ，Ｈｉｓ培地に接種し、３０℃で１～２日間、２～３ＯＤまで好気的に成長させた。細胞を遠心し、１ｍＬのＳＥＧ－Ｕｒａ，Ｈｉｓ培地（２％グルコース、０．１％エタノール、１０ｍｇ／Ｌエルゴステロール、５０ｍＭ　ＭＥＳ、ｐＨ５．５、チアミン３０ｍｇ／Ｌ、ニコチン酸３０ｍｇ／Ｌ）に再懸濁した。計算した細胞量を６０ｍＬ血清バイアル中出発ＯＤ＝０．２となるよう４５ｍＬ総容積の同じ培地に移し、上部をクリンパーで密封した。このステップは、標準的なバイオフードにおいて空気中で行った。血清バイアルを、３０℃、２００ｒｐｍで２日間インキュベートした。４８時間目に、ＯＤ並びにグルコース、イソブタノール及び経路中間体のＨＰＬＣ分析のため、試

料を取り出した。２４時間目の試料を嫌気性チャンバに取り、血清バイアルの嫌気性条件を維持した。４８時間インキュベーションの初期段階では、酵母細胞の成長によってヘッドスペース（約１５ｍＬ）に存在する空気及び液体培地が消費される。ヘッドスペースの酸素が消費されると、培養は嫌気性になる。従ってこの実験は、好気性条件から酸素制限及び嫌気性条件に切り替える条件を含む。

【０４０８】

４つのＫ９変異体のうち、ＡＢ１Ｇ９及びＡＢ１Ｄ３が比較的高いイソブタノール力価を生じた一方、４９５Ｂ５及びＡＢ１Ｄ１の力価は低かった。野生型Ｋ９　ＫＡＲＩ株は最も低い力価を生じた。理論によって拘束されることは望まないが、低い力価は、細胞が好気性条件から嫌気性条件に切り替わるときに、ＮＡＤＨ及びＮＡＤＰＨの平衡が変化することに起因すると考えられる。この理論的根拠により、嫌気性条件下ではＮＡＤＨ濃度及び利用可能性が大幅に増加し、ＮＡＤＨを使用する変異体ＫＡＲＩ酵素に好都合である。動態解析に基づけば、ＡＢ１Ｇ９（「Ｋ９Ｇ９」）及びＡＢ１Ｄ３（「Ｋ９Ｄ３」）突然変異体は、ＮＡＤＨに対するそれらの比較的低いK_M（４７及び３８μＭ）に加え、ＮＡＤＰＨに対して比較的高いK_Mを有する（２３及び９．２μＭ）。比較として、４９５Ｂ５及びＡＢ１Ｄ１のK_Mは、ＮＡＤＰＨに対してそれぞれ２．５及び１．１μＭであり、野生型Ｋ９のK_Mは０．１０μＭである。ＡＢ１Ｇ９及びＡＢ１Ｄ３の低いＮＡＤＨ K_Mが、ＡＢ１Ｇ９及びＡＢ１Ｄ３の高いＮＡＤＰＨ　K_Mと合わさって、嫌気性条件下でのＮＡＤＰＨ利用の低下、及び比較的高いＮＡＤＨ利用をもたらした可能性がある。エビデンスとして、ＡＢ１Ｇ９及びＡＢ１Ｄ３はグリセロール蓄積（イソブタノール：グリセロール＝３．３）が、４９５Ｂ５及びＡＢ１Ｄ１（２～３）と比較してより低い。野生型Ｋ９のイソブタノール：グリセロール比は、同じく好気性から嫌気性に切り替える条件下で１：１である。

【０４０９】

【表２２】

表 18.

血清バイアルにおいて好気性から嫌気性に切り替える実験で計測された野生型及び変異 K9 KARI 酵素の動態特性、並びにイソブタノール力価及び生成能力

クローン名	K_M (NADPH)	NADPH V_{max} (U/mg)	K_M (NADH)	NADH V_{max} (U/mg)	イソブタノール g/L	有効イソブタノール生成能力 (g/g 細胞)
WT K9 KARI	0.19	2.0	326	1.5	0.9	3.1
AB1G9	23	2.4	47	2.0	3.4	10.5
495B5	3.5	2.5	44	1.9	2.2	9.2
AB1D3	9.2	2.1	38	1.9	3.3	10.8
AB1D1	1.1	2.8	164	2.1	2.3	9.5

【０４１０】

実施例８

サッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）株ＢＰ１１３５（ＰＮＹ１５０５）及びＰＮＹ１５０７並びにイソブタノール生成誘導体の

構築

この例は、サッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）株ＢＰ１１３５及びＰＮＹ１５０７の構築について記載する。これらの株はＰＮＹ１５０３（ＢＰ１０６４）から誘導した。ＰＮＹ１５０３は、ＣＥＮ．ＰＫ １１３－７Ｄ（ＣＢＳ ８３４０；Ｃｅｎｔｒａａｌｂｕｒｅａｕ ｖｏｏｒ Ｓｃｈｉｍｍｅｌｃｕｌｔｕｒｅｓ（ＣＢＳ） Ｆｕｎｇａｌ Ｂｉｏｄｉｖｅｒｓｉｒｙ Ｃｅｎｔｒｅ，オランダ）から誘導した。ＢＰ１１３５は、ＦＲＡ２遺伝子のさらなる欠失を含む。ＰＮＹ１５０７は、ＡＤＨ１遺伝子のさらなる欠失を伴いＢＰ１１３５から誘導したもので、サッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）における発現用にコドン最適化されたラクトコッカス・ラクチス（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ ｌａｃｔｉｓ）由来のｋｉｖＤ遺伝子がＡＤＨ１遺伝子座に組み込まれた。

【０４１１】

欠失／組込みは、標的遺伝子の上流及び下流相同領域を含み、且つ形質転換体の選択用のＵＲＡ３遺伝子を含むＰＣＲ断片による相同組換えにより作成した。ＵＲＡ３遺伝子は相同組換えにより取り除き、スカーレスな欠失／組み込みを作成した。

【０４１２】

スカーレスな欠失／組込み手順は、Ａｋａｄａ ｅｔ ａｌ．，Ｙｅａｓｔ，２３：３９９，２００６を応用した。概して、各欠失／組込み用のＰＣＲカセットは、４つの断片Ａ－Ｂ－Ｕ－Ｃと、個々の断片をプラスミドにクローニングすることにより組み込まれる遺伝子とを組み合わせた後、欠失／組込み手順のためＰＣＲによってカセット全体を増幅することにより作製した。組み込まれる遺伝子は、カセットにおいて断片ＡとＢとの間に含まれた。ＰＣＲカセットは、天然のＣＥＮ．ＰＫ １１３－７Ｄ ＵＲＡ３遺伝子からなる選択可能／対抗選択可能マーカーのＵＲＡ３（断片Ｕ）を、プロモーター領域（ＵＲＡ３遺伝子の上流２５０ｂｐ）及びターミネーター領域（ＵＲＡ３遺伝子の下流１５０ｂｐ）と共に含んだ。断片Ａ及びＣ（各約１００～５００ｂｐ長）は、標的領域の直ちに上流の配列（断片Ａ）及び標的領域の３’配列（断片Ｃ）に対応した。断片Ａ及びＣは、カセットを相同組換えによって染色体に組み込むために用いられた。断片Ｂ（５００ｂｐ長）は、標的領域の直ちに下流５００ｂｐに対応し、相同組換えによる染色体からのＵＲＡ３マーカー及び断片Ｃの切出しに用いられ、これにより染色体へのカセットの組み込み時に断片Ｂに対応する配列のダイレクトリピートが作成された。

【０４１３】

ＦＲＡ２欠失

ＦＲＡ２コード配列の最初の１１３ヌクレオチドをインタクトなままとして、コード配列の３’末端から２５０ヌクレオチドが欠失するように、ＦＲＡ２欠失を設計した。欠失の７ヌクレオチド下流にインフレームの終止コドンが存在した。スカーレスなＦＲＡ２欠失用のＰＣＲカセットの４つの断片を、Ｐｈｕｓｉｏｎハイフィデリティ ＰＣＲマスターミックス（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ ＢｉｏＬａｂｓ；Ｉｐｓｗｉｃｈ，ＭＡ）を使用し、且つ鋳型として、Ｇｅｎｔｒａ Ｐｕｒｅｇｅｎｅ Ｙｅａｓｔ／Ｂａｃｔキット（Ｑｉａｇｅｎ；Ｖａｌｅｎｃｉａ，ＣＡ）で調製したＣＥＮ．ＰＫ １１３－７ＤゲノムＤＮＡを使用して増幅した。ＦＲＡ２断片Ａは、プライマーｏＢＰ５９４（配列番号１８３）、及びＦＲＡ２断片Ｂの５’末端と相同性を有する５’テールを含むプライマーｏＢＰ５９５（配列番号１８４）で増幅した。ＦＲＡ２断片Ｂは、ＦＲＡ２断片Ａの３’末端と相同性を有する５’テールを含むプライマーｏＢＰ５９６（配列番号１８５）、及びＦＲＡ２断片Ｕの５’末端と相同性を有する５’テールを含むプライマーｏＢＰ５９７（配列番号１８６）で増幅した。ＦＲＡ２断片Ｕは、ＦＲＡ２断片Ｂの３’末端と相同性を有する５’テールを含むプライマーｏＢＰ５９８（配列番号１８７）、及びＦＲＡ２断片Ｃの５’末端と相同性を有する５’テールを含むプライマーｏＢＰ５９９（配列番号１８８）で増幅した。ＦＲＡ２断片Ｃは、ＦＲＡ２断片Ｕの３’末端と相同性を有する５’テールを含むプライマーｏＢＰ６００（配列番号１８９）、及びプライマーｏＢＰ６０１（配列番号１９０）で増幅した。ＰＣＲ産物をＰＣＲ精製キット（Ｑｉａｇｅｎ）で精製した。

オーバーラップＰＣＲにより、ＦＲＡ２断片ＡとＦＲＡ２断片Ｂとを混合し、且つプライマーｏＢＰ５９４（配列番号１８３）及びｏＢＰ５９７（配列番号１８６）で増幅して、ＦＲＡ２断片ＡＢを作成した。オーバーラップＰＣＲにより、ＦＲＡ２断片ＵとＦＲＡ２断片Ｃとを混合し、且つプライマーｏＢＰ５９８（配列番号１８７）及びｏＢＰ６０１（配列番号１９０）で増幅して、ＦＲＡ２断片ＵＣを作成した。得られたＰＣＲ産物をアガロースゲルと、続いてゲル抽出キット（Ｑｉａｇｅｎ）で精製した。オーバーラップＰＣＲにより、ＦＲＡ２断片ＡＢとＦＲＡ２断片ＵＣとを混合し、且つプライマーｏＢＰ５９４（配列番号１８３及びｏＢＰ６０１（配列番号１９０）で増幅して、ＦＲＡ２　ＡＢＵＣカセットを作成した。ＰＣＲ産物をＰＣＲ精製キット（Ｑｉａｇｅｎ）で精製した。

【０４１４】

ＰＮＹ１５０３のコンピテント細胞を作製し、Ｆｒｏｚｅｎ－ＥＺ酵母形質転換ＩＩキット（Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ；Ｏｒａｎｇｅ，ＣＡ）を使用して、ＦＲＡ２　ＡＢＵＣ　ＰＣＲカセットで形質転換した。形質転換混合物を、３０℃の１％エタノール添加ウラシル不含合成完全培地に播いた。ｆｒａ２ノックアウトを有する形質転換体を、Ｇｅｎｔｒａ　Ｐｕｒｅｇｅｎｅ　Ｙｅａｓｔ／Ｂａｃｔキット（Ｑｉａｇｅｎ）で調製したゲノムＤＮＡを使用して、プライマーｏＢＰ６０２（配列番号１９１）及びｏＢＰ６０３（配列番号１９２）によるＰＣＲによってスクリーニングした。正しい形質転換体をＹＰＥ（酵母エキス、ペプトン、１％エタノール）で成長させ、３０℃の５－フルオロオロチン酸（０．１％）含有合成完全培地に播き、ＵＲＡ３マーカーが欠損した単離物を選択した。欠失及びマーカー除去を、Ｇｅｎｔｒａ　Ｐｕｒｅｇｅｎｅ　Ｙｅａｓｔ／Ｂａｃｔキット（Ｑｉａｇｅｎ）で調製したゲノムＤＮＡを使用して、プライマーｏＢＰ６０２（配列番号１９１）及びｏＢＰ６０３（配列番号１９２）によるＰＣＲによって確認した。単離物にＦＲＡ２遺伝子が存在しないことは、ＦＲＡ２の欠失させたコード配列に特異的なプライマーのｏＢＰ６０５（配列番号１９３）及びｏＢＰ６０６（配列番号１９４）を使用するネガティブＰＣＲ結果により実証された。正しい単離物を、株ＣＥＮ．ＰＫ　１１３－７Ｄ　ＭＡＴａ　ｕｒａ３Δ：：ｌｏｘＰ　ｈｉｓ３Δ　ｐｄｃ６Δ　ｐｄｃ１Δ：：Ｐ［ＰＤＣ１］－ＤＨＡＤ｜ｉｌｖＤ＿Ｓｍ－ＰＤＣ１ｔ　ｐｄｃ５Δ：：Ｐ［ＰＤＣ５］－ＡＤＨ｜ｓａｄＢ＿Ａｘ－ＰＤＣ５ｔ　ｇｐｄ２Δ：：ｌｏｘＰ　ｆｒａ２Δとして選択し、ＰＮＹ１５０５（ＢＰ１１３５）と命名した。

【０４１５】

この株をイソブタノール経路プラスミド（ｐＹＺ０９０、配列番号１９５）及びｐＬＨ４６８（配列番号１３９）で形質転換し、１つのクローンをＢＰ１１６８（ＰＮＹ１５０６）と命名した。

【０４１６】

ｐＹＺ０９０（配列番号１９５）は、ＡＬＳ発現用の、酵母ＣＵＰ１プロモーター（ｎｔ　２位～４４９位）から発現し、且つＣＹＣ１ターミネーター（ｎｔ　２１８１位～２４３０位）が続く枯草菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｕｂｔｉｌｉｓ）由来のａｌｓＳ遺伝子のコード領域（ｎｔ　４５７位～２１７２位）を有するキメラ遺伝子と、ＫＡＲＩ発現用の、酵母ＩＬＶ５プロモーター（２４３３位～３６２６位）から発現し、且つＩＬＶ５ターミネーター（ｎｔ　４６８２位～５３０４位）が続くラクトコッカス・ラクチス（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｌａｃｔｉｓ）由来のｉｌｖＣ遺伝子のコード領域（ｎｔ　３６３４位～４６５６位）を有するキメラ遺伝子とを含むように構築した。

【０４１７】

ＡＤＨ１欠失及びｋｉｖＤ　Ｌｌ（ｙ）組込み

ＡＤＨ１遺伝子を欠失させ、サッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）での発現用にコドン最適化したラクトコッカス・ラクチス（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｌａｃｔｉｓ）由来のｋｉｖＤコード領域によって置換した。ＡＤＨ１欠失－ｋｉｖＤ＿Ｌｌ（ｙ）組込み用のスカーレスなカセットを、参照により本明細書に援用される２０１０年６月１８日に出願された米国仮特許出願第６１／３５６３７９号明細書に記載されるとおり、初めにプラスミドｐＵＣ１９－ＵＲＡ３ＭＣＳにクロ

ーニングした。このベクターはｐＵＣ１９ベースで、多重クローニング部位（ＭＣＳ）内に位置するサッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）ＣＥＮ．ＰＫ １１３－７Ｄ由来のＵＲＡ３遺伝子の配列を含む。ｐＵＣ１９は、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）における複製及び選択用のｐＭＢ１レプリコンとβ－ラクタマーゼをコードする遺伝子とを含む。ＵＲＡ３のコード配列に加え、酵母におけるＵＲＡ３遺伝子の発現用に、この遺伝子の上流（２５０ｂｐ）及び下流（１５０ｂｐ）からの配列が存在する。このベクターはクローニング目的に用いることができ、且つ酵母組込みベクターとして用いることができる。

【０４１８】

サッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）での発現用にコドン最適化したラクトコッカス・ラクチス（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ ｌａｃｔｉｓ）由来のｋｉｖＤコード領域を、ｐＬＨ４６８（配列番号１３９）を鋳型として使用して、ＰｍｅＩ制限部位を含むプライマーｏＢＰ５６２（配列番号１９７）、及びＡＤＨ１断片Ｂの５’末端と相同性を有する５’テールを含むプライマーｏＢＰ５６３（配列番号１９８）で増幅した。ＡＤＨ１断片Ｂを、上記のとおり調製したゲノムＤＮＡから、ｋｉｖＤ＿Ｌｌ（ｙ）の３’末端と相同性を有する５’テールを含むプライマーｏＢＰ５６４（配列番号１９９）、及びＦｓｅＩ制限部位を含むプライマーｏＢＰ５６５（配列番号２００）で増幅した。ＰＣＲ産物をＰＣＲ精製キット（Ｑｉａｇｅｎ）で精製した。オーバーラップＰＣＲにより、ｋｉｖＤ＿Ｌｌ（ｙ）とＡＤＨ１断片Ｂ ＰＣＲ産物とを混合し、且つプライマーｏＢＰ５６２（配列番号１９７）及びｏＢＰ５６５（配列番号２００）で増幅して、ｋｉｖＤ＿Ｌｌ（ｙ）－ＡＤＨ１断片Ｂを作成した。得られたＰＣＲ産物をＰｍｅＩ及びＦｓｅＩで消化し、適切な酵素で消化した後、Ｔ４ ＤＮＡリガーゼによってｐＵＣ１９－ＵＲＡ３ＭＣＳの対応する部位にライゲートした。ＡＤＨ１断片Ａを、ゲノムＤＮＡから、ＳａｃＩ制限部位を含むプライマーｏＢＰ５０５（配列番号２０１）、及びＡｓｃＩ制限部位を含むプライマーｏＢＰ５０６（配列番号２０２）で増幅した。ＡＤＨ１断片Ａ ＰＣＲ産物をＳａｃＩ及びＡｓｃＩで消化し、Ｔ４ ＤＮＡリガーゼにより、ｋｉｖＤ＿Ｌｌ（ｙ）－ＡＤＨ１断片Ｂを含むプラスミドの対応する部位にライゲートした。ＡＤＨ１断片Ｃを、ゲノムＤＮＡから、ＰａｃＩ制限部位を含むプライマーｏＢＰ５０７（配列番号２０３）、及びＳａｌＩ制限部位を含むプライマーｏＢＰ５０８（配列番号２０４）で増幅した。ＡＤＨ１断片Ｃ ＰＣＲ産物をＰａｃＩ及びＳａｌＩで消化し、Ｔ４ ＤＮＡリガーゼにより、ＡＤＨ１断片Ａ－ｋｉｖＤ＿Ｌｌ（ｙ）－ＡＤＨ１断片Ｂを含むプラスミドの対応する部位にライゲートした。ハイブリッドプロモーターＵＡＳ（ＰＧＫ１）－P_{FBA1}を、ベクターｐＲＳ３１６－ＵＡＳ（ＰＧＫ１）－P_{FBA1}－ＧＵＳ（配列番号２０９）から、ＡｓｃＩ制限部位を含むプライマーｏＢＰ６７４（配列番号２０５）、及びＰｍｅＩ制限部位を含むプライマーｏＢＰ６７５（配列番号２０６）で増幅した。ＵＡＳ（ＰＧＫ１）－P_{FBA1} ＰＣＲ産物をＡｓｃＩ及びＰｍｅＩで消化し、Ｔ４ ＤＮＡリガーゼにより、ｋｉｖＤ＿Ｌｌ（ｙ）－ＡＤＨ１断片ＡＢＣを含むプラスミドの対応する部位にライゲートした。組込みカセット全体を、得られたプラスミドからプライマーｏＢＰ５０５（配列番号２０１）及びｏＢＰ５０８（配列番号２０４）で増幅し、ＰＣＲ精製キット（Ｑｉａｇｅｎ）で精製した。

【０４１９】

ＰＮＹ１５０５のコンピテント細胞を作製し、Ｆｒｏｚｅｎ－ＥＺ酵母形質転換ＩＩキット（Ｚｙｍｏ Ｒｅｓｅａｒｃｈ）を使用して、上記で構築したＡＤＨ１－ｋｉｖＤ＿Ｌｌ（ｙ）ＰＣＲカセットで形質転換した。形質転換混合物を、３０℃の１％エタノール添加ウラシル不含合成完全培地に播いた。形質転換体をＹＰＥ（１％エタノール）で成長させて、３０℃の５－フルオロオロチン酸（０．１％）含有合成完全培地に播き、ＵＲＡ３マーカーが欠損した単離物を選択した。ＡＤＨ１の欠失及びｋｉｖＤ＿Ｌｌ（ｙ）の組込みを、Ｇｅｎｔｒａ Ｐｕｒｅｇｅｎｅ Ｙｅａｓｔ／Ｂａｃｔキット（Ｑｉａｇｅｎ）で調製したゲノムＤＮＡを使用して、外部プライマーｏＢＰ４９５（配列番号２０７）及びｏＢＰ４９６（配列番号２０８）による、並びにｋｉｖＤ＿Ｌｌ（ｙ）特異的プライ

マーｏＢＰ５６２（配列番号１９７）及び外部プライマーｏＢＰ４９６（配列番号２０８）によるＰＣＲによって確認した。正しい単離物を、株ＣＥＮ．ＰＫ　１１３－７Ｄ　ＭＡＴａ　ｕｒａ３Δ：：ｌｏｘＰ　ｈｉｓ３Δ　ｐｄｃ６Δ　ｐｄｃ１Δ：：Ｐ［ＰＤＣ１］－ＤＨＡＤ｜ｉｌｖＤ＿Ｓｍ－ＰＤＣ１ｔｐｄｃ５Δ：：Ｐ［ＰＤＣ５］－ＡＤＨ｜ｓａｄＢ＿Ａｘ－ＰＤＣ５ｔ　ｇｐｄ２Δ：：ｌｏｘＰ　ｆｒａ２Δ　ａｄｈ１Δ：：ＵＡＳ（ＰＧＫ１）Ｐ［ＦＢＡ１］－ｋｉｖＤ＿Ｌｌ（ｙ）－ＡＤＨ１ｔとして選択し、ＰＮＹ１５０７（ＢＰ１２０１）と命名した。ＰＮＹ１５０７をイソブタノール経路プラスミドｐＹＺ０９０（配列番号１９５）及びｐＢＰ９１５（配列番号１８２）で形質転換し、得られた株をＰＮＹ１５１３と命名した。

【０４２０】

ｐＲＳ３１６－ＵＡＳ（ＰＧＫ１）－ＦＢＡ１ｐ－ＧＵＳベクターの構築

カセットＵＡＳ（ＰＧＫ１）－ＦＢＡ１ｐ（配列番号７６６をクローニングするため、第一に、６０２ｂｐのＦＢＡ１プロモーター（ＦＢＡ１ｐ）を、ＣＥＮ．ＰＫのゲノムＤＮＡからプライマーＴ－ＦＢＡ１（ＳａｌＩ）（配列番号７６７）及びＢ－ＦＢＡ１（ＳｐｅＩ）（配列番号７６８）でＰＣＲ増幅し、プラスミドｐＷＳ３５８－ＰＧＫ１ｐ－ＧＵＳ（配列番号７６９）のＳａｌＩ及びＳｐｅＩ部位に、プラスミドのＳａｌＩ／ＳｐｅＩ消化によりＰＧＫ１ｐプロモーターを除去した後にクローニングして、ｐＷＳ３５８－ＦＢＡ１ｐ－ＧＵＳを得た。ｐＷＳ３５８－ＰＧＫ１ｐ－ＧＵＳプラスミドは、ｐＲＳ４２３ベクター（Ｃｈｒｉｓｔｉａｎｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅ，１１０：１１９－１２２，１９９２）から誘導されたｐＷＳ３５８の多重クローニング部位に、ＰＧＫ１ｐ及びβ－グルクロニダーゼ遺伝子（ＧＵＳ）ＤＮＡ断片を挿入することによって作成した。第二に、得られたｐＷＳ３５８－ＦＢＡ１ｐ－ＧＵＳプラスミドをＳａｌＩ及びＳａｃＩで消化し、ＦＢＡ１ｐプロモーター、ＧＵＳ遺伝子、及びＦＢＡｔターミネーターを含むＤＮＡ断片をゲル精製し、ｐＲＳ３１６のＳａｌＩ／ＳａｃＩ部位にクローニングして、ｐＲＳ３１６－ＦＢＡ１ｐ－ＧＵＳを作成した。第三に、３－ホスホグリセリン酸キナーゼ（ＰＧＫ１）オープンリーディングフレームの上流の－５１９位と－４０２位との間に位置する上流活性化配列（ＵＡＳ）を含む１１８ｂｐのＤＮＡ断片、すなわちＵＡＳ（ＰＧＫ１）を、ＣＥＮ．ＰＫのゲノムＤＮＡからプライマーＴ－Ｕ／ＰＧＫ１（ＫｐｎＩ）（配列番号７７０）及びＢ－Ｕ／ＰＧＫ１（ＳａｌＩ）（配列番号７７１）でＰＣＲ増幅した。ＰＣＲ産物をＫｐｎＩ及びＳａｌＩで消化し、ｐＲＳ３１６－ＦＢＡ１ｐ－ＧＵＳのＫｐｎＩ／ＳａｌＩ部位にクローニングして、ｐＲＳ３１６－ＵＡＳ（ＰＧＫ１）－ＦＢＡ１ｐ－ＧＵＳを作成した。

【０４２１】

実施例９

ＡＬＤ６の除去を含む改良された組換え宿主細胞

本例の目的は、イソブタノール生成を改善する酵母宿主株の修飾方法について記載することである。このような修飾には、イソブチルアルデヒドレダクターゼ活性をコードする遺伝子の組込み、並びにそれぞれＮＡＤＰ＋依存性アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ及びＮＡＤＰＨ依存性デヒドロゲナーゼをコードする天然遺伝子ＡＬＤ６及びＹＭＲ２２６ｃの除去が含まれる。

【０４２２】

Ｓ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）株ＰＮＹ２２１１の構築

ＰＮＹ２２１１を、以下の段落に記載するとおり、Ｓ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）株ＰＮＹ１５０７（実施例８）からいくつかのステップで構築した。初めにＰＮＹ１５０７を、ホスホケトラーゼ（ｐｈｏｓｏｐｈｏｋｅｔｏｌａｓｅ）遺伝子を含むように修飾した。次に、この株に、ホスホケトラーゼ（ｐｈｏｓｐｈｏｋｅｌｏａｓｅ）遺伝子に隣接する配列に標的化された組込みベクターを使用してアセト乳酸シンターゼ遺伝子（ａｌｓＳ）を加えた。最後に、相同組換えを用いてホスホケトラーゼ遺伝子及び組込みベクター配列を除去し、ｐｄｃ１Δ：：ｉｌｖＤ（実施例１２に記載される）と染色体ＸＩＩの天然ＴＲＸ１遺伝子との間の遺伝子間領域にａｌｓＳのスカーレスな挿入を得

た。ＰＮＹ２２１１の得られた遺伝子型は、ＭＡＴａ　ｕｒａ３Δ：：ｌｏｘＰ　ｈｉｓ３Δ　ｐｄｃ６Δ　ｐｄｃ１Δ：：Ｐ［ＰＤＣ１］－ＤＨＡＤ｜ｉｌｖＤ＿Ｓｍ－ＰＤＣ１ｔ－Ｐ［ＦＢＡ１］－ＡＬＳ｜ａｌｓＳ＿Ｂｓ－ＣＹＣ１ｔ　ｐｄｃ５Δ：：Ｐ［ＰＤＣ５］－ＡＤＨ｜　ｓａｄＢ＿Ａｘ－ＰＤＣ５ｔ　ｇｐｄ２Δ：：ｌｏｘＰ　ｆｒａ２Δ　ａｄｈ１Δ：：ＵＡＳ（ＰＧＫ１）Ｐ［ＦＢＡ１］－ｋｉｖＤ＿Ｌｌ（ｙ）－ＡＤＨ１ｔである。

【０４２３】

ＰＮＹ１５０７に相同組換えによってホスホケトラーゼ遺伝子カセットを導入した。組込みコンストラクトは以下のとおり作成した。プラスミドｐＲＳ４２３：：ＣＵＰ１－ａｌｓＳ＋ＦＢＡ－ｂｕｄＡ（以前に米国特許出願公開第２００９／０３０５３６３号明細書（これは全体として参照により本明細書に援用される）に記載されている）をＮｏｔＩ及びＸｍａＩで消化して１．８ｋｂのＦＢＡ－ｂｕｄＡ配列を除去し、クレノウ断片で処理した後、ベクターを再びライゲートした。次に、ＣＵＰ１プロモーターを、ＤＮＡ２．０（Ｍｅｎｌｏ　Ｐａｒｋ，ＣＡ）のＤＮＡ合成及びベクター構築サービスによって、ＴＥＦ１プロモーター変異体（以前にＮｅｖｏｉｇｔ　ｅｔ　ａｌ．Ａｐｐｌ．Ｅｎｖｉｒｏｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．７２：５２６６－５２７３（２００６）（これは全体として参照により本明細書に援用される）により記載されたＭ４変異体）によって置換した。得られたプラスミドｐＲＳ４２３：：ＴＥＦ（Ｍ４）－ａｌｓＳをＳｔｕＩ及びＭｌｕＩで切断し（ａｌｓＳ遺伝子の一部及びＣＹＣ１ターミネーターを含む１．６ｋｂ部分を除去する）、プライマーＮ１１７６（配列番号２８２）及びＮ１１７７（配列番号２８３）でｐＲＳ４２６：：ＧＰＤ－ｘｐｋ１＋ＡＤＨ－ｅｕｔＤ（配列番号３８３）から作成した４ｋｂのＰＣＲ産物、並びにプライマーＮ８２２（配列番号２８５）及びＮ１１７８（配列番号２８６）で酵母ゲノムＤＮＡ（ＥＮＯ１プロモーター領域）から作成した０．８ｋｂのＰＣＲ産物ＤＮＡ（配列番号２８４）と組み合わせて、Ｓ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）株ＢＹ４７４１（ＡＴＣＣ番号２０１３８８）に形質転換した；ギャップ修復クローニング方法、Ｍａ　ｅｔ　ａｌ．Ｇｅｎｅ　５８：２０１－２１６（１９８７）を参照のこと。ヒスチジン不含の合成完全培地に細胞を播いて形質転換体を得た。予想したプラスミド（ｐＲＳ４２３：：ＴＥＦ（Ｍ４）－ｘｐｋ１＋ＥＮＯ１－ｅｕｔＤ、配列番号２９３）が正しく構築されたことを、ＰＣＲ（プライマーＮ８２１（配列番号２８７）及びＮ１１１５（配列番号２８８））及び制限消化（ＢｇｌＩ）によって確認した。続いて２つのクローンを配列決定した。３．１ｋｂのＴＥＦ（Ｍ４）－ｘｐｋ１遺伝子をＳａｃＩ及びＮｏｔＩによる消化によって単離し、ｐＵＣ１９－ＵＲＡ３：：ｉｌｖＤ－ＴＲＸ１ベクター（クローンＡ、ＡｆｌＩＩで切断）にクローニングした。クローニング断片をクレノウ断片で処理してライゲーション用の平滑末端を作成した。ライゲーション反応物を大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）Ｓｔｂｌ３細胞に形質転換することにより、アンピシリン耐性について選択した。ＴＥＦ（Ｍ４）－ｘｐｋ１の挿入を、ＰＣＲ（プライマーＮ１１１０（配列番号３６７）及びＮ１１１４（配列番号２９０））によって確認した。ベクターをＡｆｌＩＩで線状化し、クレノウ断片で処理した。１．８ｋｂのＫｐｎＩ－ＨｉｎｃＩＩジェネティシン耐性カセット（配列番号３８４）を、クレノウ断片処理後にライゲートすることによってクローニングした。ライゲーション反応物を大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）Ｓｔｂｌ３細胞に形質転換することにより、アンピシリン耐性について選択した。ジェネティシンカセットの挿入をＰＣＲ（プライマーＮ１６０ＳｅｑＦ５（配列番号２１０）及びＢＫ４６８（配列番号３６８））によって確認した。プラスミド配列は、配列番号２９１（ｐＵＣ１９－ＵＲＡ３：：ｐｄｃ１：：ＴＥＦ（Ｍ４）－ｘｐｋ１：：ｋａｎ）として提供される。

【０４２４】

得られた組込みカセット（ｐｄｃ１：：ＴＥＦ（Ｍ４）－ｘｐｋ１：：ＫａｎＭＸ：：ＴＲＸ１）を単離し（ＡｓｃＩ及びＮａｅＩ消化により、ゲル精製した５．３ｋｂバンドが生じた）、Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｆｒｏｚｅｎ－ＥＺ酵母形質転換キット（カタログ番号Ｔ２００１）を使用してＰＮＹ１５０７に形質転換した。形質転換体を、ＹＰ

Ｅ＋５０μｇ／ｍｌ　Ｇ４１８に播くことにより選択した。予想した遺伝子座への組込みを、ＰＣＲ（プライマーＮ８８６（配列番号２１１）及びＮ１２１４（配列番号２８１））によって確認した。次に、ＣｒｅリコンビナーゼをコードするプラスミドｐＲＳ４２３：：ＧＡＬ１ｐ－Ｃｒｅ（配列番号２７１）を使用してｌｏｘＰ隣接ＫａｎＭＸカセットを除去した。カセットが正しく除去されたことを、ＰＣＲ（プライマーｏＢＰ５１２（配列番号３３７）及びＮ１６０ＳｅｑＦ５（配列番号２１０））によって確認した。最後に、実施例１３に記載されるａｌｓＳ組込みプラスミドｐＵＣ１９－ｋａｎ：：ｐｄｃ１：：ＦＢＡ－ａｌｓＳ：：ＴＲＸ１、クローンＡ）を、含まれたジェネティシン選択マーカーを使用してこの株に形質転換した。２つの組み込み体を、プラスミドｐＹＺ０９０Δａｌｓ Ｓ（配列番号３７１）及びｐＢＰ９１５（配列番号１８２）による形質転換（Ａｍｂｅｒｇ，Ｂｕｒｋｅ　ａｎｄ　Ｓｔｒａｔｈｅｒｎ“Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｙｅａｓｔ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ”（２００５）のプロトコル＃２を用いて形質転換した）、並びにグルコース含有培地における成長及びイソブタノール生成の評価によって、アセト乳酸シンターゼ活性について試験した（成長及びイソブタノール計測方法は以下のとおりである：全ての株を、０．３％グルコース及び０．３％エタノールを炭素源として含有するヒスチジン及びウラシル不含の合成完全培地（１２５ｍＬベント付き三角フラスコ（ＶＷＲカタログ番号８９０９５－２６０中の１０ｍＬ培地）で成長させた。一晩インキュベートした後（３０℃、Ｉｎｎｏｖａ（登録商標）４０　Ｎｅｗ　Ｂｒｕｎｓｗｉｃｋ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃシェーカーにおいて２５０ｒｐｍ）、培養物を２％グルコース及び０．０５％エタノールを含有する合成完全培地（１２５ｍＬの密栓した三角フラスコ（ＶＷＲカタログ番号８９０９５－２６０）中の２０ｍｌ培地）に希釈して０．２ＯＤ（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ　ＢｉｏＰｈｏｔｏｍｅｔｅｒ計測）に戻した。４８時間インキュベートした後（３０℃、Ｉｎｎｏｖａ（登録商標）４０　Ｎｅｗ　Ｂｒｕｎｓｗｉｃｋ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃシェーカーにおいて２５０ｒｐｍ）、培養上清（Ｓｐｉｎ－Ｘ遠心管フィルタユニット、Ｃｏｓｔａｒ　カタログ番号８１６９を使用して回収した）を、米国特許出願公開第２００７／００９２９５７号明細書（これは全体として参照により本明細書に援用される）に記載される方法によってＨＰＬＣにより分析した）２つのクローンのうちの一方が陽性で、ＰＮＹ２２１８と命名した。

【０４２５】

ＰＮＹ２２１８をＣｒｅリコンビナーゼで処理し、得られたクローンを、ｘｐｋ１遺伝子の欠失及びｐＵＣ１９組込みベクター配列についてＰＣＲ（プライマーＮ８８６（配列番号２１１）及びＮ１６０ＳｅｑＲ５（配列番号３８８））によりスクリーニングした。これにより、組込みベクターの挿入（ベクター、マーカー遺伝子及びｌｏｘＰ配列がなくなるため、「スカーレスな」挿入）の間に導入されたｘｐｋ１の上流のＤＮＡ及び相同ＤＮＡの組換え後には、ｐｄｃ１－ＴＲＸ１遺伝子間領域に組み込まれたａｌｓＳ遺伝子のみが残った。この組換えは任意の箇所で起こり得たが、ジェネティシン選択がなくてもベクター組込みは安定しているように見え、組換え現象はＣｒｅリコンビナーゼの導入後にのみ観察された。１つのクローンをＰＮＹ２２１１と命名した。

【０４２６】

プラスミドｐＹＺ０９０ΔａｌｓＳ及びｐＢＰ９１５を含むＰＮＹ２２１８の単離物をＰＮＹ２２０９と命名した。

【０４２７】

ＰＮＹ１５２８（ＰＮＹ２２１１におけるｈＡＤＨ組込み）

欠失／組込みは、標的領域の上流及び下流相同領域を含み、且つ形質転換体の選択用のＵＲＡ３遺伝子を含むＰＣＲ産物による相同組換えによって作成した。ＵＲＡ３遺伝子を相同組換えにより取り除き、スカーレスな欠失／組み込みを作成した。

【０４２８】

ＹＰＲＣΔ１５欠失及びウマ肝臓ａｄｈ組込み

ＹＰＲＣΔ１５遺伝子座を欠失させ、サッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）由来のＰＤＣ５プロモーター領域（５３８ｂｐ）及

びサッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）由来のＡＤＨ１ターミネーター領域（３１６ｂｐ）と共に、サッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）での発現用にコドン最適化したウマ肝臓ａｄｈ遺伝子によって置換した。ＹＰＲＣΔ１５欠失－Ｐ［ＰＤＣ５］－ａｄｈ＿ＨＬ（ｙ）－ＡＤＨ１ｔ組込み用のスカーレスなカセットを、初めにプラスミドｐＵＣ１９－ＵＲＡ３ＭＣＳ（実施例８に記載される）にクローニングした。

【０４２９】

断片Ａ－Ｂ－Ｕ－Ｃを、Ｐｈｕｓｉｏｎハイフィデリティ ＰＣＲマスターミックス（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　ＢｉｏＬａｂｓ；Ｉｐｓｗｉｃｈ，ＭＡ）を使用し、且つ鋳型として、Ｇｅｎｔｒａ　Ｐｕｒｅｇｅｎｅ　Ｙｅａｓｔ／Ｂａｃｔキット（Ｑｉａｇｅｎ；Ｖａｌｅｎｃｉａ，ＣＡ）で調製したＣＥＮ．ＰＫ　１１３－７ＤゲノムＤＮＡを使用して増幅した。ＹＰＲＣΔ１５断片Ａは、ゲノムＤＮＡから、ＫｐｎＩ制限部位を含むプライマーｏＢＰ６２２（配列番号２１２）、及びＹＰＲＣΔ１５断片Ｂの５’末端と相同性を有する５’テールを含むプライマーｏＢＰ６２３（配列番号２１３）で増幅した。ＹＰＲＣΔ１５断片Ｂは、ゲノムＤＮＡから、ＹＰＲＣΔ１５断片Ａの３’末端と相同性を有する５’テールを含むプライマーｏＢＰ６２４（配列番号２１４）、及びＦｓｅＩ制限部位を含むプライマーｏＢＰ６２５（配列番号２１５）で増幅した。ＰＣＲ産物をＰＣＲ精製キット（Ｑｉａｇｅｎ）で精製した。オーバーラップＰＣＲにより、ＹＰＲＣΔ１５断片ＡとＹＰＲＣΔ１５断片Ｂ　ＰＣＲ産物とを混合し、且つプライマーｏＢＰ６２２（配列番号２１２）及びｏＢＰ６２５（配列番号２１５）で増幅して、ＹＰＲＣΔ１５断片Ａ－ＹＰＲＣΔ１５断片Ｂを作成した。得られたＰＣＲ産物をＫｐｎＩ及びＦｓｅＩで消化し、適切な酵素で消化した後、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼによってｐＵＣ１９－ＵＲＡ３ＭＣＳの対応する部位にライゲートした。ＹＰＲＣΔ１５断片Ｃを、ゲノムＤＮＡから、ＮｏｔＩ制限部位を含むプライマーｏＢＰ６２６（配列番号２１６）、及びＰａｃＩ制限部位を含むプライマーｏＢＰ６２７（配列番号２１７）で増幅した。ＹＰＲＣΔ１５断片Ｃ　ＰＣＲ産物をＮｏｔＩ及びＰａｃＩで消化し、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼにより、ＹＰＲＣΔ１５断片ＡＢを含むプラスミドの対応する部位にライゲートした。ＰＤＣ５プロモーター領域を、ＣＥＮ．ＰＫ　１１３－７ＤゲノムＤＮＡから、ＡｓｃＩ制限部位を含むプライマーＨＹ２１（配列番号２１８）、及びａｄｈ＿Ｈｌ（ｙ）の５’末端と相同性を有する５’テールを含むプライマーＨＹ２４（配列番号２１９）で増幅した。ａｄｈ＿Ｈｌ（ｙ）－ＡＤＨ１ｔを、ｐＢＰ９１５（配列番号１８２）から、Ｐ［ＰＤＣ５］の３’末端と相同性を有する５’テールを含むプライマーＨＹ２５（配列番号２２０）、及びＰｍｅＩ制限部位を含むＨＹ４（配列番号２２１）で増幅した。ＰＣＲ産物をＰＣＲ精製キット（Ｑｉａｇｅｎ）で精製した。オーバーラップＰＣＲにより、Ｐ［ＰＤＣ５］とａｄｈ＿ＨＬ（ｙ）－ＡＤＨ１ｔ　ＰＣＲ産物とを混合し、且つプライマーＨＹ２１（配列番号２１８）及びＨＹ４（配列番号２２１）で増幅して、Ｐ［ＰＤＣ５］－ａｄｈ＿ＨＬ（ｙ）－ＡＤＨ１ｔを作成した。得られたＰＣＲ産物をＡｓｃＩ及びＰｍｅＩで消化し、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼにより、ＹＰＲＣΔ１５断片ＡＢＣを含むプラスミドの対応する部位にライゲートした。組込みカセット全体を、得られたプラスミドから、プライマーｏＢＰ６２２（配列番号２１２）及びｏＢＰ６２７（配列番号２１７）で増幅した。

【０４３０】

ＰＮＹ２２１１のコンピテント細胞を作製し、Ｆｒｏｚｅｎ－ＥＺ酵母形質転換ＩＩキット（Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ；Ｏｒａｎｇｅ，ＣＡ）を使用して、ＹＰＲＣΔ１５欠失－Ｐ［ＰＤＣ５］－ａｄｈ＿ＨＬ（ｙ）－ＡＤＨ１ｔ組込みカセットＰＣＲ産物で形質転換した。形質転換混合物を、３０℃の１％エタノール添加ウラシル不含合成完全培地に播いた。形質転換体を、プライマーＵＲＡ３－ｅｎｄ　Ｆ（配列番号２２２）及びｏＢＰ６３７（配列番号２２４）によるＰＣＲによってスクリーニングした。正しい形質転換体をＹＰＥ（１％エタノール）で成長させて、１％ＥｔＯＨを補足した、且つ５－フルオロオロチン酸（０．１％）を含有する３０℃の合成完全培地に播き、ＵＲＡ３マーカーが欠損した単離物を選択した。ＹＰＲＣΔ１５の欠失及びＰ［ＰＤＣ５］－ａｄｈ＿ＨＬ（

ｙ）－ＡＤＨ１ｔの組込みを、ＹｅａＳｔａｒゲノムＤＮＡキット（Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）で調製したゲノムＤＮＡを使用して、外部プライマーｏＢＰ６３６（配列番号２２３）及びｏＢＰ６３７（配列番号２２４）によるＰＣＲによって確認した。以下の遺伝子型の正しい単離物を、さらなる修飾用に選択した：ＣＥＮ．ＰＫ　１１３－７Ｄ　ＭＡＴａ　ｕｒａ３Δ：：ｌｏｘＰ　ｈｉｓ３Δ　ｐｄｃ６Δ　ｐｄｃ１Δ：：Ｐ［ＰＤＣ１］－ＤＨＡＤ｜ｉｌｖＤ＿Ｓｍ－ＰＤＣ１ｔ－Ｐ［ＦＢＡ１］－ＡＬＳ｜ａｌｓＳ＿Ｂｓ－ＣＹＣ１ｔ　ｐｄｃ５Δ：：Ｐ［ＰＤＣ５］－ＡＤＨ｜ｓａｄＢ＿Ａｘ－ＰＤＣ５ｔ　ｇｐｄ２Δ：：ｌｏｘＰ　ｆｒａ２Δ　ａｄｈ１Δ：：ＵＡＳ（ＰＧＫ１）Ｐ［ＦＢＡ１］－ｋｉｖＤ＿Ｌｌ（ｙ）－ＡＤＨ１ｔ　ｙｐｒｃΔ１５Δ：：Ｐ［ＰＤＣ５］－ＡＤＨ｜ａｄｈ＿Ｈｌ－ＡＤＨ１ｔ。

【０４３１】

ｆｒａ２Δにおけるウマ肝臓ａｄｈ組込み

サッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）での発現用にコドン最適化したウマ肝臓ａｄｈ遺伝子を、サッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）由来のＰＤＣ１プロモーター領域（８７０ｂｐ）及びサッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）由来のＡＤＨ１ターミネーター領域（３１６ｂｐ）と共に、ｆｒａ２欠失部位に組み込んだ。ｆｒａ２Δ－Ｐ［ＰＤＣ１］－ａｄｈ＿ＨＬ（ｙ）－ＡＤＨ１ｔ組込み用のスカーレスなカセットを、初めにプラスミドｐＵＣ１９－ＵＲＡ３ＭＣＳにクローニングした。

【０４３２】

断片Ａ－Ｂ－Ｕ－Ｃを、ＰｈｕｓｉｏｎハイフィデリティＰＣＲマスターミックス（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　ＢｉｏＬａｂｓ；Ｉｐｓｗｉｃｈ，ＭＡ）を使用し、且つ鋳型として、Ｇｅｎｔｒａ　Ｐｕｒｅｇｅｎｅ　Ｙｅａｓｔ／Ｂａｃｔキット（Ｑｉａｇｅｎ；Ｖａｌｅｎｃｉａ，ＣＡ）で調製したＣＥＮ．ＰＫ　１１３－７ＤゲノムＤＮＡを使用して増幅した。ｆｒａ２Δ断片Ｃは、ゲノムＤＮＡから、ＮｏｔＩ制限部位を含むプライマーｏＢＰ６９５（配列番号２２９）、及びＰａｃＩ制限部位を含むプライマーｏＢＰ６９６（配列番号２３０）で増幅した。ｆｒａ２Δ断片Ｃ　ＰＣＲ産物をＮｏｔＩ及びＰａｃＩで消化し、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼにより、ｐＵＣ１９－ＵＲＡ３ＭＣＳの対応する部位にライゲートした。ｆｒａ２Δ断片Ｂは、ゲノムＤＮＡから、ＰｍｅＩ制限部位を含むプライマーｏＢＰ６９３（配列番号２２７）、及びＦｓｅＩ制限部位を含むプライマーｏＢＰ６９４（配列番号２２８）で増幅した。得られたＰＣＲ産物をＰｍｅＩ及びＦｓｅＩで消化し、適切な酵素で消化した後、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼにより、ｆｒａ２Δ断片Ｃを含むプラスミドの対応する部位にライゲートした。ｆｒａ２Δ断片Ａは、ゲノムＤＮＡから、ＢａｍＨＩ及びＡｓｉＳＩ制限部位を含むプライマーｏＢＰ６９１（配列番号２２５）、並びにＡｓｃＩ及びＳｗａＩ制限部位を含むプライマーｏＢＰ６９２（配列番号２２６）で増幅した。ｆｒａ２Δ断片Ａ　ＰＣＲ産物をＢａｍＨＩ及びＡｓｃＩで消化し、適切な酵素で消化した後、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼにより、ｆｒａ２Δ断片ＢＣを含むプラスミドの対応する部位にライゲートした。ＰＤＣ１プロモーター領域を、ＣＥＮ．ＰＫ　１１３－７ＤゲノムＤＮＡから、ＡｓｃＩ制限部位を含むプライマーＨＹ１６（配列番号２３１）、及びａｄｈ＿Ｈｌ（ｙ）の５’末端と相同性を有する５’テールを含むプライマーＨＹ１９（配列番号２３２）で増幅した。ａｄｈ＿Ｈｌ（ｙ）－ＡＤＨ１ｔは、ｐＢＰ９１５から、Ｐ［ＰＤＣ１］の３’末端と相同性を有する５’テールを含むプライマーＨＹ２０（配列番号２３３）、及びＰｍｅＩ制限部位を含むＨＹ４（配列番号２２１）で増幅した。ＰＣＲ産物をＰＣＲ精製キット（Ｑｉａｇｅｎ）で精製した。オーバーラップＰＣＲにより、Ｐ［ＰＤＣ１］とａｄｈ＿ＨＬ（ｙ）－ＡＤＨ１ｔ　ＰＣＲ産物とを混合し、且つプライマーＨＹ１６（配列番号２３１）及びＨＹ４（配列番号２２１）で増幅して、Ｐ［ＰＤＣ１］－ａｄｈ＿ＨＬ（ｙ）－ＡＤＨ１ｔを作成した。得られたＰＣＲ産物をＡｓｃＩ及びＰｍｅＩで消化し、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼにより、ｆｒａ２Δ断片ＡＢＣを含むプラスミドの対応する部位にライゲートした。組込みカセット全体を、得られたプラス

ミドからプライマーｏＢＰ６９１（配列番号２２５）及びｏＢＰ６９６（配列番号２３０）で増幅した。

【０４３３】

ＹＰＲＣΔ１５にａｄｈ＿Ｈｌ（ｙ）を組み込んだＰＮＹ２２１１変異体のコンピテント細胞を作製し、Ｆｒｏｚｅｎ－ＥＺ酵母形質転換ＩＩキット（Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）を使用して、ｆｒａ２Δ－Ｐ［ＰＤＣ１］－ａｄｈ＿ＨＬ（ｙ）－ＡＤＨ１ｔ組込みカセットＰＣＲ産物で形質転換した。形質転換混合物を、３０℃の１％エタノール添加ウラシル不含合成完全培地に播いた。形質転換体を、プライマーＵＲＡ３－ｅｎｄ　Ｆ（配列番号２２２）及びｏＢＰ７３１（配列番号２３５）によるＰＣＲによってスクリーニングした。正しい形質転換体をＹＰＥ（１％エタノール）で成長させて、１％ＥｔＯＨを補足した、且つ５－フルオロオロチン酸（０．１％）を含有する３０℃の合成完全培地に播き、ＵＲＡ３マーカーが欠損した単離物を選択した。Ｐ［ＰＤＣ１］－ａｄｈ＿ＨＬ（ｙ）－ＡＤＨ１ｔの組込みを、ＹｅａＳｔａｒゲノムＤＮＡキット（Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）で調製したゲノムＤＮＡを使用して、内部プライマーＨＹ３１（配列番号２３６）及び外部プライマーｏＢＰ７３１（配列番号２３５）によるコロニーＰＣＲ、並びに外部プライマーｏＢＰ７３０（配列番号２３４）及びｏＢＰ７３１（配列番号２３５）によるＰＣＲによって確認した。以下の遺伝子型の正しい単離物を、ＰＮＹ１５２８と命名した：ＣＥＮ．ＰＫ　１１３－７Ｄ　ＭＡＴａ　ｕｒａ３Δ：：ｌｏｘＰ　ｈｉｓ３Δ　ｐｄｃ６Δ　ｐｄｃ１Δ：：Ｐ［ＰＤＣ１］－ＤＨＡＤ｜ｉｌｖＤ＿Ｓｍ－ＰＤＣ１ｔ－Ｐ［ＦＢＡ１］－ＡＬＳ｜ａｌｓＳ＿Ｂｓ－ＣＹＣ１ｔ　ｐｄｃ５Δ：：Ｐ［ＰＤＣ５］－ＡＤＨ｜ｓａｄＢ＿Ａｘ－ＰＤＣ５ｔ　ｇｐｄ２Δ：：ｌｏｘＰ　ｆｒａ２Δ：：Ｐ［ＰＤＣ１］－ＡＤＨ｜ａｄｈ＿Ｈｌ－ＡＤＨ１ｔ　ａｄｈ１Δ：：ＵＡＳ（ＰＧＫ１）Ｐ［ＦＢＡ１］－ｋｉｖＤ＿Ｌｌ（ｙ）－ＡＤＨ１ｔ　ｙｐｒｃΔ１５Δ：：Ｐ［ＰＤＣ５］－ＡＤＨ｜ａｄｈ＿Ｈｌ－ＡＤＨ１ｔ。

【０４３４】

ＰＮＹ２２３７（スカーレスなＹＭＲ２２６ｃ欠失）

遺伝子ＹＭＲ２２６ｃを、Ｓ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）株ＰＮＹ１５２８から、ＰＣＲ増幅した２．０ｋｂの線状のスカーレス欠失カセットを使用する相同組換えにより欠失させた。カセットは、ＵＲＡ３遺伝子で構成されるスプライスされたＰＣＲ増幅断片から、選択可能なマーカーとしてのその天然のプロモーター及びターミネーター、欠失カセットの組込み及び天然の介在配列の除去を促進するＹＭＲ２２６ｃ遺伝子染色体遺伝子座に隣接する上流及び下流の相同性配列、並びにＵＲＡ３マーカーの組換え及び除去を促進する反復配列と共に構築した。フォワード及びリバースＰＣＲプライマー（それぞれＮ１２５１及びＮ１２５２、配列番号２４７及び２４８）が、ｐＬＡ３３（ｐＵＣ１９：：ｌｏｘＰ－ＵＲＡ３－ｌｏｘＰ（配列番号２６８））に由来する１，２０８ｂｐのＵＲＡ３発現カセットを増幅した。フォワード及びリバースプライマー（それぞれＮ１２５３及びＮ１２５４、配列番号２４９及び２５０）が、Ｓ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）株ＰＮＹ２２１１（上記）のゲノムＤＮＡ調製物に由来する３’ＵＲＡ３重複配列タグを有する２５０ｂｐの下流相同性配列を増幅した。フォワード及びリバースＰＣＲプライマー（それぞれＮ１２５５及びＮ１２５６、配列番号２５１及び２５２）が、Ｓ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）株ＰＮＹ２２１１のゲノムＤＮＡ調製物由来の５’ＵＲＡ３重複配列タグを有する２５０ｂｐの反復配列を増幅した。フォワード及びリバースＰＣＲプライマー（それぞれＮ１２５７及びＮ１２５８、配列番号２５３及び２５４）が、Ｓ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）株ＰＮＹ２２１１のゲノムＤＮＡ調製物由来の５’反復重複配列タグを有する２５０ｂｐの上流相同性配列を増幅した。

【０４３５】

約１．５μｇのＰＣＲ増幅カセットを、ＺＹＭＯ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｆｒｏｚｅｎ酵母形質転換キットを使用してコンピテントにした株ＰＮＹ１５２８（上記）に形質転換し、ｙｍｒ２２６ｃΔ：：ＵＲＡ３カセットが組み込まれた細胞を選択するため、形質転換

混合物をＳＥ　１．０％　－ウラシルに播いて３０℃でインキュベートした。７２～９６時間後に出現する形質転換体を、続いて同じ培地に短くストリークし、３０℃で２４～４８時間インキュベートする。短いストリークを、隣接する内向き染色体特異的プライマー（Ｎ１２３９、配列番号２４３）と対を形成する５’の外向きＵＲＡ３欠失カセット特異的内部プライマー（Ｎ１２４９、配列番号２４５）及び隣接する内向き染色体特異的プライマー（Ｎ１２４２、配列番号２４４）と対を形成する３’の外向きＵＲＡ３欠失カセット特異的プライマー（Ｎ１２５０、配列番号２４６）によるＰＣＲにより、ｙｍｒ２２６ｃΔ::ＵＲＡ３についてスクリーニングする。ポジティブＰＮＹ１５２８　ｙｍｒ２２６ｃΔ::ＵＲＡ３　ＰＣＲスクリーニングから、それぞれ５９８ｂｐ及び７２６ｂｐの５’及び３’ＰＣＲ産物が得られた。

【０４３６】

３つの陽性ＰＮＹ１５２８　ｙｍｒ２２６ｃΔ::ＵＲＡ３クローンを選び取り、ＹＰＥ　１％培地で一晩培養して、そのうち１００μＬを、マーカー除去のためＹＰＥ　１％＋５－ＦＯＡに播いた。２４～４８時間後に出現するコロニーを、５’及び３’染色体特異的プライマー（Ｎ１２３９及びＮ１２４２）により、マーカー欠損についてＰＣＲスクリーニングした。ポジティブＰＮＹ１５２８　ｙｍｒ２２６ｃΔマーカーレスＰＣＲスクリーニングから、８０１ｂｐのＰＣＲ産物が得られた。複数のクローンが得られ、１つをＰＮＹ２２３７と命名した。

【０４３７】

ＰＮＹ２２３８及びＰＮＹ２２４３（ＡＬＤ６欠失株）

ベクターを、ＡＬＤ６コード配列がＣｒｅ－ｌｏｘ再利用可能ＵＲＡ３選択マーカーに置換されるように設計した。ＡＬＤ６の配列５’及び３’を、ＰＣＲ（それぞれプライマー対Ｎ１１７９及びＮ１１８０並びにＮ１１８１及びＮ１１８２；それぞれ配列番号２３７、２３８、２３９、及び２４０）によって増幅した。これらの断片をＴＯＰＯベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　カタログ番号Ｋ２８７５－Ｊ１０）にクローニングして配列決定（Ｍ１３フォワードプライマー（配列番号２６９）及びリバースプライマー（配列番号２７０））した後、５’及び３’隣接配列を、ｐＬＡ３３（ｐＵＣ１９::ｌｏｘＰ::ＵＲＡ３::ｌｏｘＰ）（配列番号２６８）にそれぞれＥｃｏＲＩ及びＳｐｈＩ部位でクローニングした。各ライゲーション反応物を大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）Ｓｔｂｌ３細胞に形質転換し、これをＬＢ　Ａｍｐプレートでインキュベートして形質転換体を選択した。配列の正しい挿入を、ＰＣＲ（それぞれプライマーＭ１３フォワード（配列番号２６９）及びＮ１１８０（配列番号２３８）並びにＭ１３リバース（配列番号２７０）及びＮ１１８１（配列番号２３９））によって確認した。

