

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7635118号
(P7635118)

(45)発行日 令和7年2月25日(2025.2.25)

(24)登録日 令和7年2月14日(2025.2.14)

(51)国際特許分類		F I		
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 P	19/12 (2006.01)	C 1 2 P	19/12	
C 1 2 P	19/04 (2006.01)	C 1 2 P	19/04	C
C 1 2 N	15/54 (2006.01)	C 1 2 N	15/54	
請求項の数 17 (全27頁)				
(21)出願番号	特願2021-512664(P2021-512664)	(73)特許権者	511297753	
(86)(22)出願日	令和1年9月2日(2019.9.2)		クリスチャン・ハンセン・ハーエムオー	
(65)公表番号	特表2021-536259(P2021-536259 A)		・ゲーエムベーハー	
(43)公表日	令和3年12月27日(2021.12.27)		Chr. Hansen HMO