【０４３８】

上記に記載されるベクター（ｐＵＣ１９::ａｌｄ６Δ::ｌｏｘＰ－ＵＲＡ３－ｌｏｘＰ）をＡｈｄＩで線状化し、標準的な酢酸リチウム法を用いてＰＮＹ１５２８及びＰＮＹ２２３７に形質転換した（但し、細胞とＤＮＡとのインキュベーションは２．５時間に延長した）。１％エタノールを炭素源として供給したウラシル不含合成完全培地に播くことにより、形質転換体を得た。パッチした形質転換体を、プライマーＮ１２１２（配列番号２４１）及びＮ１１８０（５’末端）（配列番号２３８）並びにＮ１１８１（配列番号２３９）及びＮ１２１３（配列番号２４２）（３’末端）を使用して、ＰＣＲによるスクリーニングにより欠失／組込みを確認した。Ｃｒｅリコンビナーゼを有するプラスミド（ｐＲＳ４２３::ＧＡＬ１ｐ－Ｃｒｅ＝配列番号２７１）を、ヒスチジンマーカー選択を用いて株に形質転換した。形質転換体を０．５％ガラクトース添加ＹＰＥにおいて継代した。コロニーを、５－ＦＯＡに対する耐性（ＵＲＡ３マーカーの欠損）及びヒスチジン栄養要求性（Ｃｒｅプラスミドの欠損）についてスクリーニングした。隣接ｌｏｘＰ部位を介してＵＲＡ３遺伝子が正しく除去されたことを、ＰＣＲ（それぞれプライマーＮ１２６２及びＮ１２６３、配列番号２５５及び２５６）によって確認した。加えて、ＡＬＤ６遺伝子に対して内部のプライマー（それぞれＮ１２３０及びＮ１２３１；配列番号２６１及び２６２）を使用して、部分二倍体が存在しないことを確実にした。最後に、ａｌｄ６Δ

：：ｌｏｘＰクローンをＰＣＲによりスクリーニングして、ｕｒａ３Δ：：ｌｏｘＰ（Ｎ１２２８とＮ１２２９、配列番号２５９及び２６０）及びｇｐｄ２Δ：：ｌｏｘＰ（Ｎ１２２３及びＮ１２２５、配列番号２５７及び２５８）との間の転座が起こっていないことを確認した。ＰＮＹ１５２８の形質転換体のスクリーニングから２つの陽性クローンを同定した。クローンＢはＰＮＹ２２４３と命名された。ＰＮＹ２２３７の形質転換体のスクリーニングから３つの陽性クローンを同定した。クローンＥ及びＫは、いずれも小規模でのイソブタノール生成についてアッセイした（下記）。ほとんどのパラメータが統計的に同一であったが、さらなる展開用にはクローンＥを選択した（ＰＮＹ２２３８）。

【０４３９】

実施例１０

イソブタノール経路プラスミド

本例の目的は、宿主株におけるイソブタノール生成用のイソブタノール経路プラスミドの構築又は修飾について記載することである。

【０４４０】

ｐＹＺ０６７（配列番号３７４）を、以下のキメラ遺伝子を含むように構築した：１）ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ発現用の、酵母ＦＢＡ１プロモーターから発現し、且つＦＢＡ１ターミネーターが続くＣ末端Ｌｕｍｉｏタグを有するミュータンス菌（Ｓ．ｍｕｔａｎｓ）ＵＡ１５９由来のｉｌｖＤ遺伝子のコード領域、２）アルコールデヒドロゲナーゼ発現用の、酵母ＧＰＭ１プロモーターから発現し、且つＡＤＨ１ターミネーターが続くウマ肝臓ＡＤＨのコード領域、及び３）ケトイソ吉草酸デカルボキシラーゼの発現用の、酵母ＴＤＨ３プロモーターから発現し、且つＴＤＨ３ターミネーターが続くラクトコッカス・ラクチス（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｌａｃｔｉｓ）由来のＫｉｖＤ遺伝子のコード領域。

【０４４１】

ｐＹＺ０６７（配列番号３７４）からｋｉｖＤ及びａｄｈの双方のプロモーター－遺伝子－ターミネーターカセットを欠失させることにより、ｐＹＺ０６７ΔｋｉｖＤΔｈＡＤＨ（配列番号３８５）を構築した。ｐＹＺ０６７をＢａｍＨＩ及びＳａｃＩで消化し（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　ＢｉｏＬａｂｓ；Ｉｐｓｗｉｃｈ，ＭＡ）、７９３４ｂｐ断片をアガロースゲルと、続いてゲル抽出キット（Ｑｉａｇｅｎ；Ｖａｌｅｎｃｉａ，ＣＡ）で精製した。ＤＮＡの単離断片をＤＮＡポリメラーゼＩラージ（クレノウ）断片（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　ＢｉｏＬａｂｓ；Ｉｐｓｗｉｃｈ，ＭＡ）で処理し、次にＴ４　ＤＮＡリガーゼによりセルフライゲートし、これを用いてコンピテントＴＯＰ１０大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）を形質転換した。形質転換体からのプラスミドを単離し、正確な欠失であることを配列分析により確認した。正しいプラスミド単離物をｐＹＺ０６７ΔｋｉｖＤΔｈＡＤＨと命名した。

【０４４２】

ｐＹＺ０６７ΔｋｉｖＤΔｉｌｖＤ（配列番号７７２）を、ＡＤＨの発現用の、酵母ＧＰＭプロモーター（ｎｔ　３９１６位～３１６０位）から発現し、且つＡＤＨ１ターミネーター（ｎｔ　２０１２位～１６９７位）が続くサッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）での発現用にコドン最適化したウマ肝臓由来のａｄｈ遺伝子のコード領域（ｎｔ　３１４８位～２０２１位）を有するキメラ遺伝子を含むように構築した。ｐＹＺ０６７からｋｉｖＤ及びｉｌｖＤの双方のプロモーター－遺伝子－ターミネーターカセットを欠失させることにより、ｐＹＺ０６７ＤｋｉｖＤＤｉｌｖＤを構築した。ｐＹＺ０６７をＡａｔＩＩ及びＳａｃＩで消化し（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　ＢｉｏＬａｂｓ；Ｉｐｓｗｉｃｈ，ＭＡ）、１０１９６ｂｐ断片をアガロースゲルと、続いてゲル抽出キット（Ｑｉａｇｅｎ；Ｖａｌｅｎｃｉａ，ＣＡ）で精製した。ＤＮＡの単離断片をＤＮＡポリメラーゼＩラージ（クレノウ）断片（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　ＢｉｏＬａｂｓ；Ｉｐｓｗｉｃｈ，ＭＡ）で処理し、次にＴ４　ＤＮＡリガーゼによりセルフライゲートした。次に得られたプラスミドをＮｇｏＭＩＶ及びＢａｍＨＩで消化

し（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ ＢｉｏＬａｂｓ；Ｉｐｓｗｉｃｈ，ＭＡ）、７５３３ｂｐ断片をアガロースゲルと、続いてゲル抽出キット（Ｑｉａｇｅｎ；Ｖａｌｅｎｃｉａ，ＣＡ）で精製した。ＤＮＡの単離断片をＤＮＡポリメラーゼＩラージ（クレノウ）断片（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ ＢｉｏＬａｂｓ；Ｉｐｓｗｉｃｈ，ＭＡ）で処理し、次にＴ４ＤＮＡリガーゼによりセルフライゲートした。プラスミドを単離し、正確な欠失であることを配列分析により確認した。正しいプラスミド単離物をｐＹＺ０６７ＤｋｉｖＤＤｉｌｖＤと命名した。

【０４４３】

ｐＹＺ０９０（配列番号１９５）から誘導されたｐＫ９Ｇ９．ＯＬＥ１ｐ．ｉｌｖＤ（配列番号７７３）を、ＤＨＡＤ発現用の、酵母ＯＬＥ１プロモーター（ｎｔ ５９８６位～５３８７位）から発現し、且つＦＢＡ１ターミネーター（ｎｔ ３６３２位～３３２０位）が続く、ミュータンス菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｍｕｔａｎｓ）由来のｉｌｖＤ遺伝子のコード領域（ｎｔ ５３７７位～３６４１位）を有するキメラ遺伝子と、ＫＡＲＩ発現用の、酵母ＩＬＶ５プロモーター（ｎｔ ４２７位～１６２０位）から発現し、且つＩＬＶ５ターミネーター（ｎｔ ２６８５位～３３０７位）が続く、アナエロスティペス・カカエ（Ａｎａｅｒｏｓｔｉｐｅｓ ｃａｃｃａｅ）由来のｉｌｖＣ遺伝子の変異体Ｋ９Ｇ９（核酸及びアミノ酸配列番号７７４及び６４７）のコード領域（ｎｔ １６２８位～２６５９位）を有するキメラ遺伝子とを含むように構築した。プラスミドの構築は以下のとおりであった。酵母ＦＢＡ１プロモーターから発現し、且つＦＢＡ１ターミネーターが続く、ミュータンス菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｍｕｔａｎｓ）由来のｉｌｖＤ遺伝子のコード領域を有するプラスミドｐＹＺ０６７からのキメラ遺伝子を、制限酵素ＮｇｏＭＩＶ及びＢａｍＨＩによる消化後、ｐＹＺ０９０にライゲートした。ａｌｓＳコード領域とＣＵＰ１プロモーターの３’末端の２８０ｂｐとを、得られたプラスミドから制限酵素ＳｐｅＩ及びＰａｃＩで消化することにより欠失させ、得られた大型ＤＮＡ断片をセルフライゲートした。制限酵素ＮｇｏＭＩＶ及びＰｍｌＩで消化することにより、得られたプラスミドからｉｌｖＤの上流の酵母ＦＢＡ１プロモーターを除去し、プライマーｐＯＬＥ１－ＮｇｏＭＩ（配列番号７７５）及びｐＯＬＥ１－ＰｍｌＩ（配列番号７７６）で増幅した酵母ＯＬＥ１プロモーターによって置換した。制限酵素ＰｍｅＩ及びＳｆｉＩによる消化と、続く大型ＤＮＡ断片のゲル精製により、ラクトコッカス・ラクチス（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ ｌａｃｔｉｓ）由来のｉｌｖＣ遺伝子のコード領域を、得られたプラスミドから欠失させた。アナエロスティペス・カカエ（Ａｎａｅｒｏｓｔｉｐｅｓ ｃａｃｃａｅ）由来の変異体Ｋ９Ｇ９ ｉｌｖＣ遺伝子のコード領域（配列番号７７７）をＰｍｅＩ及びＳｆｉＩでｐＬＨ７０１（配列番号７７８）から消化し、ゲル精製した。２つのＤＮＡ断片をライゲートしてｐＫ９Ｇ９．ＯＬＥ１ｐ．ｉｌｖＤを作成した。

【０４４４】

実施例１１

ＰＮＹ２２４０及びＰＮＹ２２４２の構築

株ＰＮＹ２２４０は、プラスミドｐＬＨ７０２（配列番号１８１）及びｐＢＰ９１５（配列番号１８２）による形質転換後のＰＮＹ２２１１から誘導した。形質転換体を、ヒスチジン又はウラシル不含合成完全培地（炭素源として１％エタノール）に播いた。形質転換体を、代わりに２％グルコース及び０．０５％エタノールを炭素源として含有する同じ培地にパッチした。３つのパッチを使用して、液体培地（０．３％グルコース及び０．３％エタノールを炭素源として含むウラシル不含の合成完全）を接種した。イソブタノール生成を試験するため、液体培養物を、２％グルコース及び０．０５％エタノールを炭素源として含有し、またＢＭＥビタミンミックス（Ｓｉｇｍａ カタログ番号Ｂ６８９１）も含有したウラシル不含合成完全培地に継代培養した。培養物を、密閉した血清バイアル（１５ｍｌバイアル中１０ｍｌの培地）において３０℃で振盪（Ｉｎｆｏｒｓ Ｍｕｌｔｉｔｒｏｎシェーカーで２５０ｒｐｍ）しながらインキュベートした。４８時間後、培養培地をろ過し（Ｓｐｉｎ－Ｘカラム）、ＨＰＬＣにより分析した（米国特許出願公開第２００７／００９２９５７号明細書（これは全体として参照により本明細書に援用される）に

記載されるとおり）。１つのクローンをＰＮＹ２２４０と命名した。

【０４４５】

株ＰＮＹ２２４２は、プラスミドｐＬＨ７０２（配列番号１８１）及びｐＹＺ０６７Δｋｉｖ ＤΔｈＡＤＨ（本明細書において上記に記載される）による形質転換後のＰＮＹ２２３８から誘導した。形質転換体を、ヒスチジン又はウラシル不含合成完全培地（炭素源として１％エタノール）に播いた。形質転換体を、代わりに２％グルコース及び０．０５％エタノールを炭素源として含有する同じ培地にパッチした。３つのパッチを、上記に記載したとおり、イソブタノール生成について試験した。グルコース消費及びイソブタノール生成の点で、３つ全てが同様に機能した。１つのクローンをＰＮＹ２２４２と命名し、本明細書において以下に記載するとおり、発酵条件下でさらに特徴付けた。

【０４４６】

実施例１２

サッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）株ＢＰ１０６４（ＰＮＹ１５０３）の構築

株ＢＰ１０６４は、ＣＥＮ．ＰＫ １１３－７Ｄ（ＣＢＳ ８３４０；Ｃｅｎｔｒａａｌｂｕｒｅａｕ ｖｏｏｒ Ｓｃｈｉｍｍｅｌｃｕｌｔｕｒｅｓ（ＣＢＳ）Ｆｕｎｇａｌ Ｂｉｏｄｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｃｅｎｔｒｅ，オランダ）から得たもので、以下の遺伝子の欠失を含む：ＵＲＡ３、ＨＩＳ３、ＰＤＣ１、ＰＤＣ５、ＰＤＣ６、及びＧＰＤ２。ＢＰ１０６４をプラスミドｐＹＺ０９０（配列番号１９５）及びｐＬＨ４６８（配列番号１３９）で形質転換して、株ＮＧＣＩ－０７０（ＢＰ１０８３；ＰＮＹ１５０４）を作成した。

【０４４７】

コード配列全体を完全に取り除いた欠失を、標的遺伝子の上流及び下流の相同性領域と、形質転換体選択用のＧ４１８耐性マーカー又はＵＲＡ３遺伝子のいずれかとを含むＰＣＲ断片による相同組換えによって作成した。ｌｏｘＰ部位が隣接するＧ４１８耐性マーカーは、Ｃｒｅリコンビナーゼを用いて取り除いた（ｐＲＳ４２３：：ＰＧＡＬ１－ｃｒｅ；配列番号２７１）。ＵＲＡ３遺伝子は相同組換えにより取り除いてスカーレス欠失を作成するか、又はｌｏｘＰ部位が隣接する場合、Ｃｒｅリコンビナーゼを用いて取り除いた。

【０４４８】

ＵＲＡ３欠失

内因性ＵＲＡ３コード領域を欠失させるため、ｕｒａ３：：ｌｏｘＰ－ｋａｎＭＸ－ｌｏｘＰカセットを、ｐＬＡ５４鋳型ＤＮＡ（配列番号３８６）からＰＣＲ増幅した。ｐＬＡ５４は、Ｋ．ラクチス（Ｋ．ｌａｃｔｉｓ）ＴＥＦ１プロモーター及びｋａｎＭＸマーカーを含み、ｌｏｘＰ部位が隣接しているため、Ｃｒｅリコンビナーゼによる組換え及びマーカーの除去が可能である。ＰＣＲは、Ｐｈｕｓｉｏｎ ＤＮＡポリメラーゼ並びにプライマーＢＫ５０５及びＢＫ５０６（配列番号２９４及び２９５）を使用して行った。各プライマーのＵＲＡ３部分は、ｌｏｘＰ－ｋａｎＭＸ－ｌｏｘＰマーカーの組込みによってＵＲＡ３コード領域の置換が生じるように、ＵＲＡ３プロモーターの上流の５’領域及びコード領域の下流の３’領域に由来した。ＰＣＲ産物を、標準的な遺伝学的技法（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｙｅａｓｔ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，２００５，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ，ｐｐ．２０１－２０２）を用いてＣＥＮ．ＰＫ １１３－７Ｄに形質転換し、形質転換体を３０℃のＧ４１８含有ＹＰＤ（１００μｇ／ｍｌ）で選択した。プライマーＬＡ４６８及びＬＡ４９２（配列番号２９６及び２９７）を用いたＰＣＲにより形質転換体をスクリーニングして組込みが正しいことを確認し、ＣＥＮ．ＰＫ １１３－７Ｄ Δｕｒａ３：：ｋａｎＭＸと命名した。

【０４４９】

ＨＩＳ３欠失

Ｐｈｕｓｉｏｎハイフィデリティ ＰＣＲマスターミックス（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ

ＢｉｏＬａｂｓ；Ｉｐｓｗｉｃｈ，ＭＡ）、及びＧｅｎｔｒａ　Ｐｕｒｅｇｅｎｅ　Ｙｅａｓｔ／Ｂａｃｔキット（Ｑｉａｇｅｎ；Ｖａｌｅｎｃｉａ，ＣＡ）で調製した、鋳型としてのＣＥＮ．ＰＫ　１１３－７ＤゲノムＤＮＡを使用して、スカーレスＨＩＳ３欠失用のＰＣＲカセットの４つの断片を増幅した。ＨＩＳ３断片Ａは、プライマーｏＢＰ４５２（配列番号２９８）及びＨＩＳ３断片Ｂの５’末端と相同性を有する５’テールを含むプライマーｏＢＰ４５３（配列番号２９９）により増幅した。ＨＩＳ３断片Ｂは、ＨＩＳ３断片Ａの３’末端と相同性を有する５’テールを含むプライマーｏＢＰ４５４（配列番号３００）、及びＨＩＳ３断片Ｕの５’末端と相同性を有する５’テールを含むプライマーｏＢＰ４５５（配列番号３０１）により増幅した。ＨＩＳ３断片Ｕは、ＨＩＳ３断片Ｂの３’末端と相同性を有する５’テールを含むプライマーｏＢＰ４５６（配列番号３０２）、及びＨＩＳ３断片Ｃの５’末端と相同性を有する５’テールを含むプライマーｏＢＰ４５７（配列番号３０３）により増幅した。ＨＩＳ３断片Ｃは、ＨＩＳ３断片Ｕの３’末端と相同性を有する５’テールを含むプライマーｏＢＰ４５８（配列番号３０４）、及びプライマーｏＢＰ４５９（配列番号３０５）により増幅した。ＰＣＲ産物をＰＣＲ精製キット（Ｑｉａｇｅｎ）で精製した。オーバーラップＰＣＲにより、ＨＩＳ３断片ＡとＨＩＳ３断片Ｂとを混合し、プライマーｏＢＰ４５２（配列番号２９８）及びｏＢＰ４５５（配列番号３０１）で増幅して、ＨＩＳ３断片ＡＢを作成した。オーバーラップＰＣＲにより、ＨＩＳ３断片ＵとＨＩＳ３断片Ｃとを混合し、プライマーｏＢＰ４５６（配列番号３０２）及びｏＢＰ４５９（配列番号３０５）で増幅して、ＨＩＳ３断片ＵＣを作成した。得られたＰＣＲ産物をアガロースゲルで精製し、続いてゲル抽出キット（Ｑｉａｇｅｎ）で精製した。オーバーラップＰＣＲにより、ＨＩＳ３断片ＡＢとＨＩＳ３断片ＵＣとを混合し、プライマーｏＢＰ４５２（配列番号２９８）及びｏＢＰ４５９（配列番号３０５）で増幅して、ＨＩＳ３　ＡＢＵＣカセットを作成した。ＰＣＲ産物をＰＣＲ精製キット（Ｑｉａｇｅｎ）で精製した。

【０４５０】

ＣＥＮ．ＰＫ　１１３－７Ｄ　Δｕｒａ３：：ｋａｎＭＸのコンピテント細胞を作製し、Ｆｒｏｚｅｎ－ＥＺ酵母形質転換ＩＩキット（Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ；Ｏｒａｎｇｅ，ＣＡ）を使用して、ＨＩＳ３　ＡＢＵＣ　ＰＣＲカセットで形質転換した。形質転換混合物を、３０℃の２％グルコース添加ウラシル不含合成完全培地に播いた。ｈｉｓ３ノックアウトを含む形質転換体を、Ｇｅｎｔｒａ　Ｐｕｒｅｇｅｎｅ　Ｙｅａｓｔ／Ｂａｃｔキット（Ｑｉａｇｅｎ）で調製したゲノムＤＮＡを使用して、プライマーｏＢＰ４６０（配列番号３０６）及びｏＢＰ４６１（配列番号３０７）でのＰＣＲによりスクリーニングした。正しい形質転換体を、ＣＥＮ．ＰＫ　１１３－７Ｄ　Δｕｒａ３：：ｋａｎＭＸ　Δｈｉｓ３：：ＵＲＡ３として選択した。

【０４５１】

Δｕｒａ３部位からのＫａｎＭＸマーカー除去及びΔｈｉｓ３部位からのＵＲＡ３マーカー除去

ＣＥＮ．ＰＫ　１１３－７Ｄ　Δｕｒａ３：：ｋａｎＭＸ　Δｈｉｓ３：：ＵＲＡ３を、Ｆｒｏｚｅｎ－ＥＺ酵母形質転換ＩＩキット（Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）を使用してｐＲＳ４２３：：ＰＧＡＬ１－ｃｒｅ（配列番号２７１、米国仮特許出願第６１／２９０，６３９号明細書に記載される）で形質転換し、３０℃の２％グルコース添加ヒスチジン及びウラシル不含合成完全培地に播くことにより、ＫａｎＭＸマーカーを取り除いた。３０℃の１％ガラクトース添加ＹＰで形質転換体を６時間成長させて、Ｃｒｅリコンビナーゼ及びＫａｎＭＸマーカーの切り出しを誘導し、３０℃のＹＰＤ（２％グルコース）プレートに播いて回収した。単離物をＹＰＤで一晩成長させ、３０℃の５－フルオロオロチン酸（０．１％）含有合成完全培地に播いて、ＵＲＡ３マーカーが失われた単離物を選択した。５－ＦＯＡ耐性単離物をＹＰＤで成長させてそこに播き、ｐＲＳ４２３：：ＰＧＡＬ１－ｃｒｅプラスミドを取り除いた。単離物を、ＹＰＤ＋Ｇ４１８プレート、ウラシル不含合成完全培地プレート、及びヒスチジン不含合成完全培地プレートでの成長を評価することにより、ＫａｎＭＸマーカー、ＵＲＡ３マーカー、及びｐＲＳ４２３：：ＰＧＡＬ

１－ｃｒｅプラスミドの喪失について確認した。Ｇ４１８に対して感受性を有し、且つウラシル及びヒスチジン栄養要求性であった正しい単離物を、株ＣＥＮ．ＰＫ　１１３－７Ｄ　Δｕｒａ３：：ｌｏｘＰ　Δｈｉｓ３として選択し、ＢＰ８５７と命名した。欠失及びマーカー除去を、Ｇｅｎｔｒａ　Ｐｕｒｅｇｅｎｅ　Ｙｅａｓｔ／Ｂａｃｔキット（Ｑｉａｇｅｎ）で調製したゲノムＤＮＡを使用して、Δｕｒａ３用のプライマーｏＢＰ４５０（配列番号３０８）及びｏＢＰ４５１（配列番号３０９）並びにΔｈｉｓ３用のプライマーｏＢＰ４６０（配列番号３０６）及びｏＢＰ４６１（配列番号３０７）でのＰＣＲ及び配列決定により確認した。

【０４５２】

ＰＤＣ６欠失

Ｐｈｕｓｉｏｎハイフィデリティ ＰＣＲマスターミックス（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　ＢｉｏＬａｂｓ）、及びＧｅｎｔｒａ　Ｐｕｒｅｇｅｎｅ　Ｙｅａｓｔ／Ｂａｃｔキット（Ｑｉａｇｅｎ）で調製した、鋳型としてのＣＥＮ．ＰＫ　１１３－７ＤゲノムＤＮＡを使用して、スカーレスＰＤＣ６欠失用のＰＣＲカセットの４つの断片を増幅した。ＰＤＣ６断片Ａは、プライマーｏＢＰ４４０（配列番号３１０）及びＰＤＣ６断片Ｂの５’末端と相同性を有する５’テールを含むプライマーｏＢＰ４４１（配列番号３１１）により増幅した。ＰＤＣ６断片Ｂは、ＰＤＣ６断片Ａの３’末端と相同性を有する５’テールを含むプライマーｏＢＰ４４２（配列番号３１２）、及びＰＤＣ６断片Ｕの５’末端と相同性を有する５’テールを含むプライマーｏＢＰ４４３（配列番号３１３）により増幅した。ＰＤＣ６断片Ｕは、ＰＤＣ６断片Ｂの３’末端と相同性を有する５’テールを含むプライマーｏＢＰ４４４（配列番号３１４）、及びＰＤＣ６断片Ｃの５’末端と相同性を有する５’テールを含むプライマーｏＢＰ４４５（配列番号３１５）により増幅した。ＰＤＣ６断片Ｃは、ＰＤＣ６断片Ｕの３’末端と相同性を有する５’テールを含むプライマーｏＢＰ４４６（配列番号３１６）、及びプライマーｏＢＰ４４７（配列番号３１７）により増幅した。ＰＣＲ産物をＰＣＲ精製キット（Ｑｉａｇｅｎ）で精製した。オーバーラップＰＣＲにより、ＰＤＣ６断片ＡとＰＤＣ６断片Ｂとを混合し、プライマーｏＢＰ４４０（配列番号３１０）及びｏＢＰ４４３（配列番号３１３）で増幅して、ＰＤＣ６断片ＡＢを作成した。オーバーラップＰＣＲにより、ＰＤＣ６断片ＵとＰＤＣ６断片Ｃとを混合し、プライマーｏＢＰ４４４（配列番号３１４）及びｏＢＰ４４７（配列番号３１７）で増幅して、ＰＤＣ６断片ＵＣを作成した。得られたＰＣＲ産物をアガロースゲルで精製し、続いてゲル抽出キット（Ｑｉａｇｅｎ）で精製した。オーバーラップＰＣＲにより、ＰＤＣ６断片ＡＢとＰＤＣ６断片ＵＣとを混合し、プライマーｏＢＰ４４０（配列番号３１０）及びｏＢＰ４４７（配列番号３１７）で増幅して、ＰＤＣ６　ＡＢＵＣカセットを作成した。ＰＣＲ産物をＰＣＲ精製キット（Ｑｉａｇｅｎ）で精製した。

【０４５３】

ＣＥＮ．ＰＫ　１１３－７Ｄ　Δｕｒａ３：：ｌｏｘＰ　Δｈｉｓ３のコンピテント細胞を作製し、Ｆｒｏｚｅｎ－ＥＺ酵母形質転換ＩＩキット（Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）を使用して、ＰＤＣ６　ＡＢＵＣ　ＰＣＲカセットで形質転換した。形質転換混合物を、３０℃の２％グルコース添加ウラシル不含合成完全培地に播いた。ｐｄｃ６ノックアウトを含む形質転換体を、Ｇｅｎｔｒａ　Ｐｕｒｅｇｅｎｅ　Ｙｅａｓｔ／Ｂａｃｔキット（Ｑｉａｇｅｎ）で調製したゲノムＤＮＡを使用して、プライマーｏＢＰ４４８（配列番号３１８）及びｏＢＰ４４９（配列番号３１９）でのＰＣＲによりスクリーニングした。正しい形質転換体を、株ＣＥＮ．ＰＫ　１１３－７Ｄ　Δｕｒａ３：：ｌｏｘＰ　Δｈｉｓ３　Δｐｄｃ６：：ＵＲＡ３として選択した。

【０４５４】

ＣＥＮ．ＰＫ　１１３－７Ｄ　Δｕｒａ３：：ｌｏｘＰ　Δｈｉｓ３　Δｐｄｃ６：：ＵＲＡ３をＹＰＤで一晩成長させ、３０℃の５－フルオロオロチン酸（０．１％）含有合成完全培地に播いて、ＵＲＡ３マーカーが失われた単離物を選択した。欠失及びマーカー除去を、Ｇｅｎｔｒａ　Ｐｕｒｅｇｅｎｅ　Ｙｅａｓｔ／Ｂａｃｔキット（Ｑｉａｇｅｎ）で調製したゲノムＤＮＡを使用して、プライマーｏＢＰ４４８（配列番号３１８）及び

ｏＢＰ４４９（配列番号３１９）でのＰＣＲ及び配列決定により確認した。単離物にＰＤＣ６遺伝子が存在しないことが、ＰＤＣ６のコード配列に特異的なプライマーｏＢＰ５５４（配列番号３２０）及びｏＢＰ５５５（配列番号３２１）を使用したネガティブＰＣＲの結果により実証された。正しい単離物をＣＥＮ．ＰＫ　１１３－７Ｄ　Δｕｒａ３：：ｌｏｘＰ　Δｈｉｓ３　Δｐｄｃ６として選択し、ＢＰ８９１と命名した。

【０４５５】

ＰＤＣ１欠失ｉｌｖＤＳｍ組込み

ＰＤＣ１遺伝子を欠失させ、ストレプトコッカス・ミュータンス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｍｕｔａｎｓ）ＡＴＣＣ番号７００６１０由来のｉｌｖＤコード領域によって置換した。Ｐｈｕｓｉｏｎハイフィデリティ ＰＣＲマスターミックス（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　ＢｉｏＬａｂｓ）、及びＧｅｎｔｒａ　Ｐｕｒｅｇｅｎｅ　Ｙｅａｓｔ／Ｂａｃｔキット（Ｑｉａｇｅｎ）で調製した、鋳型としてのＮＹＬＡ８３（米国仮特許出願第６１／２４６，７０９号明細書に記載される）ゲノムＤＮＡを使用して、ＰＤＣ１欠失－ｉｌｖＤＳｍ組込み用のＰＣＲカセットの、ストレプトコッカス・ミュータンス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｍｕｔａｎｓ）由来のｉｌｖＤコード領域が後続するＡ断片を増幅した。ＰＤＣ１断片Ａ－ｉｌｖＤＳｍ（配列番号３２２）は、プライマーｏＢＰ５１３（配列番号３２６）及びＰＤＣ１断片Ｂの５’末端と相同性を有する５’テールを含むプライマーｏＢＰ５１５（配列番号３２７）により増幅した。ＰＤＣ１欠失－ｉｌｖＤＳｍ組込み用のＰＣＲカセットのＢ断片、Ｕ断片、及びＣ断片は、Ｐｈｕｓｉｏｎハイフィデリティ ＰＣＲマスターミックス（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　ＢｉｏＬａｂｓ）、及びＧｅｎｔｒａ　Ｐｕｒｅｇｅｎｅ　Ｙｅａｓｔ／Ｂａｃｔキット（Ｑｉａｇｅｎ）で調製した、鋳型としてのＣＥＮ．ＰＫ　１１３－７ＤゲノムＤＮＡを使用して増幅した。ＮＹＬＡ８３は、米国特許出願公開第２００９／０３０５３６３号明細書（これは全体として参照により本明細書に援用される）に記載されるＰＤＣ１欠失－ｉｌｖＤＳｍ組込みを有する株である。ＰＤＣ１断片Ｂは、ＰＤＣ１断片Ａ－ｉｌｖＤＳｍの３’末端と相同性を有する５’テールを含むプライマーｏＢＰ５１６（配列番号３２８）、及びＰＤＣ１断片Ｕの５’末端と相同性を有する５’テールを含むプライマーｏＢＰ５１７（配列番号３２９）により増幅した。ＰＤＣ１断片Ｕは、ＰＤＣ１断片Ｂの３’末端と相同性を有する５’テールを含むプライマーｏＢＰ５１８（配列番号３３０）、及びＰＤＣ１断片Ｃの５’末端と相同性を有する５’テールを含むプライマーｏＢＰ５１９（配列番号３３１）により増幅した。ＰＤＣ１断片Ｃは、ＰＤＣ１断片Ｕの３’末端と相同性を有する５’テールを含むプライマーｏＢＰ５２０（配列番号３３２）、及びプライマーｏＢＰ５２１（配列番号３３３）により増幅した。ＰＣＲ産物をＰＣＲ精製キット（Ｑｉａｇｅｎ）で精製した。オーバーラップＰＣＲにより、ＰＤＣ１断片Ａ－ｉｌｖＤＳｍとＰＤＣ１断片Ｂとを混合し、プライマーｏＢＰ５１３（配列番号３２６）及びｏＢＰ５１７（配列番号３２９）で増幅して、ＰＤＣ１断片Ａ－ｉｌｖＤＳｍ－Ｂを作成した。オーバーラップＰＣＲにより、ＰＤＣ１断片ＵとＰＤＣ１断片Ｃとを混合し、プライマーｏＢＰ５１８（配列番号３３０）及びｏＢＰ５２１（配列番号３３３）で増幅して、ＰＤＣ１断片ＵＣを作成した。得られたＰＣＲ産物をアガロースゲルで精製し、続いてゲル抽出キット（Ｑｉａｇｅｎ）で精製した。オーバーラップＰＣＲにより、ＰＤＣ１断片Ａ－ｉｌｖＤＳｍ－ＢとＰＤＣ１断片ＵＣとを混合し、プライマーｏＢＰ５１３（配列番号３２６）及びｏＢＰ５２１（配列番号３３３）で増幅して、ＰＤＣ１　Ａ－ｉｌｖＤＳｍ－ＢＵＣカセット（配列番号３２３）を作成した。ＰＣＲ産物をＰＣＲ精製キット（Ｑｉａｇｅｎ）で精製した。

【０４５６】

ＣＥＮ．ＰＫ　１１３－７Ｄ　Δｕｒａ３：：ｌｏｘＰ　Δｈｉｓ３　Δｐｄｃ６のコンピテント細胞を作製し、Ｆｒｏｚｅｎ－ＥＺ酵母形質転換ＩＩキット（Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）を使用して、ＰＤＣ１　Ａ－ｉｌｖＤＳｍ－ＢＵＣ　ＰＣＲカセットで形質転換した。形質転換混合物を、３０℃の２％グルコース添加ウラシル不含合成完全培地に播いた。ｐｄｃ１ノックアウトｉｌｖＤＳｍ組込みを含む形質転換体を、Ｇｅｎｔｒａ　Ｐｕｒｅｇｅｎｅ　Ｙｅａｓｔ／Ｂａｃｔキット（Ｑｉａｇｅｎ）で調製したゲノムＤ

ＮＡを使用して、プライマーｏＢＰ５１１（配列番号３３６）及びｏＢＰ５１２（配列番号３３７）でのＰＣＲによりスクリーニングした。単離物にＰＤＣ１遺伝子が存在しないことが、ＰＤＣ１のコード配列に特異的なプライマーｏＢＰ５５０（配列番号３３８）及びｏＢＰ５５１（配列番号３３９）を使用したネガティブＰＣＲの結果により実証された。正しい形質転換体を、株ＣＥＮ．ＰＫ　１１３－７Ｄ　Δｕｒａ３：：ｌｏｘＰ　Δｈｉｓ３　Δｐｄｃ６　Δｐｄｃ１：：ｉｌｖＤＳｍ－ＵＲＡ３として選択した。

【０４５７】

ＣＥＮ．ＰＫ　１１３－７Ｄ　Δｕｒａ３：：ｌｏｘＰ　Δｈｉｓ３　Δｐｄｃ６　Δｐｄｃ１：：ｉｌｖＤＳｍ－ＵＲＡ３をＹＰＤで一晩成長させ、３０℃の５－フルオロオロチン酸（０．１％）含有合成完全培地に播いて、ＵＲＡ３マーカーが失われた単離物を選択した。ＰＤＣ１の欠失、ｉｌｖＤＳｍの組込み、及びマーカー除去を、Ｇｅｎｔｒａ　Ｐｕｒｅｇｅｎｅ　Ｙｅａｓｔ／Ｂａｃｔキット（Ｑｉａｇｅｎ）で調製したゲノムＤＮＡを使用して、プライマーｏＢＰ５１１（配列番号３３６）及びｏＢＰ５１２（配列番号３３７）でのＰＣＲ及び配列決定により確認した。正しい単離物を、株ＣＥＮ．ＰＫ　１１３－７Ｄ　Δｕｒａ３：：ｌｏｘＰ　Δｈｉｓ３　Δｐｄｃ６　Δｐｄｃ１：：ｉｌｖＤＳｍとして選択し、ＢＰ９０７と命名した。

【０４５８】

ＰＤＣ５欠失ｓａｄＢ組込み

ＰＤＣ５遺伝子を欠失させ、アクロモバクター・キシロスオキシダンス（Ａｃｈｒｏｍｏｂａｃｔｅｒ　ｘｙｌｏｓｏｘｉｄａｎｓ）由来のｓａｄＢコード領域によって置換した（ｓａｄＢ遺伝子については、米国特許出願公開第２００９／０２６９８２３号明細書（これは全体として参照により本明細書に援用される）に記載される）。ＰＤＣ５欠失－ｓａｄＢ組込み用のＰＣＲカセットのセグメントを、初めにプラスミドｐＵＣ１９－ＵＲＡ３ＭＣＳにクローニングした。

【０４５９】

ｐＵＣ１９－ＵＲＡ３ＭＣＳはｐＵＣ１９ベースであり、多重クローニング部位（ＭＣＳ）内に位置するサッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）由来のＵＲＡ３遺伝子の配列を含む。ｐＵＣ１９は、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）における複製及び選択用のｐＭＢ１レプリコン及びβ－ラクタマーゼをコードする遺伝子を含む。ＵＲＡ３のコード配列に加え、この遺伝子の上流及び下流からの配列が、酵母においてＵＲＡ３遺伝子を発現させるために含まれた。このベクターはクローニング目的で用いることができ、また、酵母組込みベクターとしても用いることができる。

【０４６０】

ＵＲＡ３コード領域を、サッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）ＣＥＮ．ＰＫ　１１３－７ＤゲノムＤＮＡ由来のＵＲＡ３コード領域の上流２５０ｂｐ及び下流１５０ｂｐと共に包含するＤＮＡを、ＰｈｕｓｉｏｎハイフィデリティＰＣＲマスターミックス（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　ＢｉｏＬａｂｓ）を使用して、ＢａｍＨＩ、ＡｓｃＩ、ＰｍｅＩ、及びＦｓｅＩ制限部位を含むプライマーｏＢＰ４３８（配列番号３３４）、及びＸｂａＩ、ＰａｃＩ、及びＮｏｔＩ制限部位を含むｏＢＰ４３９（配列番号３３５）により増幅した。ゲノムＤＮＡを、Ｇｅｎｔｒａ　Ｐｕｒｅｇｅｎｅ　Ｙｅａｓｔ／Ｂａｃｔキット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して調製した。ＰＣＲ産物及びｐＵＣ１９（配列番号３２５）を、ＢａｍＨＩ及びＸｂａＩで消化した後、Ｔ４ＤＮＡリガーゼによりライゲートして、ベクターｐＵＣ１９－ＵＲＡ３ＭＣＳを作成した。このベクターを、プライマーｏＢＰ２６４（配列番号３４２）及びｏＢＰ２６５（配列番号３４３）でのＰＣＲ及び配列決定により確認した。

【０４６１】

ｓａｄＢ及びＰＤＣ５断片Ｂのコード配列をｐＵＣ１９－ＵＲＡ３ＭＣＳにクローニングして、ＰＤＣ５　Ａ－ｓａｄＢ－ＢＵＣ　ＰＣＲカセットのｓａｄＢ－ＢＵ部分を作成した。ｓａｄＢのコード配列を、ｐＬＨ４６８－ｓａｄＢ（配列番号３５９）を鋳型とし

て使用して、ＡｓｃＩ制限部位を含むプライマーｏＢＰ５３０（配列番号３４４）、及びＰＤＣ５断片Ｂの５’末端と相同性を有する５’テールを含むプライマーｏＢＰ５３１（配列番号３４５）で増幅した。ＰＤＣ５断片Ｂは、ｓａｄＢの３’末端と相同性を有する５’テールを含むプライマーｏＢＰ５３２（配列番号３４６）、及びＰｍｅＩ制限部位を含むプライマーｏＢＰ５３３（配列番号３４７）により増幅した。ＰＣＲ産物をＰＣＲ精製キット（Ｑｉａｇｅｎ）で精製した。オーバーラップＰＣＲにより、ｓａｄＢとＰＤＣ５断片ＢとのＰＣＲ産物を混合し、プライマーｏＢＰ５３０（配列番号３４４）及びｏＢＰ５３３（配列番号３４７）で増幅して、ｓａｄＢ－ＰＤＣ５断片Ｂを作成した。得られたＰＣＲ産物をＡｓｃＩ及びＰｍｅＩで消化し、適切な酵素で消化した後、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼによってｐＵＣ１９－ＵＲＡ３ＭＣＳの対応する部位にライゲートした。得られたプラスミドを、プライマーｏＢＰ５３６（配列番号３４８）及びＰＤＣ５断片Ｃの５’末端と相同性を有する５’テールを含むｏＢＰ５４６（配列番号３４９）を用いたｓａｄＢ－断片Ｂ－断片Ｕ増幅用の鋳型として使用した。ＰＤＣ５断片Ｃは、ＰＤＣ５　ｓａｄＢ－断片Ｂ－断片Ｕの３’末端と相同性を有する５’テールを含むプライマーｏＢＰ５４７（配列番号３５０）、及びプライマーｏＢＰ５３９（配列番号３５１）により増幅した。ＰＣＲ産物をＰＣＲ精製キット（Ｑｉａｇｅｎ）で精製した。オーバーラップＰＣＲにより、ＰＤＣ５　ｓａｄＢ－断片Ｂ－断片ＵとＰＤＣ５断片Ｃとを混合し、プライマーｏＢＰ５３６（配列番号３４８）及びｏＢＰ５３９（配列番号３５１）で増幅して、ＰＤＣ５　ｓａｄＢ－断片Ｂ－断片Ｕ－断片Ｃを作成した。得られたＰＣＲ産物をアガロースゲルで精製し、続いてゲル抽出キット（Ｑｉａｇｅｎ）で精製した。ＰＤＣ５　ｓａｄＢ－断片Ｂ－断片Ｕ－断片Ｃを、天然ＰＤＣ５コード配列の直ちに上流の５０ヌクレオチドと相同性を有する５’テールを含むプライマーｏＢＰ５４２（配列番号３５２）、及びｏＢＰ５３９（配列番号３５１）で増幅することにより、ＰＤＣ５　Ａ－ｓａｄＢ－ＢＵＣカセット（配列番号３２４）を作成した。ＰＣＲ産物をＰＣＲ精製キット（Ｑｉａｇｅｎ）で精製した。

【０４６２】

ＣＥＮ．ＰＫ　１１３－７Ｄ　Δｕｒａ３：：ｌｏｘＰ　Δｈｉｓ３　Δｐｄｃ６　Δｐｄｃ１：：ｉｌｖＤＳｍのコンピテント細胞を作製し、Ｆｒｏｚｅｎ－ＥＺ酵母形質転換ＩＩキット（Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）を使用して、ＰＤＣ５　Ａ－ｓａｄＢ－ＢＵＣ　ＰＣＲカセットで形質転換した。形質転換混合物を、３０℃の１％エタノール添加（グルコース不含）ウラシル不含合成完全培地に播いた。ｐｄｃ５ノックアウトｓａｄＢ組込みを含む形質転換体を、Ｇｅｎｔｒａ　Ｐｕｒｅｇｅｎｅ　Ｙｅａｓｔ／Ｂａｃｔキット（Ｑｉａｇｅｎ）で調製したゲノムＤＮＡを使用して、プライマーｏＢＰ５４０（配列番号３５３）及びｏＢＰ５４１（配列番号３５４）でのＰＣＲによりスクリーニングした。単離物にＰＤＣ５遺伝子が存在しないことが、ＰＤＣ５のコード配列に特異的なプライマーｏＢＰ５５２（配列番号３５５）及びｏＢＰ５５３（配列番号３５６）を使用したネガティブＰＣＲの結果により実証された。正しい形質転換体を、株ＣＥＮ．ＰＫ　１１３－７Ｄ　Δｕｒａ３：：ｌｏｘＰ　Δｈｉｓ３　Δｐｄｃ６　Δｐｄｃ１：：ｉｌｖＤＳｍ　Δｐｄｃ５：：ｓａｄＢ－ＵＲＡ３として選択した。

【０４６３】

ＣＥＮ．ＰＫ　１１３－７Ｄ　Δｕｒａ３：：ｌｏｘＰ　Δｈｉｓ３　Δｐｄｃ６　Δｐｄｃ１：：ｉｌｖＤＳｍ　Δｐｄｃ５：：ｓａｄＢ－ＵＲＡ３をＹＰＥ（１％エタノール）で一晩成長させ、３０℃のエタノール添加（グルコース不含）且つ５－フルオロオロチン酸（０．１％）含有合成完全培地に播いて、ＵＲＡ３マーカーが失われた単離物を選択した。ＰＤＣ５の欠失、ｓａｄＢの組込み、及びマーカー除去を、Ｇｅｎｔｒａ　Ｐｕｒｅｇｅｎｅ　Ｙｅａｓｔ／Ｂａｃｔキット（Ｑｉａｇｅｎ）で調製したゲノムＤＮＡを使用して、プライマーｏＢＰ５４０（配列番号３５３）及びｏＢＰ５４１（配列番号３５４）でのＰＣＲにより確認した。正しい単離物を、株ＣＥＮ．ＰＫ　１１３－７Ｄ　Δｕｒａ３：：ｌｏｘＰ　Δｈｉｓ３　Δｐｄｃ６　Δｐｄｃ１：：ｉｌｖＤＳｍ　Δｐｄｃ５：：ｓａｄＢとして選択し、ＢＰ９１３と命名した。

【０４６４】
ＧＰＤ２欠失
内因性ＧＰＤ２コード領域を欠失させるため、ｌｏｘＰ－ＵＲＡ３－ｌｏｘＰ　ＰＣＲ（配列番号３６０）を鋳型ＤＮＡとして使用して、ｇｐｄ２：：ｌｏｘＰ－ＵＲＡ３－ｌｏｘＰカセット（配列番号３６１）をＰＣＲ増幅した。ｌｏｘＰ－ＵＲＡ３－ｌｏｘＰは、ｌｏｘＰリコンビナーゼ部位が隣接する（ＡＴＣＣ番号７７１０７）由来のＵＲＡ３マーカーを含む。ＰＣＲは、Ｐｈｕｓｉｏｎ　ＤＮＡポリメラーゼ及びプライマーＬＡ５１２及びＬＡ５１３（配列番号３４０及び３４１）を使用して行った。各プライマーのＧＰＤ２部分は、ｌｏｘＰ－ＵＲＡ３－ｌｏｘＰマーカーの組込みがＧＰＤ２コード領域の置換をもたらすように、ＧＰＤ２コード領域の上流の５’領域及びそのコード領域の下流の３’領域に由来するものとした。ＰＣＲ産物をＢＰ９１３に形質転換し、１％エタノール添加（グルコース不含）ウラシル不含合成完全培地で形質転換体を選択した。プライマーｏＢＰ５８２及びＡＡ２７０（配列番号３５７及び３５８）を用いたＰＣＲにより形質転換体をスクリーニングして、組込みが正しいことを確認した。

【０４６５】
ＵＲＡ３マーカーを、ｐＲＳ４２３：：ＰＧＡＬ１－ｃｒｅ（配列番号２７１）で形質転換し、３０℃の１％エタノール添加ヒスチジン不含合成完全培地に播くことにより再利用した。形質転換体を１％エタノール添加且つ５－フルオロオロチン酸（０．１％）含有合成完全培地にストリークし、３０℃でインキュベートして、ＵＲＡ３マーカーが失われた単離物を選択した。５－ＦＯＡ耐性単離物をＹＰＥ（１％エタノール）で成長させて、ｐＲＳ４２３：：ＰＧＡＬ１－ｃｒｅプラスミドを取り除いた。欠失及びマーカー除去を、プライマーｏＢＰ５８２（配列番号３５７）及びｏＢＰ５９１（配列番号３６２）でのＰＣＲにより確認した。正しい単離物を、株ＣＥＮ．ＰＫ　１１３－７Ｄ　Δｕｒａ３：：ｌｏｘＰ　Δｈｉｓ３　Δｐｄｃ６　Δｐｄｃ１：：ｉｌｖＤＳｍ　Δｐｄｃ５：：ｓａｄＢ　Δｇｐｄ２：：ｌｏｘＰとして選択し、ＢＰ１０６４（ＰＮＹ１５０３）と命名した。

【０４６６】
実施例１３
ＰＮＹ２２０４及びイソブタノール経路プラスミドの構築
本例の目的は、染色体ＸＩＩにおけるＰＤＣ１及びＴＲＸ１コード配列間の天然に存在する遺伝子間領域へのアセト乳酸シンターゼをコードする遺伝子の組込みを可能にするベクターの構築について記載することである。このベクターを使用して得られる株についても記載する。

【０４６７】
組込みベクターｐＵＣ１９－ｋａｎ：：ｐｄｃ１：：ＦＢＡ－ａｌｓＳ：：ＴＲＸ１の構築
１．７ｋｂのＢｂｖＣＩ／ＰａｃＩ断片をｐＲＳ４２６：：ＧＰＤ：：ａｌｓＳ：：ＣＹＣ（米国特許第７，８５１，１８８号明細書（これは全体として参照により本明細書に援用される）に記載される）から、予めＢｂｖＣＩ／ＰａｃＩで消化してＩＬＶ５遺伝子を切り離したｐＲＳ４２６：：ＦＢＡ：：ＩＬＶ５：：ＣＹＣ（米国特許第７，８５１，１８８号明細書（これは全体として参照により本明細書に援用される）に記載される）に移すことにより、ＦＢＡ－ａｌｓＳ－ＣＹＣｔカセットを構築した。ライゲーション反応物を大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ＴＯＰ１０細胞に形質転換し、形質転換体を、プライマーＮ９８ＳｅｑＦ１（配列番号３６３）及びＮ９９ＳｅｑＲ２（配列番号３６５）を使用するＰＣＲによってスクリーニングした。ベクターからＢｇｌＩＩ及びＮｏｔＩを使用してＦＢＡ－ａｌｓＳ－ＣＹＣｔカセットを単離し、ｐＵＣ１９－ＵＲＡ３：：ｉｌｖＤ－ＴＲＸ１（クローン「Ｂ」）のＡｆｌＩＩ部位にクローニングした（クレノウ断片を使用して、ライゲーションに適合する末端を作製した）。ベクターにおいて両方向にａｌｓＳカセットを含む形質転換体が得られ、ＰＣＲにより、構成「Ａ」についてプライマーＮ９８ＳｅｑＦ４（配列番号３６４）及びＮ１１１１（配列番号３６６）を使用し、構成「Ｂ」に

ついてＮ９８ＳｅｑＦ４（配列番号３６４）及びＮ１１１０（配列番号３６７）を使用して確認した。次に、ＵＲＡ３遺伝子（１．２ｋｂのＮｏｔＩ／ＮａｅＩ断片）を除去し、且つジェネティシンカセットを付加することにより、ジェネティシン選択可能なバージョンの「Ａ」構成ベクターを作製した。クレノウ断片を用いて全ての末端をライゲーションに適合させ、及びプライマーＢＫ４６８（配列番号３６８）及びＮ１６０ＳｅｑＦ５（配列番号２１０）を使用して、ＰＣＲにより形質転換体をスクリーニングし、先のＵＲＡ３マーカーと同じ向きのジェネティシン耐性遺伝子を有するクローンを選択した。得られたクローンは、ｐＵＣ１９－ｋａｎ：：ｐｄｃ１：：ＦＢＡ－ａｌｓＳ：：ＴＲＸ１（クローンＡ）（配列番号３８７）と命名した。

【０４６８】

ａｌｓＳ組込み株及びイソブタノール生成誘導体の構築

上記に記載されるｐＵＣ１９－ｋａｎ：：ｐｄｃ１：：ＦＢＡ－ａｌｓＳ組込みベクターをＰｍｅＩで直鎖化し、ＰＮＹ１５０７（上記の実施例８に記載される）に形質転換した。ＰｍｅＩは、クローニングされたｐｄｃ１－ＴＲＸ１遺伝子間領域内でベクターを切断し、従ってその位置に標的化した組込みをもたらす（Ｒｏｄｎｅｙ Ｒｏｔｈｓｔｅｉｎ，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，１９９１，ｖｏｌｕｍｅ １９４，ｐｐ．２８１－３０１）。形質転換体をＹＰＥ＋５０μｇ／ｍｌ Ｇ４１８で選択した。パッチした形質転換体を、プライマーＮ１６０ＳｅｑＦ５（配列番号２１０）及びｏＢＰ５１２（配列番号３３７）を使用したＰＣＲにより、組込みイベントについてスクリーニングした。２つの形質転換体を、それらの株のイソブタノール産生能力を評価することにより、アセト乳酸シンターゼ機能について間接的に試験した。このため、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）－酵母シャトルベクター（ｐＹＺ０９０ΔａｌｓＳ及びｐＢＰ９１５、以下に記載される）に、さらなるイソブタノール経路遺伝子を提供した。１つのクローンをＰＮＹ２２０５と命名した。プラスミドを含まない親株をＰＮＹ２２０４と命名した（ＭＡＴａ ｕｒａ３Δ：：ｌｏｘＰ ｈｉｓ３Δ ｐｄｃ６Δ ｐｄｃ１Δ：：Ｐ［ＰＤＣ１］－ＤＨＡＤ｜ｉｌｖＤ＿Ｓｍ－ＰＤＣ１ｔ－ｐＵＣ１９－ｌｏｘＰ－ｋａｎＭＸ－ｌｏｘＰ－Ｐ［ＦＢＡ１］－ＡＬＳ｜ａｌｓＳ＿Ｂｓ－ＣＹＣ１ｔ ｐｄｃ５Δ：：Ｐ［ＰＤＣ５］－ＡＤＨ｜ｓａｄＢ＿Ａｘ－ＰＤＣ５ｔ ｇｐｄ２Δ：：ｌｏｘＰ ｆｒａ２Δ ａｄｈ１Δ：：ＵＡＳ（ＰＧＫ１）Ｐ［ＦＢＡ１］－ｋｉｖＤ＿Ｌｌ（ｙ）－ＡＤＨ１ｔ）。

【０４６９】

イソブタノール経路プラスミド（ｐＹＺ０９０ΔａｌｓＳ及びｐＢＰ９１５）

ｐＹＺ０９０（配列番号１９５）をＳｐｅＩ及びＮｏｔＩで消化して、ＣＵＰ１プロモーターの大部分並びに全てのａｌｓＳコード配列及びＣＹＣターミネーターを除去した。次にベクターを、クレノウ断片による処理後にセルフライゲートし、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ＳｔｂｌＳ３細胞に形質転換することにより、アンピシリン耐性について選択した。２つの独立したクローンについて、プライマーＮ１９１（配列番号３７０）を使用したＰＣＲによるライゲーション接合部にわたるＤＮＡ配列決定により、ＤＮＡ領域の除去を確認した。得られたプラスミドをｐＹＺ０９０ΔａｌｓＳ（配列番号３７１）と命名した。酵母におけるＤＨＡＤ、ＫｉｖＤ及びＨＡＤＨ発現用のｐＬＨ４６８プラスミドを構築した。ｐＬＨ４６８（配列番号１３９）から、ｋｉｖＤ遺伝子及びｋｉｖＤの上流の９５７塩基対のＴＤＨ３プロモーターを欠失させることにより、ｐＢＰ９１５（配列番号１８２）を構築した。ｐＬＨ４６８をＳｗａＩで消化し、大きい断片（１２８９６ｂｐ）をアガロースゲルと、続いてゲル抽出キット（Ｑｉａｇｅｎ；Ｖａｌｅｎｃｉａ，ＣＡ）で精製した。ＤＮＡの単離断片をＴ４ ＤＮＡリガーゼによりセルフライゲートし、これを使用してエレクトロコンピテントＴＯＰ１０大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）を形質転換した。形質転換体からのプラスミドを単離し、ＳｗａＩ制限酵素による制限解析により、正確な欠失であることを確認した。単離物もまた、プライマーｏＢＰ５５６（配列番号３７２）及びｏＢＰ５６１（配列番号３７３）により、欠失部位にわたり配列決定した。正確な欠失を有するクローンを、ｐＢＰ９１５（ｐＬＨ４６８ΔｋｉｖＤ）（配列番号１８２）と命名した。

【０４７０】
ｐＹＺ０９０は、ｐＨＲ８１（ＡＴＣＣ番号８７５４１、Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ）骨格をベースとする。ｐＹＺ０９０を、ＡＬＳの発現用の、酵母ＣＵＰ１プロモーター（ｎｔ　２位～４４９位）から発現し、且つＣＹＣ１ターミネーター（ｎｔ　２１８１位～２４３０位）が続く枯草菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｕｂｔｉｌｉｓ）由来のａｌｓＳ遺伝子のコード領域（ｎｔ　４５７位～２１７２位）を有するキメラ遺伝子と、ＫＡＲＩ発現用の、酵母ＩＬＶ５プロモーター（２４３３位～３６２６位）から発現し、且つＩＬＶ５ターミネーター（ｎｔ　４６８２位～５３０４位）が続くラクトコッカス・ラクチス（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｌａｃｔｉｓ）由来のｉｌｖＣ遺伝子のコード領域（ｎｔ　３６３４位～４６５６位）を有するキメラ遺伝子とを含むように構築した。

【０４７１】
実施例１４
イソブタノール生成－ＰＮＹ１９１０及びＰＮＹ２２４２
方法：
接種培地の調製
１Ｌの接種培地は以下を含んだ：６．７ｇ、アミノ酸不含酵母窒素原基礎培地（Ｄｉｆｃｏ　０９１９－１５－３）；２．８ｇ、ヒスチジン、ロイシン、トリプトファン及びウラシル不含酵母合成ドロップアウト培地添加剤（Ｓｉｇｍａ　Ｙ２００１）；２０ｍＬの１％（ｗ／ｖ）Ｌ－ロイシン；４ｍＬの１％（ｗ／ｖ）Ｌ－トリプトファン；３ｇのエタノール；１０ｇのグルコース。

【０４７２】
限定発酵培地の調製
接種後のブロスの容積は８００ｍＬで、以下の最終組成を有した（リットルあたり）：５ｇ硫酸アンモニウム、２．８ｇリン酸二水素カリウム、１．９ｇ硫酸マグネシウム七水和物（ｓｅｐｔａｈｙｄｒａｔｅ）、０．２ｍＬ消泡剤（Ｓｉｇｍａ　ＤＦ２０４）、ヒスチジン、ロイシン、トリプトファン、及びウラシル不含酵母合成ドロップアウト培地添加剤（Ｓｉｇｍａ　Ｙ２００１）、１６ｍｇ　Ｌ－ロイシン、４ｍｇ　Ｌ－トリプトファン、６ｍＬのビタミン混合物（１Ｌの水中、５０ｍｇビオチン、１ｇパントテン酸Ｃａ、１ｇニコチン酸、２５ｇミオイノシトール、１ｇチアミン塩化物塩酸塩、１ｇ塩酸ピリドキソール、０．２ｇ　ｐ－アミノ安息香酸）、６ｍＬの微量ミネラル溶液（１Ｌの水中、１５ｇ　ＥＤＴＡ、４．５ｇ硫酸亜鉛七水和物、０．８ｇ塩化マンガン二水和物（ｄｅｈｙｄｒａｔｅ）、０．３ｇ塩化コバルト六水和物、０．３ｇ硫酸銅五水和物、０．４ｇモリブデン酸二ナトリウム二水和物（ｄｉｓｏｄｉｕｍ　ｍｏｌｙｂｄｅｎｕｍ　ｄｅｈｙｄｒａｔｅ）、４．５ｇ塩化カルシウム二水和物、３ｇ硫酸鉄七水和物、１ｇホウ酸、０．１ｇヨウ化カリウム）、３０ｍｇチアミンＨＣｌ、３０ｍｇニコチン酸。２Ｎ　ＫＯＨによりｐＨを５．２に調整し、グルコースを１０ｇ／Ｌまで添加した。

【０４７３】
接種材料の調製
凍結バイアルから直接、全バイアル培養物（約１ｍｌ）を１０ｍＬの接種培地にピペッティングすることにより、１２５ｍＬ振盪フラスコを接種した。フラスコを２６０ｒｐｍ及び３０℃でインキュベートした。株をＯＤ約１．０まで一晩成長させた。λ＝６００ｎｍのＯＤは、Ｂｅｃｋｍａｎ分光光度計（Ｂｅｃｋｍａｎ，米国）で決定した。

【０４７４】
バイオリアクター実験計画
発酵は、実働容積が０．８Ｌの１Ｌ　Ｂｉｏｓｔａｔ　Ｂ　ＤＣＵ３発酵槽（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ，米国）で行った。排ガス組成をＰｒｉｍａ　ＤＢ質量分析器（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｅｌｅｃｔｒｏｎ　Ｃｏｒｐ．，米国）によりモニタした。発酵全体を通して温度は３０℃に維持し、ｐＨは２Ｎ　ＫＯＨによって５．２に制御した。８０ｍＬの接種材料を直接接種した後は、撹拌によってｄＯを３０％に制御し、ｐＨを５．２５に制御し、曝気を０．２Ｌ／分に制御した。ＯＤが約３に達した後、嫌気性培養のためガスをＮ２に切り替

えた。発酵全体を通してグルコースは、５０％（ｗ／ｗ）溶液を手動で添加することにより過剰（５～２０ｇ／Ｌ）に維持した。

【０４７５】

培養実験の分析方法

十分に混合したブロス試料をキュベット（ＣＳ５００　ＶＷＲ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ，独国）にピペッティングすることにより、λ＝６００ｎｍのＯＤを分光光度計で決定した。試料のバイオマス濃度が分光光度計の線吸収範囲（典型的にはＯＤ値０．０００～０．３００）を超える場合、０．９％ＮａＣｌ溶液で試料を希釈して、線吸収範囲の値を得た。

【０４７６】

培養上清中におけるグルコース、イソブタノール、及び他の発酵副生成物の計測を、屈折率（ＲＩ）検出器及びダイオードアレイ（２１０ｎｍ）検出器と共にＢｉｏ－Ｒａｄ　Ａｍｉｎｅｘ　ＨＰＸ－８７Ｈカラム（Ｂｉｏ－Ｒａｄ，米国）を使用してＨＰＬＣにより行った。移動相として０．０１Ｎ　H_2SO_4を使用して、０．６ｍＬ／分の流量及び４０℃のカラム温度でクロマトグラフ分離を達成した。これらの条件下でイソブタノール保持時間は３２．２分である。排ガス試料中のイソブタノール濃度を質量分析計により決定した。

【０４７７】

結果

光学濃度（ＯＤ）として計測される最高バイオマス濃度、イソブタノール生成の容積速度、最終イソブタノール力価、及びグルコースに対するイソブタノール収率を、以下の表に提供する。株ＰＮＹ２２４２は、株ＰＮＹ１９１０と比べてより高い力価及びより速い速度を有し、より高い比速度及び力価のイソブタノールを生成した。比速度は図５に示す。培養上清中のＤＨＩＶ＋ＤＨＭＢの蓄積は、ＰＮＹ２２４２株と比較してＰＮＹ１９１０で３倍高かった（図６）。グルコースに対するグリセロール、ピルビン酸、ＢＤＯ、ＤＨＩＶ＋ＤＨＭＢ*、αＫＩＶ、及びイソ酪酸の収率を図７に示す。

*ＨＰＬＣ法により分析したＤＨＩＶには、ＤＨＩＶ及びＤＨＭＢの両方が含まれる。

【０４７８】

【表２３】

表 19

株	最大 OD600	速度 (g/L/h)	力価 (g/L)	収率 (g/g)
PNY1910	5.0	0.16	10.9	0.25
PNY2242	5.0	0.23	16.1	0.27

【０４７９】

実施例１５

Ｋ９Ｇ９エラープローン ＰＣＲライブラリの構築

Ｋ９Ｇ９のエラープローンＰＣＲを実施して、ＮＡＤＨと比べてＮＡＤＰＨに対するＫｍ値の増加を有する変異体をスクリーニングできるライブラリを作成した。Ｋ９Ｇ９の突然変異誘発ＰＣＲを、ＧｅｎｅＭｏｒｐｈ（登録商標）ＩＩ　ＥＺＣｌｏｎｅドメイン突然変異生成キット（カタログ番号２００５５２；Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ　Ｄｉｖｉｓｉｏｎ，Ｌａ　Ｊｏｌｌａ，ＣＡ）により実施した。プライマーＫ９Ｇ９＿ＥＺ＿Ｆ１（ＡＡＡ　ＣＡＴ　ＧＧＡ　ＡＧＡ　ＡＴＧ　ＴＡＡ　ＧＡＴ　ＧＧＣ；配列番号３９０）及びＫ９Ｇ９＿ＥＺ＿Ｒ１（ＴＣＡ　ＧＴＴ　ＧＴＴ　ＡＡＴ　ＣＡＡ　ＣＴＴ　ＧＴＣ　ＴＴＣ　Ｇ；配列番号３９１）は、Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ（Ｃｏｒａｌｖｉｌｌｅ　ＩＡ）によって商業的に合成された。プライマー、鋳型、及びddH_2

Ｏの他には、ここで使用した試薬は、上記に示すキットと共に提供された。突然変異誘発ＰＣＲ混合物は、４μｌのｐＨＲ８１－ＰＩｌｖ５－ＫＡＲＩ－Ｋ９．Ｇ９（配列番号３９２）（７７０ｎｇ／μｇ）、１．２５μｌの各プライマー（１００ｎｇ／μｌストック）、５μｌの１０×Ｍｕｔａｚｙｍｅ　ＩＩ反応緩衝液、１μｌの４０ｍＭ　ｄＮＴＰ混合物、１．５μｌのＭｕｔａｚｙｍｅ　ＩＩ　ＤＮＡポリメラーゼ、及び３６μｌのｄｄH_2Oからなった。ＰＣＲ反応には以下の条件を用いた：開始温度は９５℃で２．０分間、続いて３０回の加熱／冷却サイクルであった。各サイクルは、９５℃で３０秒間、４８℃で３０秒間、及び７２℃で２．０分間からなった。温度サイクルの完了時に、試料をさらに１０．０分間７２℃に保ち、次に４℃に維持して試料の回復を待った。反応産物をアガロースゲル電気泳動（ｅｌｅｃｔｒｏｐｈｌｏｒｅｓｉｓ）（１％アガロース、１×ＴＢＥ緩衝液）によって鋳型から分離し、ＳｔｒａｔａＰｒｅｐ（登録商標）ＤＮＡゲル抽出キット（カタログ番号４００７６６、Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ　Ｄｉｖｉｓｉｏｎ，Ｌａ　Ｊｏｌｌａ，ＣＡ）を製造者の推奨どおり使用して回収した。

【０４８０】

単離した反応産物をメガプライマーとして用いて、上記に示すキットの「ＥＺＣｌｏｎｅ反応」において遺伝子ライブラリを作成した。メガプライマー、鋳型、及びｄｄH_2Oの他には、ここで使用した試薬は、上記に示すキットと共に提供された。反応物は、２５μｌの２×ＥＺＣｌｏｎｅ酵素混合物、４μｌのメガプライマー（１２５ｎｇ／μｌ）、ｐＢＡＤ．ＫＡＲＩベクター（２５ｎｇ／μｌ）における２μｌのＫ９Ｇ９、３μｌのＥＺＣｌｏｎｅ溶液、及び１６μｌのｄｄH_2Oからなった。反応には以下の条件を用いた：開始温度は９５℃で１．０分間、続いて３０回の加熱／冷却サイクルであった。各サイクルは、９５℃で５０秒間、６０℃で５０秒間、及び６８℃で１０．０分間からなった。温度サイクルの完了時に試料をさらに１０．０分間７２℃に保ち、次に４℃に維持して試料の回復を待った。１μｌのＤｐｎ　Ｉ（１０Ｕ／μｌ）を添加し、混合物を３７℃で４時間インキュベートした。

【０４８１】

次に、４μｌのＤｐｎ　Ｉで消化した「ＥＺＣｌｏｎｅ反応」の産物を、５０μｌ　ＸＬ１０－Ｇｏｌｄ（登録商標）ウルトラコンピテント大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）細胞（ＧｅｎｅＭｏｒｐｈ（登録商標）ＩＩ　ＥＺＣｌｏｎｅドメイン突然変異生成キットに提供される）に製造者の推奨どおり形質転換した。形質転換体を、ＬＢ培地及び１００μｇ／ｍｌアンピシリンを含有する寒天プレート（カタログ番号Ｌ１００４、Ｔｅｋｎｏｖａ　Ｉｎｃ．Ｈｏｌｌｉｓｔｅｒ，ＣＡ）に広げ、３７℃で一晩インキュベートし、４℃で保存した。これらのステップを、形質転換１回あたり４μｌのＤｐｎ　Ｉ消化した「ＥＺＣｌｏｎｅ反応」産物及び５０μｌの細胞で、合計１０回の形質転換にわたり繰り返した。ＸＬ－Ｇｏｌｄにおいて得られたライブラリを、Ｍ９塩を含有する溶液で寒天プレートから剥がし取り、合わせて、ＬＢ培地及び１００μｇ／ｍｌアンピシリンを含有する培地に希釈し、３７℃で一晩インキュベートした。ＱＩＡｐｒｅｐ　Ｓｐｉｎミニプレップキット（カタログ番号２７０６；Ｑｉａｇｅｎ，Ｖａｌｅｎｃｉａ，ＣＡ）により、製造者により提供されるプロトコルに従い細胞からライブラリＤＮＡを単離した。次に増幅したライブラリを用いることにより、ＢｉｏＲａｄ　Ｇｅｎｅ　Ｐｕｌｓｅｒ　ＩＩ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ　Ｉｎｃ．，Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，ＣＡ）を使用して大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）のエレクトロコンピテント株Ｂｗ２５１１３（ΔｉｌｖＣ）を形質転換した。形質転換したクローンを、ＬＢ培地及び１００μｇ／ｍｌアンピシリンを含有する寒天プレート（番号１０１３２０－１５４、Ｔｅｋｎｏｖａ　Ｉｎｃ．Ｈｏｌｌｉｓｔｅｒ，ＣＡ）に広げ、３７℃で一晩インキュベートした。クローンを、実施例１６に記載されるとおりのハイスループットスクリーニングに用いた。

【０４８２】

実施例１６

ＮＡＤＨ活性のＮＡＤＰ＋阻害の減少をスクリーニングすることによる、ＮＡＤＰＨに対

するK$_M$が増加したＫ９Ｇ９変異体の同定

実施例１５に記載されるＫ９Ｇ９ライブラリを、ＮＡＤＨ依存性ＫＡＲＩ活性のＮＡＤＰ$^+$阻害が低下した変異体についてスクリーニングした。ＮＡＤＨによる活性のＮＡＤＰ$^+$阻害が低下したＫ９Ｇ９変異体は、潜在的に、ＮＡＤＨに対するK$_M$に対してのＮＡＤＰＨに対するK$_M$の比の増加を示し得る。ＮＡＤＨに対するＫｍと比べたＮＡＤＰＨに対するK$_M$を増加させることを具体的な目的として、スクリーニングのヒットを部分的に精製して動態解析を実施し、ＮＡＤＨでの、及びＮＡＤＰＨでのV$_{max}$及びK$_M$パラメータを決定した。

【０４８３】

Ｋ９Ｇ９遺伝子ライブラリのハイスループットスクリーニングアッセイ

突然変異体ＫＡＲＩ酵素の遺伝子ライブラリのハイスループットスクリーニングを、本明細書に記載されるとおり実施した：５５４．４ｇ／Ｌグリセロール、６８ｍＭの（NH_4）$_2SO_4$、４ｍＭ　$MgSO_4$、１７ｍＭクエン酸ナトリウム、１３２ｍＭ　KH_2PO_4、３６ｍＭ　K_2HPO_4を含有する１０×凍結用培地を、分子的に純粋な水で調製し、ろ過滅菌した。この１０×凍結用培地をＬＢ培地で希釈することにより、凍結用培地を調製した。１×凍結用培地のアリコート（２００μＬ）を、９６ウェルアーカイブプレート（カタログ番号３３７０、Ｃｏｒｎｉｎｇ　Ｉｎｃ．Ｃｏｒｎｉｎｇ，ＮＹ）の各ウェルに使用した。

【０４８４】

ＬＢ寒天プレートからクローンを選択して、凍結用培地を含有する９６ウェルアーカイブプレートに接種し、振盪なしに３７℃で一晩成長させた。次にアーカイブプレートを－８０℃で保存した。陰性対照としては、ｐＢＡＤ－ＨｉｓＢ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）で形質転換した、米国特許第８，１２９，１６２号明細書に記載されるとおりの大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）株Ｂｗ２５１１３（ΔｉｌｖＣ）を常に使用した。ライブラリの陽性対照は、米国特許第８，１２９，１６２号明細書に記載されるとおりの、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）株Ｂｗ２５１１３（ΔｉｌｖＣ）におけるＫ９Ｇ９－ＫＡＲＩであった。

【０４８５】

アーカイブプレートからのクローンを９６ディープウェルプレートに接種した。各ウェルは、解凍したアーカイブプレートからの細胞３．０μｌ、１００μｇ／ｍｌアンピシリン及び誘導物質として０．０２％（ｗ／ｖ）アラビノースを含有するＬＢ培地２００μｌを含んだ。細胞を、振盪（９００ｒｐｍ）しながら８０％湿度の３７℃で一晩成長させ、遠心（３７５０ｒｐｍ、２５℃で５分）（Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ遠心機、Ｂｒｉｎｋｍａｎｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ，Ｉｎｃ．Ｗｅｓｔｂｕｒｙ，ＮＹ）により回収した。後の分析のため、細胞ペレットを－２０℃で保存した。

【０４８６】

アッセイ基質（Ｒ，Ｓ）－アセトラクテートを、Ａｕｌａｂａｕｇｈ　ａｎｄ　Ｓｃｈｌｏｓｓ（Ａｕｌａｂａｕｇｈ　ａｎｄ　Ｓｃｈｌｏｓｓ，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，２９：２８２４－２８３０，１９９０）により記載されるとおり合成した。このアッセイで使用した他の化学物質は全て、Ｓｉｇｍａから購入した。ＫＡＲＩによるアセトラクテートからα，β－ジヒドロキシイソバレレートへの酵素変換の後、プレートリーダー（Ｓａｐｈｉｒｅ　２、Ｔｅｃａｎ，Ｍａｎｎｅｄｏｒｆ，スイス）を使用して、３４０ｎｍの反応から補因子ＮＡＤＨの酸化を計測した。活性は、６２２０$M^{-1}cm^{-1}$　ＮＡＤＨのモル吸光係数を使用して計算した。

【０４８７】

ディープウェルプレート中の凍結細胞ペレット及びＢｕｇＢｕｓｔｅｒ（Ｎｏｖａｇｅｎ　７１４５６，Ｄａｒｍｓｔａｄｔ，独国）を、同時に室温で３０分間加温した。３０分間加温した後、７５μｌの５０％ＢｕｇＢｕｓｔｅｒ（ｖ／ｖ水中）を各ウェルに添加し、プレートシェーカーを使用して細胞を懸濁した。細胞ペレット／５０％Ｂｕｇ　Ｂｕｓｔｅｒ懸濁液を有するプレートを室温で３０分間インキュベートした。細胞溶解物を７５μＬのｄ．ｄ水で希釈して、０．５×ライセートを得た。希釈した無細胞抽出物のアッ

セイを、２．５mMのＮＡＤＰ＋を含む、又は含まない、２．４mM（Ｒ／Ｓ）－アセトラクテート、１００mM ＨＥＰＥＳ ｐＨ６．８、１００mM ＫＣｌ、１０mM $MgCl_2$、１５０μM ＮＡＤＨ、１２．５μＬ ０．５×細胞溶解物を含有する緩衝液中、３０℃で実施した。

【０４８８】

ＮＡＤＨ ＫＡＲＩ活性のＮＡＤＰ＋阻害が低下したＫ９Ｇ９変異体の同定

ＮＡＤＰ＋の存在下におけるＮＡＤＨ酸化速度の計測値の、ＮＡＤＰ＋の非存在下におけるＮＡＤＨ酸化速度の計測値に対する比を、各変異体及び陽性対照ウェル（２個／プレート）について計算した。全ての陽性対照ウェルの比の平均及び標準偏差（合計10^4個）を計算した。

【０４８９】

変異体ウェルは、ＮＡＤＰ＋の非存在下における速度が０．１ＯＤ／時間より高く、且つ速度比がいずれも０．４５より大きく（陽性対照平均より３標準偏差高く）且つ１より小さい場合、初期ヒットを含むと考えた。４６０７個の潜在的な変異体のプールから合計５２１個のヒットが同定された。これらの初期ヒットを統合して、さらなる分析用により小さいライブラリを形成した。

【０４９０】

初期ライブラリヒットの二次スクリーニング

統合したヒットライブラリを生物学的トリプリケートで成長させ、無細胞抽出物を調製し、上記に記載したとおりアッセイした。次に、上記のとおり、変異体及び陽性対照の速度比を計算した。詳細な動態解析用に選択された最終的なヒットは、以下の基準を満たした：ＮＡＤＰ＋の非存在下における速度が０．６ＯＤ／時間より高く、速度比が０．５１より大きく且つ１より小さく、且つ３個の生物学的レプリケートのうち少なくとも２個がこれらの基準に合格。動態解析用に１７個のヒットが同定され、１００μｇ／ｍＬアンピシリンを添加したＬＢプレートにストリークして広げた。

【０４９１】

Ｋ９Ｇ９変異体の配列分析

二次ＨＴＳスクリーニングから同定された１７個の変異体のＤＮＡ配列決定を、ＴｅｍｐｌｉＰｈｉ（商標）（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用することにより、プライマーｐＢＡＤ－Ｆｏｒ（ＡＴＧＣＣＡＴＡＧＣＡＴＴＴＴＴＡＴＣＣ；配列番号３９３）及びｐＢＡＤ－Ｒｅｖ（ＣＴＧＡＴＴＴＡＡＴＣＴＧＴＡＴＣＡＧＧＣＴ；配列番号３９４）で達成した。

【０４９２】

【表２４】

表 20. K9G9 変異体のアミノ酸置換

変異体	配列	アミノ酸置換
878 C1	873	同定なし
879 A7	874	K90M
879 C2	875	H37Q
880 A11	876	A182T, P320Q
880 B4	877	K57E
880 D11	878	K90M, A174V
881 A2	879	K90M, I133V, K282T
881 G3	880	Y53F, E74G
881 G9	881	K90E
882 B12	882	H118R
882 C10	883	G31S, R61S, C121Y, D129N, G183D
882 C7	933	E54G
882 F9	934	K90E, Q160H
882 G6	935	G55A
882 G12	936	V142L, S285Y
883 C4	937	A170V
883 G9	938	L197M, K310M

【０４９３】

部分的に精製した変異体タンパク質の動態解析

米国特許第８，１２９，１６２号明細書に記載されるとおりの、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）株Ｂｗ２５１１３（ΔｉｌｖＣ）を使用して、１７個の変異体及び陽性対照Ｋ９Ｇ９を発現させた。株は、１２５ｍＬのバッフル付きベント付きフィルタ付き蓋のフラスコにおいて、１００μｇ／ｍＬアンピシリンを含有する１０ｍＬのＬＢブロス（番号４６－０６０－ＣＭ、Ｍｅｄｉａｔｅｃｈ，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ）中、振盪しながら３７℃で８時間成長させた。２００μＬのこの培養物を使用して、１００μｇ／ｍＬアンピシリン及び０．２％（ｗ／ｖ）アラビノースを添加した１００ｍＬ　ＬＢブロスを接種した。これらの培養物を、５００ｍＬのバッフル付きベント付きフィルタ付き蓋のフラスコにおいて、振盪しながら３７℃で１６～１８時間成長させた。細胞を２０ｍＬ及び２つの４０ｍＬアリコートに回収し、上清をデカントして、ペレットを－８０℃で凍結した。

【０４９４】

タンパク質を部分的に精製するため、２０ｍＬの細胞培養物収集物に相当する細胞ペレットを解凍し、１ｍＬのＢｕｇ　Ｂｕｓｔｅｒ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ（Ｎｏｖａｇｅｎ　７１４５６，Ｄａｒｍｓｔａｄｔ，独国）に再懸濁した。細胞懸濁液を室温で１５分間インキュベートし、続いて６０℃で１５分間インキュベートして、易熱性（ｈｅａｔ　ｌｉａｂｌｅ）タンパク質を変性させた。細胞残屑及び変性タンパク質を、４℃で３０分間遠心することによりペレット化した。Ｋ９Ｇ９及び変異体を含む、耐熱性細胞質タンパク質を含む上清を回収し、４℃で保存した。

【０４９５】

耐熱性細胞質タンパク質画分の総タンパク量を、Ｃｏｏｍａｉｓｓｅ　Ｐｌｕｓ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　番号２３２３８、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，Ｉｌｌ）を使用してブラッドフォードアッセイにより計測した。標準としてＢＳＡを用いた。Ｃａｒｙ　３００分光光度計（Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｗｉｌｍｉｎｇｔｏｎ，ＤＥ）を使用して５９５ｎｍの吸光度を決定することにより、タンパク質の濃度を計測した。

【０４９６】

ＮＡＤＨ及びＮＡＤＰＨに対するV_{max}値及びK_M値を決定するため、部分的に精製した

タンパク質を、様々な濃度のＮＡＤＨ（０、１６．４、３２．８、６５．７、９８．５、１６４．３及び２４６．５μＭ）及びＮＡＤＰＨ（０、１２．８、２５．６、５１．２、７６．８及び１２８μＭ）でアッセイした。アッセイは、１００ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（ｐＨ６．８）、１０ｍＭ　$MgCl_2$、１００ｍＭ　ＫＣｌ及び４．８ｍＭ　Ｒ／Ｓ－アセトラクテートにおいて３０℃で行った。アッセイには、０．１～０．３５ｍｇ／ｍＬの総タンパク量を加えた。Ｃａｒｙ　３００分光光度計（Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｗｉｌｍｉｎｇｔｏｎ，ＤＥ）を使用して３４０ｎｍでのＮＡＤ（Ｐ）Ｈの酸化をモニタすることにより、Ｓ－アセトラクテートから ＤＨＩＶへの変換速度を計測した。活性は、６２２０$M^{-1}cm^{-1}$のモル吸光係数を使用して計算した。補因子濃度に対して比活性（Ｕ／ｍｇ）をプロットすることによりV_{max}値及びK_m値を計算し、Ｋａｌｅｉｄａｇｒａｐｈソフトウェア（Ｓｙｎｅｒｇｙ，Ｒｅａｄｉｎｇ，ＰＡ）を使用してデータをミカエリス・メンテン式にフィットさせた。

【０４９７】

【表２５】

表 21. NAD (P)H 消費アッセイにより決定するときの、部分的に精製した K9G9 変異体の動態値

変異体	V_{max} NADPH, U/mg	K_m NADPH, μM	V_{max}/K_m NADPH, L/min*mg	V_{max} NADH, U/mg	K_m NADH, μM	V_{max}/K_m NADH, L/min*mg
K9G9	1.53	45.5	0.034	1.09	67.4	0.016
878 C1	0.75	42.2	0.018	0.62	107.8	0.006
879 A7	2.51	546	0.005	1.44	263	0.006
879 C2	1.27	103	0.012	1.23	187	0.007
880 A11	0.72	86.9	0.008	0.51	117	0.004
880 B4	1.23	233	0.005	1.14	133	0.009
880 D11	1.38	130	0.011	1.50	232	0.006
881 A2	0.88	93.5	0.009	1.13	166.8	0.007
881 G3	0.69	99.2	0.007	0.69	61.8	0.011
881 G9	1.03	158	0.007	0.96	310	0.003
882 B12	0.87	30.3	0.029	0.49	78.9	0.006
882 C10	0.71	34.1	0.021	0.56	97.9	0.006
882 C7	1.62	45.3	0.036	0.96	75.6	0.013
882 F9	1.39	256	0.005	1.19	335	0.004
882 G6	0.95	47.4	0.020	0.74	98.7	0.007
882 G12	1.06	63.5	0.017	0.75	81.2	0.009
883 C4	1.26	46.8	0.027	0.67	83.9	0.008
883 G9	1.26	38	0.033	1.01	71.9	0.014

【０４９８】

実施例１７

部位特異的突然変異誘発によるＫ９　ＫＡＲＩ変異体の手動組換え

Ｋ９Ｇ９誘導体Ｋ９ＪＢ４及びＫ９ＪＧ３（実施例１６においてそれぞれ８８０　Ｂ４及び８８１　Ｇ３として同定された）の部位特異的突然変異誘発を実施し、例に記載する他のアミノ酸変化を組み込んだ。最初のステップは、実施例５に記載されるＮ８７Ｐ置換を加えることであった。ＱｕｉｋＣｈａｎｇｅ（登録商標）ＩＩ部位特異的突然変異誘発キット（カタログ番号２００５２３；Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ　Ｄｉｖｉｓｉｏｎ，Ｌａ　Ｊｏｌｌａ，ＣＡ）を用いて、プライマーＮ８７ＰＣ１（ＣＴＧＡＣＡＴＣＡＴＴＡＴＧＡＴＣＴＴＧＡＴＣＣＣＡＧＡＴＧＡＡＡＡＧＣＡＧＧＣＴＡＣＣＡＴＧＴＡＣ；配列番号３９５）及びＮ８７ＰＣ１ｒ（ＧＴＡＣＡＴＧＧＴＡＧＣＣＴＧＣＴＴＴＴＣＡＴＣＴＧＧＧＡＴＣＡＡＧＡＴＣＡＴＡＡＴＧＡＴＧＴＣＡＧ；配列番号３９６）によりＫＡＲＩ遺伝子に突然変異を

導入した。プライマー、鋳型、及びddH_2Oを除き、ここで使用した全ての試薬は、上記に指示するキットと共に提供された。プライマーは、Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ ＤＮＡ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ（Ｃｏｒａｌｖｉｌｌｅ ＩＡ）により商業的に合成された。鋳型は、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ベクター（ｐＢＡＤ．ＫＡＲＩ）におけるＫ９ＫＡＲＩ変異体であった。Ｋ９ＪＢ４の突然変異生成は、反応混合物に１μｌ Ｋ９ＪＢ４（５０ｎｇ／μｌ）、１μｌの各プライマー（１５０ｎｇ／ｕｌ）、５μｌの１０×反応緩衝液、１μｌのｄＮＴＰ混合物、１μｌのＰｆｕ Ｕｌｔｒａ ＨＦ ＤＮＡポリメラーゼ、及び４０μｌのddH_2Oを含んだ。Ｋ９ＪＧ３反応混合物では、１μｌ Ｋ９ＪＢ４（５０ｎｇ／ｕｌ）を１μｌ Ｋ９ＪＧ３（５０ｎｇ／μｌ）に代えた。双方の反応とも、以下の条件を用いた：開始温度は９５℃で３０秒間、続いて１６回の加熱／冷却サイクルであった。各サイクルは、９５℃で３０秒間、５５℃で３０秒間、及び６８℃で５．０分間からなった。温度サイクルの完了時に、試料を４℃に維持して試料の回復を待った。１μｌのＤｐｎ Ｉ（１０Ｕ／μｌ）を各反応物に添加し、混合物を３７℃で１時間インキュベートした。

【０４９９】

２μｌの各突然変異誘発反応物を、製造者の指示に従いＯｎｅ Ｓｈｏｔ（登録商標）ＴＯＰ１０化学的コンピテント大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号Ｃ４０４００３）に形質転換した。形質転換体を、ＬＢ培地及び１００μｇ／ｍｌアンピシリンを含有する寒天プレート（カタログ番号Ｌ１００４、Ｔｅｋｎｏｖａ Ｉｎｃ．Ｈｏｌｌｉｓｔｅｒ，ＣＡ）に広げ、３７℃で一晩インキュベートした。次に複数の形質転換体を、ＴｅｍｐｌｉＰｈｉ（商標）（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）ベースのＤＮＡ配列決定に対して、プライマーｐＢＡＤ－Ｆｏｒ（ＡＴＧＣＣＡＴＡＧＣＡＴＴＴＴＴＡＴＣＣ；配列番号３９３）及びｐＢＡＤ－Ｒｅｖ（ＣＴＧＡＴＴＴＡＡＴＣＴＧＴＡＴＣＡＧＧＣＴ；配列番号３９４）を用いて選択した。確認されたＫＡＲＩ配列を有する形質転換体を１００μｇ／ｍｌアンピシリンを含有するＬＢ培地に接種し、２２５ｒｐｍで振盪しながら３３℃でインキュベートした。細胞からプラスミドＤＮＡを、ＱＩＡｐｒｅｐ Ｓｐｉｎミニプレップキット（カタログ番号２７０６；Ｑｉａｇｅｎ，Ｖａｌｅｎｃｉａ，ＣＡ）によって製造者により提供されるプロトコルに従い単離した。得られたクローンＫ９ＪＢ４Ｐ及びＫ９ＪＧ３Ｐは、それぞれＫ９ＪＢ４及びＫ９ＪＧ３に由来した。

【０５００】

さらなる部位特異的突然変異誘発を、上記の記載に変更を加えて実施した。

【０５０１】

変異体Ｋ９ＪＡ１は、プライマーｏＫ５７Ｅ１（ＧＧＴＴＴＡＴＴＣＧＡＡＧＧＴＧＣＧＧＡＧＧＡＧＴＧＧＡＡＡＡＧＡＧＣＴＧ；配列番号３９７）及びｏＫ５７Ｅ１ｒ（ＣＡＧＣＴＣＴＴＴＴＣＣＡＣＴＣＣＴＣＣＧＣＡＣＣＴＴＣＧＡＡＴＡＡＡＣＣ；配列番号３９８）を用いてＫ９ＪＧ３Ｐから誘導した。突然変異生成反応物は、１μｌ Ｋ９ＪＧ３Ｐ（５０ｎｇ／μｌ）、１μｌの各プライマー（１５０ｎｇ／ｕｌ）、５μｌの１０×反応緩衝液、１μｌのｄＮＴＰ混合物、１μｌのＰｆｕＵｌｔｒａ ＨＦ ＤＮＡポリメラーゼ、及び４０μｌのddH_2Oを含んだ。大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）形質転換体の液体培養物は、３３℃ではなく３７℃でインキュベートした。

【０５０２】

変異体Ｋ９ＳＢ２は、プライマーｏＹ５３Ｆ１（ＧＴＡＡＣＧＴＴＡＴＣＡＴＴＧＧＴＴＴＡＴＡＣＧＡＡＧＧＴＧＣＧＧＡＧＧＡＧ；配列番号３９９）及びｏＹ５３Ｆ１ｒ（ＣＴＣＣＴＣＣＧＣＡＣＣＴＴＣＧＡＡＴＡＡＡＣＣＡＡＴＧＡＴＡＡＣＧＴＴＡＣ；配列番号４００）を用いてＫ９ＪＢ４Ｐから誘導した。突然変異生成反応物は、１μｌ Ｋ９ＪＢ４Ｐ（５０ｎｇ／μｌ）、１μｌの各プライマー（１５０ｎｇ／ｕｌ）、５μｌの１０×反応緩衝液、１μｌのｄＮＴＰ混合物、１μｌのＰｆｕＵｌｔｒａ ＨＦ ＤＮＡポリメラーゼ、及び４０μｌのｄｄＨ２Ｏを含んだ。大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）形質転換体の液体培養物は、３３℃ではなく３７℃でインキュベートした。

【０５０３】
変異体Ｋ９ＳＢ２－Ｋ９０Ｌは、プライマーｏＫ９０Ｌ１（ＧＡＴＣＴＴＧＡＴＣＣＣＡＧＡＴＧＡＡＴＴＧＣＡＧＧＣＴＡＣＣＡＴＧＴＡＣＡＡＡＡＡＣ；配列番号４０１）及びｏＫ９０Ｌ１ｒ（ＧＴＴ　ＴＴＴ　ＧＴＡ　ＣＡＴ　ＧＧＴ　ＡＧＣ　ＣＴＧ　ＣＡＡ　ＴＴＣ　ＡＴＣ　ＴＧＧ　ＧＡＴ　ＣＡＡ　ＧＡＴ　Ｃ；配列番号４０２）を用いてＫ９ＳＢ２から誘導した。突然変異生成反応物は、２．５μｌ　Ｋ９ＳＢ２（５０ｎｇ／μｌ）、１μｌの各プライマー（１５０ｎｇ／ｕｌ）、５μｌの１０×反応緩衝液、１μｌのｄＮＴＰ混合物、１μｌのＰｆｕＵｌｔｒａ　ＨＦ　ＤＮＡポリメラーゼ、及び３８．５μｌのｄｄH_2Oを含んだ。加熱／冷却サイクルについて、５５℃で３０秒間のステップは１分間に増やした。大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）形質転換体の液体培養物は、３３℃ではなく３７℃でインキュベートした。

【０５０４】
変異体Ｋ９ＳＢ２－Ｋ９０Ｍは、プライマーｏＫ９０Ｍ１（ＣＴＴＧＡＴＣＣＣＡＧＡＴＧＡＡＡＴＧＣＡＧＧＣＴＡＣＣＡＴＧＴＡＣＡＡＡＡＡＣ；配列番号４０３）及びｏＫ９０Ｍ１ｒ（ＧＴＴ　ＴＴＴ　ＧＴＡ　ＣＡＴ　ＧＧＴ　ＡＧＣ　ＣＴＧ　ＣＡＴ　ＴＴＣ　ＡＴＣ　ＴＧＧ　ＧＡＴ　ＣＡＡ　Ｇ；配列番号４０４）を用いてＫ９ＳＢ２から誘導した。突然変異生成反応物は、２．５μｌ　Ｋ９ＳＢ２（５０ｎｇ／μｌ）、１μｌの各プライマー（１５０ｎｇ／ｕｌ）、５μｌの１０×反応緩衝液、１μｌのｄＮＴＰ混合物、１μｌのＰｆｕＵｌｔｒａ　ＨＦ　ＤＮＡポリメラーゼ、及び３８．５μｌのｄｄH_2Oを含んだ。加熱／冷却サイクルについて、５５℃で３０秒間のステップは１分間に増やした。大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）形質転換体の液体培養物は、３３℃ではなく３７℃でインキュベートした。

【０５０５】
【表２６】

表 22. K9G9 変異体のアミノ酸置換及び組み合わせ

変異体	アミノ酸配列番号	核酸配列番号	アミノ酸置換
K9JB4	417	418	S56A, K57E, S58E
K9JB4P	419	420	S56A, K57E, S58E, N87P
K9JG3	421	422	Y53F, S56A, S58E, E74G
K9JG3P	423	424	Y53F, S56A, S58E, E74G, N87P
K9JA1	425	426	Y53F, S56A, K57E, S58E, E74G, N87P
K9SB2	427	428	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P
K9SB2-K90L	429	430	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, K90L
K9SB2-K90M	431	432	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, K90M

【０５０６】
実施例１８
K_M　ＮＡＤＨに対するK_M　ＮＡＤＰＨの比が増加した精製Ｋ９Ｇ９誘導体の動態特性決定

Ｋ９Ｇ９及び変異体を、米国特許第８，１２９，１６２号明細書に記載されるとおり、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）株Ｂｗ２５１１３（ΔｉｌｖＣ）において過剰発現させて精製することにより、補因子親和性及び最大速度のより正確な測定を達成した。

【０５０７】
発現及び特性決定のため、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）プラスミド（ｐＢＡＤ．ＫＡＲＩ）を用いることにより、ＢｉｏＲａｄ　Ｇｅｎｅ　Ｐｕｌｓｅｒ　ＩＩ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ　Ｉｎｃ．，Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，ＣＡ）を使用して米国特許第８，１２９，１６２号明細書に記載されるとおり大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）のエレクトロコンピテント株Ｂｗ２５１１３（ΔｉｌｖＣ）を形質転換した。形質転換したクローンを、

ＬＢ培地及び１００μｇ／ｍｌアンピシリンを含有する寒天プレート（番号１０１３２０－１５４、Ｔｅｋｎｏｖａ Ｉｎｃ．Ｈｏｌｌｉｓｔｅｒ，ＣＡ）に広げ、３７℃で一晩インキュベートした。各株について単一の形質転換体を、１００μｇ／ｍｌアンピシリンを含むＬＢプレートにストリークして広げた。これらのプレートの各々の単一コロニーを使用して、１００μｇ／ｍｌアンピシリンを含む１０ｍＬ ＬＢブロスを接種した。これらの培養物を、ベント付きフィルタ付きの蓋を有する１２５ｍＬバッフル付きフラスコにおいて、振盪しながら３７℃で８時間成長させた。２００μＬのこの培養物を使用して、１００μｇ／ｍｌアンピシリン及び０．２％（ｗ／ｖ）アラビノースを含むＬＢブロスが入った、フィルタ付きベント付きの蓋を有する５００ｍＬバッフル付きフラスコ２つを接種した。発現培養物を、振盪しながら３７℃で１６～１８時間成長させた。細胞を遠心により４０ｍＬアリコートに収集した；上清を廃棄し、精製まで細胞ペレットを－８０℃で凍結した。

【０５０８】

Ｋ９Ｇ９及び全ての変異体を、同じプロセスを用いて精製した。各々４０ｍＬの細胞培養物アリコートに相当する２つの細胞ペレットを、４ｍＬ Ｂｕｇ Ｂｕｓｔｅｒ Ｍａｓｔｅｒ Ｍｉｘ（Ｎｏｖａｇｅｎ ７１４５６，Ｄａｒｍｓｔａｄｔ，独国）に再懸濁し、室温で１５分間、続いて６０℃で１５分間インキュベートした。変性タンパク質及び細胞残屑を、３０分間及び４℃、７，０００ｒｐｍで遠心することによりペレット化した。上清をデカントし、溜めて、Ａｃｒｏｄｉｓｃ ０．２μｍシリンジフィルタ（ＰＮ４１９２、Ｐａｌｌ，Ａｎｎ Ａｒｂｏｒ，ＭＩ）でろ過した。ろ過して熱処理した無細胞抽出物から、ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ ＨｉＬｏａｄ ２６／６０ Ｓｕｐｅｒｄｅｘ ２００ゲルろ過カラム（１７－１０７１－０１、Ｂｕｃｋｉｎｇｈａｍｓｈｉｒｅ，英国）を使用してＫ９Ｇ９を精製した。カラムは、タンパク質を負荷する前に、流量２．０ｍＬ／分の５０ｍＭ ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．５） ５ｍＭ $MgCl_2$緩衝液により０．２ＣＶの平衡で予め平衡化させた。Ｋ９Ｇ９及び変異体を、流量２．０ｍＬ／分の５０ｍＭ ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．５） ５ｍＭ $MgCl_2$緩衝液による１．５ＣＶの均一濃度ステップで溶出した。Ｆｒａｃ－９５０フラクションコレクター（Ｂｕｃｋｉｎｇｈａｍｓｈｉｒｅ，英国）をサーペンタインパターンで使用して、容積２．５ｍＬの画分を回収した。Ｋ９Ｇ９及び変異体は全て、画分Ｄ５～Ｅ５又はＤ６～Ｅ４の間に溶出した。１５ｍＬ Ａｍｉｃｏｎ Ｕｌｔｒａ ＹＭ－３０スピンフィルタ（ＵＦＣ９０３００８、Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ，Ｂｉｌｌｅｒｃｉａ，ＭＡ）を使用して画分をプールし、１０ｍＬ １００ｍＭ ＨＥＰＥＳ（ｐＨ６．８）及び１０ｍＭ $MgCl_2$緩衝液で洗浄した。ろ液を廃棄し、精製したタンパク質を、１００ｍＭ ＨＥＰＥＳ（ｐＨ６．８）及び１０ｍＭ $MgCl_2$を含有する１ｍＬ緩衝液を使用して膜から溶出した。

【０５０９】

ＮＡＤＨ及びＮＡＤＰＨに対するV_{max}値及びK_M値を決定するため、精製したタンパク質を、ＮＡＤ（Ｐ）Ｈ再生系と組み合わせた様々な濃度のＮＡＤ（Ｐ）Ｈ（０～１０００μＭ）でアッセイした。アッセイは、１００ｍＭ ＭＯＰＳ、ｐＨ６．８、１０ｍＭ ＭｇＣｌ２、１ｍＭ ＥＤＴＡ、５ｍＭ（Ｒ／Ｓ）－アセトラクテート、１ｍＭ グルコース－６－ホスフェート、３ｍＵ／μＬ グルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼを含有する緩衝液中３０℃で行った。１０分後に３容積の０．１％ギ酸で反応をクエンチした。ＬＣ－ＭＳを用いてＤＨＩＶ濃度を計測した。生成されたＤＨＩＶの量を一定の時点で計測することにより、Ｓ－アセトラクテートからＤＨＩＶへの変換速度を決定した。補因子濃度に対する比活性（Ｕ／ｍｇ）をプロットすることによりV_{max}値及びK_m値を計算し、データをミカエリス・メンテン式にフィットさせた。アセトラクテートＫｍ値（一定濃度のＮＡＤＨにおける）の計測から、補因子Ｋｍ測定に用いた一定のアセトラクテート濃度が飽和していたことが示された。

【０５１０】

【表２７】

表 23. DHIV 形成アッセイにより決定するときの、精製 K9G9 変異体の動態値

変異体	V_{max} NADPH, U/mg	K_m NADPH, μM	V_{max}/K_m NADPH, L/min*mg	V_{max} NADH, U/mg	K_m NADH, μM	V_{max}/K_m NADH, L/min*mg
K9G9	2.2	24.1	0.091	1.9	78.2	0.024
K9JB4	2.7	249	0.011	3.4	115	0.030
K9JB4P	2	83.2	0.024	2.9	34.1	0.085
K9G3	3.1	113	0.027	2.8	106	0.026
K9G3P	1.8	33.6	0.054	2.1	18.1	0.116
K9JA1	2.6	63.4	0.041	3.4	14	0.243
K9SB2	1.7	44.8	0.038	1.8	11.6	0.155
K9SB2-K90L	2.1	173	0.012	2.4	28.6	0.084
K9SB2-K90M	1.8	245	0.007	2.2	41.3	0.053

【０５１１】

実施例１９

K_m ＮＡＤＨに対するK_m ＮＡＤＰＨの比が増加したＫ９Ｇ９誘導体のイソブタノール生成

大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ベクター（ｐＢＡＤ．ＫＡＲＩ）由来の変異ＫＡＲＩ遺伝子をｐＨＲ８１－ＰＩｌｖ５－ＫＡＲＩ－Ｋ９．Ｇ９のＰｍｅＩ及びＳｆｉＩ部位にサブクローニングすることにより、Ｋ９ＪＢ４、Ｋ９ＪＢ４Ｐ、Ｋ９ＪＧ３、Ｋ９ＪＧ３Ｐ、Ｋ９ＪＡ１、及びＫ９ＳＢ２の酵母発現プラスミドを作製した。得られたプラスミドを、ｐＨＲ８１－ＰＩｌｖ５－ＫＡＲＩ－Ｋ９．Ｇ９及びｐＨＲ８１－ＰＩｌｖ５－ＫＡＲＩ－Ｋ９．Ｄ３（配列番号１８１）と共に、酵母におけるイソブタノール生成及び副生成物形成について分析した。酵母経路株を、経路プラスミド＃１としてのＫＡＲＩベクター、及び経路プラスミド＃２としてのｐＢＰ９１５（ｐＲＳ４２３－P_{FBA1}－ＤＨＡＤ－P_{GPM1}－ｈＡＤＨ１；配列番号１８２）の同時形質転換により、ＰＮＹ２２５９（ＭＡＴａ ｕｒａ３Δ::ｌｏｘＰ ｈｉｓ３Δ ｐｄｃ６Δ ｐｄｃ１Δ::Ｐ［ＰＤＣ１］－ＤＨＡＤ｜ｉｌｖＤ＿Ｓｍ－ＰＤＣ１ｔ－Ｐ［ＦＢＡ１］－ＡＬＳ｜ａｌｓＳ＿Ｂｓ－ＣＹＣ１ｔ ｐｄｃ５Δ::Ｐ［ＰＤＣ５］－ＡＤＨ｜ｓａｄＢ＿Ａｘ－ＰＤＣ５ｔ ｇｐｄ２Δ::ｌｏｘＰ ｆｒａ２Δ::Ｐ［ＰＤＣ１］－ＡＤＨ｜ａｄｈ＿Ｈｌ－ＡＤＨ１ｔ ａｄｈ１Δ::ＵＡＳ（ＰＧＫ１）Ｐ［ＦＢＡ１］－ｋｉｖＤ＿Ｌｇ（ｙ）－ＡＤＨ１ｔ ｙｐｒｃΔ１５Δ::Ｐ［ＰＤＣ５］－ＡＤＨ｜ａｄｈ＿Ｈｌ－ＡＤＨ１ｔ ｙｍｒ２２６ｃΔ ａｌｄ６Δ::ｌｏｘＰ；実施例２２）宿主に作製した。形質転換細胞は、ヒスチジン又はウラシル不含合成培地（炭素源として１％エタノール）に播いた。３つの形質転換体を、同じ培地の新鮮なプレートに移した。形質転換体を、血清バイアルにおける嫌気性条件下でのイソブタノール生成について試験した。

【０５１２】

３～５日後に、ＳＥ－Ｕｒａ－Ｈｉｓプレート上の形質転換からの酵母コロニーが出現した。各変異体の３つのコロニーを新鮮なＳＥ－Ｕｒａ－Ｈｉｓプレートにパッチし、３０℃で３日間インキュベートした。

【０５１３】

成長培地及び手順

酵母株の成長手順の間、２種類の培地を使用した：好気性前培養培地及び嫌気性培養培地。全ての化学物質は、特に注記されない限り、Ｓｉｇｍａ（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）から入手した。

好気性前培養培地（ＳＥ－Ｕｒａ－Ｈｉｓ）：６．７ｇ／Ｌのアミノ酸不含酵母窒素原基礎培地（Ｄｉｆｃｏ，２９１９４０，Ｓｐａｒｋｓ，ＭＤ）、１．４ｇ／Ｌのヒスチジ

ン、ロイシン、トリプトファン及びウラシル不含酵母合成ドロップアウト培地添加剤、０．２％エタノール、０．２％グルコース、０．０１％ｗ／ｖロイシン及び０．００２％ｗ／ｖトリプトファン。

嫌気性培養培地（ＳＥＧ－Ｕｒａ－Ｈｉｓ）：５０ｍＭ ＭＥＳ（ｐＨ５．５、６．７ｇ／Ｌのアミノ酸不含酵母窒素原基礎培地（Ｄｉｆｃｏ，２９１９４０，Ｓｐａｒｋｓ，ＭＤ）、１．４ｇ／Ｌのヒスチジン、ロイシン、トリプトファン及びウラシル不含酵母合成ドロップアウト培地添加剤、０．１％エタノール、３％グルコース、０．０１％ロイシン、０．００２％トリプトファン、３０ｍｇ／Ｌニコチン酸、３０ｍｇ／Ｌチアミン及び１０ｍｇ／Ｌエルゴステロール、５０／５０ｖ／ｖのＴｗｅｅｎ／エタノール溶液中に構成。

【０５１４】

パッチした細胞を、０．２％グルコース及び０．２％エタノールを含む２５ｍＬのＳＥＧ－Ｕｒａ，Ｈｉｓ培地に接種し、振盪しながら３０℃で約４８時間、蓋を閉めて漸次酸素を制限する条件下で、約１．５～２の目標OD_{600}値に達するまで成長させた。OD_{600}値を記録した。細胞を遠心によってペレット化し、上清を廃棄した。細胞ペレットをＣｏｙ嫌気バッグ（Ｇｒａｓｓ Ｌａｋｅ，ＭＩ）に移し、そこでペレットを１．０ｍＬの嫌気性成長培地（ＳＥＧ－Ｕｒａ－Ｈｉｓ）に再懸濁した。再懸濁した細胞ペレットを使用して、５０ｍＬ血清ボトル（Ｗｈｅａｔｏｎ、２２３７４８、Ｍｉｌｌｖｉｌｌｅ，ＮＪ）中３０ｍＬのＳＥＧ－Ｕｒａ－Ｈｉｓ培地を、目標初期OD_{600}値の０．２となるように接種した。全ての嫌気性培地、血清バイアル、栓及びクリンプは嫌気バッグにおいて接種前の少なくとも２４時間にわたり脱気した。血清ボトルを封栓し、クリンプし、嫌気バッグから取り出して２４０ｒｐｍで振盪しながら３０℃で成長させた。嫌気性培養物を、少なくとも１．２の目標OD_{600}値で２４～７２時間成長させた。さらなる嫌気性成長ステップでは、前の嫌気性培養ステップからの細胞を接種材料として使用した。各変異体につき３つの形質転換体を評価した。

【０５１５】

Ｋ９Ｇ９ ＫＡＲＩ変異体を含む酵母株のＨＰＬＣ分析

嫌気性成長期間の終了時にＨＰＬＣ分析用及びOD_{600}値を得るための試料を採取した。ＨＰＬＣ分析は、Ｗａｔｅｒｓ ２６９５分離ユニット、２９９６フォトダイオードアレイ検出器、及び２４１４屈折率検出器（Ｗａｔｅｒｓ，Ｍｉｌｆｏｒｄ，ＭＡ）をＳｈｏｄｅｘ Ｓｕｇａｒ ＳＨ－Ｇプレカラム及びＳｈｏｄｅｘ Ｓｕｇａｒ ＳＨ１０１１分離カラム（Ｓｈｏｄｅｘ，ＪＭ Ｓｃｉｅｎｃｅ，Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）と共に使用して実施した。化合物を、流量０．５ｍＬ／分の０．０１Ｎ硫酸の均一濃度溶離により分離した。Ｗａｔｅｒｓ Ｅｍｐｏｗｅｒ Ｐｒｏソフトウェアを使用してクロマトグラムを分析した。

【０５１６】

グリセロール、イソブタノールのモル収率及びグリセロール／イソブタノール比を決定した。各変異体について、トリプリケートの分析から平均及び標準偏差を計算した。次にスチューデントｔ検定を用いて、Ｋ９Ｄ３対照値との値の差が統計的に有意であるかどうかを決定した。新しい変異体については、ＮＡＤＨに対するK_Mと比べたＮＡＤＰＨに対するK_M値の増加が、予想される結果の、低下したＮＡＤＰＨ利用である。以下の表及び図９に報告する結果から、K_M ＮＡＤＨに対するK_M ＮＡＤＰＨの比が増加した新しい変異体が、Ｋ９Ｄ３及びＫ９Ｇ９と比べてより高いイソブタノール対グリセロール比を示すことが示される。Ｋ９ＳＢ２は、Ｋ９Ｄ３と比較して、イソブタノール（ｉｓｏｕｂｔａｎｏｌ）力価の３５％の増加を示した。

【０５１７】

【表２８】

表 24. K9G9 変異体の動態及びイソブタノールデータ

	変異体	K_m (NADPH)/ K_m (NADH)	イソブタノール/グリセロール比	イソブタノールモル収率	イソブタノール力価, mM
実験１	K9D3	0.24	1.67 ± 0.02	0.581 ± 0.007	33.9 ± 1.8
	K9JB4	2.2	2.10 ± 0.06	0.603 ± 0.006	35.3 ± 1.3
	K9JG3	1.1	2.07 ± 0.06	0.598 ± 0.004	39.1 ± 1.6
実験２	K9D3	0.24	1.75 ± 0.06	0.586 ± .0100	63.7 ± 0.6
	K9JA1	4.5	2.24 ± 0.04	0.611 ± 0.002	78.2 ± 5.4
	K9SB2	3.9	2.21 ± 0.10	0.608 ± 0.007	77.2 ± 1.4
実験３	K9G9	0.31	2.10 ± 0.03	0.624 ± 0.011	54.2 ± 1.5
	K9JG3P	1.9	2.56 ± 0.08	0.652 ± 0.009	66.3 ± 4.0
	K9JB4P	2.4	2.54 ± 0.07	0.654 ± 0.006	61.5 ± 3.4

【０５１８】

実施例２０

Ｋ９ＳＢ２エラープローンＰＣＲライブラリの構築

Ｋ９ＳＢ２エラープローンＰＣＲライブラリを、Ｋ９Ｇ９ライブラリと同様の方法に以下の変更を加えて構築した。突然変異誘発ＰＣＲ混合物は、ｐＢＡＤ．ＫＡＲＩベクター（１９０ｎｇ／μｌ）における９．５μｌ　Ｋ９ＳＢ２、１．２５μｌのプライマーＫ９Ｇ９＿ＥＺ＿Ｆ１（１００ｎｇ／μｌ）、１．２５μｌのプライマーＫ９Ｇ９＿ＥＺ＿Ｒ１（１００ｎｇ／μｌ）、５μｌの１０×Ｍｕｔａｚｙｍｅ　ＩＩ反応緩衝液、１μｌの４０ｍＭ　ｄＮＴＰ混合物、１．５μｌのＭｕｔａｚｙｍｅ　ＩＩ　ＤＮＡポリメラーゼ、及び３０．５μｌのｄｄＨ２Ｏからなった。「ＥＺＣｌｏｎｅ反応」は、２５μｌの２×ＥＺＣｌｏｎｅ酵素混合物、３μｌのメガプライマー（Ｋ９ＳＢ２突然変異誘発ＰＣＲ産物、１９０ｎｇ／μｌ）、２．６μｌのＫ９ＳＢ２鋳型ＤＮＡ（１９ｎｇ／μｌ）、３μｌのＥＺＣｌｏｎｅ溶液１、及び１６μｌのｄｄH_2Oを含んだ。Ｄｐｎ　Ｉステップは、混合物を３７℃で３時間インキュベートした。クローンを、実施例２１に記載されるとおりのハイスループットスクリーニングに用いた。

【０５１９】

実施例２１

ＮＡＤＨ対ＮＡＤＰＨ活性比の増加に基づくＫｍ　ＮＡＤＰＨに対するＫｍ　ＮＡＤＰＨの比がさらに増加したＫ９ＳＢ２変異体のスクリーニング

実施例２０に記載されるＫ９ＳＢ２ライブラリを、ＮＡＤＰＨ親和性が低下した変異体についてスクリーニングした。ＮＡＤＨに対するＫｍと比べたＮＡＤＰＨに対するＫｍを増加させることを具体的な目的として、スクリーニングのヒットを部分的に精製して動態解析を実施し、ＮＡＤＨでの、及びＮＡＤＰＨでの、V_{max}及びK_mパラメータを決定した。

【０５２０】

Ｋ９ＳＢ２遺伝子ライブラリのハイスループットスクリーニングアッセイ

以下を除いて実施例１６に記載されるとおり、ＨＴＳを用いて変異体をスクリーニングした。アッセイ緩衝液は、２．４ｍＭ（Ｒ／Ｓ）－アセトラクテート、１００ｍＭ　ＨＥＰＥＳ　ｐＨ６．８、１０ｍＭ　$MgCl_2$、１５０μＭ　ＮＡＤＨ又は１００μＭ　ＮＡＤＰＨ及び１２．５μＬ　０．５×細胞溶解物からなった。

【０５２１】

各変異体及び陽性対照ウェル（２個／プレート）について、１５０μＭ　ＮＡＤＨの酸化速度計測値に対する１００μＭ　ＮＡＤＰＨの酸化速度計測値の比を計算した。変異体ウェルは、ＮＡＤＨ速度が０．６ＯＤ／時間より高く、且つ速度比（ＮＡＤＰＨ／ＮＡＤ

Ｈ）が０．３７未満であった（陽性対照平均より３標準偏差低い）場合に、初期ヒットを含むと考えた。４９４７個の潜在的変異体のプールから合計２１８ヒットが同定された。これらの初期ヒットを統合し、さらなる分析用により小さいライブラリを形成した。

【０５２２】

統合した初期ヒットライブラリを生物学的トリプリケートで成長させて、上記に記載したとおり無細胞抽出物を調製してアッセイした。次に、上記のとおり変異体及び陽性対照の速度比を計算した。詳細な動態解析用に選択された最終的なヒットは、以下の基準を満たした：ＮＡＤＰＨ／ＮＡＤＨ速度比が０．４５未満であり、ＮＡＤＨ速度が０．６ＯＤ／時間より高く、且つ３つの生物学的レプリケートのうち少なくとも２つがこれらの基準に合格。１０７個の変異体が同定された。

【０５２３】

また、データを分析して、ＮＡＤＨ補因子によるＳ－アセトラクテートからＤＨＩＶへの変換速度がより高い変異体も同定した。全ての陽性対照についてＮＡＤＨ酸化の平均速度及び標準偏差を計算した。変異体は、ＮＡＤＨ酸化が陽性対照の速度（２．５２４ＯＤ／時間）より少なくとも３標準偏差高かった場合に、潜在的ヒットと見なした。６８個の変異体が同定され、配列分析により、１７個が少なくとも１つのアミノ酸置換を有することが決定された。置換Ｔ９３Ａ及びＴ９３Ｉは各々２回出現し、変異体２０１７　Ｂ１２及びＤ６をさらなる分析用に選択している。

【０５２４】

二次ＨＴＳスクリーニングから同定された１０７個の変異体ＤＮＡ配列決定を、ＴｅｍｐｌｉＰｈｉ（商標）（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用することにより、プライマーｐＢＡＤ－Ｆｏｒ（ＡＴＧＣＣＡＴＡＧＣＡＴＴＴＴＴＡＴＣＣ；配列番号３９３）及びｐＢＡＤ－Ｒｅｖ（ＣＴＧＡＴＴＴＡＡＴＣＴＧＴＡＴＣＡＧＧＣＴ；配列番号３９４）で達成した。１０５個の配列が親と異なった。アミノ酸置換を、以下の２つの表のうち最初の表に掲載する。

【０５２５】

ＮＡＤＨ速度スクリーニングから同定された６８個の変異体のＤＮＡ配列決定を、ＴｅｍｐｌｉＰｈｉ（商標）（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用することにより、プライマーｐＢＡＤ－Ｆｏｒ（ＡＴＧＣＣＡＴＡＧＣＡＴＴＴＴＴＡＴＣＣ；配列番号３９３）及びｐＢＡＤ－Ｒｅｖ（ＣＴＧＡＴＴＴＡＡＴＣＴＧＴＡＴＣＡＧＧＣＴ；配列番号３９４）で達成した。１７個の配列が野生型と異なった。繰り返し出現した２つの置換のアミノ酸置換を、以下の２番目の表に掲載する。

【０５２６】

【表２９】

表 25. K9SB2 変異体のアミノ酸置換

変異体	配列	アミノ酸置換
K9SB2	427	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P
2011 A2	433	Y53F, G55D, S56A, K57E, S58E, N87P
2011 A3	434	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, M94I
2011 A5	435	Y53F, S56A, K57E, S58E, M83I, N87P, L185M, E217D
2011 A7	436	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, D98V
2011 A9	437	Y53F, S56A, K57E, S58E, F67I, N87P
2011 A11	438	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, M94T, K126E, T273A
2011 B1	439	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, M94I, A279T
2011 B2	440	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, Q91L
2011 B3	441	Y53L, S56A, K57E, S58E, N87P
2011 B4	442	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, P135T
2011 B7	443	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, L185M
2011 B8	444	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, C233S, F296Y
2011 B10	445	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, A303D
2011 C1	446	Y53F, S56A, K57E, S58E, E63K, N87P, G251D, K294R
2011 C3	448	Y53F, S56A, K57E, S58E, A72V, N87P, N102Y, F189I, Y245H
2011 C6	449	Y53F, S56A, K57E, S58E, I84F, N87P
2011 C7	450	E13V, Y53F, S56A, K57E, S58E, M94I, N87P, T141I
2011 C8	451	Y53F, S56A, K57E, S58E, A72V, N87P, N102Y, F189I, Y245H
2011 C9	447	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, E194D
2011 C10	452	Y53F, A56G, K57E, S58E, K60N, N87P
2011 C12	453	Y53F, S56A, K57E, S58E, I84L, N87P, N97T
2011 D1	454	L39M, Y53F, S56A, K57E, S58E, E68G, N87P
2011 D2	455	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, M94I, V307I
2011 D3	456	Y53F, S56A, K57E, S58E, F67I, N87P
2011 D4	457	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, P135L, A202V
2011 D5	458	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, G164S, G199A
2011 D6	500	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, S247C
2011 D8	459	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, N116I
2011 D9	460	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, K90M
2011 D11	461	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, M94L, T259I
2011 D12	462	Y53F, S56A, K57E, S58E, M83K, N87P

【０５２７】

【表３０】

2011 E3	463	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, I122V, L297W
2011 E4	464	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, A112S, Q160R
2011 E8	465	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, V142I, P320L
2011 E11	466	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, Q91L
2011 F2	467	Y53F, S56V, K57E, S58E, N87P, A210T
2011 F4	468	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, F189I
2011 F6	469	Y53F, S56G, K57E, S58E, K60N, N87P
2011 F9	470	A41V, Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, S305P
2011 F10	471	Y53F, S56A, K57E, S58E, L85M, N87P
2011 G1	472	E13V, Y53F, S56A, K57E, S58E, M94I, N87P, T141I
2011 G3	473	H35Q, Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P
2011 G4	474	Y53F, S56A, K57E, S58E, I84F, N87P
2011 G8	475	A26T, Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, K90M
2011 G9	476	Y53F, S56T, K57E, S58E, N87P
2011 G10	477	Y53F, S56A, K57E, S58E, I84F, N87P
2011 H1	478	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, M94I, V156L
2011 H5	479	Y53F, S56A, K57E, S58E, I84L, N87P
2011 H7	480	Y53F, S56T, K57E, S58E, N87P
2011 H9	481	Y53F, G55C, S56A, K57E, S58E, N87P
2012 A2	482	Y53F, S56A, K57E, S58E, R61G, I86V, N87P
2012 A7	483	Y53F, S56A, K57E, S58E, T71S, A76V, N87P
2012 A8	484	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, M212T
2012 A9	485	H35Q, Y53F, S56A, K57E, S58E, A72T, N87P
2012 A10	486	A36T, Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P
2012 A11	487	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, S247T
2012 B3	488	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, P135S
2012 B4	489	Y53F, S56A, K57E, S58E, W59R, N87P, K278E
2012 B5	490	Y53F, S56V, K57E, S58E, N87P, I234V
2012 B6	491	Y30H, Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P
2012 B9	492	I50M, Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P
2012 C2	493	Y53L, S56A, K57E, S58E, N87P
2012 C3	494	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, F115V, T191S, V208I, C209W, F292I
2012 C5	495	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, M94I
2012 C6	496	Y53F, S56A, K57E, S58E, F67L, N87P
2012 C8	497	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, M94I, M169T
2012 C10	498	Y53F, S56A, K57E, S58E, F67I, N87P, T276I
2012 D1	499	Y53F, S56A, K57E, S58E, I84F, N87P, M132T
2012 D8	501	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, P135S
2012 D11	502	K8N, Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, K90M, T141I
2012 E5	503	Y53F, S56A, K57E, S58E, I84L, N87P
2012 E9	504	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, V142I, T191S, C233S
2012 F1	505	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, H235Y
2012 F2	506	Y53F, S56V, K57E, S58E, N87P, V232D
2012 F3	507	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, K90M, V142I, T187S
2012 F4	508	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, M94I, G149D
2012 F7	509	E13V, Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, M94I, T141I
2012 F10	510	Y53F, S56A, K57E, S58E, Q65H, N87P, F189I

【０５２８】

【表３１】

2012 F12	511	Y53F, S56V, K57E, S58E, N87P
2012 G3	512	Y53F, S56T, K57E, S58E, N87P, R190S
2012 G4	513	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, N102S, V142I
2012 G5	514	Y53F, S56A, K57E, S58E, I84L, N87P
2012 G8	515	Y53F, S56A, K57E, S58E, K77N, N87P, A92V
2012 G9	516	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, M94I, V307I
2012 G10	517	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, T195I
2012 G12	518	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, F309I
2012 H1	519	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, K90T, A180S
2012 H3	520	Y53F, S56A, K57E, S58E, W59C, N87P
2012 H7	521	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, M94I, A202T
2012 H9	522	H35N, Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P
2012 H11	523	Y53F, S56A, K57E, S58E, A72V, N87P, L211M, I240M
2013 A2	524	Y53F, S56T, K57E, S58E, N87P, Q288H
2013 A4	525	Y53F, S56A, K57E, S58E, L85M, N87P
2013 A5	526	L52S, Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P
2013 B2	527	A36T, Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, V203I
2013 B5	528	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, P135T
2013 B7	529	I9M, Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, K90E
2013 B8	530	Y53F, G55C, S56A, K57E, S58E, N87P
2013 B9	531	Y53F, S56V, K57E, S58E, N87P
2013 B11	532	A38V, Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P
2013 C1	533	Y53L, S56A, K57E, S58E, N87P, M237I
2013 C6	534	K23M, Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, E194D
2013 C8	535	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, P135T
2013 C12	536	Y53F, S56A, K57E, S58E, A72V, N87P, T93S, A176V, H235Y
2013 D1	537	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, M94R, K310M

【０５２９】

【表３２】

表 26. K9SB2 変異体のアミノ酸置換

変異体	アミノ酸配列番号; 核酸配列番号	アミノ酸置換
K9SB2	427	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P
2017 B12	639; 640	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, T93I
2017 D6	641; 642	Y53F, S56A, K57E, S58E, N87P, T93A

【０５３０】

部分的に精製したＫ９ＳＢ２変異体タンパク質の動態解析

米国特許第８，１２９，１６２号明細書に記載されるとおりの、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）株Ｂｗ２５１１３（ΔｉｌｖＣ）を使用して、二次ＨＴＳスクリーニングからの１０７個の変異体及び陽性対照Ｋ９ＳＢ２を発現させた。アーカイブプレートからのクローンを９６ディープウェルプレートに接種した。各ウェルは、解凍したアーカイブプレートからの細胞３．０μｌ、１００μｇ／ｍｌアンピシリン及び誘導物質として０．０２％（ｗ／ｖ）アラビノースを含有するＬＢ培地２００μｌを含んだ。細胞を、振盪（９００ｒｐｍ）しながら８０％湿度３７℃で一晩成長させ、遠心（４０００ｒｐｍ、４℃で７分）（７５００４２５１、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ）によ

り回収し、後の分析のため細胞ペレットを－８０℃で保存した。

【０５３１】

ディープウェルプレートの凍結細胞ペレットを、同時に室温で３０分間解凍した。７５μｌの５０％ＢｕｇＢｕｓｔｅｒ（Ｎｏｖａｇｅｎ　７１４５６，Ｄａｒｍｓｔａｄｔ，独国）（ｖ／ｖ水中）を各々に添加し、プレートシェーカーを用いて細胞を懸濁した。５０％　Ｂｕｇ　Ｂｕｓｔｅｒ中の細胞懸濁液を室温で３０分間インキュベートした後、次に６０℃で１５分間インキュベートした。細胞残屑及び変性した易熱性タンパク質を遠心（４０００ｒｐｍ、４℃で１５分）（７５００４２５１、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ）によりペレット化し、７５μＬの上清を平底９６ウェルプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ，３３７０，Ｃｏｒｎｉｎｇ，ＮＹ）に移し、７５μＬ　１００ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（ｐＨ６．８）、１００ｍＭ　ＫＣｌ、１０ｍＭ　$MgCl_2$で２倍希釈した。

【０５３２】

Ｃｏｏｍａｉｓｓｅ　Ｐｌｕｓ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、番号２３２３８、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ）によるブラッドフォードアッセイを用いることにより、総タンパク量を決定した。標準としてＢＳＡを用いた。Ｃａｒｙ　３００分光光度計（Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｗｉｌｍｉｎｇｔｏｎ，ＤＥ）を使用して５９５ｎｍの吸光度を決定することにより、タンパク質の濃度を計測した。

【０５３３】

ＮＡＤＨ及びＮＡＤＰＨに対するV_{max}値及びK_M値を決定するため、部分的に精製したタンパク質を、様々な濃度のＮＡＤＨ（２０、３０、４０、６０、８０、１２０、２００及び３００μＭ）及びＮＡＤＰＨ（６０、８０、１２０、２００、３００及び４００μＭ）でアッセイした。アッセイは、１００ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（ｐＨ６．８）、１０ｍＭ　$MgCl_2$、１００ｍＭ　ＫＣｌ及び４．８ｍＭ　Ｒ／Ｓ－アセトラクテートにおいて３０℃で行った。アッセイには、０．００５～０．０１５ｍｇ／ｍＬの総タンパク量を添加した。Ｓｐｅｃｔｒａｍａｘ　３８４　Ｐｌｕｓプレートリーダー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ，Ｓｕｎｎｙｖａｌｅ，ＣＡ）を使用して３４０ｎｍでのＮＡＤ（Ｐ）Ｈの酸化をモニタすることにより、Ｓ－アセトラクテートから ＤＨＩＶへの変換速度を計測した。活性は、$6220 M^{-1}cm^{-1}$のモル吸光係数を使用して計算した。補因子濃度に対して比活性（Ｕ／ｍｇ）をプロットすることによりV_{max}値及びK_m値を計算し、Ｋａｌｅｉｄａｇｒａｐｈソフトウェア（Ｓｙｎｅｒｇｙ，Ｒｅａｄｉｎｇ，ＰＡ）を使用してデータをミカエリス・メンテン式にフィットさせた。

【０５３４】

【表３３】

表 27. NAD (P)H 消費アッセイによって決定するときの、部分的に精製した K9SB2 変異体の動態値

変異体	V_{max} NADPH, U/mg	K_m NADPH, μM	V_{max}/K_m NADPH, L/min*mg	V_{max} NADH, U/mg	K_m NADH, μM	V_{max}/K_m NADH, L/min*mg
K9SB2	1.79	153	0.012	2.10	87.4	0.024
2011 A2	1.48	897	0.002	1.94	71.2	0.027
2011 A3	1.43	371	0.004	1.33	44.1	0.030
2011 A5	0.93	109	0.009	0.23	17.4	0.017
2011 A7	2.27	334	0.007	1.70	69.2	0.025
2011 A9	2.09	266	0.008	0.40	n/d	n/a
2011 A11	2.21	294	0.008	1.25	25.8	0.048
2011 B1	1.79	421	0.004	64.5	55171	0.001
2011 B2	0.33	254	0.001	0.02	264	0.007
2011 B3	1.87	505	0.004	0.68	225	0.003
2011 B4	0.36	294	0.001	0.26	171	0.002
2011 B7	n/d	1.03	n/a	0.48	25.5	0.019
2011 B8	0.83	109.5	0.008	0.61	28.7	0.021
2011 B10	0.88	171	0.005	0.46	7.53	0.061
2011 C1	1.06	404	0.003	1.51	191	0.008
2011 C3	1.08	844	0.001	2.53	500	0.005
2011 C6	1.19	388	0.003	1.90	189	0.010
2011 C7	0.71	946	0.001	1.95	457	0.004
2011 C8	1.73	1546	0.001	3.73	750	0.005
2011 C9	1.02	123	0.008	2.29	177	0.013
2011 C10	1.02	656	0.002	3.84	899	0.004
2011 C12	2.74	244	0.011	3.08	99	0.031
2011 D1	4.68	501	0.009	3.54	80.4	0.044
2011 D2	2.34	547	0.004	2.18	77.3	0.028
2011 D3	0.05	306	0.0002	0.05	44.3	0.001
2011 D4	0.47	857	0.001	0.44	91.6	0.005
2011 D5	0.75	550	0.001	0.42	57.1	0.007
2011 D6	0.70	200	0.004	0.52	25.11	0.021
2011 D8	0.04	214	0.0002	0.04	38.9	0.001
2011 D9	0.18	407	0.0004	0.16	50.2	0.003
2011 D11	0.78	185	0.004	0.61	15.0	0.041
2011 D12	0.74	190	0.004	0.80	39.0	0.021
2011 E3	0.77	163	0.005	1.54	128	0.012
2011 E4	1.59	270	0.006	3.78	234	0.016
2011 E8	0.91	435	0.002	2.16	252	0.009
2011 E11	5.56	6466	0.001	3.06	511	0.006
2011 F2	0.39	692	0.001	1.79	136	0.013
2011 F4	2.07	242	0.009	2.00	68.3	0.029

【０５３５】

【表３４】

2011 F6	1.19	946	0.001	1.35	231	0.006
2011 F9	0.57	269	0.002	0.45	27.1	0.017
2011 F10	1.43	390	0.004	1.55	79.8	0.019
2011 G1	1.31	1533	0.001	0.50	40.1	0.013
2011 G3	0.61	1003	0.001	1.00	283	0.004
2011 G4	1.00	316	0.003	2.13	174	0.012
2011 G8	0.90	482	0.002	1.22	106	0.012
2011 G9	0.30	530	0.001	3.48	549	0.006
2011 G10	0.93	358	0.003	2.13	238	0.009
2011 H1	0.96	218	0.004	1.57	114	0.014
2011 H5	1.17	81.2	0.014	1.85	86.5	0.022
2011 H7	0.20	435	0.001	1.25	173	0.007
2011 H9	1.30	741	0.002	1.55	177	0.009
2012 A2	1.71	264	0.007	1.58	55.4	0.029
2012 A7	1.98	215	0.009	1.87	67.3	0.028
2012 A8	1.19	91.8	0.013	1.24	22.7	0.055
2012 A9	0.44	481	0.001	0.34	38.1	0.009
2012 A10	1.21	340	0.004	1.31	66.7	0.020
2012 A11	1.99	342	0.006	1.37	35.9	0.038
2012 B3	0.88	1214	0.001	0.42	63.8	0.007
2012 B4	4.34	1593	0.003	1.66	95.1	0.018
2012 B5	4.88	7389	0.001	1.19	85.2	0.014
2012 B6	3.72	428	0.009	2.23	51.3	0.044
2012 B9	1.17	523	0.002	0.87	63.7	0.014
2012 C2	4.43	923	0.005	3.16	189	0.017
2012 C3	1.40	203	0.007	1.80	68.9	0.026
2012 C5	1.73	348	0.005	3.66	268	0.014
2012 C6	2.18	234	0.009	2.90	103	0.028
2012 C8	1.53	394	0.004	2.63	194	0.014
2012 C10	1.12	286	0.004	1.41	78.9	0.018
2012 D1	0.72	599	0.001	0.58	64.5	0.009
2012 D8	1.17	1528	0.001	0.47	73.6	0.006
2012 D11	0.43	334	0.001	0.52	27.7	0.019
2012 E5	2.13	257	0.008	4.77	313	0.015
2012 E9	1.07	1326	0.001	n/d	n/d	n/a
2012 F1	1.70	272	0.006	1.48	62.5	0.024
2012 F2	0.39	925	0.0004	0.79	97.8	0.008
2012 F3	1.40	2213	0.0006	0.94	142	0.007
2012 F4	2.70	719	0.004	1.50	72.9	0.021
2012 F7	0.86	840	0.001	0.77	117	0.007
2012 F10	1.92	170	0.011	1.75	27.4	0.064
2012 F12	0.90	1582	0.0006	1.75	117	0.015
2012 G3	1.47	1003	0.002	1.07	127	0.008
2012 G4	0.73	615	0.001	0.63	81.6	0.007
2012 G5	1.92	240	0.008	2.00	83.5	0.024
2012 G8	1.17	315	0.004	0.99	58.7	0.017
2012 G9	2.41	717	0.003	1.37	91.5	0.015

【０５３６】

【表３５】

2012 G10	1.06	400	0.003	0.71	39.8	0.018
2012 G12	1.58	147	0.011	2.00	70.0	0.029
2012 H1	1.49	195	0.008	1.74	68.9	0.025
2012 H3	14.98	7389	0.002	1.45	99.0	0.015
2012 H7	1.14	246	0.005	1.30	76.2	0.017
2012 H9	0.37	210	0.002	n/d	n/d	n/a
2012 H11	0.65	162	0.004	0.62	32.0	0.019
2013 A2	0.58	285	0.002	0.64	71.0	0.009
2013 A4	0.63	188	0.003	0.86	81.5	0.011
2013 A5	0.61	886	0.001	0.88	210	0.004
2013 B2	0.62	282	0.002	0.71	70.4	0.010
2013 B5	6.68	7389	0.001	0.083	150	0.006
2013 B7	1.22	433	0.003	1.12	79.0	0.014
2013 B8	0.42	90.7	0.005	1.27	191	0.007
2013 B9	5.31	13970	0.0004	1.38	217	0.006
2013 B11	0.48	212	0.002	0.60	63.2	0.010
2013 C1	0.49	149	0.003	0.68	64.8	0.0105
2013 C6	0.54	163	0.003	0.36	24.4	0.015
2013 C8	2.87	3752	0.001	0.70	188	0.004
2013 C12	0.75	495	0.002	0.79	115	0.007
2013 D1	1.31	1608	0.001	0.87	188	0.005

【０５３７】

実施例２２：

株ＰＮＹ２２５９の構築

本例の目的は、ＰＮＹ２２３８におけるａｄｈ１Δ遺伝子座のｋｉｖＤ＿Ｌｌ（ｙ）の染色体コピーをｋｉｖＤ＿Ｌｇ（ｙ）に置換するために用いられるコンストラクトの構築について記載することである。

【０５３８】

欠失／組込みは、標的領域の上流及び下流相同領域を含み、且つ形質転換体の選択用のＵＲＡ３遺伝子を含むＰＣＲ産物による相同組換えにより作成した。ＵＲＡ３遺伝子を相同組換えにより取り除き、スカーレスな欠失／組み込みを作成した。ｋｉｖＤ＿Ｌｇ（ｙ）を組み込むプラスミドは、ＵＡＳ（ＰＧＫ１）Ｐ［ＦＢＡ１］－ｋｉｖＤ＿Ｌｌ（ｙ）をサッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）のＡＤＨ１遺伝子座に組み込むように構築されたプラスミドから誘導した。ＵＡＳ（ＰＧＫ１）Ｐ［ＦＢＡ１］－ｋｉｖＤ＿Ｌｌ（ｙ）をＡＤＨ１遺伝子座に組み込むために用いるプラスミドの構築を以下に記載する。プラスミドはｐＵＣ１９－ＵＲＡ３ＭＣＳに構築した。

【０５３９】

ＡＤＨ１欠失／ＵＡＳ（ＰＧＫ１）Ｐ［ＦＢＡ１］－ｋｉｖＤ＿Ｌｌ（ｙ）組込みプラスミドの構築

サッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）での発現用にコドン最適化したラクトコッカス・ラクチス（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｌａｃｔｉｓ）由来のｋｉｖＤコード領域、ｋｉｖＤ＿Ｌｌ（ｙ）を、ｐＬＨ４６８（配列番号１３９）を鋳型として使用して、ＰｍｅＩ制限部位を含むプライマーｏＢＰ５６２（配列番号１９７）、及びＡＤＨ１断片Ｂの５’末端と相同性を有する５’テールを含むプライマーｏＢＰ５６３（配列番号１９８）で増幅した。ＡＤＨ１断片Ｂを、サッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）ＣＥＮ．ＰＫ１１３－７ＤゲノムＤＮＡから、ｋｉｖＤ＿Ｌｌ（ｙ）の３’末端と相同性を有する５’テールを含むプライマーｏＢＰ５６４（配列番号１９９）、及びＦｓｅＩ制限部位を含む

プライマーｏＢＰ５６５（配列番号２００）で増幅した。ＰＣＲ産物をＰＣＲ精製キット（Ｑｉａｇｅｎ；Ｖａｌｅｎｃｉａ，ＣＡ）で精製した。オーバーラップＰＣＲにより、ｋｉｖＤ＿Ｌｌ（ｙ）とＡＤＨ１断片Ｂ　ＰＣＲ産物とを混合し、且つプライマーｏＢＰ５６２（配列番号１９７）及びｏＢＰ５６５（配列番号２００）で増幅して、ｋｉｖＤ＿Ｌｌ（ｙ）－ＡＤＨ１断片Ｂを作成した。得られたＰＣＲ産物をＰｍｅＩ及びＦｓｅＩで消化し、適切な酵素で消化した後、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼによってｐＵＣ１９－ＵＲＡ３ＭＣＳの対応する部位にライゲートした。ＡＤＨ１断片Ａを、ゲノムＤＮＡから、ＳａｃＩ制限部位を含むプライマーｏＢＰ５０５（配列番号２０１）、及びＡｓｃＩ制限部位を含むプライマーｏＢＰ５０６（配列番号２０２）で増幅した。ＡＤＨ１断片Ａ　ＰＣＲ産物をＳａｃＩ及びＡｓｃＩで消化し、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼにより、ｋｉｖＤ＿Ｌｌ（ｙ）－ＡＤＨ１断片Ｂを含むプラスミドの対応する部位にライゲートした。ＡＤＨ１断片Ｃを、ゲノムＤＮＡから、ＰａｃＩ制限部位を含むプライマーｏＢＰ５０７（配列番号２０３）、及びＳａｌＩ制限部位を含むプライマーｏＢＰ５０８（配列番号２０４）で増幅した。ＡＤＨ１断片Ｃ　ＰＣＲ産物をＰａｃＩ及びＳａｌＩで消化し、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼにより、ＡＤＨ１断片Ａ－ｋｉｖＤ＿Ｌｌ（ｙ）－ＡＤＨ１断片Ｂを含むプラスミドの対応する部位にライゲートした。ハイブリッドプロモーターＵＡＳ（ＰＧＫ１）－P_{FBA1}（配列番号４０６）を、ベクターｐＲＳ３１６－ＵＡＳ（ＰＧＫ１）－P_{FBA1}－ＧＵＳから、ＡｓｃＩ制限部位を含むプライマーｏＢＰ６７４（配列番号２０５）、及びＰｍｅＩ制限部位を含むプライマーｏＢＰ６７５（配列番号２０６）で増幅した。ＵＡＳ（ＰＧＫ１）－P_{FBA1}　ＰＣＲ産物をＡｓｃＩ及びＰｍｅＩで消化し、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼにより、ｋｉｖＤ＿Ｌｌ（ｙ）－ＡＤＨ１断片ＡＢＣを含むプラスミドの対応する部位にライゲートして、ｐＢＰ１１８１を作成した。

【０５４０】

ｐＢＰ１７１６及びｐＢＰ１７１９の構築

ｋｉｖＤ＿Ｌｌ（ｙ）をＡＤＨ１欠失／ＵＡＳ（ＰＧＫ１）Ｐ［ＦＢＡ１］－ｋｉｖＤ＿Ｌｌ（ｙ）組込みプラスミドｐＢＰ１１８１から除去した。プラスミドをＰｍｅＩ及びＦｓｅＩで消化し、大きいＤＮＡ断片をアガロースゲルと、続いてゲル抽出キット（Ｑｉａｇｅｎ）で精製した。ＡＤＨ１断片Ｂを、ｐＢＰ１１８１から、ＰｍｅＩ制限部位を含むプライマーｏＢＰ８２１（配列番号４０７）、及びＦｓｅＩ制限部位を含むプライマーｏＢＰ４８４（配列番号４０８）で増幅した。ＡＤＨ１断片Ｂ　ＰＣＲ産物をＰｍｅＩ及びＦｓｅＩで消化し、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼにより、ゲル精製した大きいＤＮＡ断片の対応する部位にライゲートした。ｋｉｖＤ＿Ｌｌ（ｙ）の３’５００ｂｐに対応するＰＣＲ断片を、ＰＮＹ１５２８においてｋｉｖＤ＿Ｌｌ（ｙ）を標的化して欠失させるため、得られたベクターにクローニングした。この断片を、ｐＢＰ１１８１から、ＮｏｔＩ制限部位を含むプライマーｏＢＰ８２２（配列番号４０９）、及びＰａｃＩ制限部位を含むｏＢＰ８２３（配列番号４１０）で増幅した。断片をＮｏｔＩ及びＰａｃＩで消化し、適切な制限酵素で消化した後、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼにより、ｋｉｖＤ＿Ｌｌ（ｙ）欠失を有する上記のプラスミドにおけるＵＲＡ３の下流の対応する部位にライゲートした。得られたプラスミドをｐＢＰ１７１６と命名した。

【０５４１】

サッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）での発現用にコドン最適化したリステリア・グレイ（Ｌｉｓｔｅｒｉａ　ｇｒａｙｉ）由来のｋｉｖＤコード領域（配列番号４１１）、ｋｉｖＤ＿Ｌｇ（ｙ）を、ＤＮＡ２．０（Ｍｅｎｌｏ　Ｐａｒｋ，ＣＡ）により合成した。ｋｉｖＤ＿Ｌｇ（ｙ）は、ＰｍｅＩ制限部位を含むプライマーｏＢＰ８２８（配列番号４１２）、及びＰｍｅＩ制限部位を含むｏＢＰ８２９（配列番号４１３）で増幅した。得られたＰＣＲ産物をＰｍｅＩで消化し、適切な酵素で消化した後、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼにより、ｐＢＰ１７１６の対応する部位にライゲートした。クローニングした遺伝子の向きを、プライマーＦＢＡｐ－Ｆ（配列番号４１４）及びｏＢＰ８２９（配列番号４１３）によるＰＣＲによって確認した。正しい向きのｋｉｖＤ＿Ｌｇ（ｙ）を有する単離物をｐＢＰ１７１９と命名した。

【０５４２】
株ＰＮＹ２２５９の構築
ｋｉｖＤ＿Ｌｌ（ｙ）欠失／ｋｉｖＤ＿Ｌｇ（ｙ）組込みカセットを、ｐＢＰ１７１９からプライマーｏＢＰ５０５（配列番号２０１）及びｏＢＰ８２３（配列番号４１０）で増幅した。ＰＮＹ２２３８のコンピテント細胞を作製し、Ｆｒｏｚｅｎ－ＥＺ酵母形質転換ＩＩキット（Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ；Ｏｒａｎｇｅ，ＣＡ）を使用して、ＰＣＲ産物で形質転換した。形質転換混合物を、３０℃の１％エタノール添加ウラシル不含合成完全培地に播いた。形質転換体株を、プライマーＵＲＡ３－ｅｎｄ　Ｆ（配列番号２２２）及びＨＹ－５０（配列番号４１５）を使用するＰＣＲ（ＪｕｍｐＳｔａｒｔ（商標）ＲＥＤＴａｑ（著作権）ＲｅａｄｙＭｉｘ（商標））によりスクリーニングした。形質転換体をＹＰＥ（１％エタノール）で成長させて、１％ＥｔＯＨを補足した、且つ５－フルオロオロチン酸（０．１％）を含有する３０℃の合成完全培地に播き、ＵＲＡ３マーカーが欠損した単離物を選択した。ｋｉｖＤ＿Ｌｌ（ｙ）の欠失及びｋｉｖＤ＿Ｌｇ（ｙ）の組込みを、プライマーＨＹ－５０及びｏＢＰ８３４（配列番号４１６）によるＰＣＲによって確認した。ＰＮＹ２２３８におけるｋｉｖＤ＿Ｌｌ（ｙ）と同じ遺伝子座にｋｉｖＤ＿Ｌｇ（ｙ）を含み、且つ同じプロモーターから発現した一つの正しい単離物を、ＰＮＹ２２５９と命名した。
【０５４３】
実施例２３
ＮＡＤＨに対して補因子選択性を有する変異体を同定するための２つの部位飽和遺伝子ライブラリの構築
実施例４では、縮重コドンＮＮＫを有するプライマーを使用した（Ｎは４つのヌクレオチドＡ、Ｃ　Ｇ及びＴの全てを表し、一方、ＫはＧ及びＴを示す）。本例では、Ｋ９　ＫＡＲＩの５３位、５６位及び５８位に対するＡ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｖ、Ｗ、又はＹの個別のアミノ酸変化それぞれをコードするプライマーを含むプライマー混合物を用い、Ｓ、Ｔ、Ｋ、及びＲへの置換は、これらの位置に好ましくないため除外した。Ｋ９　ＫＡＲＩの３つのＮＡＤＰＨリン酸結合部位（５３位、５６位及び５８位）を標的化する飽和ライブラリのサイズは、４，０９６である（実施例４のようにＮＮＫ縮重コードプライマーを使用する３２×３２×３２、すなわち３２，７６８個の変異体と比較される）。
【０５４４】
一つのライブラリ構築方法は、５８位から開始した。初めに、同じ位置を標的とするプライマー全てを混合することにより、プライマー混合物を作製した（例えば、プライマー混合物Ｋ９＿５３ｆを、等モルの全１６個の、５３位を標的とするフォワードプライマー（以下の表に掲載する）を混合することにより作製した。同様に、Ｋ９＿５６ｆ及びＫ９＿５８ｆを調製した。共通のリバースプライマーは、Ｋ９＿１９１Ｇ＿１１２１０ｒ（配列番号１７４）：ＧＧＴＴＴＣＡＧＴＴＴＣＧＣＣＴＣＴＧＡＡＧＧＴＡＧＴＴＴＣ（この例ではＳＲと呼ばれる）である。初めに、５８位の突然変異をＰＣＲによってＡＳ６Ｆ１に導入した。突然変異生成手順は、実施例４に記載される手順と同様である。簡潔に言えば、Ｋ９＿５８ｆ及びＳＲをリン酸化した。次にリン酸化したプライマーを直接用いることにより、ＵＳＢ　Ｃｈａｎｇｅ＿Ｉｔキット（ＵＳＢ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｃｌｅｖｅｌａｎｄ，ＯＨ、番号７８４８０）を使用してＡＳ６Ｆ１に５８位の突然変異を導入した。Ｄｐｎ　Ｉで鋳型を除去した。クリーンアップしたＰＣＲ産物（Ｚｙｍｏ　ＤＮＡ　Ｃｌｅａｎ　＆　Ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｏｒ－５；Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｉｒｖｉｎｅ，ＣＡ、カタログ番号Ｄ４００３）をＫＯＢＷ－３ａ細胞に形質転換した。３７℃のインキュベーターにおいてＬＢ寒天プレート上で一晩成長させた後、全ての細胞を回収し、Ｑｉａｐｒｅｐ　Ｓｐｉｎミニプレップキット（Ｑｉａｇｅｎ　Ｉｎｃ．Ｖａｌｅｎｃｉａ，ＣＡ、カタログ番号２７１０６）を使用してＤＮＡを抽出した。
【０５４５】

次に抽出したＤＮＡを鋳型として用いることにより、５８位の突然変異生成と同じくＫ９＿５６ｆ及びＳＲを使用して５６位の突然変異を導入した。最後に５３位の突然変異を同様に導入した。３つ全ての位置（５３位、５６位及び５８位）の突然変異がＡＳ６Ｆ１に導入された後、この新しいライブラリを、実施例４に記載されるものと同じくスクリーニングした。一部の選択された突然変異体を以下の表に掲載する。

【０５４６】

他の方法は５３位から開始した。以下の表に掲載するプライマーを使用して、プライマー混合物Ｋ９＿５６ｒ及びＫ９＿５８ｒを同様に調製した）。共通のフォワードプライマーは、ｐＢＡＤ＿２６６ｆ：ＣＴＣＴＣＴＡＣＴＧＴＴＴＣＴＣＣＡＴＡＣＣＣＧ（配列番号６３４；この例ではＳＦと呼ばれる）である。初めに５３位の突然変異をＰＣＲによってＡＳ６Ｆ１に導入した。突然変異生成手順は、ＡＳ６Ｆ１を鋳型として使用し、且つＫ９＿５３ｆ及びＳＲを２つのＰＣＲプライマーとして使用する上記に記載されるものと同様である。得られた（５３位で）変異したＤＮＡを鋳型として使用し、Ｋ９＿５６ｒ及びＳＦを突然変異生成プライマーとして使用して、５６位に突然変異を導入した。最後に、Ｋ９＿５８ｒ及びＳＦを使用して、５８位における突然変異を同様に導入した。３つ全ての位置（５３位、５６位及び５８位）の突然変異がＡＳ６Ｆ１に導入された後、上記と同じくこの新しいライブラリをスクリーニングした。一部の選択された突然変異体を以下の表に掲載する。

【０５４７】

【表３６】

表 28. フォワード変異プライマー

K9-KARI の標的位置	プライマー		
53	K9_53F_031411f	GTTATCATCGGATTATTCGAAGGA	(配列番号 544)
	K9_53L_031411f	GTTATCATCGGATTATTGGAAGGA	(配列番号 545)
	K9_53Y_031411f	GTTATCATCGGATTATATGAAGGA	(配列番号 546)
	K9_53C_031411f	GTTATCATCGGATTATGTGAAGGA	(配列番号 547)
	K9_53W_031411f	GTTATCATCGGATTATGGGAAGGA	(配列番号 548)
	K9_53P_031411f	GTTATCATCGGATTACCAGAAGGA	(配列番号 549)
	K9_53H_031411f	GTTATCATCGGATTACATGAAGGA	(配列番号 550)
	K9_53Q_031411f	GTTATCATCGGATTACAAGAAGGA	(配列番号 551)
	K9_53I_031411f	GTTATCATCGGATTAATTGAAGGA	(配列番号 552)
	K9_53M_031411f	GTTATCATCGGATTAATGGAAGGA	(配列番号 553)
	K9_53N_031411f	GTTATCATCGGATTAAATGAAGGA	(配列番号 554)
	K9_53V_031411f	GTTATCATCGGATTAGTTGAAGGA	(配列番号 555)
	K9_53A_031411f	GTTATCATCGGATTAGCTGAAGGA	(配列番号 556)
	K9_53D_031411f	GTTATCATCGGATTAGATGAAGGA	(配列番号 557)
	K9_53E_031411f	GTTATCATCGGATTAGAAGAAGGA	(配列番号 558)
	K9_53G_031411f	GTTATCATCGGATTAGGTGAAGGA	(配列番号 559)
56	K9_56F_031411f	GGATTACCTGAAGGATTCAAA	(配列番号 560)
	K9_56L_031411f	GGATTACCTGAAGGATTGAAA	(配列番号 561)
	K9_56Y_031411f	GGATTACCTGAAGGATATAAA	(配列番号 562)
	K9_56C_031411f	GGATTACCTGAAGGATGTAAA	(配列番号 563)
	K9_56W_031411f	GGATTACCTGAAGGATGGAAA	(配列番号 564)
	K9_56P_031411f	GGATTACCTGAAGGACCAAAA	(配列番号 565)
	K9_56H_031411f	GGATTACCTGAAGGACATAAA	(配列番号 566)
	K9_56Q_031411f	GGATTACCTGAAGGACAAAAA	(配列番号 567)
	K9_56I_031411f	GGATTACCTGAAGGAATTAAA	(配列番号 568)
	K9_56M_031411f	GGATTACCTGAAGGAATGAAA	(配列番号 569)
	K9_56N_031411f	GGATTACCTGAAGGAAATAAA	(配列番号 570)
	K9_56V_031411f	GGATTACCTGAAGGAGTTAAA	(配列番号 571)
	K9_56A_031411f	GGATTACCTGAAGGAGCTAAA	(配列番号 572)
	K9_56D_031411f	GGATTACCTGAAGGAGATAAA	(配列番号 573)
	K9_56E_031411f	GGATTACCTGAAGGAGAAAAA	(配列番号 574)
	K9_56G_031411f	GGATTACCTGAAGGAGGTAAA	(配列番号 575)
58	K9_58F_051611f	GATTACCTGAAGGATTTAAATTCTGGAAGAGAGC	(配列番号 576)
	K9_58L_051611f	GATTACCTGAAGGATTTAAATTGTGGAAGAGAGC	(配列番号 577)
	K9_58Y_051611f	GATTACCTGAAGGATTTAAATATTGGAAGAGAGC	(配列番号 578)
	K9_58C_051611f	GATTACCTGAAGGATTTAAATGTTGGAAGAGAGC	(配列番号 579)
	K9_58W_051611f	GATTACCTGAAGGATTTAAATGGTGGAAGAGAGC	(配列番号 580)
	K9_58P_051611f	GATTACCTGAAGGATTTAAACCATGGAAGAGAGC	(配列番号 581)
	K9_58H_051611f	GATTACCTGAAGGATTTAAACATTGGAAGAGAGC	(配列番号 582)
	K9_58Q_051611f	GATTACCTGAAGGATTTAAACAATGGAAGAGAGC	(配列番号 583)
	K9_58I_051611f	GATTACCTGAAGGATTTAAAATTTGGAAGAGAGC	(配列番号 584)
	K9_58M_051611f	GATTACCTGAAGGATTTAAAATGTGGAAGAGAGC	(配列番号 585)
	K9_58N_051611f	GATTACCTGAAGGATTTAAAAATTGGAAGAGAGC	(配列番号 586)
	K9_58V_051611f	GATTACCTGAAGGATTTAAAGTTTGGAAGAGAGC	(配列番号 587)
	K9_58A_051611f	GATTACCTGAAGGATTTAAAGCTTGGAAGAGAGC	(配列番号 588)
	K9_58D_051611f	GATTACCTGAAGGATTTAAAGATTGGAAGAGAGC	(配列番号 589)
	K9_58E_051611f	GATTACCTGAAGGATTTAAAGAATGGAAGAGAGC	(配列番号 590)
	K9_58G_051611f	GATTACCTGAAGGATTTAAAGGTTGGAAGAGAGC	(配列番号 591)

【０５４８】

【表３７】

表 29. フォワード変異プライマー

K9-KARI の標的位置	プライマー		
56	K9_56F_071211r	GCTCTCTTCCATGGTTTGAATCCTTC	(配列番号 592)
	K9_56L_071211r	GCTCTCTTCCATGGTTTCAATCCTTC	(配列番号 593)
	K9_56Y_071211r	GCTCTCTTCCATGGTTTATATCCTTC	(配列番号 594)
	K9_56C_071211r	GCTCTCTTCCATGGTTTACATCCTTC	(配列番号 595)
	K9_56W_071211r	GCTCTCTTCCATGGTTTCCATCCTTC	(配列番号 596)
	K9_56P_071211r	GCTCTCTTCCATGGTTTTGGTCCTTC	(配列番号 597)
	K9_56H_071211r	GCTCTCTTCCATGGTTTATGTCCTTC	(配列番号 598)
	K9_56Q_071211r	GCTCTCTTCCATGGTTTTTGTCCTTC	(配列番号 599)
	K9_56I_071211r	GCTCTCTTCCATGGTTTAATTCCTTC	(配列番号 600)
	K9_56M_071211r	GCTCTCTTCCATGGTTTCATTCCTTC	(配列番号 601)
	K9_56N_071211r	GCTCTCTTCCATGGTTTATTTCCTTC	(配列番号 602)
	K9_56V_071211r	GCTCTCTTCCATGGTTTAACTCCTTC	(配列番号 603)
	K9_56A_071211r	GCTCTCTTCCATGGTTTAGCTCCTTC	(配列番号 604)
	K9_56D_071211r	GCTCTCTTCCATGGTTTATCTCCTTC	(配列番号 605)
	K9_56E_071211r	GCTCTCTTCCATGGTTTTTCTCCTTC	(配列番号 606)
	K9_56G_071211r	GCTCTCTTCCATGGTTTACCTCCTTC	(配列番号 607)
58	K9_58F_071211r	GTTCTTCTGCTCTCTTCCAGAATTT	(配列番号 608)
	K9_58L_071211r	GTTCTTCTGCTCTCTTCCACAATTT	(配列番号 609)
	K9_58Y_071211r	GTTCTTCTGCTCTCTTCCAATATTT	(配列番号 610)
	K9_58C_071211r	GTTCTTCTGCTCTCTTCCAACATTT	(配列番号 611)
	K9_58W_071211r	GTTCTTCTGCTCTCTTCCACCATTT	(配列番号 612)
	K9_58P_071211r	GTTCTTCTGCTCTCTTCCATGGTTT	(配列番号 613)
	K9_58H_071211r	GTTCTTCTGCTCTCTTCCAATGTTT	(配列番号 614)
	K9_58Q_071211r	GTTCTTCTGCTCTCTTCCATTGTTT	(配列番号 615)
	K9_58I_071211r	GTTCTTCTGCTCTCTTCCAAATTTT	(配列番号 616)
	K9_58M_071211r	GTTCTTCTGCTCTCTTCCACATTTT	(配列番号 617)
	K9_58N_071211r	GTTCTTCTGCTCTCTTCCAATTTTT	(配列番号 618)
	K9_58V_071211r	GTTCTTCTGCTCTCTTCCAAACTTT	(配列番号 619)
	K9_58A_071211r	GTTCTTCTGCTCTCTTCCAAGCTTT	(配列番号 620)
	K9_58D_071211r	GTTCTTCTGCTCTCTTCCAATCTTT	(配列番号 621)
	K9_58E_071211r	GTTCTTCTGCTCTCTTCCATTCTTT	(配列番号 622)
	K9_58G_071211r	GTTCTTCTGCTCTCTTCCAACCTTT	(配列番号 623)

【０５４９】

【表３８】

表 30. K_M 計測値を含む一部の突然変異体のリスト

突然変異体	配列番号 (核酸、アミノ酸)	突然変異	K_M (μM) (NADH)	K_M (μM) (NADPH)
K9 Wt	26, 27	--	326	0.2
BI7D12	625, 624	Y53Q, S56V, S58D, I86V, N87P, T131M, T191G	39	196
BI10F1	627, 626	Y53E, S56V, S58D, I86V, N87P, T131M, T191G	74	573
BJ6G6	629, 628	Y53P, S56D, S58Q, I86V, N87P, T131M, T191G	298	672
BJ7D6	631, 630	Y53P, S56V, S58E, I86V, N87P, T131M, T191G	37	236
BJ7F7	633, 632	Y53A, S56D, S58Q, I86V, N87P, T131M, T191G	269	762

【０５５０】

実施例２４

ａｌｄ６Δ株及びイソブタノール生成誘導体の構築
ラクトバチルス・プランタルム（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｐｌａｎｔａｒｕｍ）由来のｘｐｋ１及びｅｕｔＤ遺伝子用の発現カセットを含むｐＲＳ４２６：：ＧＰＤ－ｘｐｋ１＋ＡＤＨ－ｅｕｔＤ（配列番号３８３）からの５．３ｋｂ（ＢｇｌＩＩ／ＥｃｏＲＶ）ＤＮＡ断片を、上記の実施例９に記載されるｐＵＣ１９：：ａｌｄ６Ｄ：：ｌｏｘＰ－ＵＲＡ３－ｌｏｘＰベクターのＳｎａＢＩ部位において、ＡＬＤ６隣接配列間に付加した。ライゲーション反応物を大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）Ｓｔｂｌ３細胞に形質転換し、これをＬＢ　Ａｍｐプレート上でインキュベートして形質転換体を選択した。ｘｐｋ１－ｅｕｔＤカセットの挿入をＰＣＲ（プライマー）により確認した。陽性クローン（ｐＵＣ１９：：Δａｌｄ６：：ＵＲＡ３：：ｘｐｋＳ）を得た。

【０５５１】
上記に記載されるベクターをＡｈｄＩで線状化し、Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｆｒｏｚｅｎ－ＥＺ酵母形質転換キット（カタログ番号Ｔ２００１）により、２．０ｍＬ　ＹＰＥ（酵母エキス、ペプトン、１％エタノール含有）培地でのさらなる２．５時間の増殖インキュベーションを含む製造者のプロトコルに対する変更を伴い調製したＰＮＹ１５０７（本明細書に記載される）細胞に形質転換した。１％エタノールを炭素源として供給したウラシル不含合成完全培地に播くことにより、形質転換体を得た。パッチした形質転換体を、プライマーＮ１０９０及びＮ１２１３（配列番号７７９及び２４２）を使用して、ＰＣＲによるスクリーニングにより欠失／組込みを確認した。Ｃｒｅリコンビナーゼ（ｐＲＳ４２３：：ＧＡＬ１ｐ－Ｃｒｅ；配列番号２７１）を有するプラスミドを、ヒスチジンマーカー選択を用いて株に形質転換した。形質転換体を０．５％ガラクトース添加ＹＰＥにおいて継代した。コロニーを、５－ＦＯＡに対する耐性（ＵＲＡ３マーカーの欠損）及びヒスチジン栄養要求性（Ｃｒｅプラスミドの欠損）についてスクリーニングした。隣接ｌｏｘＰ部位を介してＵＲＡ３遺伝子が正しく除去されたことを、プライマーＮ１２１２及びＮ１２１４（配列番号２４１及び２８１）によるＰＣＲによって確認した。最後に、ａｌｓＳ組込みプラスミド（配列番号７８０）を、含まれたジェネティシン選択マーカーを使用してこの株に形質転換した。組み込み体を、プライマーＮ１６０ＳｅｑＦ５及びｏＢＰ５１２（配列番号３８８及び３３７）を用いて確認した。

【０５５２】
この株に、酢酸リチウム形質転換（“Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｙｅａｓｔ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ”　２００５．Ａｍｂｅｒｇ，Ｂｕｒｋｅ　ａｎｄ　Ｓｔｒａｔｈｅｒｎのプロトコル＃２）によってプラスミドｐＹＺ０９０ΔａｌｓＳ及びｐＢＰ９１５（配列番号３７１及び１８２）を形質転換した。形質転換体を、エタノールを炭素源として含むヒスチジン及びウラシル不含合成完全に播くことにより選択した。２％グルコース及び０．０５％エタノールを含むヒスチジン及びウラシル不含合成完全に形質転換体をパッチし、次に再パッチした。成長及びイソブタノール生成について６つのクローンを評価した。これらのうちの１つを、ＰＮＹ２２１６と命名した。

【０５５３】
実施例２５
Ｓ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）株ＰＮＹ２２１１からのＹＭＲ２２６ｃ欠失（ＰＮＹ２２４８の構築）
Ｓ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）株ＢＹ４７４３　ｙｍｒ２２６ｃΔ：：ＫａｎＭＸ４（ＡＴＣＣ　４０２０８１２）において利用可能なＰＣＲ増幅された線状ＫａｎＭＸ４ベースの欠失カセットを使用する相同組換えにより、遺伝子ＹＭＲ２２６ｃをＳ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）株ＰＮＹ２２１１（実施例９に記載される）から欠失させた。フォワード及びリバースＰＣＲプライマーＮ１２３７（配列番号７８４）及びＮ１２３８（配列番号７８５）により、染色体ＸＩＩＩから２，０５１ｂｐのｙｍｒ２２６ｃΔ：：ＫａｎＭＸ４欠失カセットが増幅された。ＰＣＲ産物は、ｙｍｒ２２６ｃΔ：：ＫａｎＭＸ４欠失カセットに隣接して、株ＰＮＹ２２１１で天然のＹＭＲ２２６ｃ遺伝子座に隣接する配列と１００％相同であるそれぞれ２５３ｂｐ及び２１７ｂｐの

上流及び下流配列を含んだ。隣接相同配列で組換え及び遺伝子交換が起こると、有効にＹＭＲ２２６ｃ遺伝子が欠失し、ｙｍｒ２２６ｃΔ：：ＫａｎＭＸ４欠失カセットが組み込まれる。

【０５５４】

約２．０μｇのＰＣＲ増幅産物を、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｙｅａｓｔ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ，ｐｐ．２０１－２０２（２００５））に以前記載された酢酸リチウム法を用いてコンピテントにされた株ＰＮＹ２２１１に形質転換し、形質転換混合物をＹＰＥ＋ジェネティシン（５０μｇ／ｍＬ）に播いて３０℃でインキュベートすることにより、ｙｍｒ２２６ｃΔ：：ＫａｎＭＸ４カセットが組み込まれた細胞を選択した。形質転換体を、隣接する内向き染色体特異的プライマーＮ１２３９（配列番号２４３）と対を形成する５’外向きＫａｎＭＸ４欠失カセット特異的内部プライマーＮ１２４０（配列番号７８６）及び隣接する内向き染色体特異的プライマーＮ１２４２（配列番号２４４）と対を形成する３’外向きＫａｎＭＸ４欠失カセット特異的プライマーＮ１２４１（配列番号７８７）によるＰＣＲにより、ｙｍｒ２２６ｃΔ：：ＫａｎＭＸ４についてスクリーニングした。陽性ＰＮＹ２２１１　ｙｍｒ２２６ｃΔ：：ＫａｎＭＸ４クローンが得られ、そのうちの１つをＰＮＹ２２４８と命名した。

【０５５５】

実施例２６

ＹＭＲ２２６ｃノックアウトにおけるＤＨＭＢ収率が減少したイソブタノールの生成

ＰＮＹ２２１１　ｙｍｒ２２６ｃΔ：：ＫａｎＭＸ４形質転換体及び非欠失対照（天然ＹＭＲ２２６ｃを有するＰＮＹ２２１１）を、初めに、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｙｅａｓｔ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ（２００５））に記載されるクイック・アンド・ダーティ（Ｑｕｉｃｋ ａｎｄ Ｄｉｒｔｙ）酢酸リチウム形質転換法によってイソブタノール経路含有プラスミドｐＹＺ０９０ΔａｌｓＳ（配列番号３７１）及びｐＢＰ９１５（配列番号１８２）を同時に導入することにより、グルコース培地におけるブタノール生成について試験した。プラスミド選択は、エタノールを含有する選択プレート（１．０％エタノールを含む、－ｈｉｓ －ｕｒａ合成完全培地）でのヒスチジン及びウラシル栄養要求性に基づいた。３～５日後、最もロバストな成長を示すいくつかの形質転換体を、ＳＤ ２．０％グルコース＋０．０５％エタノール －ｈｉｓ －ｕｒａにパッチすることによりグルコース培地に適合させ、３００℃で４８～７２時間インキュベートした。最もロバストな成長を示す３つのストリークを使用して、１２５ｍＬのベント付きフラスコにおけるＳＤ０．２％グルコース＋０．２％エタノール －ｈｉｓ －ｕｒａ中の１０ｍＬのシード培養物を接種し、３０℃、２５０ｒｐｍで約２４時間成長させた。次に細胞を、１２５ｍｌの密栓したフラスコにおける２％グルコース＋０．０５％エタノールを含む－ｈｉｓ －ｕｒａ合成完全培地に継代培養し、３０℃で４８時間インキュベートした。接種後及び４８時間のインキュベーション後に回収した培養上清をＨＰＬＣによって分析することによりイソブタノールの生成を決定し、及びＬＣ／ＭＳによってＤＨＭＢを定量化した。対照株は、グルコース１モルあたり０．０３～０．０７モルのモル収率でＤＨＭＢを生成することが観察された。ｙｍｒ２２６ｃΔ株の培養上清では、ＤＨＭＢに対応するピークは観察されず、そのうちの１つをＰＮＹ２２４９と命名した。

【０５５６】

実施例２７

酵母ノックアウトライブラリを用いた、アセト乳酸レダクターゼ（ＡＬＲ）活性酵素をコードする遺伝子の同定

Ｏｐｅｎ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ（登録商標）（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡの一部門）から入手可能な、株ＢＹ４７４３に由来する６０００個超の酵母株のノックアウト（「ＫＯ」）コレクションから、９５個の候

補デヒドロゲナーゼ遺伝子ノックアウト株を選択した。ノックアウト株のスターター培養物を、９６ウェルディープウェルプレート（Ｃｏｓｔａｒ　３９６０、Ｃｏｒｎｉｎｇ　Ｉｎｃ．，Ｃｏｒｎｉｎｇ　ＮＹ、又は同様のもの）において富栄養培地ＹＰＤ上で成長させ、０．６７％酵母窒素原基礎培地、０．１％カザミノ酸、２％グルコース、及び０．１Ｍ　K^+－ＭＥＳを含有する培地、ｐＨ５．５において、約０．３の出発ＯＤ　６００ｎｍで継代培養した。ＤＨＭＢ及びＤＨＩＶ計測のため、５日間の期間にわたり試料を採取した。ＤＨＩＶ及び２つのＤＨＭＢ異性体を分離し、Ｗａｔｅｒｓ（Ｍｉｌｆｏｒｄ，ＭＡ）ＡｃｑｕｉｔｙＴＱＤシステムでの液体クロマトグラフィー質量分析（「ＬＣ／ＭＳ」）により、Ａｔｌａｎｔｉｓ　Ｔ３（部品番号１８６００３５３９）カラムを使用して定量化した。カラムは３０℃に維持し、流量は０．５ｍｌ／分であった。Ａ移動相は水中０．１％ギ酸であり、Ｂ移動相はアセトニトリル中０．１％ギ酸であった。各ランは、９９％Ａで１分間、２５％Ｂまでの１分間にわたる直線勾配、続いて９９％Ａで１分間からなった。Ｗａｔｅｒｓ　ＡＣＱ＿ＴＱＤ（ｓ／ｎ　ＱＢＡ６８８）質量分析検出器により、ｍ／ｚ＝１３３（ネガティブＥＳＩ）、コーン電圧３２．５Ｖのピークについてカラム溶出液をモニタした。いわゆる「ファストＤＨＭＢ」は、典型的には１．１０分で現れ、続いてＤＨＩＶが１．２分で現れ、及び「スロー」ＤＨＭＢは１．７５分で現れる。ベースライン分離を達成し、１Ｍのストック水溶液から求めた標準溶液の分析値を参照することにより、ＤＨＩＶのピーク面積をμＭ　ＤＨＩＶ濃度に変換した。これらの計測値から、ＤＨＭＢレベルの変化のほとんどは最初の４８～６０時間に起こったとが示され、従って続く実験では、およそその時点で単一の試料を収集した。この実験では、ファストＤＨＭＢはスローＤＨＭＢより大幅に高いレベルで認められ、スローＤＨＭＢは常に検出可能というわけではなかった。多くの培養物におけるファストＤＨＭＢに対するＤＨＩＶの比は約３であったが、ＹＭＲ２２６Ｃ遺伝子が欠損した株は、一貫して極めて低濃度のファストＤＨＭＢと通常のＤＨＩＶを示し、従ってＤＨＩＶ／ファストＤＨＭＢ比は約１００であった。これから、この背景ではＹＭＲ２２６Ｃｐが主要なＡＬＲであることが示唆された。

【０５５７】

この背景においてＹＭＲ２２６Ｃｐが主要なＡＬＲであることを確認するため、ＡＬＲ及びＫＡＲＩのインビトロレベルを、ｙｍｒ２２６ｃ欠失株（アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ：ＡＴＣＣ），Ｍａｎａｓｓａｓ　ＶＡ、ＡＴＣＣ番号４０２０８１２）、及びその親のＢＹ４７４３（ＡＴＣＣ番号２０１３９０；アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ），Ｍａｎａｓｓａｓ　ＶＡ）で試験した。６ｍｌ　ＹＰＤが入った５０ｍｌチューブをＹＰＤ寒天プレートから接種し、一晩成長させた（３０℃、２５０ｒｐｍ）。細胞をペレット化し、水で１回洗浄し、酵母プロテアーゼ阻害剤カクテル（Ｒｏｃｈｅ，Ｂａｓｅｌ，スイス、カタログ番号１１８３６１７０００１、供給業者の指示どおりに使用、１０ｍｌの緩衝液あたり１錠）を含有する１ｍｌ酵母細胞質緩衝液（Ｖａｎ　Ｅｕｎｅｎ　ｅｔ　ａｌ．ＦＥＢＳ　Ｊｏｕｒｎａｌ　２７７：７４９－７６０（２０１０））に再懸濁した。トルエン（０．０２ｍｌ、Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｆａｉｒ　Ｌａｗｎ　ＮＪ）を添加し、透過処理のため、チューブをＶｏｒｔｅｘ　Ｇｅｎｉｅ　２シェーカー（Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｉｎｄｕｓｔｒｉｅｓ，Ｂｏｈｅｍｉａ　ＮＹ、モデルＧ－５６０）において最高速度で１０分間振盪した。チューブを３０℃の水浴中に置き、以下の終濃度となるよう基質を添加した：（Ｓ）－アセトラクテート（以下の実施例２９に記載するとおり酵素的に作製した）が９．４ｍＭ、ＮＡＤＰＨ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ　ＭＯ）０．２ｍＭ＋約１０ｍＭグルコース－６－ホスフェート及び２．５Ｕ／ｍｌロイコノストック・メセンテロイデス（Ｌｅｕｃｏｎｏｓｔｏｃ　ｍｅｓｅｎｔｅｒｏｉｄｅｓ）グルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼ（Ｓｉｇｍａ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ、カタログ番号Ｇ８４０４）からなるＮＡＤ（Ｐ）Ｈ－再生系。所定の時間間隔で２％ギ酸の０．１５ｍｌアリコートにアリコート（０．１５ｍｌ）を添加して

反応を停止させた。次に試料を、ＤＨＩＶ及び双方のＤＨＭＢ異性体について上記に記載したとおりＬＣ／ＭＳにより分析した；ファストＤＨＭＢ及びＤＨＩＶのみが観察された。２つの株における２つの酵素の比活性を表３１に示す。

【０５５８】

【表３９】

表 31. KARI 及び ALR 酵素活性

株	KARI	ALR
BY4743	1.7 mU/mg タンパク質	20 mU/mg
YMR226C 欠失株	2.2 mU/mg タンパク質	0.1 mU/mg

【０５５９】

データから、ＹＭＲ２２６Ｃ遺伝子産物がＡＬＲ活性の９９％超を占めたことが示唆される。

【０５６０】

実施例２８

酵母過剰発現ライブラリを使用した、アセト乳酸レダクターゼ（Ａｃｅｔｏｌａｃｔａｓｅ　Ｒｅｄｕｃｔａｓｅ）（ＡＬＲ）活性酵素をコードする遺伝子の同定

誘導性プロモーターの制御下にある、既知の酵母遺伝子＋Ｃ末端タグを含むプラスミドを各々が有する５０００個超のＹ２５８形質転換体の「酵母ＯＲＦ」コレクション（Ｏｐｅｎ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ（登録商標）、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡの一部門）から、デヒドロゲナーゼ活性に関連する遺伝子を含むプラスミドを有する９６株を、供給業者（Ｏｐｅｎ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ（登録商標））が推奨する成長及び誘導プロトコルを適合させることにより、９６ウェルフォーマットで成長させた。上記に記載したとおり細胞をペレット化してトルエンで透過処理し、濃縮基質混合物を添加して、実施例２７にあるとおりの終濃度を得た。所定時間の試料を採取し、ＤＨＩＶ及び双方のＤＨＭＢ異性体について分析した。ＡＬＲ／ＫＡＲＩ比を計算して比較した。比の高い株が、ＡＬＲ活性の過剰生成の候補であった。ファストＤＨＭＢとＤＨＩＶとの相対的形成速度のデータをＭｉｎｉｔａｂ（登録商標）（Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ　Ｉｎｃ．，Ｒｅｄｍｏｎｄ，ＷＡ）の箱ひげ図で表すと、比の半分は約９～１３に含まれ、残りのほとんどは３及び１９に含まれた。外れ値として特定された例外には、ＹＥＲ０８１Ｗ、ＹＩＬ０７４Ｃ、ＹＭＲ２２６Ｃ、ＹＢＲ００６Ｗ、及びＹＯＲ３７５Ｃが含まれ、これらについてはＡＬＲ／ＫＡＲＩ比は２２～４０に含まれた。同様の、スローＤＨＭＢとＤＨＩＶとの相対的形成速度の分析では、比の半分が９～１１に含まれたが、ＹＭＲ２２６Ｃ、ＹＰＬ２７５Ｗ、ＹＥＲ０８１Ｗ、及びＹＯＬ０５９Ｗは、比が１３～２５の外れ値として現れた。従って、ＹＭＲ２２６Ｃ及びＹＥＲ０８１Ｗの過剰発現により、双方のＤＨＭＢ合成が増加した。加えて、ＹＩＬ０７４Ｃ、ＹＢＲ００６Ｗ、及びＹＯＲ３７５ＣではファストＤＨＭＢ合成が増加し、ＹＰＬ２７５Ｗ及びＹＯＬ０５９WではスローＤＨＭＢ合成が増加した。過剰発現において同定された遺伝子のゲノムＤＮＡ配列（イントロンを含み得る）及びＯＲＦ翻訳配列は、表６に提供する。

【０５６１】

実施例２９

ＤＨＭＢによるＫＡＲＩの阻害

（Ｓ）－アセトラクテートの酵素生成

（Ｓ）－アセトラクテートをＤＨＭＢ合成の出発物質として使用した。（Ｓ）－アセトラクテートは、以下のとおり酵素的に作製した。ＩＰＴＧ制御下でクレブシエラ属（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ）ＢｕｄＢを発現するように修飾された大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ＴＯＰ１０株（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）（米国特許第７，８５１，１８８号明細書（これは全体として参照により本明細書に援用される）に以前記載されてい

る；この特許の実施例９を参照のこと）を、酵素供給源として使用した。これを２００～１０００ｍｌの培養容積で成長させた。例えば、２００ｍｌを、０．５Ｌ円錐フラスコ中の０．１ｍｇ／ｍｌアンピシリン（Ｓｉｇｍａ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）を含有するルリアブロス（Ｍｅｄｉａｔｅｃｈ，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ）で成長させ、フラスコは３７℃、２５０ｒｐｍで振盪した。ＯＤ　６００が約０．４のとき、イソプロピルチオガラクトシド（Ｓｉｇｍａ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）を０．４ｍＭとなるように添加し、成長を２時間継続した後、遠心により細胞を回収して、湿重量約１ｇの細胞を得た。同様に、約０．５～５ｇの湿潤細胞の規模で部分的精製を実施した。例えば、約０．５ｇの細胞を、２５ｍＭ　Ｎａ－ＭＥＳ　ｐＨ６を含有する２．５ｍｌ緩衝液に懸濁し、０℃で超音波処理により破壊し、遠心により清浄化した。粗抽出物に、０．１ｍＭチアミンピロリン酸、１０ｍＭ　$MgCl_2$、及び１ｍＭ　ＥＤＴＡ（全て、Ｓｉｇｍａ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯから）を補足した。次に、０．０７ｍｌの１０％　ｗ／ｖ硫酸ストレプトマイシン水溶液（Ｓｉｇｍａ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）を添加し、試料を５６℃の水浴中で２０分間加熱した。これを遠心により清浄化し、硫酸アンモニウムを５０％飽和となるよう添加した。混合物を遠心し、０．５ｍｌの２５ｍＭ　Ｎａ－ＭＥＳ、ｐＨ６．２にペレットを取り、さらなる特性決定なしに使用した。アセトラクテート合成もまた様々な規模で実施した。大量の調製は以下のとおり行った：５．５ｇのピルビン酸ナトリウムを、約４５ｍｌとなるように２５ｍＭ　Ｎａ－ＭＥＳ、ｐＨ６．２に溶解し、１０ｍＭ　$MgCl_2$、１ｍＭ　チアミンピロリン酸、１ｍＭ　ＥＤＴＡ（全て（Ｓｉｇｍａ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯから）、２５ｍＭ　酢酸ナトリウム（Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｆａｉｒ　Ｌａｗｎ　ＮＪ）、及び０．２５ｍｌのＢｕｄＢ調製物を補足した。この混合物を室温でｐＨメーター下に撹拌した。反応が進むにつれＣＯ２が発生し、ｐＨが上昇した。ピルビン酸（Ａｌｆａ，Ｗａｒｄ　Ｈｉｌｌ，ＭＡ）を蠕動ポンプによって徐々に添加して、ｐＨを６～７に維持した。ｐＨの上昇に伴い酵素反応は低速になるが、６未満に降下させてしまうと、アセト乳酸の脱カルボキシル化が問題になる。反応が完了すると、混合物を－８０℃で保存した。

【０５６２】

ＤＨＭＢの合成

（Ｓ）－アセトラクテートからＤＨＭＢを化学的に合成した。約０．８Ｍ、ｐＨ約８の、３ｍｌの粗アセトラクテート調製物を、１．２当量の$NaBH_4$（Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏ，Ｍｉｌｗａｕｋｅｅ，ＷＩ）で処理した。反応物を室温に一晩静置してから、２つに分けて、Ｂｉｏｇｅｌ　Ｐ－２（Ｂｉｏ－Ｒａｄ，Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，ＣＡ）の６０ｃｍ×１ｃｍ直径のカラムにおいて、移動相として水を使用して２分量で脱塩した。混合したＤＨＭＢを含む画分を回転蒸発により濃縮し、硫酸によってｐＨ２．２に調整した。

【０５６３】

ＨＰＬＣシステム（ＬＫＢ　２２４９ポンプ及び勾配コントローラ（ＬＫＢ、現在はＧｅｎｅｒａｌ　Ｅｌｅｃｔｒｉｃ，Ｃｈａｌｆｏｎｔ　Ｓｔ　Ｇｉｌｅｓ，英国の一部門）と、Ｈｅｗｌｅｔｔ－Ｐａｃｋａｒｄ（現在はＡｇｉｌｅｎｔ，Ｓａｎｔａ　Ｃｌａｒａ，ＣＡ）１０４０Ａ　ＵＶ／ｖｉｓ検出器とからなる）を使用し、Ｗａｔｅｒｓ　Ａｔｌａｎｔｉｓ　Ｔ３（５ｕｍ、４．６×１５０ｍｍ）を室温で０．２％ギ酸水溶液、ｐＨ２．５中、流量０．３ｍＬ／分でランさせて、２１５ｎｍでのＵＶ検出により、ＤＨＭＢのジアステレオマーを分離した。「ファスト」ＤＨＭＢは８．１分で溶出し、「スロー」ＤＨＭＢは１３．７分で溶出した。ＤＨＩＶは存在しなかった。プールした画分を取ってほぼ乾固させ、トルエンと同時蒸発させて残留するギ酸を除去した。次に残渣を水に溶解し、トリエチルアミン（Ｆｉｓｈｅｒ，Ｆａｉｒ　Ｌａｗｎ，ＮＪ）で塩基性にした。

【０５６４】

ＤＨＭＢの濃度決定及び絶対構造

精製したＤＨＭＢ溶液の濃度を以下のとおり決定した。濃度は、$NaBH_4$還元で用いられるアセトラクテートのｍｍｏｌ数に基づき推定した。ＤＨＭＢの部分量に対し、既知

量の安息香酸ナトリウム（固体安息香酸（ＡＣＳグレード、Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｆａｉｒ　Ｌａｗｎ，ＮＪ）をＮａＯＨ水溶液に溶解させることにより作製した））を添加して二成分混合物を（ほぼ）等モル量で得た。同様のＤＨＩＶ試料もまた、カスタム合成（Ａｌｂａｎｙ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ａｌｂａｎｙ　ＮＹ）によって入手した固体ナトリウム塩から調製した。試料を数回、D_2O（Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｍｉｌｗａｕｋｅｅ，ＷＩ）と同時蒸発させ、D_2Oに再溶解させた。積分プロトンＮＭＲスペクトルを得て、それを用いて安息香酸塩に対するＤＨＩＶ又はＤＨＭＢのモル比を決定した。ＤＨＭＢのＮＭＲスペクトルを$CDCl_3$中の遊離酸についての文献スペクトル（Ｋａｎｅｋｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｈｙｔｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　３９：１１５－１２０（１９９５））と比較することにより、ファストＤＨＭＢはエリスロ異性体であったことが示された。酵素的に合成したアセトラクテートはＣ－２に（Ｓ）配置を有するため、ファストＤＨＭＢは２Ｓ，３Ｓ配置を有する。スローＤＨＭＢはトレオ２Ｓ，３Ｒ配置を有する。

【０５６５】

ＮＭＲ試料の希釈物もまた、別個に調製した安息香酸溶液を標準として使用して、ＬＣ／ＭＳにより分析した。安息香酸、ＤＨＩＶ、及び２つのＤＨＭＢ異性体を分離し、上記に記載したとおり、Ａｔｌａｎｔｉｓ　Ｔ３（部品番号１８６００３５３９）カラムを使用して、Ｗａｔｅｒｓ（Ｍｉｌｆｏｒｄ，ＭＡ）ＡｃｑｕｉｔｙＴＱＤシステムでＬＣ／ＭＳにより定量化した。安息香酸をｍ／ｚ＝１２１で検出し（ネガティブＥＳＩ）、２．０５分で現れた。混合物中における安息香酸塩の濃度は、予測された値の実験の不確かさの範囲内であった。この実験からはまた、ＤＨＭＢの異性体が、機器の全応答範囲にわたり、ＬＣ／ＭＳにおけるＤＨＩＶの感度（すなわち、ＭＳピーク面積実測値／注入ｎｍｏｌ）の約８０％であったことも示された。従って、ＤＨＩＶ標準を使用して、細胞抽出物又は酵素反応物中に存在するＤＨＭＢを定量化する場合、見かけのＤＨＭＢ濃度には１．２５を乗じなければならない。

【０５６６】

ＤＨＭＢによるＫＡＲＩの阻害計測

ラクトコッカス・ラクチス（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｌａｃｔｉｓ）（配列番号８６４）由来のいずれかの遺伝子によりコードされる精製ＫＡＲＩ、ＪＥＡ１として知られる蛍光菌（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｓ）ＫＡＲＩの誘導体（配列番号７９９；米国特許出願公開第２０１０／０１９７５１９号明細書（これは全体として参照により本明細書に援用される））、又はＫ９Ｄ３として知られるアナエロスティペス・カカエ（Ａｎａｅｒｏｓｔｉｐｅｓ　ｃａｃｃａｅ）ＫＡＲＩの変異体（配列番号７８８）を、３０℃に設定したＴＣＣ２４０Ａ温度制御ユニットを備える島津（京都、日本）ＵＶ１６０Ｕ機器において、分光光度アッセイでＤＨＭＢ阻害に対するそれらの感受性について試験した。緩衝液は、１０ｍＭ　$MgCl_2$及び１ｍＭ　ＥＤＴＡを含有する０．１Ｍ　Ｋ＋　Ｈｅｐｅｓ、ｐＨ６．８であった。ＮＡＤＰＨは０．２ｍＭで存在し、ラセミアセトラクテートは３ｍＭ又は０．７２５ｍＭのいずれかの（Ｓ）異性体で存在した。ファストＤＨＭＢ又はスローＤＨＭＢのいずれかの存在下及び非存在下におけるＮＡＤＰＨ酸化速度を計測した。各試料のV_{max}を、速度実測値及び既知のアセトラクテートK_Mからミカエリス・メンテン式を用いて計算した。ＤＨＭＢの存在下における各計測値について、アセトラクテートに対する競合的阻害用に改良したミカエリス・メンテン式を用いて（ミカエリス・メンテン式のK_M項に（１＋［Ｉ］／K_i）を乗じ、この式をK_iについて解く）、容積K_iを推定した。結果はＮＭＲ実験の完了時にｍＭに変換した。それを表３２に示す。

【０５６７】

【表４０】

表 32. DHMB 異性体による KARI 阻害の K_I 値

株	ファスト DHMB	スロー DHMB
JEA1	0.23 mM	0.23 mM
K9D3	0.3 mM	0.2 mM
L.ラクチス (L. lactis)	2.8 mM	2.3 mM

【０５６８】

実施例３０

ＤＨＭＢによるＤＨＡＤの阻害

Ｓｚａｍｏｓｉ ｅｔ ａｌ．，Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓ．１０１：９９９－１００４（１９９３）により記載されるとおりの比色アッセイの変法を用いることにより、スタフォコッカス・ミュータンス（Ｓｔａｐｈｏｃｏｃｃｕｓ ｍｕｔａｎｓ）由来の精製したジヒドロキシ酸デヒドラターゼ（ＤＨＡＤ）を、ジヒドロキシイソバレレート（ＤＨＩＶ）から２－ケトイソバレレート（２－ＫＩＶ）への変換のＤＨＭＢによる阻害について試験した。このアッセイは、３０℃に維持される加熱ブロックに置いた２ｍＬエッペンドルフ試験管において行った。アッセイ混合物の最終容積は０．８ｍＬで、１００ｍＭ Ｈｅｐｅｓ－ＫＯＨ緩衝液、ｐＨ６．８、１０ｍＭ $MgCl_2$、０．５～１０ｍＭ ＤＨＩＶ、０～４０ｍＭ ＤＨＭＢ、及び１８μｇ ＤＨＡＤを含んだ。アッセイは、１０倍濃縮した基質ストックを添加することにより開始した。０．１分及び３０分の時点で試料を取り出し（０．３５ｍＬ）、第２のエッペンドルフ試験管において０．０５％の２，４－ジニトロフェニルヒドラジン（Ａｌｄｒｉｃｈ）を含む０．３５ｍＬ ０．１Ｎ ＨＣｌに混合することにより反応を停止させた。室温で３０分間インキュベートした後、０．３５ｍＬの４Ｎ ＮａＯＨを混合物に添加し、混合し、遠心機（Ｂｅｃｋｍａｎ－Ｃｏｕｌｔｅｒ Ｍｉｃｒｏｆｕｇｅ １８）において１５，０００×Ｇで２分間遠心した。次に、５４０ｎｍでの溶液の吸光度を、Ｃａｒｙ ３００ Ｂｉｏ ＵＶ－Ｖｉｓ分光光度計（ｓｐｅｃｔｒｏｐｈｏｍｅｔｅｒ）（Ｖａｒｉａｎ）を使用して１ｃｍ経路長キュベットで計測した。真正の２－ＫＩＶ（Ｆｌｕｋａ）を使用した標準曲線に基づき、０．２８ｍＭ ２－ＫＩＶにより５４０ｎｍにおける１ＯＤ吸光度を求めた。ファストＤＨＭＢ又はスローＤＨＭＢのいずれかの存在下及び非存在下で、２－ＫＩＶの形成速度を計測した。いずれの形態のＤＨＭＢも、ＤＨＩＶの競合的阻害剤のように挙動した。これらの阻害定数（Ｋｉ）を、単純な競合的阻害のミカエリス・メンテン式から計算した：$v = S \times V_{max} / (S + K_M \times (1 + I / K_i))$、式中、ｖは２－ＫＩＶ形成速度の計測値であり、ＳはＤＨＩＶの初期濃度であり、V_{max}は１０ｍＭ ＤＨＩＶ及びＤＨＭＢ無しで実測した速度から計算した最大速度であり、K_Mは０．５ｍＭの予め計測された定数であり、及びＩはＤＨＭＢの濃度である。ＤＨＭＢのファスト及びスロー異性体の阻害定数の計算値は、それぞれ７ｍＭ及び５ｍＭであった。

【０５６９】

実施例３１

ＹＭＲ２２６Ｃ相同体の同定

サッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）のＹＭＲ２２６Ｃ遺伝子の相同体を、ＧｅｎＢａｎｋ非冗長ヌクレオチドデータベースのＢＬＡＳＴ検索（ｂｌａｓｔ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／Ｂｌａｓｔ．ｃｇｉ）、サッカロミセス属（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）ゲノムデータベースにおける真菌ゲノムＢＬＡＳＴ検索ツール（ｗｗｗ．ｙｅａｓｔｇｅｎｏｍｅ．ｏｒｇ／ｃｇｉ－ｂｉｎ／ｂｌａｓｔ－ｆｕｎｇａｌ．ｐｌ）、及びＧｅｎｏｌｅｖｕｒｅｓ ＰｒｏｊｅｃｔのＢＬＡＳＴツール（ｇｅｎｏｌｅｖｕｒｅｓ．ｏｒｇ／ｂｌａｓｔ．ｈｔｍｌ＃）によって求めた。ＹＭＲ２２６Ｃと高度な配列同一性を示す１８酵母種のユニーク配列が同定

され、関連するデータベースの受託記録から、これらの遺伝子の完全なＯＲＦを復旧した。これらのＯＲＦによりコードされるポリペプチド配列を、Ｖｅｃｔｏｒ　ＮＴＩ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ　ＣＡ）のトランスレーション（Ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎ）機能により決定した。ポリヌクレオチド配列及びポリペプチド配列を、以下の表３３に示す。この表には、酵母種、ヌクレオチドデータベース受託番号、並びにＤＮＡ及びタンパク質配列を提供する。Ｓ．クルイベリ（Ｓ．ｋｌｕｙｖｅｒｉ）の配列は、提供される受託番号でＧｅｎｏｌｅｖｕｒｅｓデータベースにある；他はＧｅｎＢａｎｋにある。配列間のパーセント同一性は表３４に示す。

【０５７０】

１８個のＯＲＦを、ＡｌｉｇｎＸ（Ｖｅｃｔｏｒ　ＮＴＩを使用してアラインメントした；アカパンカビ（Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ　ｃｒａｓｓａ）由来の推定ＮＡＤＰ＋依存性デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子（ＸＭ＿９５７６２１、ＧｅｎＢａｎｋ　ＢＬＡＳＴ検索でＹＭＲ２２６Ｃヌクレオチド配列を使用して同定された）を、外群として使用した。得られた系統樹を図１１に示し、配列アラインメントを図１２に示す。

【０５７１】

これらの相同体のＹＭＲ２２６Ｃとの配列同一性は、最低５５％（ヤロウイア・リポリティカ（Ｙａｒｒｏｗｉａ　ｌｉｐｏｌｙｔｉｃａ）及びシゾサッカロミセス・ポンベ（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｐｏｍｂｅ））乃至最大９０％（Ｓ．パラドクサス（Ｓ．ｐａｒａｄｏｘｕｓ））の範囲である。ＢＬＡＳＴ検索からは、４８４塩基対にわたり９２％の配列同一性を有するＳ．パストリアヌス（Ｓ．ｐａｓｔｏｒｉａｎｕｓ）（受託番号ＣＪ９９７５３７）由来のｃＤＮＡも明らかとなったが、この種はＳ．バヤヌス（Ｓ．ｂａｙａｎｕｓ）（そのＹＭＲ２２６Ｃ相同体はＳ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）配列と８２％の同一性を示す）との間のハイブリッドであり、利用可能なＯＲＦ配列が一部のみであったため、この配列は比較に含めなかった。カノニカルな実験室株Ｓ２８８Ｃ由来のＹＭＲ２２６Ｃ配列を、１２個の他のＳ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）株由来の配列と比較したところ、わずか４つの一塩基多型が認められたに過ぎず（配列同一性９９．５％）、これが当該種において高度に保存された遺伝子であることを示している。

【０５７２】

【表４１】

表 33: YMR226C 酵母相同体

種	受託番号 (データベース 受託日)	核酸 配列番号	アミノ酸 配列番号
サッカロミセス・パラドクサス (Saccharomyces paradoxus)	AABY01000127 (3/7/2011)	698	699
サッカロミセス・バヤヌス (Saccharomyces bayanus)	AACA01000631 (3/7/2011)	700	701
サッカロミセス・カステリイ (Saccharomyces castellii)	AACF01000116 (3/7/2011)	702	703
サッカロミセス・ミカタエ (Saccharomyces mikatae)	AACH01000019 (3/7/2011)	704	705
アシュビア・ゴッシピイ (Ashbya gossypii)	AE016819 (3/7/2011)	706	707
カンジダ・グラブラタ (Candida glabrata)	CR380959 (3/7/2011)	708	709
デバリオミセス・ハンセニイ (Debaryomyces hansenii)	CR382139 (3/7/2011)	710	711
シェフェルソミセス・スチピチス (Scheffersomyces stipitis) (旧*ピキア・スチピチス (Pichia stipitis)*)	XM_001387479 (3/7/2011)	712	713
マイヤロジマ・ギリエルモンディイ (Meyerozyma guilliermondii) (旧*ピキア・ギリエルモンディイ (Pichia guilliermondii)*)	XM_001482184 (3/7/2011)	714	715
バンデルワルトジマ・ポリスポラ (Vanderwaltozyma polyspora) (旧*クルイベロミセス・ポリスポルス (Kluyveromyces polysporus)*)	XM_001645671 (3/4/2011)	716	717
カンジダ・デュブリニエンシス (Candida dubliniensis)	XM_002419771 (3/7/2011)	718	719
ザイゴサッカロミセス・ロウキシイ (Zygosaccharomyces rouxii)	XM_002494574 (3/7/2011)	720	721
ラカンセア・サーモトレランス (Lachancea thermotolerans) (旧*クルイベロミセス・サーモトレランス (Kluyveromyces thermotolerans)*)	XM_002553230 (3/4/2011)	722	723
クルイベロミセス・ラクチス (Kluyveromyces lactis)	XM_451902 (3/4/2011)	724	725
サッカロミセス・クルイベリ (Saccharomyces kluyveri)	SAKL0H04730 (3/7/2011)	726	727
ヤロウイア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica)	XM_501554 (3/8/2011)	728	729
シゾサッカロミセス・ポンベ (Schizosaccharomyces pombe)	NM_001018495 (3/8/2011)	730	731

【０５７３】

【表４２】

表 34: YMR226C 相同体パーセント同一性

種	Sm	Sb	Sca	Ag	Dh	Ss	Mg	Cd	Cg	Vp	Sk	Kl	Lt	Zr	Sce	Sp	Yl	Nc
Spa	88	82	70	64	62	62	58	57	67	68	68	69	68	68	90	55	55	56
Sm		82	70	64	60	62	58	56	67	69	68	70	68	69	86	57	56	57
Sb			71	63	59	62	58	53	67	66	68	70	69	67	82	56	56	58
Sca				60	62	61	60	59	65	69	69	71	64	70	69	57	53	54
Ag					56	60	57	54	59	61	62	62	62	62	63	54	55	55
Dh						64	62	61	61	63	62	61	59	63	62	57	57	53
Ss							68	64	61	62	62	64	62	63	62	56	58	58
Mg								60	57	58	60	60	59	62	59	57	57	56
Cd									57	62	59	60	54	60	58	57	53	49
Cg										69	70	68	67	67	66	55	56	55
Vp											71	72	67	70	71	58	52	51
Sk												77	71	72	69	53	54	54
Kl													71	72	71	56	52	54
Lt														69	69	53	60	58
Zr															69	58	55	55
Sce																55	55	56
Spo																	58	60
Yl																		61
Nc																		

表 34 凡例: サッカロミセス・パラドクサス *(Saccharomyces paradoxus)* ("Spa"); サッカロミセス・ミカタエ *(Saccharomyces mikatae)* ("Sm"); サッカロミセス・バヤヌス *(Saccharomyces bayanus)* ("Sb"); サッカロミセス・カステリイ *(Saccharomyces castellii)* ("Sca"); アシュビア・ゴッシピイ *(Ashbya gossypii)* ("Ag"); デバリオミセス・ハンセニイ *(Debaryomyces hansenii)* ("Dh"); シェフェルソミセス・スチピチス *(Scheffersomyces stipitis)* ("Ss"); マイヤロジマ・ギリエルモンディイ *(Meyerozyma guilliermondii)* ("Mg"); カンジダ・デュブリニエンシス *(Candida dubliniensis)* ("Cd"); カンジダ・グラブラタ *(Candida glabrata)* ("Cg"); バンデルワルトジマ・ポリスポラ *(Vanderwaltozyma polyspora)* ("Vp"); サッカロミセス・クルイベリ *(Saccharomyces kluyveri)* ("Sk"); クルイベロミセス・ラクチス *(Kluyveromyces lactis)* ("Kl"); ラカンセア・サーモトレランス *(Lachancea thermotolerans)* ("Lt"); ザイゴサッカロミセス・ロウキシイ *(Zygosaccharomyces rouxii)* ("Zr"); サッカロミセス・セレビシエ *(Saccharomyces cerevisiae)* ("Sce"); シゾサッカロミセス・ポンベ *(Schizosaccharomyces pombe)* ("Spo"); ヤロウイア・リポリティカ *(Yarrowia lipolytica)* ("Yl"); アカパンカビ *(Neurospora crassa)* ("Nc")

【０５７４】

実施例３２（予測的）

酵素アッセイを用いたイソブチルアルデヒドをイソ酪酸に変換する能力についてのＳ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）由来のアルデヒドデヒドロゲナーゼのスクリーニング

この例は、Ｓ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）由来のどの内因性アルデヒドデヒドロゲナーゼがイソブチルアルデヒドをイソ酪酸に酵素変換できるかを決定する方法を実証する。

【０５７５】

既知のアルデヒドデヒドロゲナーゼ酵素に個別の破壊を含むＳ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）株を、ＡＴＣＣ：ＢＹ４７４１　Δａｌｄ２：：ｋａｎＭＸ４（ＡＴＣＣ番号４０００７５３）；ＢＹ４７４１　Δａｌｄ３：：ｋａｎＭＸ４（ＡＴＣＣ番号４０００７５２）；ＢＹ４７４１　Δａｌｄ４：：ｋａｎＭＸ４（ＡＴＣＣ番号４００１６７１）；ＢＹ４７４１　Δａｌｄ５：：ｋａｎＭＸ４（ＡＴＣＣ番号４０００２１３）；及びＢＹ４７４１　Δａｌｄ６：：ｋａｎＭＸ４（ＡＴＣＣ番号４００２７６７）から得る。

【０５７６】

上記の欠失株を、初めに、３０℃の５ｍｌのＹＰＤ培地が入ったチューブにおいて一晩成長させる。５ｍｌの一晩培養物を５００ｍｌフラスコ中の１００ｍｌの培地に移し、２２０ｒｐｍで振盪しながら３０℃でインキュベートする。培養物が６００ｎｍで１～２Ｏ

．Ｄ．に達したところで培養物を収集する。試料を１０ｍｌの２０ｍＭトリス（ｐＨ７．５）で洗浄し、次に１ｍｌの同じトリス緩衝液に再懸濁する。試料を、０．１ｍｍシリカ（Ｌｙｓｉｎｇ　Ｍａｔｒｉｘ　Ｂ，ＭＰ　ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌｓ）が入った２．０ｍｌチューブに移す。次に細胞をビーズビーター（ＢＩＯ１０１）で破壊する。微量遠心機において１３，０００ｒｐｍ、４℃で３０分間遠心することにより、上清を得る。典型的には、一回のアッセイで０．０６～０．１ｍｇの粗抽出タンパク質を使用する。粗抽出物中のタンパク質は、クーマシー染色によるブラッドフォードアッセイにより決定した。

【０５７７】

Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ及びＢｏｓｔｉａｎ　ａｎｄ　Ｂｅｔｔｓ（Ｂｏｓｔｉａｎ，Ｋ．Ａ．ａｎｄ　Ｂｅｔｔｓ，Ｇ．Ｆ．（１９７８）Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｊｏｕｒｎａｌ　１７３，７７３－７８６）により提供されるプロトコルに従い、アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を計測する。上記の欠失株からの粗抽出物及び市販のアルデヒドデヒドロゲナーゼを、この方法を用いて試験する。

【０５７８】

代替的アッセイは、１～３０ｍＭの濃度のイソブチルアルデヒドを、密封したガラスＧＣバイアル中の約０．１ｍｇの粗抽出タンパク質に添加し、それを３０℃で３０分間インキュベートすることである。次に抽出物を０．２２μｍスピンフィルタ（Ｃｏｒｎｉｎｇ、カタログ番号８１６９）を用いて３０００ｒｐｍで３分間遠心し、ＧＣ－ＭＳ分析のため、ろ液をＧＣバイアルに移す。イソブチルアルデヒド及びイソ酪酸を検出する。

【０５７９】

ＧＣ方法は、Ａｇｉｌｅｎｔ（Ｓａｎｔａ　Ｃｌａｒａ，ＣＡ）の検出用の５９７５質量分析器及びＤＢ－１７０１カラム（３０ｍ×０．２５ｍｍＩＤ、０．２５μｍフィルム）を備えたＡｇｉｌｅｎｔ　７８９０　ＧＣを利用する。キャリアガスは１．０ｍＬ／分の一定流量のヘリウムである；注入器スプリットは２５０℃で１：１０である；オーブン温度は４０℃で１分間、１０℃／分で４０℃から１２０℃、及び３０℃／分で１２０℃から２４０℃である。イソブチルアルデヒド及びイソ酪酸の同定及び定量化のため、ＭＳ検出をフルスキャンモードで使用する。以下の化合物の検量線を作成する：イソブチルアルデヒド、イソ酪酸、及びイソブタノール。

【０５８０】

実施例３３

Ｓ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）におけるイソブタノール経路遺伝子発現用の発現ベクターの構築

ｐＬＨ４７５－ＪＥＡ１構築

酵母においてＡＬＳ及びＫＡＲＩを発現させるため、ｐＬＨ４７５－ＪＥＡ１プラスミド（配列番号４１９）を構築した。ｐＬＨ４７５－ＪＥＡ１は、以下のキメラ遺伝子を含むｐＨＲ８１ベクター（ＡＴＣＣ番号８７５４１）である：１）ＣＵＰ１プロモーター（配列番号７８９）、枯草菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｕｂｔｉｌｉｓ）由来のアセト乳酸シンターゼコード領域（ＡｌｓＳ；配列番号７９０；タンパク質配列番号７９１）及びＣＹＣ１ターミネーター２（配列番号７９２）；２）ＩＬＶ５プロモーター（配列番号７９３）、Ｐｆ５．ＩｌｖＣ－ＪＥＡ１コード領域及びＩＬＶ５ターミネーター（配列番号７９４）；及び３）ＦＢＡ１プロモーター（配列番号７９５）、Ｓ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）ＫＡＲＩコード領域（ＩＬＶ５；配列番号７９６；タンパク質配列番号７９７）及びＣＹＣ１ターミネーター（配列番号７９８）。

【０５８１】

Ｐｆ５．ＩｌｖＣ－ＪＥＡ１コード領域は、蛍光菌（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｓ）に由来するＫＡＲＩをコードする配列であるが、米国特許出願公開第２００９／０１６３３７６号明細書及び同第２０１０／０１９７５１９号明細書（これらは全体として参照により本明細書に援用される）に記載された突然変異を含む。Ｐｆ５．ＩｌｖＣ－ＪＥＡ１によりコードされるＫＡＲＩ（核酸及びアミノ酸配列番号７９９及び８００）は、天然の蛍光菌（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｓ）ＫＡＲ

Ｉと比較してアミノ酸変化を有する。

【０５８２】

発現ベクターｐＬＨ４６８

酵母においてＤＨＡＤ、ＫｉｖＤ、及びＨＡＤＨを発現させるため、ｐＬＨ４６８プラスミド（配列番号１３９）を構築した。

【０５８３】

Ｌ．ラクチス（Ｌ．ｌａｃｔｉｓ）ケトイソ吉草酸デカルボキシラーゼ（ＫｉｖＤ）及びウマ肝臓アルコールデヒドロゲナーゼ（ＨＡＤＨ）のコード領域を、サッカロミセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）での発現に最適化されたコドンに基づきＤＮＡ２．０によって合成し（それぞれ配列番号８０１及び８０２）、プラスミドｐＫｉｖＤｙ－ＤＮＡ２．０及びｐＨａｄｈｙ－ＤＮＡ２．０に提供した。コードされたタンパク質は、それぞれ配列番号８０３及び８０４である。ＫｉｖＤ及びＨＡＤＨ用の個々の発現ベクターを構築した。ｐＬＨ４６７（ｐＲＳ４２６：：P_{TDH3}－ｋｉｖＤｙ－ＴＤＨ３ｔ）を構築するため、米国特許出願公開第２００８／０１８２３０８号明細書の実施例１７（これは参照により本明細書に援用される）に記載されるベクターｐＮＹ８；別名ｐＲＳ４２６．ＧＰＤ－ａｌｄ－ＧＰＤｔをＡｓｃＩ及びＳｆｉＩ酵素で消化し、これによってＧＰＤプロモーター及びａｌｄコード領域を切り出した。ｐＮＹ８からのＴＤＨ３プロモーター断片（配列番号８０５）をＰＣＲ増幅することにより、５’プライマーＯＴ１０６８及び３’プライマーＯＴ１０６７（配列番号８０６及び８０７）を使用して５’末端にＡｓｃＩ部位、及び３’末端にＳｐｅＩ部位を付加した。ＡｓｃＩ／ＳｆｉＩ消化したｐＮＹ８ベクター断片を、ＡｓｃＩ及びＳｐｅＩで消化したＴＤＨ３プロモーターＰＣＲ産物、並びにベクターｐＫｉｖＤ－ＤＮＡ２．０から単離したコドン最適化ｋｉｖＤコード領域を含むＳｐｅＩ－ＳｆｉＩ断片とライゲートした。三重のライゲーションにより、ベクターｐＬＨ４６７（ｐＲＳ４２６：：ＰＴＤＨ３－ｋｉｖＤｙ－ＴＤＨ３ｔ）が作成された。ｐＬＨ４６７（配列番号８０８）を制限マッピング及び配列決定により確認した。

【０５８４】

ｐＬＨ４３５（ｐＲＳ４２５：：ＰＧＰＭ１－Ｈａｄｈｙ－ＡＤＨ１ｔ）は、米国特許出願公開第２００９／０３０５３６３号明細書の実施例３（これは参照により本明細書に援用される）に記載されるベクターｐＲＳ４２５：：ＧＰＭ－ｓａｄＢ（配列番号８０９）から誘導した。ｐＲＳ４２５：：ＧＰＭ－ｓａｄＢは、ＧＰＭ１プロモーター（配列番号８１０）、アクロモバクター・キシロスオキシダンス（Ａｃｈｒｏｍｏｂａｃｔｅｒ　ｘｙｌｏｓｏｘｉｄａｎｓ）のブタノールデヒドロゲナーゼからのコード領域（ｓａｄＢ；ＤＮＡ配列番号８１１；タンパク質配列番号８１２）、及びＡＤＨ１ターミネーター（配列番号４４４）を含むキメラ遺伝子を有するｐＲＳ４２５ベクター（ＡＴＣＣ番号７７１０６）である。ｐＲＳ４２５：：ＧＰＭｐ－ｓａｄＢは、ｓａｄＢコード領域の５’末端及び３’末端にそれぞれＢｂｖＩ及びＰａｃＩ部位を含む。プライマーＯＴ１０７４及びＯＴ１０７５（配列番号８１３及び８１４）を使用する部位特異的突然変異誘発により、ｓａｄＢコード領域の５’末端にＮｈｅＩ部位を付加してベクターｐＲＳ４２５－ＧＰＭｐ－ｓａｄＢ－ＮｈｅＩを生成し、これを配列決定により確認した。ｐＲＳ４２５：：P_{GPM1}－ｓａｄＢ－ＮｈｅＩをＮｈｅＩ及びＰａｃＩで消化してｓａｄＢコード領域を抜き出し、ベクターｐＨａｄｈｙ－ＤＮＡ２．０からのコドン最適化ＨＡＤＨコード領域を含むＮｈｅＩ－ＰａｃＩ断片とライゲートすることにより、ｐＬＨ４３５（配列番号８１５）を作成した。

【０５８５】

ＫｉｖＤ及びＨＡＤＨ発現カセットを単一のベクターに組み合わせるため、酵母ベクターｐＲＳ４１１（ＡＴＣＣ番号８７４７４）をＳａｃＩ及びＮｏｔＩで消化し、P_{GPM1}－Ｈａｄｈｙ－ＡＤＨ１ｔカセットを含むｐＬＨ４３５からのＳａｌＩ－ＮｏｔＩ断片と共に、P_{TDH3}－ｋｉｖＤｙ－ＴＤＨ３ｔカセットを含むｐＬＨ４６７からのＳａｃＩ－ＳａｌＩ断片とトリプルライゲーション反応でライゲートした。これによりベクターｐＲＳ４

１１：：P_{TDH3}－ｋｉｖＤｙ－P_{GPM1}－Ｈａｄｈｙ（ｐＬＨ４４１、配列番号８１６）を得て、これを制限マッピングにより確認した。

【０５８６】

低級イソブタノール経路における３つの遺伝子：ｉｌｖＤ、ｋｉｖＤｙ及びＨａｄｈｙの全ての共発現ベクターを作成するため、本発明者らは、ＩｌｖＤ遺伝子の供給源として、ｐＲＳ４２３　ＦＢＡ　ｉｌｖＤ（Ｓｔｒｅｐ）（配列番号８１７）を使用した。このシャトルベクターは、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）における維持用のＦ１起点（ｎｔ　１４２３位～１８７９位）と、酵母における複製用の２ミクロン起点（ｎｔ　８０８２位～９４２６位）とを含む。このベクターは、ＦＢＡ１プロモーター（ｎｔ　２１１１位～３１０８位；配列番号７９５）と、ＦＢＡ１ターミネーター（ｎｔ　４８６１位～５８６０位；配列番号８１８）とを有する。加えてこれは、酵母における選択用のＨｉｓマーカー（ｎｔ　５０４位～１１６３位）と、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）における選択用のアンピシリン耐性マーカー（ｎｔ　７０９２位～７９４９位）とを有する。ミュータンス菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｍｕｔａｎｓ）ＵＡ１５９（ＡＴＣＣ番号７００６１０）由来のｉｌｖＤコード領域（ｎｔ　３１１６位～４８２８位；配列番号８１９；タンパク質配列番号８２０）がＦＢＡ１プロモーターとＦＢＡ１ターミネーターとの間にあり、発現用のキメラ遺伝子を形成する。加えて、ｌｕｍｉｏタグがｉｌｖコード領域に融合している（ｎｔ　４８２９位～４８４９位）。

【０５８７】

最初のステップは、ＳａｃＩ及びＳａｃＩＩ（ＳａｃＩＩ部位はＴ４　ＤＮＡポリメラーゼを使用して平滑末端化されている）によりｐＲＳ４２３　ＦＢＡ　ｉｌｖＤ（Ｓｔｒｅｐ）（ｐＲＳ４２３－ＦＢＡ（ＳｐｅＩ）－ＩｌｖＤ（ミュータンス菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｍｕｔａｎｓ））－Ｌｕｍｉｏとも称される）を線状化することであり、全長９，４８２ｂｐのベクターが得られた。第２のステップは、ＳａｃＩ及びＫｐｎＩ（ＫｐｎＩ部位はＴ４　ＤＮＡポリメラーゼを使用して平滑末端化されている）によりｐＬＨ４４１からｋｉｖＤｙ－ｈＡＤＨｙカセットを単離することであり、これにより６，０６３ｂｐ断片が得られた。この断片を、ｐＲＳ４２３－ＦＢＡ（ＳｐｅＩ）－ＩｌｖＤ（ミュータンス菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｍｕｔａｎｓ））－Ｌｕｍｉｏからの９，４８２ｂｐのベクター断片とライゲートした。これによりベクターｐＬＨ４６８（ｐＲＳ４２３：：P_{FBA1}－ｉｌｖＤ（Ｓｔｒｅｐ）Ｌｕｍｉｏ－ＦＢＡ１ｔ－P_{TDH3}－ｋｉｖＤｙ－ＴＤＨ３ｔ－ＰＧＰＭ１－ｈａｄｈｙ－ＡＤＨ１ｔ）が作成され、これを制限マッピング及び配列決定により確認した。

【０５８８】

実施例３４

ピルビン酸デカルボキシラーゼ及びヘキソキナーゼ２に修飾を含むＳ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）宿主株の構築

この例は、Ｓ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）の内因性ＰＤＣ１、ＰＤＣ５、及びＰＤＣ６遺伝子の挿入－不活性化について記載する。ＰＤＣ１、ＰＤＣ５、及びＰＤＣ６遺伝子は、ピルビン酸デカルボキシラーゼの３つの主要なアイソザイムをコードする。グルコースのリン酸化及び転写抑制に関与するヘキソキナーゼ２もまた不活性化される。得られたＰＤＣ／ＨＸＫ２不活性化株を、発現ベクターｐＬＨ４７５－ＪＥＡ１及びｐＬＨ４６８の宿主として使用した。

【０５８９】

ｐｄｃ６：：　P_{GPM1}－ｓａｄＢ組込みカセットの構築及びＰＤＣ６欠失：

ｐＲＳ４２５：：ＧＰＭ－ｓａｄＢ（参照によって援用される米国特許出願公開第２００９／０３０５３６３号明細書に記載される）からのＧＰＭ－ｓａｄＢ－ＡＤＨｔセグメント（配列番号８２１）をｐＵＣ１９－ＵＲＡ３ｒからのＵＲＡ３ｒ遺伝子に連結することにより、ｐｄｃ６：：P_{GPM1}－ｓａｄＢ－ＡＤＨ１ｔ－ＵＲＡ３ｒ組込みカセットを作製した。ｐＵＣ１９－ＵＲＡ３ｒ（配列番号８２２）は、７５ｂｐの相同反復配列が隣接するｐＲＳ４２６（ＡＴＣＣ番号７７１０７）からのＵＲＡ３マーカーを含み、インビボ

での相同組換え及びＵＲＡ３マーカーの除去が可能である。２つのＤＮＡセグメントを、鋳型としてｐＲＳ４２５：：ＧＰＭ－ｓａｄＢ及びｐＵＣ１９－ＵＲＡ３ｒプラスミドＤＮＡを使用して、Ｐｈｕｓｉｏｎ　ＤＮＡポリメラーゼ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ　Ｉｎｃ．，Ｂｅｖｅｒｌｙ，ＭＡ；カタログ番号Ｆ－５４０Ｓ）並びにプライマー１１４１１７－１１Ａ～１１４１１７－１１Ｄ（配列番号８２３、８２４、８２５、８２６）、及び１１４１１７－１３Ａ及び１１４１１７－１３Ｂ（配列番号８２７及び８２８）により、ＳＯＥ　ＰＣＲ（Ｈｏｒｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９８９）Ｇｅｎｅ　７７：６１－６８により記載されるとおり）によって連結した。

【０５９０】

ＳＯＥ　ＰＣＲの外側プライマー（１１４１１７－１３Ａ及び１１４１１７－１３Ｂ）は、それぞれＰＤＣ６プロモーター及びターミネーターの上流及び下流の領域と相同な５’及び３’約５０ｂｐ領域を含んだ。完成したカセットＰＣＲ断片をＢＹ４７００（ＡＴＣＣ番号２００８６６）に形質転換し、形質転換体を、３０℃のウラシル不含２％グルコース添加合成完全培地に、標準的な遺伝学的技法（Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｙｅａｓｔ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，２００５，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ，ｐｐ．２０１－２０２）を用いて維持した。形質転換体をＰＣＲによりプライマー１１２５９０－３４Ｇ及び１１２５９０－３４Ｈ（配列番号８２９及び８３０）、並びに１１２５９０－３４Ｆ及び１１２５９０－４９Ｅ（配列番号８３１及び８３２）を使用してスクリーニングし、ＰＤＣ６コード領域の欠失を含むＰＤＣ６遺伝子座における組込みを確認した。ＵＲＡ３ｒマーカーは、標準的なプロトコルに従い３０℃の２％グルコース及び５－ＦＯＡを補足した合成完全培地に播くことによって再利用した。５－ＦＯＡプレートからのコロニーをＳＤ　－ＵＲＡ培地にパッチして成長がないことを確認することにより、マーカーの除去を確認した。得られた同定株は、遺伝子型：ＢＹ４７００　ｐｄｃ６：：P_{GPM1}－ｓａｄＢ－ＡＤＨ１ｔを有する。

【０５９１】

ｐｄｃ１：：　P_{PDC1}－ｉｌｖＤ組込みカセット及びＰＤＣ１欠失の構築：

ｐＬＨ４６８からのｉｌｖＤ－ＦＢＡ１ｔセグメントをｐＵＣ１９－ＵＲＡ３ｒからのＵＲＡ３ｒ遺伝子と、Ｐｈｕｓｉｏｎ　ＤＮＡポリメラーゼ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ　Ｉｎｃ．，Ｂｅｖｅｒｌｙ，ＭＡ；カタログ番号Ｆ－５４０Ｓ）及びプライマー１１４１１７－２７Ａ～１１４１１７－２７Ｄ（配列番号８２３、８２４、８２５、８２６）により、鋳型としてｐＬＨ４６８及びｐＵＣ１９－ＵＲＡ３ｒプラスミドＤＮＡを使用するＳＯＥ　ＰＣＲ（Ｈｏｒｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９８９）Ｇｅｎｅ　７７：６１－６８により記載されるとおり）によって連結することにより、ｐｄｃ１：：P_{PDC1}－ｉｌｖＤ－ＦＢＡ１ｔ－ＵＲＡ３ｒ組込みカセット（配列番号８３３）を作製した。

【０５９２】

ＳＯＥ　ＰＣＲ用の外側プライマー（１１４１１７－２７Ａ及び１１４１１７－２７Ｄ）は、ＰＤＣ１プロモーターの下流及びＰＤＣ１コード配列の下流の領域と相同な５’及び３’約５０ｂｐ領域を含んだ。完成したカセットＰＣＲ断片をＢＹ４７００　ｐｄｃ６：：P_{GPM1}－ｓａｄＢ－ＡＤＨ１ｔに形質転換し、形質転換体を、３０℃のウラシル不含２％グルコース添加合成完全培地に、標準的な遺伝学的技法（Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｙｅａｓｔ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，２００５，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ，ｐｐ．２０１－２０２）を用いて維持した。形質転換体をＰＣＲによりプライマー１１４１１７－３６Ｄ及び１３５（配列番号８３４及び８３５）並びにプライマー１１２５９０－４９Ｅ及び１１２５９０－３０Ｆ（配列番号８３２及び８３６）を使用してスクリーニングし、ＰＤＣ１コード配列の欠失を含むＰＤＣ１遺伝子座における組込みを確認した。ＵＲＡ３ｒマーカーは、標準的なプロトコルに従い３０℃の２％グルコース及び５－ＦＯＡを補足した合成完全培地に播くことによって再利用した。５－ＦＯＡプレートからのコロニー

をＳＤ －ＵＲＡ培地にパッチして成長がないことを確認することにより、マーカーの除去を確認した。得られた同定株「ＮＹＬＡ６７」は、遺伝子型：ＢＹ４７００ ｐｄｃ６：： P_{GPM1}－ｓａｄＢ－ＡＤＨ１ｔ ｐｄｃ１：： P_{PDC1}－ｉｌｖＤ－ＦＢＡ１ｔを有する。

【０５９３】

ＨＩＳ３欠失

内因性ＨＩＳ３コード領域を欠失させるため、ｈｉｓ３：：ＵＲＡ３ｒ２カセットをＵＲＡ３ｒ２鋳型ＤＮＡ（配列番号８３７）からＰＣＲ増幅した。ＵＲＡ３ｒ２は、インビボでの相同組換え及びＵＲＡ３マーカーの除去が可能となるように、５００ｂｐ相同反復配列が隣接するｐＲＳ４２６（ＡＴＣＣ番号７７１０７）からのＵＲＡ３マーカーを含む。Ｐｈｕｓｉｏｎ ＤＮＡポリメラーゼ並びにプライマー１１４１１７－４５Ａ及び１１４１１７－４５Ｂ（配列番号８３８及び８３９）を使用してＰＣＲを行い、これにより約２．３ｋｂのＰＣＲ産物が作成された。各プライマーのＨＩＳ３部分をＨＩＳ３プロモーターの上流の５’領域及びコード領域の下流の３’領域から誘導することで、ＵＲＡ３ｒ２マーカーの組込みによりＨＩＳ３コード領域の置換が生じるようにした。ＰＣＲ産物を、標準的な遺伝学的技法（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｙｅａｓｔ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，２００５，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ，ｐｐ．２０１－２０２）を用いてＮＹＬＡ６７に形質転換し、３０℃のウラシル不含２％グルコース添加合成完全培地で形質転換体を選択した。３０℃のヒスチジン不含２％グルコース添加合成完全培地における形質転換体のレプリカ平板法により、形質転換体をスクリーニングして、正しい組込みを確認した。ＵＲＡ３ｒマーカーは、標準的なプロトコルに従い３０℃の２％グルコース及び５－ＦＯＡを補足した合成完全培地に播くことによって再利用した。５－ＦＯＡプレートからのコロニーをＳＤ－ＵＲＡ培地にパッチして成長がないことを確認することにより、マーカーの除去を確認した。ＮＹＬＡ７３と呼ばれる得られた同定株は、遺伝子型：ＢＹ４７００ ｐｄｃ６：：P_{GPM1}－ｓａｄＢ－ＡＤＨ１ｔ ｐｄｃ１：： P_{PDC1}－ｉｌｖＤ－ＦＢＡ１ｔ Δｈｉｓ３を有する。

【０５９４】

ＨＸＫ２の欠失：

ｈｘｋ２：：ＵＲＡ３ｒカセットを、Ｐｈｕｓｉｏｎ ＤＮＡポリメラーゼ並びにプライマー３８４及び３８５（配列番号８４０及び８４１）を使用してＵＲＡ３ｒ２鋳型（上記に記載される）からＰＣＲ増幅し、これにより約２．３ｋｂのＰＣＲ産物が作成された。各プライマーのＨＸＫ２部分をＨＸＫ２プロモーターの上流の５’領域及びコード領域の下流の３’領域から誘導することで、ＵＲＡ３ｒ２マーカーの組込みによりＨＸＫ２コード領域の置換が生じるようにした。ＰＣＲ産物を、標準的な遺伝学的技法（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｙｅａｓｔ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，２００５，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ，ｐｐ．２０１－２０２）を用いてＮＹＬＡ７３に形質転換し、３０℃のウラシル不含２％グルコース添加合成完全培地で形質転換体を選択した。形質転換体を、プライマーＮ８６９及びＮ８７１（配列番号８４２及び８４３）を使用するＰＣＲによってスクリーニングすることにより、ＨＸＫ２コード領域の置換を含むＨＸＫ２遺伝子座における正しい組込みを確認した。ＵＲＡ３ｒ２マーカーは、標準的なプロトコルに従い３０℃の２％グルコース及び５－ＦＯＡを補足した合成完全培地に播くことによって再利用した。５－ＦＯＡプレートからのコロニーをＳＤ －ＵＲＡ培地にパッチして成長がないことを確認することにより、マーカーの除去を確認したとともに、プライマーＮ９４６及びＮ９４７（配列番号８４４及び８４５）を使用するＰＣＲにより、正しいマーカー除去を確認した。ＮＹＬＡ８３と命名される得られた同定株は、遺伝子型：ＢＹ４７００ ｐｄｃ６：： P_{GPM1}－ｓａｄＢ－ＡＤＨ１ｔ ｐｄｃ１：： P_{PDC1}－ｉｌｖＤ－ＦＢＡ１ｔ Δｈｉｓ３ Δｈｘｋ２を有する。

【０５９５】

ｐｄｃ５：：ｋａｎＭＸ組込みカセット及びＰＤＣ５欠失の構築

ｐｄｃ５：：ｋａｎＭＸ４カセットを、Ｐｈｕｓｉｏｎ ＤＮＡポリメラーゼ並びにプライマーＰＤＣ５：：ＫａｎＭＸＦ及びＰＤＣ５：：ＫａｎＭＸＲ（配列番号８４６及び８４７）を使用して株ＹＬＲ１３４Ｗ染色体ＤＮＡ（ＡＴＣＣ番号４０３４０９１）からＰＣＲ増幅し、これにより約２．２ｋｂのＰＣＲ産物が作成された。各プライマーのＰＤＣ５部分をＰＤＣ５プロモーターの上流の５’領域及びコード領域の下流の３’領域から誘導することで、ｋａｎＭＸ４マーカーの組込みによりＰＤＣ５コード領域の置換が生じるようにした。ＰＣＲ産物をＮＹＬＡ８３に形質転換し、形質転換体を上記に記載したとおり選択及びスクリーニングした。ＮＹＬＡ８４と命名される同定された正しい形質転換体は、遺伝子型：ＢＹ４７００ ｐｄｃ６：： P_{GPM1}－ｓａｄＢ－ＡＤＨ１ｔ ｐｄｃ１：： P_{PDC1}－ｉｌｖＤ－ＦＢＡ１ｔ Δｈｉｓ３ Δｈｘｋ２ ｐｄｃ５：：ｋａｎＭＸ４を有する。

【０５９６】

プラスミドベクターｐＬＨ４６８及びｐＬＨ４７５－ＪＥＡ１を、標準的な遺伝学的技法（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｙｅａｓｔ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，２００５，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ）を用いて株ＮＹＬＡ８４（ＢＹ４７００ ｐｄｃ６：：P_{GPM1}－ｓａｄＢ－ＡＤＨ１ｔ ｐｄｃ１：：P_{PDC1}－ｉｌｖＤ－ＦＢＡ１ｔ Δｈｉｓ３ Δｈｘｋ２ ｐｄｃ５：：ｋａｎＭＸ４）に同時に形質転換し、得られた株を、３０℃のヒスチジン及びウラシル不含１％エタノール添加合成完全培地に維持した。

【０５９７】

実施例３５（予測的）

ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ヘキソキナーゼ２、及びアルデヒドデヒドロゲナーゼに修飾を含むＳ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）宿主株の構築

この例は、イソ酪酸（ｉｓｏｂｕｔｒｙｉｃ ａｃｉｄ）の形成を消失又は低下させる１つ以上のアルデヒドデヒドロゲナーゼの不活性化について記載する。ＡＬＤ２の破壊が例として用いられるが、この方法は任意のアルデヒドデヒドロゲナーゼの破壊に用いることができる。得られるＮＹＬＡ８４誘導株は、発現ベクターｐＬＨ４７５－ＪＥＡ１及びｐＬＨ４６８の宿主として用いられる。

【０５９８】

ＡＬＤ２の欠失：

ａｌｄ２：：ＵＲＡ３ｒカセットを、Ｐｈｕｓｉｏｎ ＤＮＡポリメラーゼ並びにプライマーＴ００１及びＴ００２（配列番号８４８及び８４９）を使用してＵＲＡ３ｒ２鋳型（上記に記載される）からＰＣＲ増幅し、これにより約２．３ｋｂのＰＣＲ産物が作成される。各プライマーのＡＬＤ２部分をＡＬＤ２遺伝子の５’配列及び３’配列から誘導することで、ＵＲＡ３ｒ２マーカーの組込みによりＡＬＤ２コード領域の置換が生じるようにする。ＰＣＲ産物を、標準的な遺伝学的技法（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｙｅａｓｔ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，２００５，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ，ｐｐ．２０１－２０２）を用いてＮＹＬＡ８４に形質転換し、３０℃のウラシル不含１％エタノール添加合成完全培地で形質転換体を選択する。形質転換体を、プライマーＴ００３及びＴ００４（配列番号８５０及び８５１）を使用するＰＣＲによってスクリーニングすることにより、ＡＬＤ２コード領域の置換を含むＡＬＤ２遺伝子座における正しい組込みを確認する。ＵＲＡ３ｒ２マーカーは、標準的なプロトコルに従い３０℃の１％エタノール及び５－ＦＯＡを補足した合成完全培地に播くことによって再利用する。５－ＦＯＡプレートからのコロニーをＳＥ －ＵＲＡ培地にパッチして成長がないことを確認することにより、マーカー除去を確認するとともに、プライマーＴ００４及びＴ００５（配列番号８５１及び８５２）を使用するＰＣＲにより、正しいマーカー除去を確認する。得られた同定株をＮＹＬＡ８４ Δａｌｄ２と命名し、これは遺伝子型：ＢＹ４７００ ｐｄｃ６：： P_{GPM1}－ｓａｄＢ－ＡＤＨ１ｔ ｐｄｃ１：： P_{PDC1}－ｉｌｖＤ－ＦＢＡ１ｔ Δｈｉｓ３ Δｈ

ｘｋ２　Δａｌｄ２である。
【０５９９】
実施例３６
ＮＹＬＡ８４における組換えＳ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）のイソブタノール生成
ＨＰＬＣ方法
グルコース及び発酵副生成物組成の分析は、当業者に周知されている。例えば、一つの高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）方法は、Ｓｈｏｄｅｘ　ＳＨ－１０１１カラムをＳｈｏｄｅｘ　ＳＨ－Ｇガードカラムと共に（双方ともＷａｔｅｒｓ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｍｉｌｆｏｒｄ，ＭＡから入手可能）、屈折率（ＲＩ）検出を伴い利用する。クロマトグラフ分離は、０．５ｍＬ／分の流量及び５０℃のカラム温度で、０．０１ＭH_2SO_4を移動相として使用して実現される。イソブタノール保持時間は４７．６分である。
【０６００】
ＮＹＬＡ８４における組換えＳ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）のイソブタノール生成
本例の目的は、酵母株ＮＹＬＡ８４におけるイソブタノールの生成について記載することである。この酵母株は、ピルビン酸デカルボキシラーゼの３つのアイソザイムをコードする遺伝子ＰＤＣ１、ＰＤＣ５、及びＰＤＣ６の欠失、及びヘキソキナーゼ２をコードするＨＸＫ２の欠失を含む。この株はまた、ＡｌｓＳ（アセト乳酸シンターゼ）、ＫＡＲＩ（ケト酸レダクトイソメラーゼ）、ＤＨＡＤ（ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ）、ＫｉｖＤ（ケトイソ吉草酸デカルボキシラーゼ）、ＳａｄＢ（二級アルコールデヒドロゲナーゼ）、及びＨＡＤＨ（ウマ肝臓アルコールデヒドロゲナーゼ）の異種発現用のコンストラクトも含む。
【０６０１】
株構築
標準的なＰＥＧ／酢酸リチウム媒介性形質転換法により、プラスミドｐＬＨ４６８及びｐＬＨ４７５－ＪＥＡ１をＮＹＬＡ８４に導入した。グルコース、ヒスチジン及びウラシル不含合成完全培地で形質転換体を選択した。エタノール（１％ｖ／ｖ）を炭素源として使用した。３日後、炭素源として２％グルコース及び０．５％エタノールの両方を補足したヒスチジン及びウラシル不含の合成完全培地に形質転換体をパッチした。グリセロール終濃度が１５％（ｗ／ｖ）となるように対数期培養物を４５％グリセロールで希釈することにより、フリーザーバイアルを作製した。
【０６０２】
イソブタノールの生成
フリーザーバイアルを使用して、炭素源として２％グルコース及び０．５％エタノールの両方を補足したヒスチジン及びウラシル不含の合成完全培地８０ｍｌを接種した。
【０６０３】
発酵条件：
１リットル発酵槽を０．４Ｌの水で調製して滅菌した。冷却後、ろ過滅菌した培地を添加して、接種後の８００ｍＬにおいて以下の終濃度を得た：
【０６０４】
培地（終濃度）：
６．７ｇ／Ｌ、アミノ酸不含酵母窒素原基礎培地（Ｄｉｆｃｏ）
２．８ｇ／Ｌ、ヒスチジン、ロイシン、トリプトファン及びウラシル不含酵母合成ドロップアウト培地添加剤（Ｓｉｇｍａ　Ｙ２００１）
２０ｍＬ／Ｌの１％（ｗ／ｖ）Ｌ－ロイシン
４ｍＬ／Ｌの１％（ｗ／ｖ）Ｌ－トリプトファン
１ｍＬ／Ｌエルゴステロール／ｔｗｅｅｎ／エタノール溶液
０．２ｍＬ／Ｌ　Ｓｉｇｍａ　ＤＦ２０４

１０ｇ／Ｌグルコース
【０６０５】
発酵槽は、ＫＯＨによりｐＨ５．５に、３０％ｄＯ、温度３０℃、及び空気流量０．２ＳＬＰＭ（又は、０．２５ｖｖｍ）に制御するように設定した。接種時、空気流量は当初０．０１ＳＬＰＭに設定し、次に成長が確立したところで０．２ＳＬＰＭに増加させた。グルコースは、手動で添加することにより、全体を通じて５～１５ｇ／Ｌに維持した。
【０６０６】
空気を０．２５ｖｖｍで発酵槽に連続供給した。連続曝気により、発酵槽の水相からイソブタノールの多量のストリッピングが起きた。ストリッピングに起因するイソブタノールの損失を定量化するため、発酵槽からの排ガスを質量分析器（Ｐｒｉｍａ　ｄＢ質量分析器、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｅｌｅｃｔｒｏｎ　Ｃｏｒｐ．，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）に直接送り込み、ガス流中のイソブタノールの量を定量化した。７４又は４２の質量対電荷比におけるイソブタノールピークを連続的にモニタすることにより、ガス流中のイソブタノールの量を定量化した。発酵中、ＨＰＬＣを用いて水相のグルコース及び有機酸をモニタした。グルコースはまた、グルコース分析器（ＹＳＩ，Ｉｎｃ．，Ｙｅｌｌｏｗ　Ｓｐｒｉｎｇｓ，ＯＨ）も使用して迅速にモニタした。発酵槽から水相を定期的に取り出した後、水相のイソブタノールを、本明細書の上記のＨＰＬＣ方法に記載されるとおりＨＰＬＣによって定量化した。ストリッピングに起因するイソブタノール損失に対して補正した有効力価は、７．５ｇ／Ｌであった。イソ酪酸の力価は１．２８ｇ／Ｌであった（図１４）。
【０６０７】
実施例３７（予測的）
ＮＹＬＡ８４　Δａｌｄ２における組換えＳ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）のイソブタノール生成
本例の目的は、酵母株ＮＹＬＡ８４におけるイソブタノールの生成について記載することである。ＡＬＤ２の破壊が例として用いられるが、この例は任意のアルデヒドデヒドロゲナーゼの破壊に用いることができる。ＮＹＬＡ８４　Δａｌｄ２酵母株は、ピルビン酸デカルボキシラーゼの３つのアイソザイムをコードする遺伝子ＰＤＣ１、ＰＤＣ５、及びＰＤＣ６の欠失、ヘキソキナーゼ２をコードするＨＸＫ２の欠失、及びアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードするＡＬＤ２の欠失を含む。この株はまた、ＡｌｓＳ（アセト乳酸シンターゼ）、ＫＡＲＩ（ケト酸レダクトイソメラーゼ）、ＤＨＡＤ（ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ）、ＫｉｖＤ（ケトイソ吉草酸デカルボキシラーゼ）、及びＳａｄＢ（二級アルコールデヒドロゲナーゼ）の異種発現用のコンストラクトも含む。
【０６０８】
株構築
標準的なＰＥＧ／酢酸リチウム媒介性形質転換法により、プラスミドｐＬＨ４６８及びｐＬＨ４７５－ＪＥＡ１をＮＹＬＡ８４　Δａｌｄ２に導入する。グルコース、ヒスチジン及びウラシル不含合成完全培地で形質転換体を選択する。エタノール（１％ｖ／ｖ）を炭素源として使用する。３日後、炭素源として２％グルコース及び０．５％エタノールの両方を補足したヒスチジン及びウラシル不含の合成完全培地に形質転換体をパッチする。グリセロール終濃度が１５％（ｗ／ｖ）となるように対数期培養物を４５％グリセロールで希釈することにより、フリーザーバイアルを作製する。
【０６０９】
イソブタノールの生成
フリーザーバイアルを使用して、炭素源として０．２５％グルコース及び０．５％エタノールの両方を補足したヒスチジン及びウラシル不含の合成完全培地８０ｍｌを接種する。０．４Ｌの水で１リットル発酵槽を調製して滅菌する。冷却後、ろ過滅菌した培地を添加して、接種後の８００ｍＬにおいて以下の終濃度を得る：
【０６１０】
培地（終濃度）：
６．７ｇ／Ｌ、アミノ酸不含酵母窒素原基礎培地（Ｄｉｆｃｏ）

２．８ｇ／Ｌ、ヒスチジン、ロイシン、トリプトファン及びウラシル不含酵母合成ドロップアウト培地添加剤（Ｓｉｇｍａ　Ｙ２００１）
２０ｍＬ／Ｌの１％（ｗ／ｖ）Ｌ－ロイシン
４ｍＬ／Ｌの１％（ｗ／ｖ）Ｌ－トリプトファン
１ｍＬ／Ｌエルゴステロール／ｔｗｅｅｎ／エタノール溶液
０．２ｍＬ／Ｌ　Ｓｉｇｍａ　ＤＦ２０４
１０ｇ／Ｌグルコース

【０６１１】

発酵槽は、ＫＯＨによりｐＨ５．５に、３０％ｄＯ、温度３０℃、及び空気流量０．２ＳＬＰＭ（又は、０．２５ｖｖｍ）に制御するように設定する。接種時、空気流量は当初０．０１ＳＬＰＭに設定し、次に成長が確立したところで０．２ＳＬＰＭに増加させる。グルコースは、手動で添加することにより、全体を通じて５～１５ｇ／Ｌに維持する。

【０６１２】

ストリッピングに起因するイソブタノールの損失を定量化するため、発酵槽からの排ガスを質量分析器（Ｐｒｉｍａ　ｄＢ質量分析器、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｅｌｅｃｔｒｏｎ　Ｃｏｒｐ．，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）に直接送り込み、ガス流中のイソブタノールの量を定量化する。７４又は４２の質量対電荷比におけるイソブタノールピークを連続的にモニタすることにより、ガス流中のイソブタノールの量を定量化する。発酵中、ＨＰＬＣを用いて水相のグルコース及び有機酸をモニタする。グルコースはまた、グルコース分析器（ＹＳＩ，Ｉｎｃ．，Ｙｅｌｌｏｗ　Ｓｐｒｉｎｇｓ，ＯＨ）も使用して迅速にモニタする。発酵槽から水相を定期的に取り出した後、水相のイソブタノール及びイソ酪酸をＨＰＬＣによって定量化する。

【０６１３】

実施例３８

イソ酪酸生成の分析

０．０５％エタノールを補足したヒスチジン及びウラシル不含合成完全培地に株を接種した。培養物が定常期に達したところで、それらを新鮮な培地（出発ＯＤ＝０．２）に継代培養した。ＰＮＹ２２０５（実施例１３）は、ホスホケトラーゼ経路を有しないＰＤＣＫＯ酵母で観察されるＣ２要求を満たすように、培地に０．０５％エタノールを補足した。ＰＮＹ２２０９（実施例１３）は、細胞をエタノール含有及び不含の培地に継代培養した。ａｌｄ６Δクローン（ＰＮＹ２２１６及び同質遺伝子クローン、実施例２４）は、エタノール不含培地を使用した。培養物は、スクリューキャップ付き振盪フラスコ（１２５ｍｌフラスコ中２０ｍｌの培地）において成長させた。接種直後、及び４８時間後に再度、培養上清を収集した。これらの培養上清をＨＰＬＣにより分析し（参照により本明細書に援用される米国特許出願公開第２００７００９２９５７号明細書に記載される）、グルコース消費及びイソ酪酸濃度を決定した。

【０６１４】

【表４３】

表 35. ald6Δ株におけるイソ酪酸のモル収率

株	イソ酪酸モル収率 (モル/消費グルコースモル)
PNY2205*	0.09
PNY2209*	0.07
PNY2209	0.09
PNY2216 及び５つの他の同質遺伝子クローン	0.03

* 培養培地に 0.05%エタノールを補足したことを示す

【０６１５】

実施例３９
新規株におけるイソブタノール生成の増加及び副生成物生成の減少
この例の目的は、プラスミドｐＫ９Ｇ９．ＯＬＥ１ｐ．ｉｌｖＤを使用して残りのイソブタノール経路遺伝子を供給する新規に構築した株による小規模培養実験について記載することである。
【０６１６】
新規宿主株ＰＮＹ１５２８、ＰＮＹ２２４３、ＰＮＹ２２３７及びＰＮＹ２２３８をプラスミドｐＫ９Ｇ９．ＯＬＥ１ｐ．ｉｌｖＤで形質転換し、イソブタノール生成について試験した。１％エタノールを炭素源として含むウラシル不含合成完全培地で選択することにより、形質転換体を得た。形質転換体を、２％グルコース及び０．０５％エタノールを炭素源として含むウラシル不含合成完全培地にパッチした。パッチを使用して、液体培地（０．３％グルコース及び０．３％エタノールを炭素源として含むウラシル不含合成完全）を接種した。イソブタノール生成を試験するため、液体培養物を、２％グルコース及び０．０５％エタノールを炭素源として含有し、またＢＭＥビタミンミックス（Ｓｉｇｍａカタログ番号Ｂ６８９１）も含有したウラシル不含合成完全培地に継代培養した。培養物を、密閉した血清バイアル（１５ｍｌバイアル中１０ｍｌの培地）において３０℃で振盪しながら（Ｉｎｆｏｒｓ　Ｍｕｌｔｉｔｒｏｎシェーカーで２５０ｒｐｍ）インキュベートした。４８時間後、培養培地をろ過し（Ｓｐｉｎ－Ｘカラム）、ＨＰＬＣにより分析した（米国特許出願公開第２００７００９２９５７号明細書に以前記載されたとおり）。ａｌｄ６Δを有する株では、経路副生成物イソブチレートのモル収率が５０％減少した。ＰＮＹ２２３８ベースの株は、より高いグルコース消費及びイソブタノール力価を有することが分かった（クローンＫの結果は、以下の表に示す）。
【０６１７】
【表４４】

表 36. ald6Δ 株におけるイソ酪酸のモル収率

株	関連する表現型	イソ酪酸モル収率 (モル/消費グルコースモル)
PNY2205*	ALD6+, C2 依存性	0.09
PNY2209*	ALD6+, C2 非依存性	0.07
PNY2209	ALD6+, C2 非依存性	0.09
PNY2216 及び 5 つの他の同質遺伝子クローン	ALD6-, C2 非依存性	0.03

* 培養培地に 0.05%エタノールを補足したことを示す。
株は全て、プラスミド pK9G9.OLE1p.ilvD を含んだ。PNY2237 及び PNY2238 由来の株については、提供するデータは 2 つの生物学的レプリケートの平均である。

【０６１８】
実施例４０
部位飽和遺伝子ライブラリの構築及びＰＮＹ２２５９における得られた変異体のイソブタノール生成のスクリーニング
３０９位に全２０個の個々のアミノ酸変化をコードするプライマーを含むリバースプライマー混合物（この例ではＫ９＿３０９ｒと呼ばれる）（表３７）及びフォワードプライマーＫ９＿１３１Ｔ＿０８０２１１ｆ：ＧＧＡＣＴＴＧＡＴＧＴＣＡＣＴＡＴＧＡＴＣ（この例ではＫ９＿１３１Ｔｆと呼ばれる）を用いて、Ｋ９　ＫＡＲＩの位置３０９位を標的化する一部位飽和ライブラリを作成した。変異体Ｋ９ＳＢ２を含むプラスミド（ｐＨＲ８１－ＩＬＶ５ｐ．Ｋ９ＳＢ２．ＴＥＦ１（Ｍ４）ｐ．ｉｌｖＤ（配列番号９３０、「ｐＬＨ７４４」とも称される）。
【０６１９】
簡潔に言えば、メガプライマーをレギュラーＰＣＲによって調製した。メガプライマー

ＰＣＲ混合物は、４５μｌのＳｕｐｅｒＭｉｘ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ、番号１０５７２０６３）、２．０μｌ　Ｋ９＿１３１Ｔｆ（２０μＭ）、２．０μｌ　Ｋ９＿３０９ｒ（２０μＭ）及び１．０μｌ鋳型（５０ｎｇ／μｌ）からなった。メガプライマーを作製するＰＣＲプログラムは以下である：開始温度は９５℃で１．０分間、続いて３５回の加熱／冷却サイクルであった。各サイクルは、９５℃で２０秒間、５５℃で２０秒間、及び７２℃で１．０分間からなった。次にメガプライマーを使用することにより、実施例５に示すものと同じ手順を用いてＫ９ＳＢ２に突然変異を導入した。一部位飽和ライブラリからのクローンを配列決定した。

【０６２０】

得られたユニーク変異体を、ｐＬＨ７４４と共に、酵母におけるイソブタノール生成及び副生成物形成について（各突然変異体につき三回）分析した。ＫＡＲＩベクターを形質転換することにより、ＰＮＹ２２５９（ＭＡＴａ　ｕｒａ３Δ：：ｌｏｘＰ　ｈｉｓ３Δ　ｐｄｃ６Δ　ｐｄｃ１Δ：：Ｐ［ＰＤＣ１］－ＤＨＡＤ｜ｉｌｖＤ＿Ｓｍ－ＰＤＣ１ｔ－Ｐ［ＦＢＡ１］－ＡＬＳ｜ａｌｓＳ＿Ｂｓ－ＣＹＣ１ｔ　ｐｄｃ５Δ：：Ｐ［ＰＤＣ５］－ＡＤＨ｜ｓａｄＢ＿Ａｘ－ＰＤＣ５ｔ　ｇｐｄ２Δ：：ｌｏｘＰ　ｆｒａ２Δ：：Ｐ［ＰＤＣ１］－ＡＤＨ｜ａｄｈ＿Ｈｌ－ＡＤＨ１ｔ　ａｄｈ１Δ：：ＵＡＳ（ＰＧＫ１）Ｐ［ＦＢＡ１］－ｋｉｖＤ＿Ｌｇ（ｙ）－ＡＤＨ１ｔ　ｙｐｒｃΔ１５Δ：：Ｐ［ＰＤＣ５］－ＡＤＨ｜ａｄｈ＿Ｈｌ－ＡＤＨ１ｔ　ｙｍｒ２２６ｃΔ　ａｌｄ６Δ：：ｌｏｘＰ；実施例２２）宿主に酵母経路株を作製した。形質転換細胞をヒスチジン又はウラシル不含合成培地（炭素源として１％エタノール）に播いた。３つの形質転換体を、同じ培地の新鮮なプレートに移した。形質転換体を、４８ウェルプレート（Ａｘｙｇｅｎ，Ｕｎｉｏｎ　Ｃｉｔｙ，ＣＡ　番号３９１－０５－０６１）において、嫌気性条件下でのイソブタノール生成について試験した。

【０６２１】

ＳＥ－Ｕｒａプレート上の形質転換からの酵母コロニーは、５～７日後に現れた。各変異体から３つのコロニーを新鮮なＳＥ－Ｕｒａプレートにパッチし、３０℃で３日間インキュベートした。

【０６２２】

成長培地及び手順

酵母株の成長手順の間、２種類の培地を使用した：好気性前培養培地及び嫌気性培養培地。全ての化学物質は、特に注記されない限り、Ｓｉｇｍａ（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）から入手した。

好気性前培養培地（ＳＥ－Ｕｒａ）：６．７ｇ／Ｌのアミノ酸不含酵母窒素原基礎培地（Ｄｉｆｃｏ，２９１９４０，Ｓｐａｒｋｓ，ＭＤ）、１．４ｇ／Ｌのヒスチジン、ロイシン、トリプトファン及びウラシル不含酵母合成ドロップアウト培地添加剤、０．２％エタノール、０．２％グルコース、０．０１％ｗ／ｖロイシン、０．００２％ｗ／ｖヒスチジン、及び０．００２％ｗ／ｖトリプトファン。

嫌気性培養培地（ＳＥＧ－Ｕｒａ－Ｈｉｓ）：５０ｍＭ　ＭＥＳ（ｐＨ５．５、６．７ｇ／Ｌのアミノ酸不含酵母窒素原基礎培地（Ｄｉｆｃｏ，２９１９４０，Ｓｐａｒｋｓ，ＭＤ）、１．４ｇ／Ｌのヒスチジン、ロイシン、トリプトファン及びウラシル不含酵母合成ドロップアウト培地添加剤、０．１％エタノール、３％グルコース、０．０１％ロイシン、０．００２％ｗ／ｖヒスチジン、０．００２％トリプトファン、３０ｍｇ／Ｌニコチン酸、３０ｍｇ／Ｌチアミン及び１０ｍｇ／Ｌエルゴステロール、５０／５０ｖ／ｖのＴｗｅｅｎ／エタノール溶液中に構成。

【０６２３】

パッチした細胞を４８ウェルプレートに接種した。各ウェルは、１．５ｍｌの好気性培地を含む。プレートを透過性フォイルで被覆し、振盪しながら３０℃で一晩成長させた。次に細胞密度（OD_{600}）を計測した。各ウェルについて最終OD_{600}＝０．２で１．５ｍｌの細胞懸濁液（嫌気性培地中）となる細胞の量を計算し、嫌気性培地に１．５ｍｌ細胞懸濁液を調製し、各ウェルに添加した。４８ウェルプレートの酸素は、嫌気性チャンバ（

Ｃｏｙ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｏｄｕｃｔｓ Ｉｎｃ．Ｇｒａｓｓ Ｌａｋｅ，ＭＩ）を製造者のプロトコルに従い使用して除去した。次に細胞を、振盪しながら３０℃で２日間成長させた。次に細胞密度（$ＯＤ_{600}$）を計測した。最も良好に成長した突然変異体は、イソブタノール生成計測のため、４８ウェルプレートにおいて同じ２日間の成長を経た。２日間の嫌気性成長の後、次に細胞密度（$ＯＤ_{600}$）を計測した。細胞を４，０００ｇで５分間遠心し、ＬＣ／ＭＳを用いたイソブタノール計測のため、上清を回収した。

【０６２４】

Ｋ９　ＫＡＲＩ突然変異体を有する酵母株のＬＣ／ＭＳ分析

嫌気性成長期間の終了時にＬＣＭＳ分析用の試料を採取した。ＬＣＭＳ分析は、Ｗａｔｅｒｓ ＡｃＱｕｉｔｙ ＵＰＬＣ分離ユニット及びＡｃＱｕｉｔｙ ＴＱＤ ｔｒｉｐｌｅ ｑｕａｄ質量分析器（Ｗａｔｅｒｓ，Ｍｉｌｆｏｒｄ，ＭＡ）をＷａｔｅｒｓ ＡｃＱｕｉｔｙ ＵＰＬＣ ＨＳＳ Ｔ３分離カラム（Ｗａｔｅｒｓ，Ｍｉｌｆｏｒｄ，ＭＡ）と共に使用して実施した。９９％水相で始まり９９％有機相で終わる水（＋０．１％ギ酸）及びアセトニトリル（＋０．１％ギ酸）の逆相勾配を用いて、０．５ｍＬ／分の流量で化合物を分離した。Ｗａｔｅｒｓ Ｍａｓｓｌｙｎｘ ４．１ソフトウェア（Ｗａｔｅｒｓ，Ｍｉｌｆｏｒｄ，ＭＡ）を使用してクロマトグラムを分析した。イソブタノールのマイクロモル収率を、Ｗａｔｅｒｓ Ｑｕａｎｌｙｎｘソフトウェア（Ｗａｔｅｒｓ，Ｍｉｌｆｏｒｄ，ＭＡ）を用い、標準のトリプリケート分析の検量線を使用して計算した。

【０６２５】

【表４５】

表 37. リバースプライマー

K9-KARI の 標的位置	プライマー
309	K9_309I_111711r: CTTTCTCATAGCCTTAATGTGGAC(配列番号 884) K9_309L_111711r: CTTTCTCATAGCCTTTAAGTGGAC(配列番号 885) K9_309Y_111711r: CTTTCTCATAGCCTTATAGTGGAC(配列番号 886) K9_309C_111711r: CTTTCTCATAGCCTTACAGTGGAC(配列番号 887) K9_309W_111711r: CTTTCTCATAGCCTTCCAGTGGAC(配列番号 888) K9_309P_111711r: CTTTCTCATAGCCTTTGGGTGGAC(配列番号 889) K9_309H_111711r: CTTTCTCATAGCCTTATGGTGGAC(配列番号 890) K9_309Q_111711r: CTTTCTCATAGCCTTTTGGTGGAC(配列番号 891) K9_309M_111711r: CTTTCTCATAGCCTTCATGTGGAC(配列番号 892) K9_309N_111711r: CTTTCTCATAGCCTTATTGTGGAC(配列番号 893) K9_309V_111711r: CTTTCTCATAGCCTTAACGTGGAC(配列番号 894) K9_309A_111711r: CTTTCTCATAGCCTTAGCGTGGAC(配列番号 895) K9_309D_111711r: CTTTCTCATAGCCTTATCGTGGAC(配列番号 896) K9_309E_111711r: CTTTCTCATAGCCTTTTCGTGGAC(配列番号 897) K9_309G_111711r: CTTTCTCATAGCCTTACCGTGGAC(配列番号 898) K9_309S_111711r: CTTTCTCATAGCCTTAGAGTGGAC(配列番号 899) K9_309T_111711r: CTTTCTCATAGCCTTAGTGTGGAC(配列番号 900) K9_309R_111711r: CTTTCTCATAGCCTTTCTGTGGAC(配列番号 901) K9_309K_111711r: CTTTCTCATAGCCTTCTTGTGGAC(配列番号 902)

【０６２６】

【表４６】

表 38. 2 日間の嫌気的成長後の OD_{600} 及びイソブタノール力価 (mM)を含む一部の変異体のリスト

変異体	アミノ酸配列番号	反復	OD_{600}	イソブタノール力価 (mM)
K9C4	927	1	0.5502	76.99
		2	0.6578	84.05
		3	0.7301	98.91
K9C8	928	1	0.6887	116.57
		2	0.5309	78.77
		3	0.6859	102.49
K9SB2	427	1	0.6314	88.39
		2	0.5977	81.18
		3	0.2325	44.60

【０６２７】

実施例４１

Ｋ９ＳＢ２のトランケート変種であるＫ９ＳＢ２＿ＳＨ（Ｋ９ＳＢ２＿ｓｈｏｒｔ）の構築

最初の５個のＮ末端アミノ酸（ＭＥＥＣＫ）が欠損したＫ９ＳＢ２の変種をコードする遺伝子を、Ｐｈｕｓｉｏｎ（登録商標）ハイフィデリティＰＣＲキット（カタログ番号Ｅ０５５３Ｌ、Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ ＢｉｏＬａｂｓ）によるＰＣＲによって調製した。プライマーＫｓｈｏｒｔ１（ＡＡＡＣＣＧＧＴＴＴＡＡＡＣＡＧＴＡＴＧＧＣＴＡＡＧＡＴＴＴＡＣＴＡＣＣＡＡＧＡＡＧＡＣＴＧ；配列番号９０３）及びＹＧｒｅｖ（ＴＴＣＴＧＴＴＴＴＡＴＣＡＧＡＣＣＧＣＴＴＣ；配列番号９０４）は、Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ ＤＮＡ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ（Ｃｏｒａｌｖｉｌｌｅ ＩＡ）により合成された。プライマー、ｄＮＴＰ混合物（カタログ番号１８４２７－０１３、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）、鋳型、及びddH_2Oの他には、ここで使用した試薬は、上記に示すキットと共に提供された。ＰＣＲ混合物は、ｐＢＡＤ．ＫＡＲＩプラスミド（２０ｎｇ／μｌ；実施例１７に記載されるプラスミド調製物；配列番号４２８）中１μｌのＫ９ＳＢ２、２μｌの各プライマー（２０μＭストック）、１０μｌの５×Ｐｈｕｓｉｏｎ ＨＦ緩衝液、２μｌの５ｍＭ ｄＮＴＰ混合物、０．５μｌポリメラーゼ、及び２８μｌのddH_2Oからなった。ＰＣＲ反応には以下の条件を用いた：開始温度は９８℃で２分間、続いて３０回の加熱／冷却サイクルであった。各サイクルは、９８℃で１０秒間、４８℃で３０秒間、及び７２℃で１．５分間からなった。温度サイクルの完了時に、試料をさらに１０分間７２℃に維持し、次に４℃に維持して試料の回復を待った。反応産物をアガロースゲル電気泳動（ｅｌｅｃｔｒｏｐｈｌｏｒｅｓｉｓ）（１％アガロース、１×ＴＢＥ緩衝液）によって鋳型から分離し、Ｉｌｌｕｓｔｒａ ＧＦＸ（商標）ＰＣＲ ＤＮＡ及びゲルバンド精製キット（カタログ番号２８－９０３４－７０、ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）を製造者の推奨どおり使用して回収した。精製したＰＣＲ産物をＰｍｅＩ及びＳｆｉＩで消化し、ｐＢＡＤ－ｐｓ－ＪＥＡ１（配列番号９０５）の対応する部位にライゲートし、ｐＢＡＤ．ＫＡＲＩにおける得られたコンストラクトＫ９ＳＢ２＿ＳＨの配列（配列番号９２９）を確認した。

【０６２８】

実施例４２

Ｋ９ＳＢ２及び他のＫＡＲＩ酵素の試験用酵母発現プラスミドの作成

ｐＨＲ８１－ＩＬＶ５ｐ－Ｋ９ＳＢ２－ＴＥＦ（Ｍ４）－ＩｌｖＤ（ｐＬＨ７４４；配列番号９３０）の構築：

Ｋ９ＳＢ２遺伝子を、ＰｍｅＩ及びＳｆｉＩ消化によりｐＨＲ８１－ＩＬＶ５ｐ－Ｋ９ＳＢ２から切り出し、ＰｍｅＩ及びＳｆｉＩ部位でｐＨＲ８１－ＩＬＶ５ｐ－Ｋ９Ｄ３－

ＴＥＦ（Ｍ４）－ＩｌｖＤ（ｐＢＰ２０９０）とライゲートした。ライゲートしたベクターをｐＨＲ８１－ＩＬＶ５ｐ－Ｋ９ＳＢ２－ＴＥＦ（Ｍ４）－ＩｌｖＤ（ｐＬＨ７４４）と命名し、このベクターを配列決定により確認した。

【０６２９】

Ｋ９ＳＢ２＿ＳＨ＿ＤＨＡＤ（配列番号９３１）の構築：

消化したＫ９ＳＢ２＿ＳＨ　ＰＣＲ産物（実施例４１に記載される）を、ｐＬＨ７４４のＰｍｅＩ及びＳｆｉＩ部位にライゲートし、配列決定により確認した。

【０６３０】

Ｋ９ＳＢ２＿ＳＨ＿８１（配列番号９３２）の構築

消化したＫ９ＳＢ２＿ＳＨ　ＰＣＲ産物（実施例４１に記載される）を、ｐＨＲ８１－ＰＩｌｖ５－ＫＡＲＩ－Ｋ９．Ｇ９のＰｍｅＩ及びＳｆｉＩ部位にライゲートし、配列決定により確認した。

【０６３１】

Ｋ９ＳＢ２誘導体の酵母発現用プラスミドの構築

ｐＢＡＤ．ＫＡＲＩプラスミドからの対応するＫＡＲＩ遺伝子をプラスミドｐＬＨ７４４及びプラスミドｐＨＲ８１－ＰＩｌｖ５－ＫＡＲＩ－Ｋ９．Ｇ９のＰｍｅＩ及びＳｆｉＩ部位にサブクローニングすることにより、表３９に掲載される変異体（実施例１７及び２１に記載される）用の酵母発現プラスミドを作成した。コンストラクトを配列決定により確認した。

【０６３２】

【表４７】

表 39: 酵母発現プラスミドにサブクローニングしたK9SB2 誘導体

K9SB2 誘導体	別名	アミノ酸配列番号	核酸配列番号
K9SB2-K90M	K9_David	431	432
K9SB2-G55D	K9_Eliza	433	946
K9SB2-Q91L	K9_Frank	440	947
K9SB2-A303D	K9_Grace	445	948
K9SB2-M94-V307I	K9_Ingrid	455	949
K9SB2-F67I	K9_Jarvis	437	950
K9SB2-A56G-K90N	K9_Kelly	452	951
K9SB2-G55C	K9_Norman	481	952
K9SB2-P135S	K9_Ophelia	488	953
K9SB2-F53L	K9_Pat	441	954
K9SB2-Q94I	K9_Quentin	495	955
K9SB2-F67L	K9_Ralph	496	956
K9SB2-K8N-K90M-T141I	K9_Sophia	502	957
K9SB2-E13V-M94I-T141I	K9_Tiberius	509	958
K9SB2-A56V	K9_Ursala	511	959
K9SB2-I84L	K9_Victor	514	960
K9SB2-W59C	K9_Watson	520	961
K9SB2-T93A	K9_Xavier	641	642

【０６３３】

Ｋ９ＳＢ２誘導体のトランケート変種の酵母発現用プラスミドの構築

Ｋ９ＳＢ２誘導体のＮ末端がトランケートされた変種を、実施例４１の記載に変更を加えて調製した。プライマーＫｓｈｏｒｔ１は、Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ（Ｃｏｒａｌｖｉｌｌｅ　ＩＡ）により合成された５’リン酸

化（ｐｈｏｐｈｏｒｙｌａｔｅｄ）プライマーＫＰＳＨ１（ＡＡＡＣＡＧＴＡＴＧ ＧＣＴ ＡＡＧ ＡＴＴ ＴＡＣ ＴＡＣ ＣＡＡ ＧＡＡ ＧＡＣ ＴＧ；配列番号９０６）に置き換えた。ＰＣＲにおけるＫ９ＳＢ２は、表３９に掲載する変異体（ｐＢＡＤ．ＫＡＲＩプラスミド）のプール混合物に置き換えた。精製したＰＣＲ産物はＳｆｉＩで消化し、ｐＨＲ８１－ＰＩｌｖ５－ＫＡＲＩ－Ｋ９．Ｇ９のＰｍｅＩ及びＳｆｉＩ部位にライゲートした。ＴｅｍｐｌｉＰｈｉ（商標）（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）及びプライマーｐＨＲ８１－Ｆ（ＡＣＡＣＣＣＡＧＴＡＴＴＴＣＣＣＴＴＴＣＣ）及びｐＨＲ８１－Ｒｅｖ（ＣＴＡ ＧＴＧ ＴＡＣ ＡＧＡ ＴＧＴ ＡＴＧ ＴＣＧ Ｇ）（配列番号９２４及び９２５）によるＤＮＡ配列決定を実施して、各トランケート誘導体を同定した。同定された変異体を表４０に示す。続いてトランケート変種のコード配列をプラスミドｐＬＨ７４４のＰｍｅＩ及びＳｆｉＩ部位にサブクローニングし、配列決定により確認した。

【０６３４】
【表４８】

表 40. K9SB2 誘導体のトランケート変種

変異体	アミノ酸配列番号	核酸配列番号
K9_David_SH	196	263
K9_Eliza_SH	266	907
K9_Frank_SH	267	908
K9_Grace_SH	389	909
K9_Ingrid_SH	405	910
K9_Jarvis_SH	781	911
K9_Kelly_SH	782	912
K9_Norman_SH	783	913
K9_Ophelia_SH	835	914
K9_Pat_SH	853	915
K9_Quentin_SH	854	916
K9_Ralph_SH	855	917
K9_Ursala_SH	856	918
K9_Watson_SH	857	858
K9_Xavier_SH	859	919

【０６３５】
Ｋ９＿Ｚｅｋｅ＿ＳＨ（Ｋ９ＳＢ２－Ｋ９０Ｍ－Ｔ９３Ａ）及びＫ９＿Ａｎｎａｂｅｌ＿ＳＨ（Ｋ９ＳＢ２－Ｋ９０Ｍ－Ｔ９３Ｉ）の構築

Ｋ９＿Ｚｅｋｅ＿ＳＨ（配列番号８６０、タンパク質配列番号８６１）及びＫ９＿Ａｎｎａｂｅｌ＿ＳＨ（配列番号８６２、タンパク質配列番号８６３）は、ＱｕｉｋＣｈａｎｇｅ（登録商標）Ｌｉｇｈｔｎｉｎｇ部位特異的突然変異誘発キット（カタログ番号２１０５１８；Ａｇｉｌｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ Ｐｒｏｄｕｃｔｓ Ｄｉｖｉｓｉｏｎ，Ｌａ Ｊｏｌｌａ，ＣＡ）を用いた部位特異的突然変異誘発によってＫ９＿Ｄａｖｉｄ＿ＳＨから誘導した。プライマー、鋳型、及びddH_2Oを除いては、ここで使用した全ての試薬は、上記に指示するキットと共に提供された。プライマーは、Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ ＤＮＡ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ（Ｃｏｒａｌｖｉｌｌｅ ＩＡ）により合成された。

【０６３６】
Ｋ９＿Ｚｅｋｅ＿ＳＨについて、用いたプライマーは、ｏＭＴ９３Ａ（ＧＡＴＣＣＣＡＧＡＴＧＡＡＡＴＧＣＡＧＧＣＴＧＣＣＡＴＧＴＡＣＡＡＡＡＡＣＧＡＣＡＴＣＧ；配列

番号９２０））及びｏＭＴ９３Ａｒｅｖ（ＣＧＡＴＧＴＣＧＴＴＴＴＴＧＴＡＣＡＴＧＧＣＡＧＣＣＴＧＣＡＴＴＴＣＡＴＣＴＧＧＧＡＴＣ；配列番号９２１）であった。反応混合物は、ｐＨＲ８１－ＰＩｌｖ５－ＫＡＲＩ－Ｋ９．Ｇ９誘導ベクター（２０ｎｇ／μｌ）中の１μｌ　Ｋ９＿Ｄａｖｉｄ＿ＳＨ、１μｌの各プライマー（１５０ｎｇ／ｕｌ）、５μｌの１０×反応緩衝液、１μｌのｄＮＴＰ混合物、１．５μｌ　ＱｕｉｋＳｏｌｕｔｉｏｎ、１ｕｌ　ＱｕｉｋＣｈａｎｇｅ　Ｌｉｇｈｔｎｉｎｇ酵素、及び３８．５μｌ　ｄｄH_2Oを含んだ。Ｋ９＿Ａｎｎａｂｅｌ＿ＳＨは、プライマーをｏＭＴ９３Ｉ（ＧＡＴＣＣＣＡＧＡＴＧＡＡＡＴＧＣＡＧＧＣＴＡＴＣＡＴＧＴＡＣＡＡＡＡＡＣＧＡＣＡＴＣＧ；配列番号９２２）及びｏＭＴ９３Ｉｒｅｖ（ＣＧＡＴＧＴＣＧＴＴＴＴＴＧＴＡＣＡＴＧＡＴＡＧＣＣＴＧＣＡＴＴＴＣＡＴＣＴＧＧＧＡＴＣ；配列番号９２３）に置き換えた。

【０６３７】

双方の反応とも、以下の条件を用いた：開始温度は９５℃で２分間、続いて１８回の加熱／冷却サイクルであった。各サイクルは、９５℃で２０秒間、６０℃で１０秒間、及び６８℃で６分間からなった。温度サイクルの完了時に、試料を４℃に保って試料の回復を待った。２μｌのＤｐｎ　Ｉを各反応物に添加し、混合物を３７℃で１時間インキュベートした。２μｌの各突然変異誘発反応物を、Ｏｎｅ　Ｓｈｏｔ（登録商標）Ｓｔｂｌ３（商標）化学的コンピテント大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号Ｃ７３７３－０３）に、製造者の指示に従い形質転換した。形質転換体を、ＬＢ培地及び１００μｇ／ｍｌアンピシリンを含有する寒天プレート（カタログ番号Ｌ１００４、Ｔｅｋｎｏｖａ　Ｉｎｃ．Ｈｏｌｌｉｓｔｅｒ，ＣＡ）に広げ、３７℃で一晩インキュベートした。次に複数の形質転換体を、プライマーｐＨＲ８１－Ｆ（ＡＣＡＣＣＣＡＧＴＡＴＴＴＣＣＣＴＴＴＣＣ；配列番号９２４）及びｐＨＲ８１－Ｒｅｖ（ＣＴＡ　ＧＴＧ　ＴＡＣ　ＡＧＡ　ＴＧＴ　ＡＴＧ　ＴＣＧ　Ｇ；配列番号９２５）を用いたＴｅｍｐｌｉＰｈｉ（商標）ＤＮＡ　ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ（商標）（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）に対して選択した。確認された配列を有する変異体（ｐＨＲ８１－ＰＩｌｖ５－ＫＡＲＩ－Ｋ９．Ｇ９誘導ベクターのＫ９＿Ｚｅｋｅ＿ＳＨ及びＫ９＿Ａｎｎａｂｅｌ＿ＳＨ）を、ｐＬＨ７４４（配列番号９３０）のＰｍｅＩ及びＳｆｉＩ部位にサブクローニングした。

【０６３８】

実施例４３

４８ウェルプレートにおいて嫌気性条件下で成長させるＫ９ＳＢ２及び誘導体のイソブタノール生成

実施例４２に記載されるとおりｐＬＨ７４４から誘導したベクターで調製した、Ｋ９ＳＢ２、Ｋ９ＳＢ２＿ＳＨ、及びＫ９ＳＢ２－Ｔ９３Ａの酵母発現プラスミドを用いて、４８ウェルプレートにおいて嫌気性条件下で成長させた酵母のイソブタノール生成を評価した。イソブタノール生成株は、ＫＡＲＩ変異体のコード配列を含むプラスミドを形質転換してウラシル不含合成培地（炭素源として１％エタノール）に播くことにより、宿主ＰＮＹ２２５９（ＭＡＴａ　ｕｒａ３Δ：：ｌｏｘＰ　ｈｉｓ３Δ　ｐｄｃ６Δ　ｐｄｃ１Δ：：Ｐ［ＰＤＣ１］－ＤＨＡＤ｜ｉｌｖＤ＿Ｓｍ－ＰＤＣ１ｔ－Ｐ［ＦＢＡ１］－ＡＬＳ｜ａｌｓＳ＿Ｂｓ－ＣＹＣ１ｔ　ｐｄｃ５Δ：：Ｐ［ＰＤＣ５］－ＡＤＨ｜ｓａｄＢ＿Ａｘ－ＰＤＣ５ｔ　ｇｐｄ２Δ：：ｌｏｘＰ　ｆｒａ２Δ：：Ｐ［ＰＤＣ１］－ＡＤＨ｜ａｄｈ＿Ｈｌ－ＡＤＨ１ｔ　ａｄｈ１Δ：：ＵＡＳ（ＰＧＫ１）Ｐ［ＦＢＡ１］－ｋｉｖＤ＿Ｌｇ（ｙ）－ＡＤＨ１ｔ　ｙｐｒｃΔ１５Δ：：Ｐ［ＰＤＣ５］－ＡＤＨ｜ａｄｈ＿Ｈｌ－ＡＤＨ１ｔ　ｙｍｒ２２６ｃΔ　ａｌｄ６Δ：：ｌｏｘＰ）に作製した。ＳＥ－Ｕｒａプレート上の形質転換からの酵母コロニーは、３０℃でインキュベートして３～５日後に出現した。各変異体の少なくとも３つのコロニーを新鮮なＳＥ－Ｕｒａプレートにパッチし、３０℃でインキュベートした。

【０６３９】

酵母培養条件：

好気性培養培地：２ｇ／ｌエタノールを含むＳＥ －Ｕｒａ培地。
【０６４０】
嫌気性培養培地：１０ｍｇ／ｌエルゴステロール、５０ｍＭ ＭＥＳ緩衝液（ｐＨ５．５）、３０ｍｇ／ｌチアミン、及び３０ｍｇ／ｌニコチン酸を補足した、３０ｇ／ｌグルコース及び１ｇ／ｌエタノールを含むＳＥＧ －Ｕｒａ。
【０６４１】
４８ウェルプレート：Ａｘｙｇｅｎ カタログ番号Ｐ－５ＭＬ－４８－Ｃ－Ｓ、５ｍｌ／ウェル総容積、１．５ｍｌ／ウェルの培養容積。
【０６４２】
好気性培養は、プレートを透過性接着フィルム（ＶＷＲ；カタログ番号６０９４１－０８６）で被覆した。プレートを３０℃において２２５ｒｐｍで振盪した。嫌気性培養は、透過性フィルムで被覆した新しく接種したプレートの酸素を、嫌気性チャンバで２時間平衡化させることによりパージした。次にプレートの覆いを接着アルミニウムカバー（ＶＷＲ；カタログ番号８９０４９－０３４）に交換し、各プレートを、気密性プラスチックボックス（Ｍｉｔｓｕｂｉｓｈｉ Ｇａｓ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ａｍｅｒｉｃａ，Ｉｎｃ；Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ＮＹ；カタログ５０－２５）の中に、新鮮な酸素捕捉剤パック（Ｍｉｔｓｕｂｉｓｈｉ Ｇａｓ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ａｍｅｒｉｃａ，Ｉｎｃ；Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ＮＹ；カタログ１０－０１）と共に置いた。集合体全体（密閉された気密性プラスチックボックスの中の１つ又は複数のプレート及び酸素捕捉剤パック）を嫌気性チャンバから取り出し、３０℃において２２５ｒｐｍで振盪した。
【０６４３】
実験プロトコル
ＳＥ－ Ｕｒａ寒天プレート上の単一の酵母コロニーを新鮮なＳＥ－ Ｕｒａ寒天プレートにストリークし、高密度の細胞パッチが成長するまで３０℃でインキュベートした。最初の好気性培養のため、４８ウェルプレートの液体前培養物にこれらの細胞のループを接種した。一晩振盪した後、各ウェルの０．１５ｍｌを平底９６ウェルプレートに移し、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｖｉｃｅｓ（Ｓｕｎｎｙｖａｌｅ，ＣＡ）プレートリーダーで各ウェルの６００ｎｍの吸光度を計測することにより、各培養ウェルのOD_{600}を計測した。実験的に決定された検量線に基づく線形形質転換をこれらのプレートリーダー計測光学濃度に適用することにより、それらの光学濃度をキュベットベースの分光光度計の比較可能な吸光度値に変換した。
【０６４４】
各好気性前培養ウェルの計算した部分量を、０．２の（キュベット分光光度計吸光度単位で）初期OD_{600}に達するように１．５ｍｌのＳＥＧ －Ｕｒａ培地を含む新鮮な４８ウェルプレートの対応するウェルに接種した。新鮮なプレートの接種過程で好気性前培養プレートを遠心し、各ウェルから上清を除去し、各ウェルの細胞を新鮮なＳＥＧ －Ｕｒａ培地に再懸濁した。この嫌気性培養プレートを３日間振盪した。培養上清のイソブタノール濃度をＨＰＬＣにより計測した（表４１）。
【０６４５】
【表４９】

表41.1回目の嫌気性継代サイクルで達成されたイソブタノール力価

変異体	ウェル数	平均イソブタノール力価(mM)	イソブタノール力価の標準偏差(mM)
K9SB2	16	35.2	11.9
K9SB2_SH	8	67.4	12.2
K9SB2-T93A	8	40.8	9.1

【０６４６】

フォローアップの嫌気性培養を最初の嫌気性培養物から以下のとおり開始した：各嫌気性培養ウェルの計算した部分量を、０．２の（キュベット分光光度計単位で）初期OD_{600}に達するように１．５ｍｌのＳＥＧ　－Ｕｒａ培地を含む新鮮な４８ウェルプレートの対応するウェルに接種した。新鮮なプレートの接種過程で成長プレートを遠心し、各ウェルから上清を除去し、各ウェルの細胞を新鮮なＳＥＧ　－Ｕｒａ培地に再懸濁することにより、ある培養から次の培養への代謝産物のキャリーオーバーを最小限に抑えた。フォローアップ（２回目のサイクル）の嫌気性培養プレートを２日間振盪した。培養上清のイソブタノール濃度をＨＰＬＣにより計測した（表４２）。

【０６４７】

【表５０】

表 42. 2 回目の嫌気性継代サイクルで達成されたイソブタノール力価

変異体	ウェル数	平均イソブタノール力価(mM)	イソブタノール力価の標準偏差(mM)
K9SB2	16	67.6	10.8
K9SB2_SH	8	85.7	9.2
K9SB2-T93A	8	76.3	16.8

【０６４８】

実施例４４

Ｋ９Ｇ９、Ｋ９ＳＢ２、及びＫ９ＳＢ２＿ＳＨの動態特性決定

Ｋ９Ｇ９、Ｋ９ＳＢ２、Ｋ９ＳＢ２＿ＳＨを、動態パラメータの詳細な計測のため、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）株Ｂｗ２５１１３（ΔｉｌｖＣ）においてｐＢＡＤ．ＫＡＲＩプラスミドにより過剰発現させて精製した。

【０６４９】

発現、精製及び補因子動態解析を、実施例１８の記載に以下の変更を加えて実施した。発現培養物は、１２５ｍＬベント付きキャップフラスコ中の、１００μｇ／ｍｌアンピシリン及び０．２％（ｗ／ｖ）アラビノースを含む２０ｍＬのＬＢで成長させた。発現培地には、１／１０容積の８時間培養物を接種した。発現培養物は、Ｋ９　ＳＢ２について１８時間、及びＫ９ＳＢ２＿ＳＨについて２４時間成長させた。

【０６５０】

【表５１】

表 43. NADH 及び NADPH による反応を比較する動態パラメータ

変異体	配列番号	V_{max} NADPH, U/mg	K_m NADPH, μM	V_{max}/K_m NADPH, L/min*mg	V_{max} NADH, U/mg	K_m NADH, μM	V_{max}/K_m NADH, L/min*mg
K9G9	644	2.2	24.1	0.091	1.9	78.2	0.024
K9SB2	427	1.7	44.8	0.038	1.8	11.6	0.155
K9SB2_SH	637	1.7	109.9	0.015	1.7	13.3	0.128

【０６５１】

実施例４５

Ｋ９ＳＢ２及び誘導体のイソブタノール生成

４８ウェルプレートにおけるイソブタノール生成分析を、実施例４２の記載に以下の変更を加えて実施した。好気性及び嫌気性培養培地は実施例１９に記載されるものと同じで、但し０．０１％ｗ／ｖのヒスチジンを添加した。好気性前培養物のOD_{600}値は、Ｃａｒｙ　３００分光光度計（Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｗｉｌｍｉｎｇｔｏ

ｎ，ＤＥ）を使用して計測した。Ｍ－２０ローター（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ）を備えたＨｅｒａｅｕｓ　Ｍｕｌｔｉｆｕｇ　Ｘ１Ｒを使用して好気性前培養細胞をペレット化し、使用済み培養培地は廃棄した。細胞ペレットを含むプレートをＣｏｙ嫌気バッグ（Ｇｒａｓｓ　Ｌａｋｅ，ＭＩ）に移し、各ペレットに１００μＬの嫌気性培養培地を添加した。嫌気性培養培地は少なくとも２４時間脱気させてから、４８ウェルプレートに１．５ｍＬアリコートを入れた；このプロセスは嫌気バッグ内で実施した。嫌気性培養プレートに適切な容量の細胞懸濁液を接種し、接着アルミニウムフォイルで被覆した。プレートをＭＣＧ　２．５Ｌ　ＡｎａｅｒｏＰａｃｋシステム（ＭＣＧ，日本）内に置いた。ボックスを密封して嫌気バッグから取り出し、３０℃のインキュベーターに２２０ｒｐｍで振盪しながら８０時間置いた。変異体１つにつき３つの形質転換体を分析し、Ｋ９Ｄ３及びＫ９２Ｂ２について６つの形質転換を分析した（表４４）。

【０６５２】

【表５２】

表 44. イソブタノール力価

変異体	配列番号	イソブタノール力価, mM
K9D3	645	76.4 ± 9.7
K9SB2	427	93.8 ± 3.3
K9_Frank	440	27.8 ± 0.5
K9_Grace	445	89.4 ± 15.5
K9_Ingrid	455	88.3 ± 5.4
K9_Jarvis	437	91.8 ± 5.8
K9_Kelly	452	40.9 ± 4.5
K9_Norman	481	66.2 ± 10.6
K9_Ophelia	488	28.3 ± 5.3
K9_Pat	441	77.1 ± 25.6
K9_Quentin	495	80.1 ± 10.8
K9_Ralph	496	82.1 ± 21.3
K9_Sophia	502	25.3 ± 13.4
K9_Tiberius	509	11.4 ± 10.4
K9_Ursala	511	57.3 ± 26.2
K9_Victor	514	93.0 ± 11.4

【０６５３】

選択変異体に対し、実施例１９の記載に以下の変更を加えて血清バイアルにおけるイソブタノール生成分析を実施した。ＫＡＲＩ変異体は、実施例４２に記載されるとおり調製したｐＬＨ７４４から誘導したプラスミドから、酵母において発現させた。好気性前培養培地及び嫌気性成長培地の双方に、終濃度が０．０１％ｗ／ｖとなるようにヒスチジンを添加した。変異体１つにつき３つ又は４つの形質転換体を分析した（表４５、表４６、及び表４７）。

【０６５４】

【表５３】

表 45. イソブタノール力価実験１

変異体	配列番号	継代	時間	イソブタノール力価、mM	イソブタノール/グリセロール	
K9SB2	427	1	75	28.2 ± 6.85	2.11 ± 0.16	
K9SB2_SH	637	1	75	87.9 ± 1.04	2.49 ± 0.04	
K9SB2	427	2	48	85.0 ± 4.35	2.67 ± 0.06	
K9SB2_SH	637	2	48	97.4 ± 4.79	2.49 ± 0.07	

【０６５５】

【表５４】

表 46. イソブタノール力価実験２

変異体	配列番号	継代	時間	イソブタノール力価、mM	イソブタノール/グリセロール
K9SB2	427	1	44	30.2 ± 4.1	2.30 ± 0.15
K9SB2_SH	637	1	44	40.3 ± 5.6	2.41 ± 0.07
K9_David	431	1	44	36.2 ± 3.5	2.40 ± 0.10
K9_David_SH	196	1	44	41.9 ± 6.4	2.37 ± 0.04
K9_Grace	445	1	44	40.2 ± 5.5	2.30 ± 0.05
K9_Pat	441	1	44	29.0 ± 3.1	2.35 ± 0.10
K9SB2	427	2	46	59.2 ± 0.6	2.61 ± 0.03
K9SB2_SH	637	2	46	74.8 ± 3.0	2.58 ± 0.03
K9_David	431	2	46	63.8 ± 0.6	2.65 ± 0.06
K9_David_SH	196	2	46	76.7 ± 1.5	2.53 ± 0.04
K9_Grace	445	2	46	62.3 ± 3.1	2.52 ± 0.07
K9_Pat	441	2	46	50.1 ± 2.1	2.48 ± 0.07

【０６５６】

【表５５】

表 47 イソブタノール力価

変異体	配列番号	継代	時間	イソブタノール力価, mM
K9SB2	427	2	50	66.2 ± 1.8
Annabel_SH	862	2	50	74.4 ± 2.4
Zeke_SH	860	2	50	76.8 ± 8.3

【０６５７】

HMMER2.0 [2.2g]
NAME Functionally Verified KARIs
LENG 354

ALPH Amino

MAP yes

COM hmmbuild -n Functionally Verified KARIs exp-KARI.hmm exp-KARI_mod.aln

COM hmmcalibrate exp-KARI.hmm
NSEQ 25
DATE Mon Dec 8 17:34:51 2008

XT -8455 -4 -1000 -1000 -8455 -4 -8455 -4
NULT -4 -8455

NULE 595 -1558 85 338 -294 453 -1158 197 249 902 -1085 -142 -21 -313 45 531 201 384 -1998 -644
EVD -333.712708 0.110102

ファイルフォーマットバージョン：この保存ファイルフォーマットの一意の識別名。
プロファイル HMM 名
モデル長さ：モデル中の一致状態の数。
記号アルファベット：これは記号アルファベット及び記号出力確率分布のサイズを決定する。Amino の場合、アルファベットサイズは 20、記号アルファベットは「ACDEFGHIKLMNPQRSTVWY」(アルファベット順) に設定される。
マップアノテーションフラグ：yes に設定した場合、ファイルのメインセクションにおける一致状態 / コンセンサス列データの各行の後に、さらなる数字が続く。この数字は、一致状態を作り出したアラインメント列のインデックスを示す。この情報は、アラインメントの列 (1... アラインメント長) に対する一致状態 (1...M) の「マップ」を提供する。これは、例えば hmmalign -mapali の使用時、モデルを再び元のアラインメントと速やかにアラインメントするために用いられる。

保存ファイルを変更する HMMER コマンド毎のコマンドライン：これは、保存ファイルの作成に hmmbuild (デフォルトパラメータ) が適用されたことを意味する。
保存ファイルを変更する HMMER コマンド毎のコマンドライン：これは、保存プロファイルに hmmcalibrate (デフォルトパラメータ) が適用されたことを意味する。
配列数：HMM が訓練された配列の数
作成日：いつ保存ファイルが作成されたか。
Plan7 モデルのアルゴリズム固有パートの制御パートについての 8 つの「特別な」遷移。これらをモデル確率に変換し戻すために用いられる帰無確率 (null probability) は、1.0 である。8 フィールドの順番は、N->B、N->N、E->C、E->J、C->T、C->C、J->B、J->J である。
帰無モデル (単一の G 状態) の遷移確率分布。
極値分布パラメータμ及びλのそれぞれ：双方とも浮動小数点値。これらの値は hmmcalibrate によるモデルの較正時に設定される。これらはビットスコアの E 値の決定に用いられる。

HMM	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	アラインメントにおける位置
	m->m	m->i	m->d	i->m	i->i	d->m	d->d	b->m	m->e												
	-650	*	-1463																		
1(Q)	-648	-1356	-136	-44	-1453	-1166	-219	-1455	321	-1417	-911	-227	-1496	3263	122	-643	-684	-1239	-1542	-1030	7100%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-38	-5840	-6882	-894	-1115	-701	-1378	-650	*												
2(M)	-4231	-3929	-5216	-5402	-3438	-4370	-4528	-3232	-5113	-2613	5320	-5052	-4790	-4977	-4823	-4692	-4459	-3629	-4103	-4017	7200%
-	-147	-501	232	42	-382	397	104	-625	209	-467	-722	276	396	44	95	361	121	-368	-296	-251	
-	-3303	-3318	-325	-3473	-136	-701	-1378	*	*												
3(F)	-1308	-1104	-2227	-2120	3516	-2093	-244	-196	-1891	64	66	-1626	-2278	-1503	-1798	-1617	-1350	-389	305	1335	8600%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-38	-5840	-6882	-894	-1115	-943	-1060	*	*												
4(A)	1616	-1744	1125	33	-2015	-1540	-262	-1686	937	-1765	-911	-252	-1658	154	-383	-488	640	-3	-2038	-1421	8700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-901	-7402	-1125	-894	-1115	-2352	-314	*	*												
5(C)	-346	2578	1084	-712	2092	-1540	-384	-167	-624	-482	125	-731	-1705	-451	-883	-631	-338	-50	-774	-133	8800%
-	-149	-500	235	43	-381	398	106	-626	210	-466	-721	275	394	45	96	359	118	-369	-295	-249	
-	-1009	-1006	-7567	-131	-3527	-1916	-444	*	*												
6(S)	800	-586	-1937	-1415	-821	-1740	-954	1279	-1204	-584	19	-1258	-1964	-1013	-1358	1715	-476	1117	-1320	-938	9000%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-17	-6953	-7995	-894	-1115	-146	-3378	*	*												
7(K)	-956	-2411	-803	501	-2743	-1919	-558	-2483	2435	-2420	-1502	57	-2010	1146	458	829	224	-2040	-2577	-1913	9100%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
8(V)	-2472	-2010	-5089	-4702	-2534	-4789	-4391	2241	-4574	-151	-1318	-4442	-4600	-4417	-4628	-4080	-82	3023	-3952	-3510	9200%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												

【表５７】

9(Y)	-4673	-3685	-5210	-5505	2423	-5069	-1332	-3424	-5065	-392	-2838	-3726	-4920	-3835	-4458	-4313	-4533	-3643	-581	4349	9300%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*													
-																					
10(Y)	-2170	-2625	-2489	-2097	-1555	-2986	-1481	-2628	906	-2674	-2098	-2051	-3206	-1513	-1078	-2258	1039	-2435	-2009	4185	9400%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
-																					
11(D)	-2498	-4412	3500	1042	-4581	-2437	-1765	-4500	733	-4361	-3682	515	-2961	-1429	-2799	-2158	-2558	-3974	-4550	-3541	9500%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
-																					
12(K)	11	-2371	348	819	-2692	-535	-527	-2443	2294	-2387	-1461	590	-1960	-68	904	-67	-837	-1993	-2554	-1871	9600%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
-																					
13(D)	-2663	-4633	3700	580	-4789	-2487	-1872	-4738	731	-4578	-3963	-1073	-3046	-1551	-2967	-2292	-2742	-4201	-4759	-3709	9700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
-																					
14(C)	2503	3193	-4266	-3818	-2010	-3276	-2896	762	-3517	-1437	-1051	-3233	-3509	-3212	-3411	-2499	-1792	1507	-2796	-2431	9800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
-																					
15(D)	-1363	-2905	2748	542	-3202	-2072	-920	-2977	290	-2912	-2023	1270	-2294	-489	-1186	53	1116	-2518	-3086	-2349	9900%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
-																					
16(L)	-1268	-1113	-3338	-540	-1057	-2827	-1716	569	-2409	2299	-236	-2381	-2862	-2089	-2316	-232	-1213	1306	-1645	-1304	10000%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
-																					
17(S)	-1350	-2877	588	1045	-3189	-496	-920	-2963	-628	-2901	-2011	1860	-2289	-489	-1184	2139	190	-2503	-3077	-2343	10100%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-2336	-8139	-325	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
-																					
18(G)	-454	-832	-968	-1110	-2112	3143	-1211	-2091	-1317	-2264	-1691	-878	-1499	-1202	-1421	-646	-774	-1550	-1916	-1919	10200%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-38	-5840	-6882	-894	-1115	-3098	-179	*	*												
-																					
19(H)	-898	-1313	-545	-482	-320	-1336	4297	-1552	-160	-1493	-1035	-579	-1675	-363	-322	-934	-951	-1354	-725	107	10300%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-38	-5840	-6882	-894	-1115	-3098	-179	*	*												
-																					
20(D)	-872	-1812	3234	432	-2215	-967	-433	-2172	-569	-2269	-1704	99	-1453	-184	-1141	-728	-973	-1814	-2146	-1646	10400%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-38	-5840	-6882	-894	-1115	-3098	-179	*	*												
-																					
21(E)	-766	-1695	521	2831	-2050	-1029	-293	-1604	-118	-1919	-1331	69	-1441	-4	-527	-653	-814	-1512	-1988	-1505	10500%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-38	-5840	-6882	-894	-1115	-3098	-179	*	*												
-																					
22(Y)	-1337	-1228	-1681	-1596	1268	-1957	121	-918	-1294	-769	-585	-1229	-2163	-1111	-1301	-1443	-1359	-932	592	3932	10600%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-38	-5840	-6882	-894	-1115	-109	-3775	*	*												
-																					
23(I)	-2294	-1931	-4749	-4227	-1724	-4227	-3320	2306	-3952	1990	-634	-3878	94	-3538	-3812	-3411	-2247	1576	-2891	-2629	10700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	98	359	117	-369	-294	-249	

【０６５９】

【表５８】

| | | |

【表５９】

38(G)	677	-2128	-3838	-4171	-4647	3536	-3816	-4506	-4340	-4749	-3857	-3009	-3149	-3871	-4137	-1784	-2005	-3297	-4725	-4735	13700%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
39(H)	-2667	-3375	-2682	-2114	-3744	-3201	4738	-3782	-445	-3553	-2868	-2112	866	-1265	1506	-2614	-2557	-3469	-3282	-2908	13800%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
40(A)	3631	-2768	-4492	-4815	-4888	-2992	-4271	-4781	-4818	-5025	-4365	-3727	-3728	-4477	-4545	-2567	-2762	-3852	-4724	-4942	13900%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
41(H)	-3103	-3404	-2950	-2573	-783	-3679	4549	-3407	-1372	-3071	-2715	-2454	-3764	2546	-1428	-2990	-2978	-3308	2269	-295	14000%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
42(A)	3357	-1795	-4134	-4277	-4057	-2118	-3548	-3549	-4035	-4024	-3192	-2817	-2900	-3608	-3823	217	-1660	-276	-4363	-4211	14100%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
43(Q)	-1061	1950	-2044	-1475	-1236	-2372	-1154	-789	-1218	1082	1123	743	-2446	2895	-1441	-1392	-1005	-693	-1678	-1278	14200%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
44(N)	-1000	-4117	-3389	-3749	-5073	-3911	-4123	-6022	-4503	-5797	-5419	4397	-4479	-4255	-4592	-4115	-4312	-5371	-4650	-4731	14300%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
45(L)	-4414	-3800	-5638	-5628	-2290	-4980	-4628	-1886	-5423	3316	-1236	-5514	-4997	-4750	-5002	-5379	-4399	-2629	-3665	-3690	14400%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-468	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
46(R)	-1731	-3015	275	-931	-3487	-2518	-973	-3116	2321	-2955	-2123	224	-2603	256	2808	-1596	-1613	-2730	-2995	-2515	14500%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-468	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
47(D)	-2896	-4843	3855	944	-5037	-2800	-2082	-5082	-2528	-4903	-4373	-1209	-3196	-1768	-3536	-2501	-3007	-4517	-5004	-3956	14600%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
48(S)	-1536	-2212	-2363	-2678	-4293	-2279	-3082	-4365	-3331	-4524	-3676	288	-3026	-2967	-3497	3508	-1962	-3259	-4477	-4066	14700%			
-	-148	-500	232	44	-381	398	105	-627	211	-465	-721	275	393	45	95	360	118	-370	-295	-250				
-	-155	-3318	-9181	-2405	-302	-701	-1378	*	*															
49(G)	-2521	-3968	1232	-911	-4849	3373	-2126	-4854	-2535	-4752	-4136	-53	-3115	-1836	-3440	-2284	-2716	-4157	-4880	-3914	15400%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-468	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
50(V)	-2767	-2324	-5232	-4770	396	-4827	-3784	-36	-4546	848	-611	-4472	-4518	-3980	-4367	-4081	-2716	3323	-3037	-2660	15500%			
-	-148	-500	233	43	-381	399	106	-626	211	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-148	-3381	-9181	-203	-2928	-701	-1378	*	*															
51(D)	-1684	-3285	2735	2014	-3554	-2196	-1177	-3350	92	-3279	-2427	692	-2505	-770	-1595	-1483	-1666	332	-3460	-2676	15700%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
52(V)	-3122	-2868	-5092	-5160	-3522	-4180	-4687	-905	-5060	-2626	-2570	-4662	-4579	-4940	-4923	-4013	-3297	3796	-4414	-4190	15800%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				

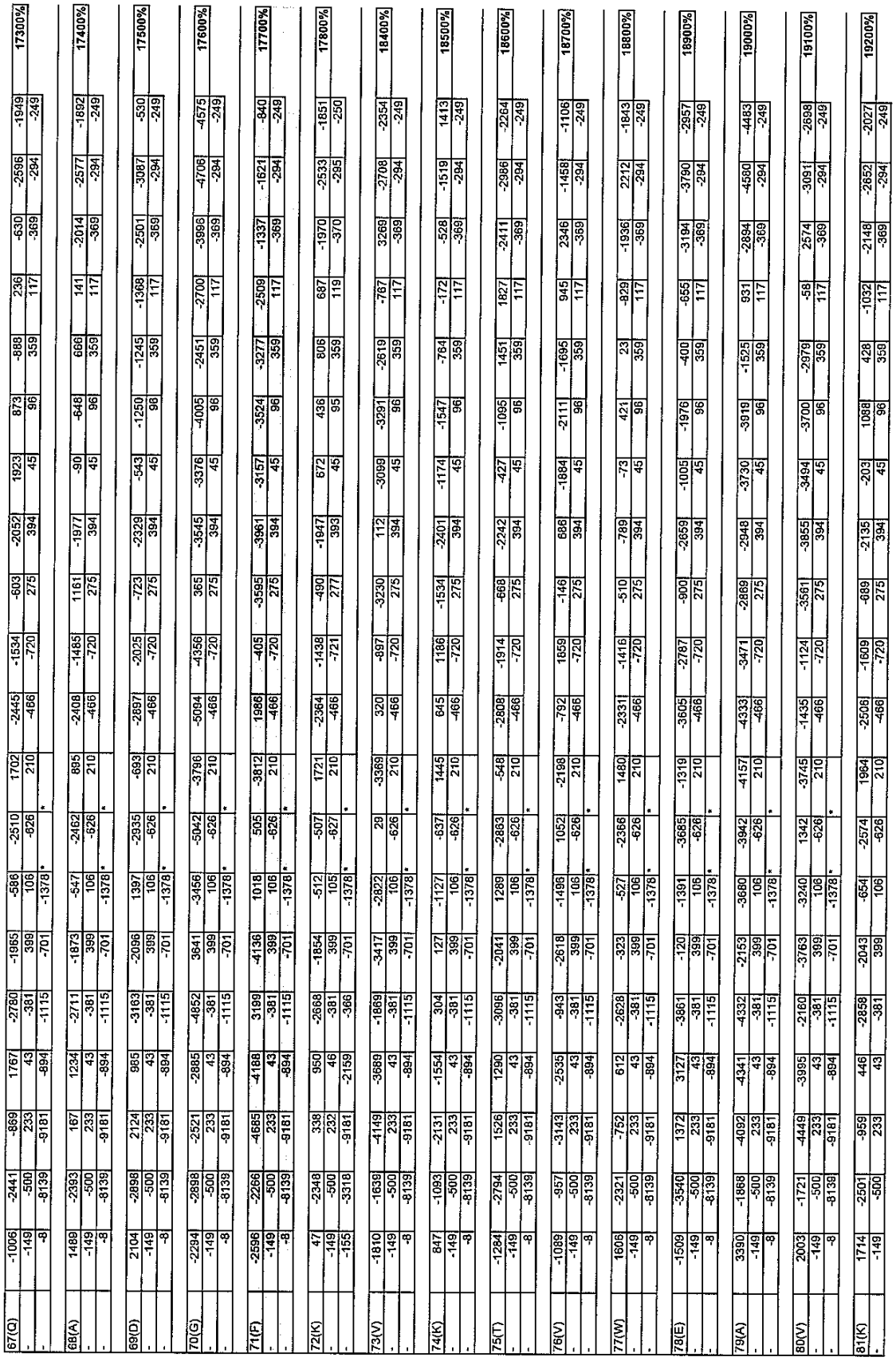
【０６６１】

【表６０】

-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																		
53(V)	369	366	-3075	-2462	-883	-2557	-1420	1415	378	-757	-117	-2098	-2610	-1809	-2037	-1630	1166	2145	-1385	-343	16900%						
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249							
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																		
54(V)	-2624	-2122	-5302	-4991	-2772	-5108	-5139	2623	-4948	-1533	-1475	-4794	-4871	-4894	-5106	-4488	-2620	3088	-4511	-3996	16000%						
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249							
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																		
55(G)	929	-2107	-3852	-4182	-4633	3492	-3809	-4486	-4335	-4732	-3835	-2897	-3132	-3863	-4127	-1761	-1982	-3275	-4720	-4725	16100%						
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249							
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																		
56(L)	-3427	-2938	-5791	-5325	-1449	-5374	-4410	-543	-5063	3041	-255	-5207	-4820	-4126	-4691	-4757	-3351	883	-3184	-3234	16200%						
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249							
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																		
57(R)	-3040	-3724	-3266	82	-4820	-3470	-1396	-3905	804	-3529	-2874	-2133	-3439	-978	3800	-2894	-2709	-3682	-3353	-3267	16300%						
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249							
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																		
58(K)	31	-2412	-803	1532	-2743	-1920	-559	-2483	1772	-2421	-1503	-556	1229	727	1079	-566	-893	-2041	-2579	-1915	16400%						
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249							
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																		
59(G)	-2671	-4661	1614	587	-4832	3103	-1901	-4803	-2269	-4648	-4047	421	-3049	-1587	-3230	-2297	-2766	-4245	-4850	-3752	16500%						
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249							
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																		
60(S)	-1499	-2308	-1932	-1859	-4008	1604	-2121	-3754	1382	-3783	-2945	-1833	-2827	-1794	-1902	2738	-1771	-2970	-3910	-3479	16600%						
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249							
-	-247	-8139	-2699	-894	-1115	-701	-1378	*	*																		
61(K)	1362	-2232	-619	-98	-2567	-427	-435	-2309	1599	-2265	-1349	1101	-1861	886	-512	833	-740	-1868	-2441	-1767	16700%						
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249							
-	-9	-7900	-8943	-894	-1115	-344	-2238	*	*																		
62(S)	-1288	-1904	-3742	-4011	-4384	-2155	-3593	-4209	-3998	-4479	-3573	-2789	-2948	-3606	-3832	3517	228	-3028	-4600	-4451	16800%						
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249							
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																		
63(W)	728	-873	-3261	-2634	1926	-2567	-1425	660	-2252	-701	-68	-2174	-2617	-1698	18	-1648	-972	983	4091	-958	16900%						
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249							
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																		
64(E)	1527	-2404	212	1636	-2722	-1878	-556	-2474	1241	-2419	-1497	350	-1985	-100	-659	96	70	-2025	-2589	-1903	17000%						
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249							
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																		
65(K)	-8	-2242	-895	770	-2502	-1963	-609	-2192	2589	22	-1353	-631	-2052	692	-617	-889	-906	-361	-2455	-1836	17100%						
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249							
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																		
66(A)	3631	-2768	-4492	-4615	-4888	-2892	-4271	-4781	-4818	-5025	-4365	-3727	-3728	-4477	-4545	-2567	-2762	-3852	-4724	-4942	17200%						
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249							
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																		

【０６６２】

【表６１】



【０６６３】

【表６２】

| | | |

【表６３】

96(A)	1981	-2315	-809	-268	-2645	-531	-579	-2374	232	-2350	-1445	-567	1217	711	445	447	-874	-1951	-2540	-1883	20700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
97(D)	491	-2351	1394	1361	-2671	-1654	1062	-2421	1010	-2387	-1440	-489	-1947	1017	362	-760	250	-623	-2535	-1852	20800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
98(V)	-2039	-1706	-4456	-3939	-1846	-3939	-3049	1986	-3656	1460	-826	804	-3870	-3351	-3565	-3105	-2000	2330	-2796	-2442	20900%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
99(Y)	-4840	-3786	-5230	-5581	1898	-5109	-1300	-3727	-5135	-3041	-3132	-3723	-4984	-3861	-4501	-4357	-4690	-3883	3325	4377	21000%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
100(E)	-163	-2353	-734	1681	-2674	-1859	868	-2422	1668	-792	-1443	777	-1952	890	286	-766	238	-1975	-2536	-1856	21100%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-257	-8139	-2649	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
101(E)	1017	-2763	862	2042	-3060	-1813	-775	-2836	-495	-2773	-1886	1956	-2143	-136	-1056	265	-1185	-2377	-2948	-2207	21200%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-9	-7891	-8933	-894	-1115	-338	-2261	*	*												
102(E)	-944	-2422	863	2138	-2740	-436	-567	-2493	894	-2437	-1515	-518	-1994	1767	-673	108	-885	-1023	-2605	-1917	21300%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
103(I)	-2660	-2156	-5316	-4965	-2520	-5119	-4900	3165	-4894	297	-1251	-4775	-4828	-4705	-4975	-4470	-2642	2240	-4202	-3814	21400%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
104(E)	1068	-2341	-760	2003	628	-1887	876	-2380	1240	-2347	-1436	-529	-1983	881	-618	-804	-855	-1954	-2530	-1862	21500%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
105(P)	-343	-3144	1561	442	-3538	-489	-1216	-3329	-1038	-3274	-2420	-848	2974	-812	-1635	469	-1644	-2849	-3462	-2693	21600%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
106(N)	-1173	-2375	-814	827	-2376	-2071	1767	-2279	-479	-2336	-1509	3151	-2218	-415	-957	-1093	-1120	-198	-2486	647	21700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
107(M)	-3415	-2890	-5826	-5252	-1352	-5488	-4282	1361	-5022	2621	2728	-5181	-4778	-4005	-4613	-4776	-3292	69	-3071	-3194	21800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
108(K)	-1941	-3098	-1997	-1232	-3650	-2740	-1025	-3210	3059	-3010	-2208	499	-2766	1457	1261	-1817	-90	-2856	-3002	-2622	21900%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
109(P)	1129	-2426	-740	964	-2747	-1913	-589	-2491	1139	-2440	-1525	-552	1941	1446	-655	-480	-913	-2050	-2610	-1935	22000%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
110(G)	-2276	-2907	-2347	-2709	-4832	3554	-3349	-5006	-3678	-5053	-4315	1193	-3507	-3243	-3937	-2418	-2674	-3974	-4703	-4521	22100%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	

【０６６５】

【表６４】

-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																
111(A)	1730	-2349	958	-198	-2661	-1868	-535	-2405	927	-2362	-1444	414	-1966	788	-630	790	-840	-303	-2540	-1863	22200%				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*																	
112(T)	1350	-1149	-14	-1461	-1155	-2314	-1111	758	-1275	-1024	1167	-1475	-2388	-1111	-1501	334	1843	354	-1581	-1182	22300%				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*																	
113(L)	-3333	-2796	-5806	-5293	-1506	-5535	-4502	1096	-5103	2935	-282	-5232	-4857	-4172	-4762	-4864	-3236	506	-3264	-3351	22400%				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*																	
114(A)	1769	-1525	158	-857	-1603	148	-891	-1181	-752	187	-712	-1040	-2228	660	-1135	-1111	-913	1305	-1913	-1442	22500%				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*																	
115(F)	-4110	-3437	-5436	-5431	4216	-5143	-2159	-1742	-5074	563	-1124	-4290	-4871	-3987	-4561	-4547	-4016	-2374	-1356	-292	22600%				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*																	
116(A)	3091	-1829	-3998	-4219	-4413	119	-3637	-4216	-4134	-4469	-3523	-2798	-2896	-3656	-3927	1514	-1679	-2983	-4632	-4539	22700%				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*																	
117(H)	-5197	-4539	-4720	-5009	-4036	-4506	5435	-6314	-4911	-5786	-5667	-4954	-4960	-5011	-4732	-5391	-5395	-6022	-4063	-3641	22800%				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*																	
118(G)	-4435	-4203	-5092	-5462	-5893	3834	-5028	-6627	-5765	-6297	-5970	-5141	-4804	-5546	-5385	-4727	-4815	-5862	-4924	-5849	22900%				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*																	
119(F)	-4044	-3387	-5534	-5444	4093	-5246	-2370	-1514	-5107	1089	-868	-4443	-4880	-3998	-4592	-4639	-3934	-2200	-1536	-523	23000%				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*																	
120(N)	885	-1899	-2020	-1781	-2956	-2135	-1925	-2602	-1809	3	-2052	3468	-2633	-1676	-2141	413	-1437	-2139	-3194	-2737	23100%				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-468	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*																	
121(I)	-2673	-2169	-5324	-4969	-2477	-5123	-4876	3293	-4893	358	-1211	-4780	-4824	-4681	-4961	-4472	-2853	1969	-4158	-3781	23200%				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*																	
122(H)	-3381	-3705	-3197	-3491	-4166	638	5216	-5496	-3798	-5304	-4811	-3481	-4185	-3770	-3879	-3508	-3702	-4793	-4170	-3759	23300%				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*																	
123(Y)	-4816	-3757	-6210	-5549	3410	-5097	2153	-3719	-5105	-3041	-3127	-3715	-4955	-3851	-4483	-4344	-4669	-3870	-547	3677	23400%				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*																	
124(G)	-1065	-2519	948	-272	-2820	1844	998	-2566	972	-284	-1622	1553	-2090	-229	-802	-938	-1011	-2133	-2708	-2021	23500%				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*																	

【０６６６】

【表６５】

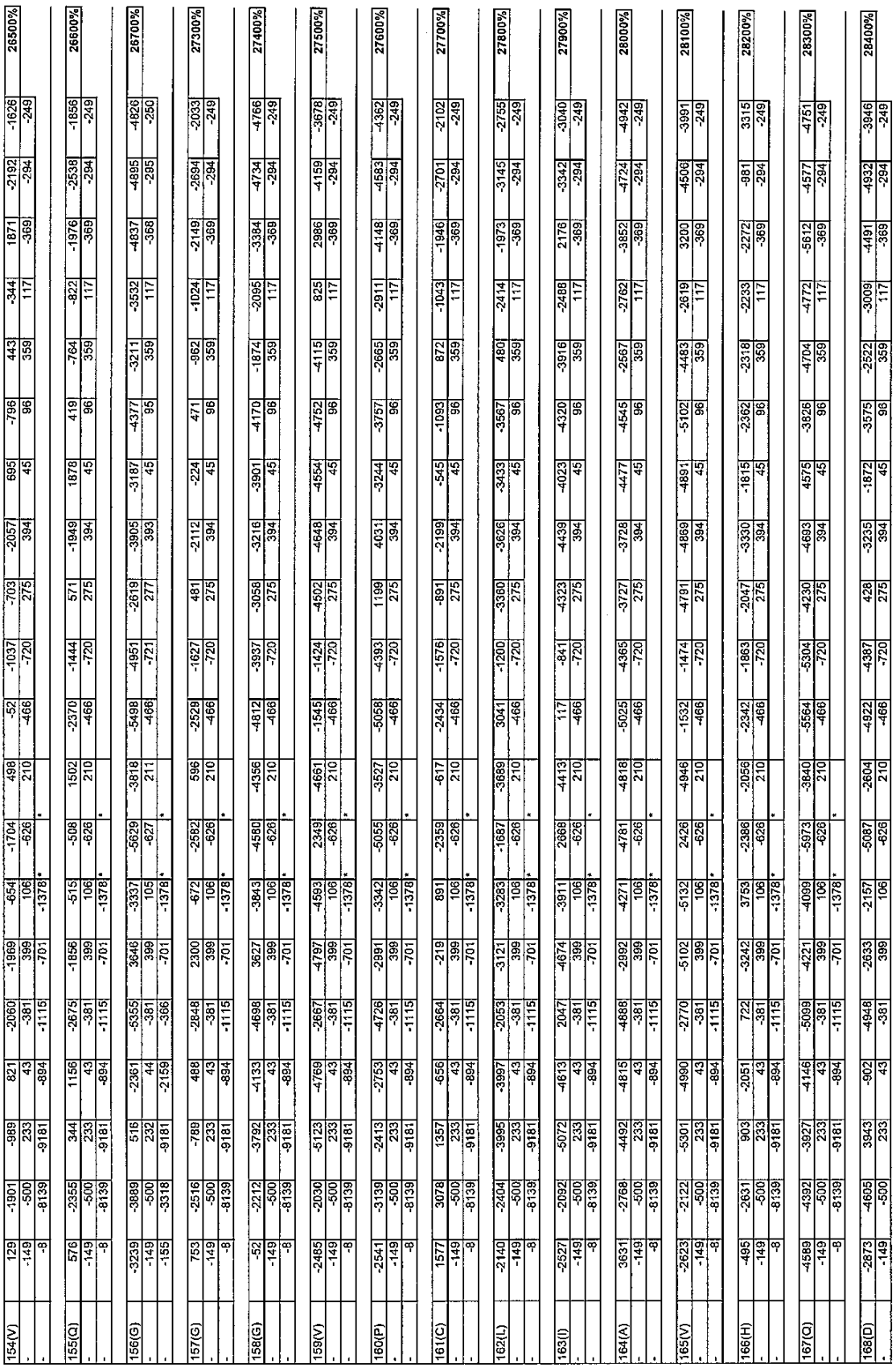
125(Q)	-412	-2285	-2466	-2166	-2068	-2877	-2019	-1589	-1588	1526	-1121	-2187	-3153	3585	-1718	-2137	-1964	-1719	-2789	-2414	23600%		
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249			
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*														
126(I)	-2254	-1916	-4813	-4439	-2466	-4221	-3932	3248	-4248	-1515	-1324	-4044	-4259	-4063	-4255	230	-2280	2003	-3673	-3237	23700%		
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249			
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*														
127(K)	-888	-2234	334	1172	-2504	-1881	-546	-93	1370	-300	-1337	465	-1974	655	-646	-794	-827	1255	-2448	-1798	23800%		
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249			
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*														
128(P)	715	-1925	-3618	-3897	-4464	653	-3594	-4274	-4053	-4520	-3596	-2770	3775	-3593	-3911	-1550	-1770	-3067	-4647	-4548	23900%		
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249			
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*														
129(P)	479	-2398	-1173	-637	-2915	-2106	-848	-2610	-289	-2586	-1713	-884	2238	1247	2195	51	-1147	-2184	-2757	-2174	24000%		
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249			
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*														
130(A)	1787	-2663	1377	529	-2976	-1992	-762	-2736	1785	-2680	-1776	-623	-2161	-319	-936	297	-1120	-2285	-2853	-2146	24100%		
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249			
-	-2336	-8139	-325	-894	-1115	-701	-1378	*	*														
131(F)	-1308	-1104	-2227	-2120	3516	-2093	-244	-196	-1891	84	66	-1626	-2278	-1503	-1798	-1617	-1350	-389	305	1335	24200%		
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249			
-	-38	-5840	-6882	-894	-1115	-3098	-179	*	*														
132(P)	-603	-937	-997	-1058	-1832	-1041	-1092	-1737	-1074	-1874	-1416	-992	3539	-1065	-1192	-789	-866	-1383	-1765	-1661	24300%		
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249			
-	-38	-5840	-6882	-894	-1115	-3098	-179	*	*														
133(K)	-804	-1483	-564	-230	-1920	-1335	-101	-1605	2889	-1630	-1021	-349	-1569	232	698	-786	-759	-1358	-1637	-1317	24400%		
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249			
-	-38	-5840	-6882	-894	-1115	-109	-3775	*	*														
134(D)	-2405	-4159	3349	-651	-4260	-261	-1744	-4307	-1947	-4207	-3514	2151	-2936	-1418	-2754	-2102	-2471	-3802	-4324	637	24500%		
-	-149	-500	233	43	-381	359	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249			
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*														
135(I)	-2047	-1713	-4504	-3983	-1821	-3943	-3061	2461	-3697	1581	-797	-3593	-3673	-3371	-3587	-342	-2009	1904	-2764	-2441	24600%		
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249			
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*														
136(D)	-2024	-3444	3495	-680	-3868	-2331	-1596	-44	-1632	-3675	-2915	685	-2782	-1248	-2305	478	-2088	-3196	-3911	-3098	24700%		
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249			
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*														
137(V)	-3122	-2888	-5092	-5160	-3522	-4180	-4687	-905	-5060	-2626	-2570	-4662	-4579	-4940	-4923	-4013	-3297	3796	-4414	-4190	24800%		
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249			
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*														
138(I)	-53	-875	-3230	-2609	1867	-393	-1422	2613	-2236	-723	-81	-2157	-2608	-1885	-2086	-1633	276	-271	-1325	844	24900%		
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249			
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*														
139(M)	315	-2345	-4754	-4279	-1396	-4001	-3301	-697	-3877	816	4676	-3879	-3994	-3361	-3676	-3242	-2531	-1114	-2746	-2629	25000%		
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249			

【０６６７】

【表６６】

| | | |

【表６７】



154(V)	129	-1901	-989	821	-2060	-1969	-654	-1704	498	-52	-1037	-703	-2057	695	-796	443	-344	1871	-2192	-1626	26500%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
155(Q)	576	-2355	344	1156	-2675	-1856	-515	-508	1502	-2370	-1444	571	-1949	1878	419	-764	-822	-1976	-2538	-1856	26600%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
156(G)	-3239	-3889	516	-2361	-5355	3646	-3337	-5629	-3818	-5498	-4951	-2619	-3905	-3187	-4377	-3211	-3532	-4837	-4895	-4826	26700%			
-	-149	-500	232	44	-381	399	105	-627	211	-466	-721	277	393	45	95	359	117	-368	-295	-250				
-	-155	-3318	-9181	-2159	-366	-701	-1378	*	*															
157(G)	753	-2516	-789	488	-2848	2300	-672	-2582	596	-2529	-1627	481	-2112	-224	471	-962	-1024	-2149	-2694	-2033	27300%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
158(G)	-52	-2212	-3792	-4133	-4698	3627	-3843	-4580	-4356	-4812	-3937	-3058	-3216	-3901	-4170	-1874	-2095	-3384	-4734	-4766	27400%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
159(V)	-2485	-2030	-5123	-4769	-2667	-4797	-4593	2349	-4661	-1545	-1424	-4502	-4648	-4554	-4752	-4115	825	2986	-4159	-3678	27500%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
160(P)	-2541	-3139	-2413	-2753	-4726	-2991	-3342	-5055	-3527	-5058	-4393	1199	4031	-3244	-3757	-2665	-2911	-4148	-4583	-4362	27600%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
161(C)	1577	3078	1357	-656	-2664	-219	891	-2359	-617	-2434	-1576	-891	-2199	-545	-1093	872	-1043	-1946	-2701	-2102	27700%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
162(L)	-2140	-2404	-3995	-3997	-2053	-3121	-3283	-1687	-3689	3041	-1200	-3360	-3626	-3433	-3567	480	-2414	-1973	-3145	-2755	27800%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
163(I)	-2527	-2092	-5072	-4613	2047	-4674	-3911	2668	-4413	117	-841	-4323	-4439	-4023	-4320	-3916	-2488	2176	-3342	-3040	27900%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
164(A)	3631	-2768	-4492	-4815	-4888	-2992	-4271	-4781	-4818	-5025	-4365	-3727	-3728	-4477	-4545	-2587	-2762	-3852	-4724	-4942	28000%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
165(V)	-2623	-2122	-5301	-4990	-2770	-5102	-5132	2426	-4946	-1532	-1474	-4791	-4869	-4891	-5102	-4483	-2619	3200	-4506	-3991	28100%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
166(H)	-495	-2631	903	-2051	722	-3242	3753	-2386	-2056	-2342	-1863	-2047	-3330	-1815	-2362	-2318	-2233	-2272	-981	3315	28200%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
167(Q)	-4589	-4392	-3927	-4146	-5099	-4221	-4099	-5973	-3840	-5564	-5304	-4230	-4693	4575	-3826	-4704	-4772	-5612	-4577	-4751	28300%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
168(D)	-2873	-4605	3943	-902	-4948	-2633	-2157	-5087	-2604	-4922	-4387	428	-3235	-1872	-3575	-2522	-3009	-4491	-4932	-3946	28400%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				

【０６６９】

【表６８】

| | | |

【表６９】

183(G)	2572	-2028	-3934	-4246	-4575	2752	-3783	-4406	-4316	-4661	-3751	-2958	-3070	-3837	-4092	-1679	-1898	-3191	-4701	-4686	29900%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
184(I)	-2178	-1808	-4630	-4153	-2094	-4190	-3417	3121	-3909	311	-1023	698	-4099	-3656	-3864	-3388	-2148	1742	-3147	-2761	30000%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
185(G)	-4435	-4203	-5092	-5462	-5893	3834	-5028	-6627	-5765	-6297	-5970	-5141	-4804	-5546	-5385	-4727	-4815	-5862	-4924	-5849	30100%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
186(G)	1392	2751	-4353	-4536	-4308	2864	-3681	-4084	-4233	-4354	-3425	-2859	-2890	-3744	-3957	712	-1656	-2914	-4553	-4470	30200%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
187(G)	855	-1822	-3738	-3769	-4188	2507	-3358	-3950	-3667	-4196	-3283	-2667	986	-3302	-3621	-1441	2334	-2867	-4408	-4236	30300%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
188(R)	-3706	-3692	-4490	-3846	1381	-4057	-2273	-3795	-1906	-3355	-3181	-3458	-4263	-2675	3948	-3768	-3671	-3813	-2283	-1328	30400%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-155	-8139	-3345	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
189(A)	2844	-1670	-3814	-3873	-4048	-1958	-3316	-3787	-3666	-4061	-3156	-2588	-2734	-3301	-3572	1088	1907	-2713	-4286	-4136	30500%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-7992	-9034	-894	-1115	-1303	-750	*	*															
190(G)	-4176	-3995	-4855	-5222	-5686	3828	-4823	-6388	-5533	-6087	-5741	-4896	-4606	-5312	-5176	-4461	-4560	-5613	-4754	-5635	30600%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-7992	-9034	-894	-1115	-422	-1980	*	*															
191(V)	-2496	-2036	-5139	-4788	-2680	-4825	-4637	2522	-4696	-1549	-1431	-4527	-4668	-4584	-4783	-4148	629	2919	-4191	-3706	30700%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
192(I)	-2760	-2307	-5270	-4785	1172	-4884	-3992	3346	-4576	662	-572	-4539	-4535	-4008	-4400	-4134	-2703	757	-3223	-3041	30800%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
193(E)	454	-3088	-801	3279	-4125	-2346	-1868	-3919	-1868	-3932	-3156	-1291	1208	-1533	-2450	-1842	-2097	-3305	-4121	-3395	30900%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
194(T)	-2738	-3109	-4509	-4810	-4918	-3305	-4346	-4885	-4769	-5072	-4551	-3987	-3998	-4580	-4545	-2999	4033	-4113	-4684	-4915	31000%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
195(T)	-1323	-1975	-2766	-2978	-4207	-2152	-3105	-4004	-3295	-4229	-3354	134	-2901	-2988	-3387	-113	3742	-2969	-4405	-4119	31100%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
196(F)	-4110	-3437	-5436	-5431	4216	-5143	-2159	-1742	-5074	563	-1124	-4290	-4871	-3987	-4561	-4547	-4016	-2374	-1356	-292	31200%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
197(K)	-111	-2844	-1470	1220	-3284	-2415	-860	-2939	2448	-2798	-1945	-1056	-2475	767	2054	-1421	-1432	-2544	-2858	-2356	31300%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				

【０６７１】

【表７０】

-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*																	
198(E)	545	-3735	1715	2880	-3961	-2308	-1442	-3818	-1408	-3725	-2924	-909	-2713	1281	-2087	-1777	-2041	-3331	-3909	-3046	31400%				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*																	
199(E)	-4574	-4665	-2714	3919	-5655	-3995	-3886	-6219	-4238	-5898	-5604	-3415	-4513	-3838	-4570	-4456	-4726	-5786	-4878	-5197	31500%				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*																	
200(T)	-1211	1331	-3446	-2962	-1399	-2495	-1930	-869	-2610	-1374	-769	-2403	-2815	-2309	-2526	-1685	3305	195	-1933	1430	31600%				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*																	
201(E)	-1941	-3222	-921	3293	-3618	-2473	-1316	-3186	916	-3225	-2465	-1447	-2749	-923	-1064	-1790	-1902	-171	-3398	-2802	31700%				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*																	
202(T)	-1286	-1898	-3764	-4016	-4329	-2157	-3572	-4120	-3959	-4408	-3517	-2789	-2947	-3588	-3797	697	3756	-2989	-4554	-4399	31800%				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*																	
203(D)	-4580	-4701	4174	-3014	-5700	-3967	-3905	-6376	-4478	-6024	-5744	-3355	-4501	-3870	-4926	-4440	-4750	-5894	-4922	-5231	31900%				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*																	
204(L)	-3705	-3122	-6060	-5527	-1359	-5814	-4569	1065	-5292	3069	-146	-5564	-4963	-4163	-4628	-5215	-3571	-1279	-3159	-3298	32000%				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*																	
205(F)	-3777	-3220	-5271	-5259	4268	-4892	-2120	417	-4916	-1143	-1314	-4142	-4753	-3956	-4473	-4270	-3740	-1889	-1349	-269	32100%				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*																	
206(G)	-4435	-4203	-5092	-5462	-5893	3834	-5028	-6627	-5765	-6297	-5970	-5141	-4804	-5546	-5385	-4727	-4815	-5862	-4924	-5849	32200%				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*																	
207(E)	-4574	-4665	-2714	3919	-5655	-3995	-3886	-6219	-4238	-5898	-5604	-3415	-4513	-3838	-4570	-4456	-4726	-5786	-4878	-5197	32300%				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*																	
208(Q)	-3157	-3746	-3170	-2450	-4497	-3515	-1763	-4161	-443	-3809	-3189	-2392	-3620	4200	1284	-3063	-2944	-3900	-3556	-3420	32400%				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*																	
209(A)	2672	-1334	-3318	-2853	-1740	371	-2072	483	-2577	-1549	-928	-2359	-2798	-2295	-2567	-1629	191	932	-2245	-1899	32500%				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*																	
210(V)	-2620	-2125	-5293	-4983	-2756	-5076	-5100	1877	-4932	-1522	-1466	-4777	-4855	-4870	-5082	-4456	-2619	3416	-4480	-3969	32600%				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*																	
211(L)	-4414	-3800	-5638	-5628	-2290	-4980	-4628	-1886	-5423	3316	-1236	-5514	-4997	-4750	-5002	-5379	-4399	-2829	-3665	-3690	32700%				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*																	

【０６７２】

【表７１】

212(C)	-2243	5044	-4840	-4445	-1998	-3905	-3598	-31	-4138	449	-930	-3902	-4040	-3778	-4010	-3184	-2306	1347	-3209	-2883	32800%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*														
213(G)	-4435	-4203	-5092	-5462	-5893	-3834	-5028	-8627	-5765	-6297	-5970	-5141	-4804	-5546	-5385	-4727	-4815	-5862	-4924	-5849	32900%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*														
214(G)	677	-2128	-3838	-4171	-4647	3536	-3816	-4506	-4340	-4749	-3857	-3009	-3149	-3871	-4137	-1784	-2005	-3297	-4725	-4735	33000%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*														
215(V)	378	724	-3707	-3104	-1160	-2986	-1919	1210	-2734	1302	-359	-2627	-3014	-2382	-2566	-2089	1123	1949	-1773	-1423	33100%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*														
216(M)	-948	-1407	-1515	156	-1452	-2164	1677	-1030	-821	-1302	1976	-1113	-2245	-718	-1173	773	1715	1332	-1794	-1343	33200%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*														
217(E)	1397	-2528	-725	2286	-2932	240	-791	-2681	328	-2645	-1744	-674	-2162	-351	-939	545	-1095	-2227	-2828	-2143	33300%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*														
218(L)	-3705	-3122	-8060	-5527	-1359	-5814	-4569	1085	-5292	3069	-146	-5564	-4963	-4163	-4828	-5215	-3571	-1279	-3159	-3296	33400%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*														
219(V)	-2600	-2108	-5251	-4894	-2568	-5025	-4783	2479	-4810	-1354	1358	-4683	-4772	-4654	-4895	-4362	-2584	3018	-4181	-3758	33500%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*														
220(K)	-1633	-2905	-1573	706	-3375	-2487	-900	-3003	2925	-2849	-2008	-1128	-2541	1714	784	-1509	-105	-2617	-2894	-2418	33600%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*														
221(A)	2352	2066	-2593	-2000	-947	-2434	-1271	-486	-32	-832	714	-1817	-2498	-1493	-1792	-1483	274	453	-1419	501	33700%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*														
222(G)	224	-1905	-3562	-3696	-3684	3361	-3297	-3220	-3625	81	-2886	-2733	-2977	-3326	-3545	-1606	-1763	-2574	-4068	-3810	33800%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*														
223(F)	-4781	-3756	-5207	-5542	4341	-5070	-1342	-3653	-5111	-2971	-3065	-3743	-4949	-3874	-4496	-4351	-4650	-3829	-591	1725	33900%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*														
224(E)	-2413	-4114	221	3465	-4392	-2485	-1689	-4248	-1608	-4112	-3396	-1094	-2951	-1336	871	-2119	-2441	-3783	-4239	-3395	34000%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*														
225(T)	-1461	-1864	-3139	-2645	-2659	-2483	-2136	-1734	-1646	-2359	-1761	-2298	-2936	-1995	920	-1748	3354	967	-2989	-2654	34100%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*														
226(L)	-3831	-3266	-5314	-5148	-673	-5068	-2476	-1443	-4706	3059	-789	-4359	-4756	-3864	-4314	-4462	-3729	-2115	-1672	1736	34200%	
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249		

【０６７３】

【表７２】

-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																	
227(V)	-1819	-1960	-4426	-4359	-2977	-3037	-3800	-439	-4098	-2145	-1909	-3451	-3600	-3879	-4011	-2397	2510	2999	-3974	-3608	34300%					
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249						
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																	
228(E)	-2863	-4790	1397	3563	-4990	-2594	-2061	-5021	-2476	-4848	-4298	-1204	-3182	-1761	-3454	-2476	-2968	-4462	-4951	-3920	34400%					
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249						
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																	
229(A)	2686	-1916	-1440	275	-2529	-292	-1240	-2176	-998	-2345	1183	-1184	-2355	-905	-1425	512	-1158	-1817	-2697	-2174	34500%					
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249						
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																	
230(G)	-4435	-4203	-5092	-5462	-5893	3834	-5028	-6627	-5765	-6297	-5970	-5141	-4804	-5546	-5385	-4727	-4815	-5862	-4924	-5849	34600%					
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249						
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																	
231(Y)	-4099	-3483	-4921	-5048	-109	-4705	-1565	-2914	-4494	-2334	2010	-3723	-4707	-3735	-4111	-4065	-4068	-3172	-847	4618	34700%					
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249						
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																	
232(Q)	1711	-2410	-772	934	-2739	-1925	-604	-2477	-171	-2433	-1524	-574	-2035	2086	345	902	-923	-2042	-2608	-1941	34800%					
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249						
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																	
233(P)	-3403	-4071	-1922	817	-5220	-3359	-3173	-5423	-3337	-5261	-4771	-2564	4045	-2989	-3760	-3320	-3624	-4817	-4763	-4636	34900%					
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249						
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																	
234(E)	-2870	-4786	1265	3587	-4993	-2600	-2068	-5026	-2483	-4652	-4303	-1212	-3188	-1768	-3458	-2484	-2974	-4467	-4950	-3925	35000%					
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249						
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																	
235(M)	-3089	-2618	-5526	-4976	-1443	-5128	-4045	653	-4735	1429	4269	-4803	-4610	-3915	-4423	-4378	-2995	1140	-3054	-3074	35100%					
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249						
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																	
236(A)	3631	-2768	-4492	-4815	-4888	-2992	-4271	-4781	-4818	-5025	-4365	-3727	-3728	-4477	-4545	-2567	-2762	-3852	-4724	-4942	35200%					
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249						
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																	
237(Y)	-4797	-3764	-5203	-5543	1114	-5069	-1339	-3694	-5111	-3013	-3107	-3741	-4951	-3876	-4497	-4354	-4666	-3859	-568	4723	35300%					
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249						
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																	
238(F)	-3828	-3605	-4146	-4086	4292	-4207	-2060	-3492	774	-3071	-3005	-3556	-4434	-3287	-2952	-3668	-3858	-3571	-1593	-494	35400%					
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249						
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																	
239(E)	-2775	-4471	-511	3582	-4815	-2610	-2057	-4863	-2317	-4711	-4124	1234	-3182	-1755	-3103	-2442	-2884	-4306	-4753	-3820	35500%					
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249						
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																	
240(C)	-1407	5023	-4397	-4323	-3016	-2468	-3398	-1251	-3952	-2540	-2082	-3044	-3133	-3588	-3744	-1803	1473	1125	-3677	-3390	35600%					
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249						
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																	

【０６７４】

【表７３】

241(L)	-3370	-2847	-5795	-5233	-1386	-5465	-4298	708	-5010	2859	1349	-5155	-4777	-4026	-4622	-4755	-3254	814	-3103	-3213	35700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
242(H)	-2519	-4224	-445	946	-4287	-2505	4583	-4377	-1764	-4237	-3571	2007	-3009	-1439	-2361	-2209	-2569	-3893	-4267	-3353	35800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
243(E)	-3177	2571	-2701	3711	-4851	-3438	-3479	-4765	-3558	-4932	-4406	-3081	-4005	-3370	-3802	-3268	-3451	-4260	-4554	-4524	35900%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
244(L)	-85	-1333	-3893	-3280	-1111	-3185	-2083	1066	-2810	2310	1961	-2823	-3170	-2501	-2721	-2289	-113	436	-1859	-1558	36000%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
245(K)	-2513	-3173	-2941	-2370	-4402	-3094	-1824	-3895	3666	-3734	-3068	-2271	-3377	-1447	-616	-2537	751	-3485	-3625	-3471	36100%
-	-149	-500	233	43	-381	400	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-155	-3318	-9181	-196	-2974	-701	-1378	*	*												
246(L)	-3571	-3023	-5954	-5375	-1321	-5646	-4390	-632	-5138	2962	1671	-5358	-4852	-4044	-4689	-4963	-3436	742	-3082	-3239	36300%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
247(I)	-2960	-2484	-5473	-5109	-1958	-5196	-4587	3728	-4915	267	-781	-4933	-4833	-4427	-4799	-4598	-2949	-64	-3627	-3397	36400%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
248(V)	-1685	-1666	-4095	-3732	-2081	-3082	-2893	-227	-3402	-1488	1383	-3123	-3419	-3145	-3320	367	-1807	3332	-2674	-2504	36500%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
249(D)	-2963	-4569	3864	-1039	-4953	-2751	-2187	-4998	767	-4822	-4260	-1424	-3314	-1891	-3072	-2624	-3060	-4467	-4770	-3962	36600%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-389	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
250(L)	-2768	-2715	-4842	-4633	-1675	-3998	-3790	-1038	-4207	3056	-562	-4150	-4179	-3740	-3989	-3399	699	-1545	-3154	-3067	36700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
251(M)	-2822	-2356	-5342	-4881	-1759	-4985	-4151	2587	-4663	173	4005	-4649	-4601	-4076	-4487	-4251	-2764	766	-3321	-3210	36800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
252(Y)	-4562	-3630	-5142	-5401	1516	-4992	-1300	-3544	-4968	-2963	-2986	-3671	-4868	-3786	-4393	381	-4432	-3662	2413	4375	36900%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
253(E)	-1959	-3457	-568	3135	-3841	-2347	-1410	-3622	-1165	-3547	-2751	-1003	-2716	1679	-1666	-1757	692	-3162	-3709	-2960	37000%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
254(G)	-347	-2818	-1215	201	-3253	2635	-921	-2921	1474	-2822	-1972	-1002	-2459	-486	658	-1397	-1435	-2521	-2923	-2378	37100%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
255(G)	-4435	-4203	-5092	-5462	-5893	3834	-5028	-6627	-5765	-6297	-5970	-5141	-4804	-5546	-5385	-4727	-4815	-5862	-4924	-5849	37200%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	

【０６７５】

【表７４】

-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																
256(I)	-2042	-1769	-4321	-3740	-1316	-3753	-2668	3134	-3389	1017	1999	194	-3653	-2958	-3221	-2884	-1980	-344	-2325	-2073	37300%				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																
257(A)	1914	-1640	-1237	128	-1748	-661	-793	-1355	-577	-49	-817	-905	-2155	-498	-993	1037	162	-1149	-2002	624	37400%				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																
258(N)	365	-3809	1001	557	-4083	1196	-1518	-3930	-1535	-3838	-3055	3219	-2763	-1148	-2243	-1845	-2131	-3433	-4027	-3144	37500%				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																
259(M)	-3656	-3159	-6816	-5350	-1349	-5421	-4248	-822	-4928	948	4920	-5248	-4838	-4039	-4539	-4860	-3558	-1557	-3044	-3030	37600%				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																
260(R)	-1614	-1949	-2260	-1663	-886	-2765	-1089	-1596	-1089	360	-1133	2239	-2814	-1215	2408	-1788	-1535	-1468	1995	1546	37700%				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																
261(Y)	-1548	-2973	568	-509	-2846	-2207	1172	-2986	441	-2941	-2110	1645	-2446	-659	-1264	-1389	-1509	-2582	-2924	3695	37800%				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																
262(S)	279	-1844	-3877	-4131	-4448	136	-3634	-4260	-4132	-4511	-3561	-2782	-2903	-3648	-3936	3391	-1692	-3009	-4661	-4566	37900%				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																
263(I)	-2653	-2149	-5311	-4961	-2538	-5114	-4905	2957	-4891	332	-1267	-4770	-4827	-4713	-4978	-4466	-2636	2521	-4218	-3821	38000%				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																
264(S)	-2212	-2711	-4019	-4348	-4697	-2899	-4045	-4988	-4527	-5102	-4364	-3492	-3638	-4203	-4355	3681	-2664	-3902	-4616	-4605	38100%				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-389	-294	-249					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																
265(N)	-2725	-4778	2906	990	-4896	-2486	-1922	-4885	-2320	-4718	-4140	3045	-3069	-1612	-3311	-2334	-2821	-4325	-4919	-3794	38200%				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																
266(T)	-2061	-3396	-596	903	-4071	-2367	-1713	-3874	-1685	-3659	-3103	2125	-2850	-1369	-2277	-1897	3157	-3351	-4055	-3271	38300%				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																
267(A)	3410	-2035	-3979	-4280	-4573	659	-3798	-4400	-4332	-4660	-3764	-2978	-3080	-3858	-4099	-1690	-1908	-3194	-4697	-4687	38400%				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																
268(E)	-2118	-3486	-1036	2964	-3935	-2588	-1284	-3596	1878	-3417	-2636	-1209	-2827	1323	-773	-1923	-2032	-3199	-3455	-2917	38500%				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249					
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*																
269(Y)	-4524	-3618	-5100	-5310	1910	-4972	-1299	-3522	834	-2951	-2965	-3849	-4847	-3741	-4299	-4199	-4391	-3637	2997	4211	38600%				
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249					
-	-155	-8139	-3345	-894	-1115	-701	-1378	*	*																

【０６７６】

【表７５】

270(G)	-4176	-3995	-4855	-5222	-5686	3828	-4823	-6386	-5533	-6087	-5741	-4896	-4606	-5312	-5178	-4461	-4560	-5613	-4754	-5635	38700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-7992	-9034	-894	-1115	-422	-1980	*	*												
271(D)	-2710	-4705	3025	1828	-4880	1758	-1932	-4863	-2320	-4703	-4115	-1084	-3073	-1621	-3297	-2330	-2809	-4301	-4894	-3793	38800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
272(Y)	-2497	-2175	-4651	-4137	2447	-4046	-2215	255	-3766	892	1558	-3537	-3886	-3109	-3468	-3181	-2410	-1282	-1615	3508	38900%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
273(V)	-1425	-1250	-3480	-2894	-1283	-3035	-1955	691	-2570	-1	-429	-2568	-3060	942	-2514	-2129	1701	2578	-1907	-1553	39000%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
274(T)	516	-1643	-1918	-1401	-2170	-2112	-1387	-1759	-1234	-2016	-1265	-1442	-2421	-1149	887	1341	2345	822	-2454	-2006	39100%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
275(G)	677	-2128	-3838	-4171	-4647	3536	-3816	-4506	-4340	-4749	-3857	-3009	-3149	-3871	-4137	-1784	-2005	-3297	-4725	-4735	39200%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
276(P)	-992	-2210	343	-359	-2447	-1960	-675	-2143	533	-2204	-1351	-651	2813	-260	-802	465	-939	-873	-2467	1093	39300%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
277(R)	-1214	-2548	-1097	1072	175	-2145	-716	-2587	848	-2528	-1653	-795	-2228	-273	2862	417	-1133	-2191	-2671	-2084	39400%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
278(V)	289	-2035	-5133	-4789	-2692	-4777	-4639	2142	-4689	-1561	-1443	-4511	-4649	-4585	-4784	-4102	-2487	3125	-4202	-3717	39500%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
279(I)	-2265	-1919	-4828	-4452	-2473	-4254	-3954	3155	-4265	-1516	-1328	-4066	-4279	-4082	-4274	226	-2288	2182	-3688	-3250	39600%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
280(D)	-1731	-3162	2329	-550	-3318	-2239	-1273	-3221	-1145	-3214	-2403	2295	-2573	-899	-1742	-1561	1851	-2804	-3366	1327	39700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
281(E)	1097	-2689	1227	2368	-2994	-2011	-796	-2753	381	-2704	-1808	-640	-2190	-358	-992	-1085	-1162	-2310	-2885	1152	39800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
282(E)	-166	-2372	859	1835	-2692	-1861	1182	-2444	490	-2388	-1462	590	478	1356	-620	116	-837	-1994	-2555	-1871	39900%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
283(T)	228	-1688	-3655	-3444	-3179	-2145	-2891	-2611	-3215	-3076	-2328	-2557	-2821	-2916	-3214	2251	2366	1397	-3549	-3270	40000%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*												
284(K)	-2991	-3623	-3848	-2331	-4472	-3512	-1356	-3763	2942	-3413	1860	-2188	-3430	-937	2705	-2874	-2650	-3556	-3267	-3189	40100%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	

【０６７７】

【表７６】

-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*																
285(E)	443	-2370	732	1690	-2691	-1663	-526	-2442	1639	-2385	-1460	-498	-1960	1120	437	106	-836	-1992	-2552	-1869	40200%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
286(A)	1871	-2286	-843	814	-2570	-1928	-578	269	1096	-2279	-1391	-586	-2019	-136	1056	-62	-881	-1889	-2488	-1849	49300%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
287(M)	-3656	-3159	-5816	-5350	-1349	-5421	-4248	-822	-4928	948	4920	-5248	-4838	-4039	-4539	-4860	-3558	-1557	-3044	-3030	40400%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
288(K)	-1646	-2891	-1591	287	-3346	-526	-912	-2971	2831	-2832	-1997	-1146	-2554	-472	1762	-1527	-1524	-2597	-2885	1245	40500%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
289(E)	-172	-2394	367	2205	-2713	-487	-545	-2465	-134	-2409	-1485	1305	-1975	663	831	-795	72	-2015	-2577	-1891	40600%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
290(C)	1574	3024	-4584	-4122	-2155	-3932	-3330	1746	-3870	-1406	-1109	3691	-3957	-3613	-3805	-3144	-2046	2342	-3118	-2720	40700%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
291(L)	-187	-2175	-4307	-3889	-898	-3779	-2344	-944	-3485	2855	-476	-3380	-3782	-3025	-3298	-2972	-2345	-1269	-1846	1565	40800%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
292(K)	862	-2347	143	1211	-2665	-1855	873	-2414	1692	-2362	917	-492	-1948	889	-603	-763	783	-1966	-2532	-1851	40900%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
293(D)	-2148	-3878	2790	1765	-4119	-2356	-1511	-3962	-1467	-3852	-3075	241	-2782	-1139	2142	-1879	-2163	-3473	-4024	-3155	41000%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
294(I)	-2630	-2131	-5302	-4991	-2737	-5092	-5106	3464	-4941	-1495	-1447	-4789	-4862	-4869	-5086	-4473	-2627	2071	-4467	-3668	41100%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
295(Q)	346	-3134	-1818	-1401	-3862	-2760	-1314	-3433	1329	-3271	-2513	-1545	-2936	3817	-430	-2018	-2031	-3060	-3278	-2908	41200%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-389	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
296(S)	-1354	-2895	1712	354	-3192	-2068	-914	-2967	-621	-2903	-2012	1817	-2288	724	-1177	1978	-96	-2508	-3076	-2340	41300%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
297(G)	-4435	-4203	-5092	-5462	-5893	3834	-5028	-6627	-5765	-6297	-5970	-5141	-4804	-5546	-5385	-4727	-4815	-5862	-4924	-5849	41400%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
298(E)	-437	-2374	-769	2013	-2697	-1895	-552	-2438	623	-2389	-1472	-536	-1991	-97	777	829	1488	-1999	-2559	-1890	41500%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															

【０６７８】

【表７７】

299(F)	-4347	-3577	-4619	543	3858	-4820	-1320	-3438	-4609	-2900	-2894	-3532	-4750	-3628	-4209	-4078	-4237	-3546	-601	2917	41600%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*													
300(A)	2827	-1603	-4068	-3628	-2047	-3165	-2823	1205	-3349	-1486	-1089	-3103	-3432	-3073	-3298	-2367	197	1100	-2812	-2447	41700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*													
301(K)	-2364	-3363	-2464	163	-4038	-3041	-1188	-3501	2928	-3234	-2487	-1693	-3047	-758	2488	-458	-2152	-3194	-3159	-2895	41800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*													
302(M)	-893	-2361	740	1760	-2680	-537	-524	-2429	930	-2376	1895	-498	-1958	-66	722	775	-833	-1982	-2545	-1864	41900%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*													
303(W)	-2965	-2563	-4795	-4482	3045	-4315	-1779	-1426	-4093	92	-987	-3564	-4179	-3330	-3743	-3475	-2878	664	4754	-84	42000%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*													
304(I)	-2621	-2136	-5246	-4859	-2364	-4987	-4577	3052	-4747	-250	1043	-4641	-4713	-4488	-4769	-4301	-2597	2384	-3934	-3596	42100%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*													
305(L)	684	-1319	-1741	761	-1375	-2223	-1037	-927	-1042	1693	-533	-1287	-2325	-915	-1349	767	-152	84	-1756	-1328	42200%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*													
306(E)	364	-4165	621	3314	-4393	-2398	-1686	-4282	-1836	-4169	-3446	728	-2893	-1339	-2626	-2045	-2402	-3767	-4362	-3401	42300%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*													
307(N)	-839	979	-1235	-681	-1738	1352	935	-1357	-549	-1572	-816	2186	-2155	-482	165	-1022	-860	30	-1990	1446	42400%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*													
308(Q)	667	-2393	-773	511	-2721	-316	-544	-2465	1211	-2405	-1484	584	-1989	2135	1528	-812	-868	-2019	-2566	-1895	42500%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*													
309(A)	2050	-1857	-1081	-526	-2013	-2012	188	-1645	-385	-1213	-1011	486	-2103	-346	1657	-953	306	-261	-2169	-1624	42600%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*													
310(G)	-1848	-2469	-2089	-2292	1262	2944	-2358	-3563	-2904	-3628	-3017	2347	-3167	-2550	-3185	-1986	-2162	-3006	-2814	-1874	42700%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*													
311(Y)	475	1019	-1606	-1042	225	-2192	-935	-946	-891	-1226	1222	357	-2267	1002	1577	-1172	-888	-800	-1730	2446	42800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*													
312(P)	-87	-2372	-1362	756	-3738	-2205	-2007	-3445	-1924	-3575	-2761	-1555	3598	-1697	-2362	-1566	266	-2803	-3832	-3277	42900%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-2336	-8139	-325	-894	-1115	-701	-1378	*													
313(K)	-804	-1483	-564	-230	-1920	-1335	-101	-1605	2889	-1630	-1021	-349	-1569	232	698	-786	-759	-1358	-1637	-1317	43000%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	

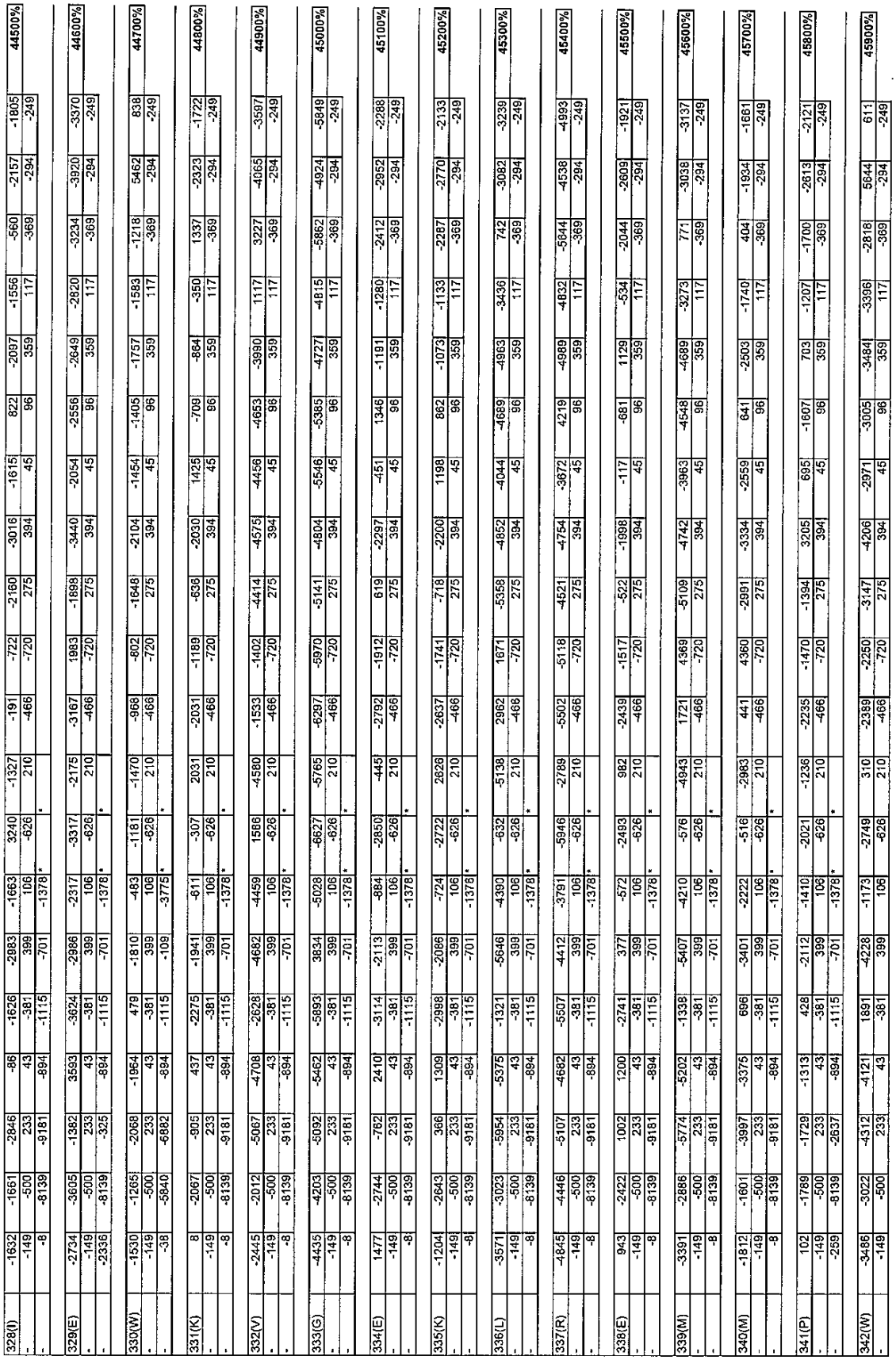
【０６７９】

【表７８】

-	-38	-5840	-6882	-894	-1115	-3098	-179	*	*															
314(E)	-766	-1695	521	2831	-2050	-1029	-293	-1804	-118	-1919	-1331	69	-1441	-4	-527	-653	-814	-1512	-1988	-1505	43100%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-38	-5840	-6882	-894	-1115	-109	-3775	*	*															
315(T)	-942	-2382	-739	1086	-2714	151	-681	-2459	-171	-2415	-1499	414	-2004	-128	839	1365	1730	-2017	-2592	-1915	43200%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
316(M)	-2196	-1920	-4499	-3891	1726	-3822	-2504	-645	-3523	1973	3030	-3442	-3673	-2938	-3257	-2944	-2114	326	-2014	1662	43300%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
317(H)	-883	-2314	-747	517	-2618	-1863	1714	-647	1272	-2322	-1408	1011	472	-69	433	-772	1411	-299	-2507	-1836	43400%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
318(A)	2474	-2397	-816	-367	-2797	-273	-722	-2529	555	-2507	-1610	592	-2110	837	-805	-138	-1006	-2092	-2899	-2039	43500%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
319(M)	-154	-986	-2485	-337	1024	-375	-1232	325	-444	667	1235	-1752	-2474	-1419	1020	-1455	670	-411	831	535	43600%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
320(R)	-1311	-2432	-1349	-724	-2724	-2272	-799	-2361	613	-644	1079	976	597	-382	2908	-1246	-1219	-2044	-2579	-2061	43700%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
321(R)	897	-2364	-833	905	-2678	-1930	-568	-2405	1293	-2366	1485	-575	-2020	-117	2045	95	-693	-1984	-2543	-1892	43800%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
322(N)	505	-2300	-750	523	-2598	121	-525	-594	485	95	-1395	1720	-1957	348	224	551	-821	-1910	-2497	-1828	43900%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
323(E)	444	-2266	-766	1488	-2551	-1871	-533	-2276	889	-2266	1474	1478	-1963	682	-629	-781	12	-279	-2472	476	44000%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
324(N)	1511	-1770	-728	-204	-2244	-1781	-426	282	601	-2121	-1133	1769	-1627	1398	447	-748	-766	-1713	-1779	-1595	44100%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
325(N)	1053	-3109	1756	1735	-3404	-2143	-1074	-3191	-846	-3124	-2254	2158	-2417	-657	-1430	-1361	197	-2727	-3303	-2540	44200%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
326(H)	-2064	-3071	-1245	-1267	-3262	-2570	4711	-3611	-1060	-3528	-2812	-1479	-2961	1288	-1287	670	-2133	-3161	-3310	-2601	44300%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															
327(Q)	-891	-2294	332	948	-2585	-739	-537	-2316	-131	-138	-1391	-518	1404	2021	-634	-785	619	-561	-2495	-1830	44400%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*	*															

【０６８０】

【表７９】



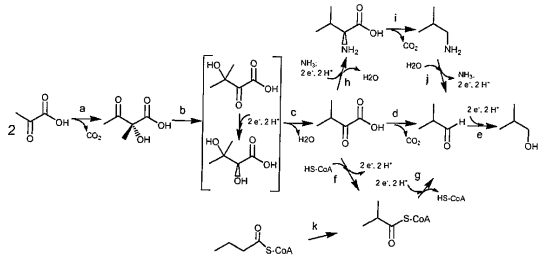
328(I)	-1632	-1661	-2846	-86	-1626	-2883	-1663	3240	-1327	-191	-722	-2160	-3018	-1615	822	-2097	-1556	-560	-2157	-1805	44500%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*																
329(E)	-2734	-3605	-1382	3593	-3624	-2986	-2317	-3317	-2175	-3167	1983	-1898	-3440	-2054	-2556	-2649	-2820	-3234	-3920	-3370	44600%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-2336	-8139	-325	-894	-1115	-701	-1378	*																
330(W)	-1530	-1265	-2068	-1964	479	-1810	-483	-1181	-1470	-966	-802	-1648	-2104	-1454	-1405	-1757	-1583	-1218	5462	838	44700%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-38	-5840	-6882	-894	-1115	-109	-3775	*																
331(K)	8	-2067	-805	437	-2275	-1941	-811	-307	2031	-2031	-1189	-636	-2030	1425	-709	-864	-350	1337	-2323	-1722	44800%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*																
332(V)	-2445	-2012	-5067	-4708	-2628	-4682	-4459	1586	-4580	-1533	-1402	-4414	-4575	-4456	-4653	-3990	1117	3227	-4065	-3597	44900%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*																
333(G)	-4435	-4203	-5092	-5462	-5893	3834	-5028	-6627	-5765	-6297	-5970	-5141	-4804	-5546	-5365	-4727	-4815	-5862	-4924	-5849	45000%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*																
334(E)	1477	-2744	-762	2410	-3114	-2113	-884	-2850	-445	-2792	-1912	619	-2297	-451	1346	-1191	-1280	-2412	-2952	-2288	45100%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*																
335(K)	-1204	-2643	366	1309	-2998	-2086	-724	-2722	2626	-2637	-1741	-718	-2200	1198	862	-1073	-1133	-2287	-2770	-2133	45200%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*																
336(L)	-3571	-3023	-5954	-5375	-1321	-5646	-4390	-632	-5138	2962	1671	-5358	-4852	-4044	-4669	-4963	-3436	742	-3082	-3239	45300%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*																
337(R)	-4845	-4446	-5107	-4682	-5507	-4412	-3791	-5946	-2789	-5502	-5118	-4521	-4754	-3872	4219	-4989	-4832	-5844	-4538	-4993	45400%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*																
338(E)	943	-2422	1002	1200	-2741	377	-572	-2493	982	-2439	-1517	-522	-1998	-117	-681	1129	-534	-2044	-2609	-1921	45500%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*																
339(M)	-3391	-2886	-5774	-5202	-1338	-5407	-4210	-576	-4943	1721	4369	-5109	-4742	-3963	-4548	-4689	-3273	771	-3038	-3137	45600%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*																
340(M)	-1812	-1601	-3997	-3375	696	-3401	-2222	-516	-2983	441	4360	-2991	-3334	-2559	641	-2503	-1740	404	-1934	-1661	45700%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*																
341(P)	102	-1789	-1729	-1313	428	-2112	-1410	-2021	-1236	-2235	-1470	-1394	3205	695	-1607	703	-1207	-1700	-2613	-2121	45800%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				
-	-259	-8139	-2637	-894	-1115	-701	-1378	*																
342(W)	-3486	-3022	-4312	-4121	1891	-4228	-1173	-2749	310	-2389	-2250	-3147	-4206	-2971	-3005	-3484	-3396	-2818	5644	611	45900%			
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249				

【０６８１】

【表８０】

| | | |

【図１】



【図２】

```
K9     (1) MEECKMAKIYYQEDCNLSLLDGKTIAVIGYGSQGHAHALNAKESGCNVII
PF5    (1) ------MKVFYDKDCDLSIIQGKKVAIIGYGSQGHAQACNLKDSGVDVTV

K9    (51) GLYEGSKSKWKRAEEQGFEVYTAAEAAKKADIIMILTNDEKQATMYKNDIE
PF5   (45) GLRKGSATVAKAEAHGLKVTDVAAAVAGADLVMILTPDEPQSQLYKNEIE

K9   (101) PNLEAGNMLMFAHGFNIHFGCIVPPKDVDVTMIAPKGPGHTVRSEYEEGK
PF5   (95) PNIKKGATLAFSHGFAIHYNQVVPRADLDVIMIAPKAPGHTVRSEFVKGG

K9   (151) GVPCLVAVEQDATGKALDMALAYALAIGGARAGVLETTFRTETETDLFGE
PF5  (145) GIPDLIAIYQDASGNAKNVALSYAAGVGGGRTGIIETTFKDETETDLFGE

K9   (201) QAVLCGGVCALMQAGFETLVEAGYDPRNAYFECIHEMKLIVDLIYQSGFS
PF5  (195) QAVLCGGTVELVKAGFETLVEAGYAPEMAYFECLHELKLIVDLMYEGGIA

K9   (251) GMRYSISNTAEYGDYITGPKIITEDTKKAMKKILSDIQDGTFAKDFLVDM
PF5  (245) NMRYSISNNAEYGEYVTGPEVINAESRQAMRNALKRIQDGEYARMFISEG

K9   (301) SDAGSQVHFKAMRKLASEHPAEVVGEEIRSLYSWSDEDKLINN---
PF5  (295) --ATGYPSMTAKRRNNAAHGIEIIGEQLRSMMPWIGANKIVDKAKN
```

【図３Ａ】

```
          K9    (1) MEECKMAKIYYQEDCNLSLLDGKTIAVIGYGSQGHAHALNAKESG-CNVI
          K1    (1) ----MAATIWYEKDADLSVFEGKKVAVIGYGSQGHAHALNLRDSG-VDVV
          K2    (1) ----MAAQIWYENDGDLSVLDGKKVAIIGYGSQGHAHALNLRDSG-VDVV
 5        K7    (1) -----MPKKYYEKDTDLNLLRGKKVAIIGYGSQGHAHALNLHESG-VDVV
          S2    (1) -QEESLMKVYYPSDADLGLIKSKKIALLGYGSQGHAHAQNLRDSGVAEVA
          K25   (1) -----MVKVYYDEVTDN--LGDKTIAIIGYGSQGHAHAQNLRDTG-HNVV
          K26   (1) ----MAVQMEYEKDVKVPALDGKKIAVIGYGSQGHAHSQNLRDTG-SDVI
L.ラクチス(L.Lactis)  (1) ----MAVTMYYEDDVEVSALAGKQIAVIGYGSQGHAHAQNLRDSG-HNVI
10

          K9   (50) IGLYEGSKSWKRAEEQGFEVYTAAEAAKKADIIMILINDEKQATMYKNDI
          K1   (46) VGLRPTSKSVEYAKEQGLEVQSVADATAEADVVMILLPDQYQAAVYKSEI
          K2   (46) VGLRPTSKSVEQAKEQGLEVKSVPEAAAEADIIMILAPDQYQRTIWANDI
          K7   (45) VGLYNGSKSWAKAEAAGLQVATVADAAKAADLIMILLPDEKQAKIYNEEI
 15       S2   (50) IALRPDSASVKKAQDAGFKVLTVAEAAKWADLMILLAPDEHQAAIYAEDL
          K25  (43) IGIRAG-KSADWAKNDGFTVLPVSEAVQQANVVMILAPDEIQGELYEKEI
          K26  (46) IGVRPG-KSFDKAKEDGFDTYTVAEAVKLADVIMILAPDEIQQELYEAEI
L.ラクチス(L.Lactis)  (46) IGVRHG-KSFDKAKEDGFETFEVGEAVAKADVIMVLAPDELQQSIYEEDI

 20       K9  (100) EPNLEAGNMLMFAHGFNIHFGCIVPPKDVDVTMIAPKGPGHTVRSEYEEG
          K1   (96) EPNLKPGAALAFAHGFNIHYGYIKPSEDHPVFMVAPKGPGHIVRREYTNG
          K2   (96) EPNIKPGAALAFAHGFNIHYGYIKPSEDHPVFMVAPKGPGHIVRREYANG
          K7   (95) APNLEEGNALVFAHGFNIHFGQVVPPSYVDVFMVAPKGPGHLVRRTYTEG
          S2  (100) KDNLRPGSALAFAHGLNIHFGLIEPRKDIDVFMIAPKGPGHIVRSEYVRG
 25       K25  (92) APNLSAGDALAFAHGFNIHFEVTTPKEVDVFLVAPKGPGHLVRRTFSEG
          K26  (95) APNLEAGNAVGFAHGFNIHFEPIKVPADVDVFMCAPKGPGHLVRRTFSEG
L.ラクチス(L.Lactis)  (95) KPNLKAGSALGFAHGFNIHFGYIKVPEDVDVFMVAPKAPGHLVRRTYTEG

          K9  (150) KGVPCLVAVEQDATGKALDMALAYALAIGGARAGVLETTFRTETETDLFG
 30       K1  (146) RGVPVVVAVEQDPDGKTWPLCLAYAKALGALRAGAIKTTFTEETETDLFG
          K2  (146) RGVPVVVAVEQDPRGDAWDITLAYAKALGALRAGAIKTTFKEETETDLFG
          K7  (145) AGVPCLIAVHQDATGKAKQYALAYANGIGGARAGVLETTFKDETETDLFG
```

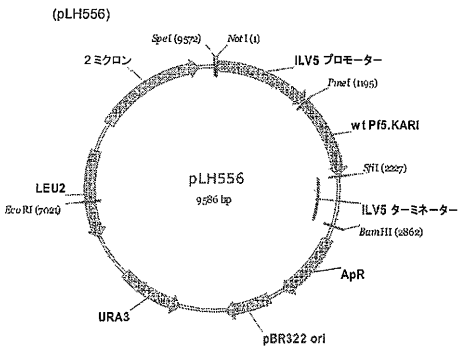
【図３Ｂ】

```
          S2  (150) GGVPCLVAVDQDASGNAHDIALAYASGIGGGRSGVIETTFREEVETDLFG
          K25 (142) FAVPALFAVYQDATGNAQETALSYAKGIGATRVGVLETTFKEETETDLFG
 5        K26 (145) FGVPALYAVYQDATGNAKDIAMDWCKGIGAARVGLLETTYKEETETDLFG
L.ラクチス(L.Lactis)  (145) FGTPALFVSHQNASGHARELAMDWAKGIGCARVGIIETTFKEETEEDLFG

          K9  (200) EQAVLCGGVCALMQAGFETLVEAGYDPRNAYFECIHEMKLIVDLIYQSGF
          K1  (196) EQDVLMGGINHLCDMGFDVLTEAGYQPEIAYFEVFHELKMLVDLANEGGL
 10       K2  (196) EQNVLMGGVNKLVEMGFEVLTDAGYQPEIAYFEVCHELKMLVDLMNEGGL
          K7  (195) EQAVLCGGVSELIKAGFETLVEAGYAPENAYFECMHEMKLIVDLLYQGGL
          S2  (200) EQAVLCGGLYALITAGFETLVEAGYAPEMAFFECMHEMKLIVDLIYEAGI
          K25 (192) EQAVLCGGLTSMIEDGFETLVEAGYQPELAYFEVCHEMKLIVDLIYEGGF
          K26 (195) EQAVLCGGLTALIETGFEVLTEAGYAPELAYFEVLHEMKLIVDLIYEGGF
L.ラクチス(L.Lactis)  (195) EQAVLCGGLTALVEAGFETLTEAGYAGELAYFEVLHEMKLIVDLMYEGGF

          K9  (250) SGMRYSISNTAEYGDYITGPKIITEDTKKAMKKILSDIQDGTFAKDFLVD
          K1  (246) NKARWSCSDTAQYGDYTS--TVITEETKKRMQYQLKRIQDGSFAKEFMDD
          K2  (246) NKARWSCSDTAQYGDYTN--TVINEDCRKRMQYHLGRIQDGSFAKEFIDD
 20       K7  (245) SMMRYSISDTAEYGDYQIGRRIITDETKKEMKKVLTEIQDGTFAKNWLLE
          S2  (250) AMMRYSISNTAEYGDLVSGPRVIHEESKKAMKALIDDIQSGRFVSEFVLD
          K25 (242) AKMRDSISNTAEYGDYVSGSRLITEQTKANMKNVLKDIQNGTFAKGFIAD
          K26 (245) KKMRQSISNTAEFGDYVSGPRVITEQVKENMKAVLADIQNGKFANDFVND
L.ラクチス(L.Lactis)  (245) TKMRQSISNTAEFGDYVTGPRIITDEVKKNMKLVLADIQSGKFAQDFVDD
 25

          K9  (300) MSDAGSQVHFKAMRKLASEHPAEVVGEEIRSLYSWSDEDKLINN------
          K1  (294) QAAG--APKFKKLQEEYSHPRLETVGPKLRAMPSWNNQVDADADMAESFN
          K2  (294) QDAG--APKFKKLQEEYGNVRLETVGPKLRAMPSWNNGQDDDADMAT-FT
          K7  (295) NQTN--RPGFNARRRMEAEHPIEKVGKELRGMMSWIDTAKVD--------
 30       S2  (300) NRAG--QPELKAARKRMAAHPIEQVGARLRKMMPWIASNKLVDKARN-KL
          K25 (292) NQAG--FPEFKKMREQNGNHPIEKVGSELRKMMPFVTKD----------
          K26 (295) YKAG--RPKLTAYREAANLEIEKVGAELRKAMPFVGQNDDDAFKIYN--
L.ラクチス(L.Lactis)  (295) FKAG--RPKLIAYREAANLEIEKTGAELRQAMPFTQSGDDDAFKIYQ--
```

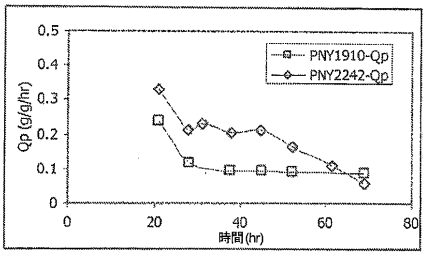
【図３Ｃ】

```
          K9  (344) ----------
          K1  (342) GKIARTQVQ
 5        K2  (341) GKIARSQVQ
          K7  (335) ----------
          S2  (347) GCF-------
          K25 (329) ----------
          K26 (341) ----------
10   L.ラクチス (341) ----------
     (L.Lactis)
```

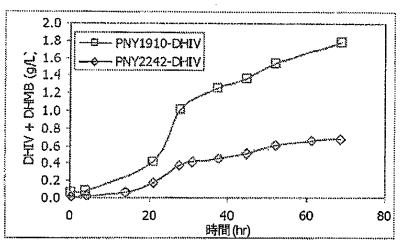
【図４】



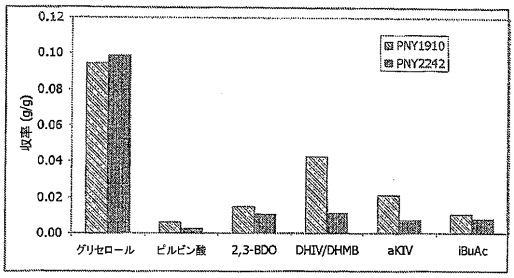
【図５】



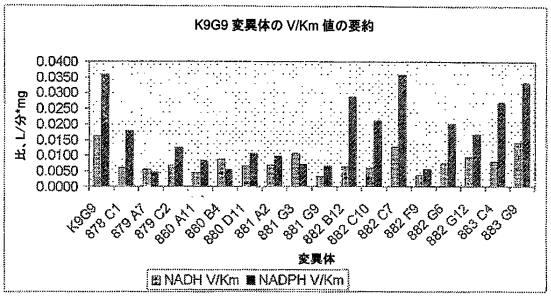
【図６】



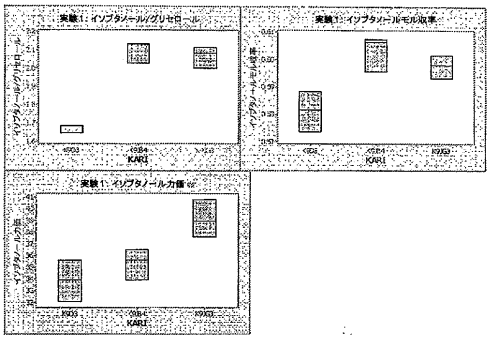
【図７】



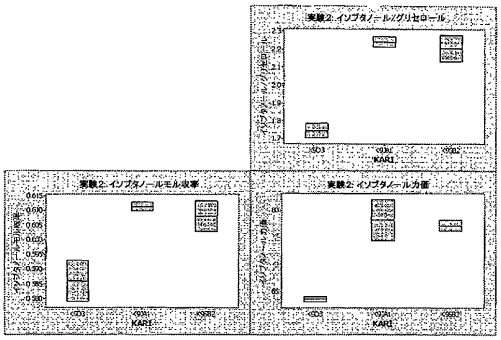
【図８】



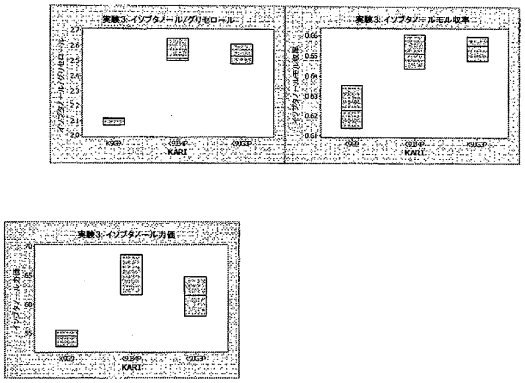
【図９Ａ】



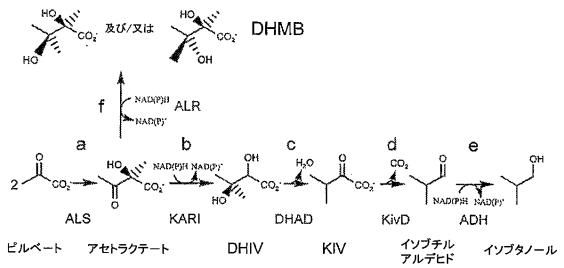
【図９Ｂ】



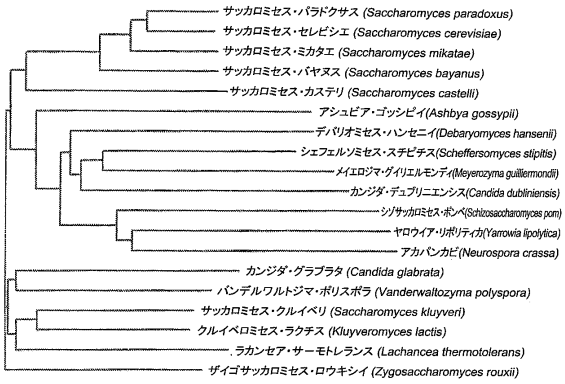
【図９Ｃ】



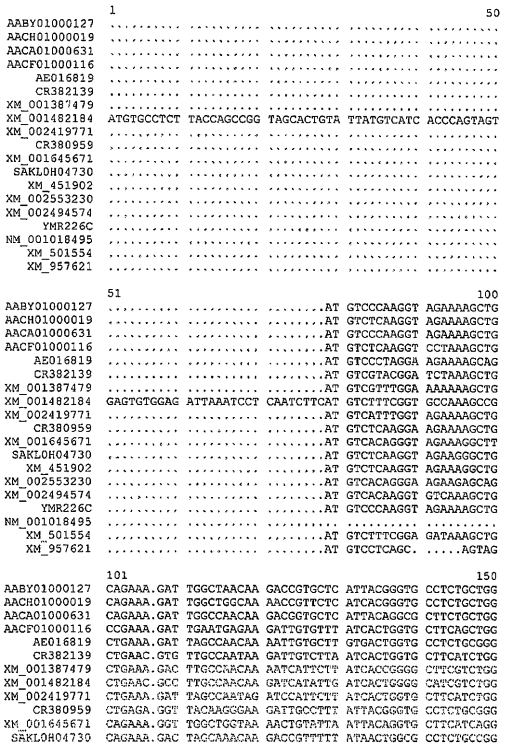
【図１０】



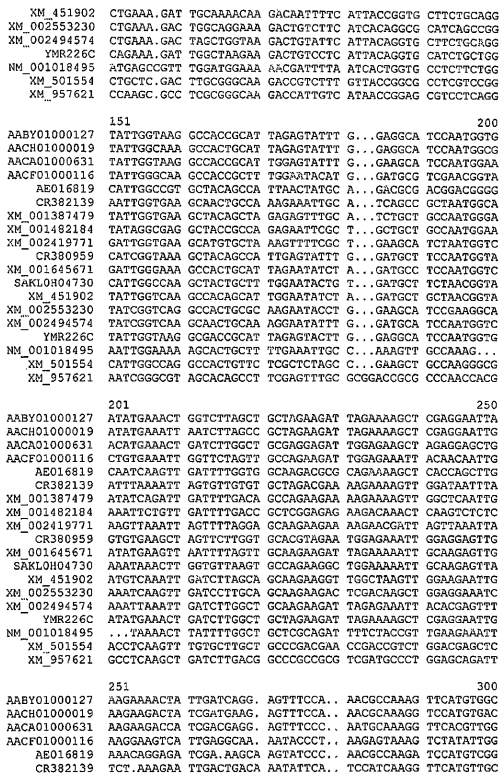
【図１１】



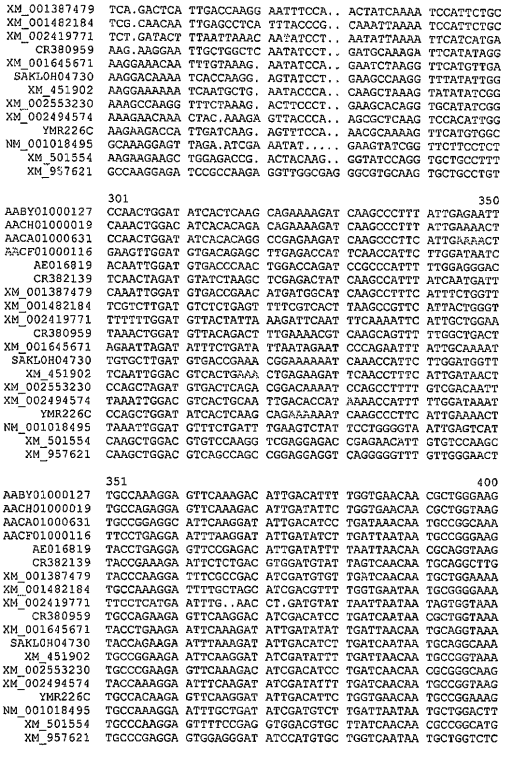
【図１２－１】



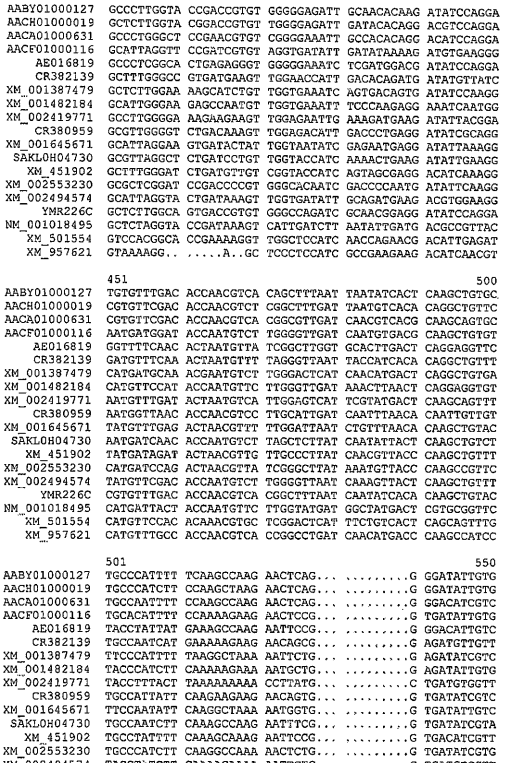
【図１２－２】



【図１２－３】



【図１２－４】



【図１２－５】

```
      YMR226C  TGCCCATATT CCAAGCCAAG AATTCAG... .........G AGATATTGTA
  NM_001018495 TTCCTATATT CTACAGCAAA AACAAGG... .........G TGATATTTTG
    XM_501554  TCGGCGAGAT GCGAAAGCGA AACAAGG... .........G CGACATTGTC
    XM_957621  TGCCCATCTT CAAGGCCCGC GGCTCCGAGG GTGGTTCGGG AGACATTGTG

                551                                               600
AABY01000127 AACTTGGG.T TCGGTGGCTG GCAGGGATGC ATACCCAACG GGTTCCATCT
AACH01000019 AACTTGGG.C TCGGTAGCTG GCAGAGATGC ATACCCAACG GGCTCCATCT
AACA01000631 AACTTGGGGC TCGGTGGCCG GCAGAGACGC ATACCCCACA GGCTCCATCT
AACF01000116 AACTTAGG.T TCAGTTGCTG GAAGAGATGC ATACCCAACA GGGTCCATTT
     AE016819 AATGTTGG.G TCGATTGCCG GCCGCGAAGC CTACCCTGGT GGCTCTATTT
     CR382139 AATATAGG.T TCAATTGCTG GAAGAGACTC TTACCCTGGA GGTGGAATTT
  XM_001387479 AACATCGG.T TCGATTGCTG GAAGAGACCC TTACCCTGGT GGATCGATCT
  XM_001482184 AACATTGG.C TCAGTGGCCG GTAGAGAACC TTACCCTGGA GGTGCAGTAT
  XM_002419771 TTCATTGG.A AGTATTGCTG GACGTGTTCC TTATAAAAAT GGAGGTGGTT
     CR380959  AACTTGGG.A TCGATTGCTG GTAGACGCC ATACCCAACG GGTGCTATAT
  XM_001645671 AATTTAGG.G TCAATTGCAG GCATAGAAGC TTACCCAACA GGATCTATAT
   SAKL0H04730 AACTTGGG.G TCTGTCGCTG GTAGAGATGC TTATCCAACC GGTGCAATCT
    XM_451902  AACTTAGG.T TCTGTTGCCG GTAGAGATGC ATATCCAACT GGTTCTATCT
  XM_002553230 AACCTGGG.T TCTGTCGCTG GCAGAGAAGC TTACCCTACA GGATCTATTT
  XM_002494574 AACATTAG.T TCGGTTGCTG GTAGAGAGGC ATACCCAGGT GGTTCCATTT
      YMR226C  AATTTGGG.T TCAATCGCTG GCAGAGACGC ATACCCAACA GGTTCTATCT
  NM_001018495 AACGTTGG.C AGTATTGCCG GCAGAGAATC ATACGTAGGC GGCTCCGTTT
    XM_501554  AACATTGG.C TCCATCGCCG GACGAGAGCC CTACGTTGGA GGAGGAATCT
    XM_957621  AACATCGG.T TCTATTGCCG GGAGAGAACC ATACGCGGGA GGCTCCATCT

                601                                               650
AABY01000127 ATTGTGCCTC CAAGTTTGCC GTGGGGGCGT TCACTGATAG TTTAAGAAAG
AACH01000019 ATTGTGCATC TAAGTTTGCC GTCGGGGCGT TCACTGAGAG TTTGAGAATG
AACA01000631 ACTGTGCTTC CAAGTTTGCC GTCGGTGCGT TCACTGACAG TTTGAGAAAG
AACF01000116 ACTGTGCTTC TAAATTTGCC GTGAGGGCCT TTACTGAAAG TTTGAGAAGG
     AE016819 ACTGTGCCAC GAAACATGCG GTCAAGGCTT TCACCAGGGC CATGCGGAAG
     CR382139 ACTGTCCAAC TAAGGCAAGT GTCAAGTCGT TTTCGCAAGT TTTAAGAAAG
  XM_001387479 ACTGTGCCTC CAAGGCTGCT GTTAAGTTCT TCTCGCATTC TTTGAGAAAG
  XM_001482184 ACTGTGCTTC AAAGGCAGCA GTTAACTACT TTTCTCATTC TTTGAGAAAG
  XM_002419771 ATTGTGCATC TAAAGCTGCT GTTCGTAGTT TCACCGATAC ATTTAGAAAA
     CR380959  ACTGTGCAAC AAAACATGCT GTCAGGGCAT TCACACAATC CTTAAGGAAG
  XM_001645671 ATTGTGCAAC TAAATTTGCA GTTAAAGCAT TCACTGAAAG TTTAAGAAAG
   SAKL0H04730 ACTGTGCTAG CAAACATGCA GTCAGAGCCT TCACTCAAAG TTTGAGGAAG
    XM_451902  ATTGTGCTTC GAAGCATGCT GTCAGAGCGT TCACTCAGTC TTTGAGAAAA
  XM_002553230 ACTGCGCTAC GAAGCACGCG GTGCGTGCTT TCACCCAGAG CCTGCGCAAG
  XM_002494574 ACTGTGCTAC TAAACACGCT GTTAAGGCAT TCACTGAAAG TTTGCGTAAG
      YMR226C  ATTGTGCCTC TAAGTTTGCC GTGGGGGCGT TCACTGATAG TTTGAGAAAG
  NM_001018495 ACTGCTCTAC CAAGTCTGCC CTTGCTCAAT TCACTTCCGC TTTGCGTAAG
    XM_501554  ACTGTGCCAC CAAGGCCGCC GTGCGATCTC TCACTGAGAC TCTCCGAAAA
    XM_957621  ACTGCGCCAC CAAGGCTGCT GTGCGCAGCT TCACCGACGC GCTGCGCAAG

                651                                               700
AABY01000127 GAGCTTATCA ACACCAAGAT CAGAGTCATC CTAATCGCAC CAGGGCTAGT
AACH01000019 GAACTTATAA ACACTAAGAT TAGAGTCATT CTAATTGCAC CAGGGTTAGT
AACA01000631 GAACTGATCA ACACGAAGAT CAGAGTTATC TTGATCGCGC CGGGGCTGGT
AACF01000116 GAATTAATTA ATACCAAGAT TAGGGTGATA TTGATAGCCC CGGGTATCGT
     AE016819 GAGCTCATTA GCACCAAGAT CCGGGTCTTC GAAATTGCGC CGGGCTCTGT
     CR382139 GAATTGATTA GCACCAAGAT TAGAGTTCTT GAGGTTCACC CTGGTAATGT
  XM_001387479 GAACTCATTA ACACCAGAAT CAGAGTTTTG GAAGTTGATC CAGGTGCTGT
  XM_001482184 GAAACTATCA ATTCCAAAAT CAGGGTCATG GAGGTGGATC CTGGGGCAGT
  XM_002419771 GAAACTATTA ATACTGGTAT TAGAGTCATT GAAGTTGATC CAGGTGCAGT
```

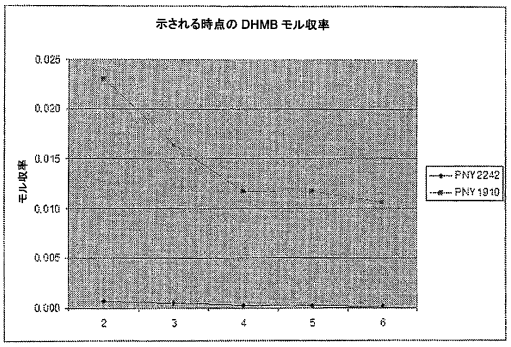
【図１２－６】

```
      CR380959  GAATTGATCA ACACCGACAT TAGAGTAATT GAAATTGCTC CTGGTATGGT
  XM_001645671  GAATTGATTA ATACAAAGAT CAGAGTTATT GAAATTGCAC CAGGTATGGT
   SAKL0H04730  GAATTGGTGA ACACCAATAT CAGAGTGATT GAAATTGCTC CGGGTAATGT
    XM_451902  GAATTAATCA ATACTGGTAT TAGGGTCATT GAGATTGCTC CAGGTAATGT
  XM_002553230 GAACTGATCA ACACAAACAT CAGGGTTATT GAGGTCGCTC CAGGTAACGT
  XM_002494574 GAATTAGTCG ATACAAAAAT CAGAGTCATG AGTATTGATC CTGGTAATGT
      YMR226C  GAGCTCATCA ACACTAAAAT TAGAGTCATT CTAATTGCAC CAGGGCTAGT
  NM_001018495 GAGACTATTG ACACTCGCAT TCGTATTATG GAGGTTGATC CTGGCTTGGT
    XM_501554  GAGAACATCG ACACTCGAAT CCGAGTCATT GAGGTTGATC CTGGAGCCGT
    XM_957621  GAGCTGATCG CCACGCGCAT CCGTGTCATG GAGATTGACC CTGGCCAGGT

                701                                               750
AABY01000127 CGAAACTGAA TTTTCACTGG TTAGATACAG AGGCAACGAG GAGCAAGCCA
AACH01000019 CGAAACTGAG TTTTCCCTGG TTAGATACAG AGGTAACGAA GAACAAGCCA
AACA01000631 TGAGACCGAG TTCTCACTGG TCAGATACAG AGGTAATGAG GAACAAGCTA
AACF01000116 CGAAACTGAA TTCTCAGTTG TTAGATACAA GGGTGATAAT GAGCGTGCTA
     AE016819 AGAAACGGAA TTCTCCATGG TTCGTATGCG CGGTAACGAA GAGAATGCCA
     CR382139 TGAAACTGAA TTTTCAAATG TCAGATTCAA GGGCGATATG GAAAAGGCAA
  XM_001387479 GTTGACCGAG TTCTCTTTGG TTCGTTTCCA CGGTGATCAG GGAGCTGCTG
  XM_001482184 AGAGACAGAG TTCTCGTTGG TTCGTTTTGG CGGTGATGCC GAGGCTGCGA
  XM_002419771 ACTTACTGAA TTTAGTGTTG TTCGTTATAA AGGTGACACT GATGCTGCCG
     CR380959  CGAAACCGAG TTTTCTGTGG TCAGGTACAA AGGTGACAAG TCCAAAGCAG
  XM_001645671 TAACACTGAA TTTTCTGTAA TTAGATATAA AGGTGACCAA GAAAAGGCAG
   SAKL0H04730 TGAAACCGAG TTTTCCTTAG TTAGATATAA AGGTGATACG GACCGTGCTA
    XM_451902  CGAAACTGAG TTCTCTCTAG TTAGATACAA GGGTGATGCC GATCGTGCTA
  XM_002553230 GGAGACCGAG TTTTCTCTGG TTAGATACAA GGGCGACTCT GAGAAAGCCA
  XM_002494574 AGAGACCGAA TTTTCTATGG TTAGATTCCG TGGTGATACA GAAAAGGCAA
      YMR226C  CGAGACTGAA TTTTCACTAG TTAGATACAG AGGTAACGAG GAACAAGCCA
  NM_001018495 CGAAACCGAA TTCAGCGTTG TGAGATTCCA CGGAGACAAA CAAAAGGCTG
    XM_501554  TGAGACCGAG TTCTCCGTCG TGCGATTCCG AGGAGACAAG TCCAAGGCCG
    XM_957621  CGAGACCGAG TTCAGCGTGG TGAGGTTCTA TGGTGATAAG AACAAGGCTG

                751                                               800
AABY01000127 AGAATGTCTA CAA.GGACAC CACCCCATTA ATGGCTGATG ACGTGGCTGA
AACH01000019 AGAATGTTTA CAA.GGACAC CACTCCGTTG ATGGCCGATG ACGTGGCTGA
AACA01000631 AAAACGTCTA CAA.GGACAC TACGCCGTTG ATGGCCGACG ACGTGGCTGA
AACF01000116 AATCTGTCTA CGATGGAGTT CACCCCTTGG AAG.CAGACG ACGTAGCAGA
     AE016819 AGAAAGTGTA CCA.GGGATT TGAACCCCTA GATGGTGATG ATATCGCTGA
     CR382139 AGCTGGTTTA CGC.GGGTAC TGAACCATTA TTATCCGAAG ACGTAGCTGA
  XM_001387479 ATGCTGTTTA TGA.AGGTAC CCAACCTTTG GATGCCTCTG ATATCCCAGA
  XM_001482184 AAAAGGTGTA TGA.GGGAAC CGAGCCTTTG GGCCCAGAAG ATATTGCGGA
  XM_002419771 ATGCTGTTTA TAC.TGGTAC TGAACCATTA ACACCAGAAG ATGTTGCTGA
     CR380959  ACGACGTCTA CAG.AGGTAC AACACCACTA TATGCCGATG ATATCCGCGA
  XM_001645671 ATAAAGTTTA TGA.AAACAC TACTCCTTTA TATGCAGATG ACATCGCTGA
   SAKL0H04730 AAAAGGTTTA TGA.AGGTAC TAACCCATTA TATGCAGATG ACATTGCAGA
    XM_451902  AACAGGTTTA CAA.AGGTAC TACTCCTCTA TATGCAGATG ACATTGCTGA
  XM_002553230 AGAAGGTTTA CGA.AGGCAC ACAACCCCTT TACGCTGACG ATATCGCAGA
  XM_002494574 AGAAGGTTTA CCA.AGACAC TGTCCCATTA TATGCAGATG ACATTGCAGA
      YMR226C  AGAATGTTTA CAA.GGATAC TACCCCATTG ATGGCTGATG ACGTGGCTGA
  NM_001018495 ATAATGTTTA CAA.AAATAG TGAGCCTTTG ACACCCGAAG ACATTGCTGA
    XM_501554  ACGCTGTTTA CGC.TGGAAC CGAGCCTCTG GTCGCTGACG ATATTGCCGA
    XM_957621  ATGCCGTCTA TGC.CGGTGT CGATCCCTTG ACGCCCGATG ATATCGCAGA

                801                                               850
AABY01000127 TTTGATCGTG TACGCAACTT CCAGGAAACA AAACACTGTA ATTGCAGACA
AACH01000019 TTTGATTGTG TATGCGACTT CAAGGAAGCA GAACACTGTA ATTGCAGACA
AACA01000631 CTTAATCGTA TATTCCACTT CCAGAAAGCA GAACACCGTG GTTGCCGACA
```

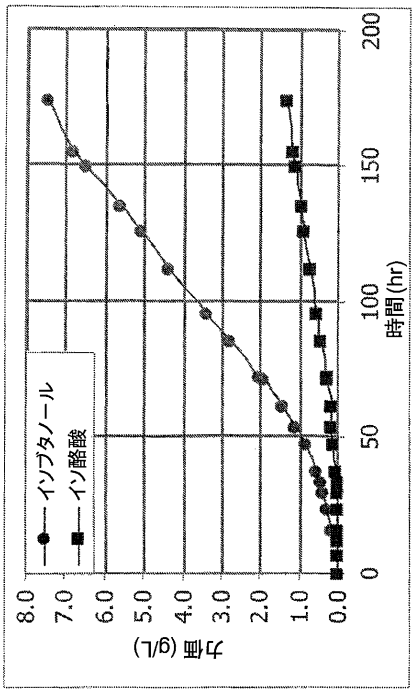
【図１２－７】

```
AACF01000116  TTTAATTGTA TACACCACTT CAAGAAAACA GAACACAGTA ATTGCTGACA
     AE016819  TACAATTGTC TATGCCACAT CCAGAAGATC CAACACCGTA GTTGCAGAGA
     CR382139  GGTTGTCGTA TTCGGACTTA CAAGAAAGCA AAATACCGTT ATTGCTGAGA
  XM_001387479 AGTTATCGTG TTTGGTATCA CCAGAAAGCA GAACACCGTC ATAGCCGAAA
  XM_001482184 AATCATTGTG TTTGCTGTGT CGAGAAAAGC CAAAACTGTC ATTGCGGAAA
  XM_002419771 AGTGGTTGTT TTTGCATCTT CAAGAAAACA AAATACCGTT ATTGCTGATA
     CR380959  TTTGATTGTG TACTCTACCA GCAGAAAGCC AAACATGGTG GTAGCAGATG
  XM_001645671 TTTGATAGTT TACACCACTT CTAGAAAATC GAATACCGTT ATCGCTGATG
   SAKL0H04730 CCTTATTGTG TATGCTACTT CTAGAAAGCC TAATACTGTC ATTCCGGATG
    XM_451902  CTTGATCGTT TATGCCACTT CAAGAAAACC TAATACTGTC ATCGCTGATG
  XM_002553230 CCTAATCGTT TACGCAACCT CGAGAAAACC AAACACCGTC ATCGCGGACG
  XM_002494574 TTTAATCGTC TATGCAACCT CTAGAAAGCA AAACACTGTC ATTGCTGACA
      YMR226C  TCTGATCGTC TATGCAACTT CCAGAAAACA AAATACTGTA ATTGCAGACA
  NM_001018495 GGTGATTCTT TTTGCCCTCA CTCGCAGAGA AAACGTCGTT ATTGCCGATA
    XM_501554  GTTCATCACC TACACTCTCA CTCGACGAGA GAATGTCGTC ATTGCCGATA
    XM_957621  GATCGTGGTG TTCGTCGTAA CACGACGGGA GAACGTTGTT GTTGCTGATA

                851                                               900
AABY01000127 CGCTAATCTT TCCAACCAAC CAAGCATCGC CTCACCACAT CTTCCGTGGA
AACH01000019 CACTAATCTT TCCTACCAAC CAAGCGTCAC CTTACCATAT CTTTCGCGGG
AACA01000631 CCCTGATCTT CCCCACCAAC CAAGCCTCGC CCTACCACAT CTTCGCGGGT
AACF01000116 CTTTGATATT CCCAACCTCT CAAGGTTCCG CATTCCACGT CCATCGCGAT
     AE016819 TGGTCGTTTA CCCATCCGCG CAAGGTTCTC TGTACGATAC TCACCGCAAC
     CR382139 CATTAGTCTT TTCAACCAAT CAAGCCAGCT CATCTCACTT ATACCGTGAA
  XM_001387479 CCTTGGTATT CCCAAGTCAC CAGGCTTCTG CCTCTCATGT TTACAAGGCT
  XM_001482184 CTTTGGTGTT TCCTACCCAT CAGGCTGGAG CAGTTCATGT TCATAGAGGG
  XM_002419771 CTTTGATTTT CCCAAATCAT CAAGCTTCTC CAGATCATGT TTATAGAAAA
     CR380959  TCCTGGTCTT CCCAACACAC CAGGCATCGG CTTCGCACAT CTACAGGGGC
  XM_001645671 TTTTGGTATT CCCAACATGC CAAGCTTCTG CATCCCATAT CTATCGTGGA
   SAKL0H04730 TTTTGGTTTT TGCTTCAAAC CAAGCATCCC CTTACCATAT CTATCGCGGT
    XM_451902  TTTTGGTATT TGCTTCCAAC CAAGCATCTC CTTACCACAT TTACCGTGGC
  XM_002553230 TTTTGGTTTT CGCTTCGAAC CAGGCTTCGC CTTACCACAT TTACCGTGGT
  XM_002494574 CTTTGATCTT CTCTTCTAAC CAGGCATCAC CATACCACCT CTACAGAGGC
      YMR226C  CTTTAATCTT TCCAACAAAC CAAGCGTCAC CTCATCATAT CTTCCGTGGA
  NM_001018495 CACTTGTTTT CCCATCCCAT CAAGGTGGTG CCAATCATGT GTACAGAAAG
    XM_501554  CTCTCATTTT CCCCAACCAC CAGGCTTCTC CTACTCACGT CTACCGAAAG
    XM_957621  CGTTGGTCTT CCCTAGCCAT CAGGCTGGCG CTGGTATTAT GCACCGCAAG

                901                 921
AABY01000127 TGA..... .......... . (配列番号41)
AACH01000019 TGA..... .......... . (配列番号47)
AACA01000631 TAA..... .......... . (配列番号43)
AACF01000116 TAA..... .......... . (配列番号45)
     AE016819 TAA..... .......... . (配列番号49)
     CR382139 AGCGATAAAT AA..... . (配列番号53)
  XM_001387479 CCTAAGTAG. .......... . (配列番号55)
  XM_001482184 CCGCTTGAGT GA..... . (配列番号57)
  XM_002419771 CCTAATTAA. .......... . (配列番号61)
     CR380959  GACTAA.... .......... . (配列番号51)
  XM_001645671 TAA..... .......... . (配列番号59)
   SAKL0H04730 GACTAA.... .......... . (配列番号69)
    XM_451902  GAATAG.... .......... . (配列番号67)
  XM_002553230 TAG..... .......... . (配列番号65)
  XM_002494574 TCTCAAGACA AAACCAATTG A (配列番号63)
      YMR226C  TAA..... .......... . (配列番号24)
  NM_001018495 CAAGCGTAG. .......... . (配列番号73)
    XM_501554  AACTGA.... .......... . (配列番号71)
    XM_957621  TCGACATGA. .......... . (配列番号75)
```

【図１３】



【図１４】



【配列表】
0006099623000001.app

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 61/467,249
(32)優先日 平成23年3月24日(2011.3.24)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/472,484
(32)優先日 平成23年4月6日(2011.4.6)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/472,487
(32)優先日 平成23年4月6日(2011.4.6)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/472,497
(32)優先日 平成23年4月6日(2011.4.6)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/472,474
(32)優先日 平成23年4月6日(2011.4.6)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 61/570,513
(32)優先日 平成23年12月14日(2011.12.14)
(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 キャサリン・ジェイ・ギブソン
アメリカ合衆国デラウェア州１９８０９．ウィルミントン．メープルアベニュー３０２
(72)発明者 ホーンシエン・ホーァ
アメリカ合衆国デラウェア州１９８０３．ウィルミントン．タッカウェイドライブ１２０
(72)発明者 リサ・エル・ホワーン
アメリカ合衆国デラウェア州１９７０７．ホッケシン．オールドウィルミントンロード１４２３
(72)発明者 ダニエル・ピー・オキーフ
アメリカ合衆国ペンシルベニア州１９０７８－２７３１．リドリーパーク．ショーロード３２８
(72)発明者 アーサー・レオ・クルッケバーグ
アメリカ合衆国デラウェア州１９８０６．ウィルミントン．ペンシルベニアアベニュー１４０４
(72)発明者 ヨウゲン・リー
アメリカ合衆国ニュージャージー州０８５３４．ペニントン．ケンツデールドライブ４
(72)発明者 ローリ・アン・マッジオーホール
アメリカ合衆国デラウェア州１９８１０．ウィルミントン．ノースロックフィールドドライブ３４１３
(72)発明者 ジェシカ・マケルヴァイン
アメリカ合衆国デラウェア州１９８０７．ウィルミントン．マウントエアリードライブ７
(72)発明者 マーク・ジェイ・ネルソン
アメリカ合衆国デラウェア州１９７１１．ニューアーク．フィスクレーン７０７
(72)発明者 ランジャーン・パトナーイク
アメリカ合衆国デラウェア州１９７０２．ニューアーク．ドナルドプレストンドライブ５
(72)発明者 スティーヴン・ケアリー・ロスマン
アメリカ合衆国デラウェア州１９８１０．ウィルミントン．ロングウッドドライブ２６２１

審査官 鳥居 敬司

(56)参考文献 国際公開第２０１０／０５１５２７（WO，Ａ１）
米国特許出願公開第２００９／０１６３３７６（ＵＳ，Ａ１）
米国特許出願公開第２０１０／０１２９８８６（ＵＳ，Ａ１）

国際公開第２０１１／００８９２４（WO，Ａ１）
"BOMCX7_9FIRM", [online], retrieved from UniProtKB/TrEMBL, 2011.02, [2016.2.3検索],
Accession No.BOMCX7

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ　１５／００－１５／９０
Ｃ１２Ｎ　　１／００－１／３８
Ｃ１２Ｎ　　９／００－９／９９
Ｃ１２Ｐ　　７／００－７／６６
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＵｎｉＰｒｏｔ／ＧｅｎｅＳｅｑ
ＷＰＩＤＳ／ＷＰＩＸ（ＳＴＮ）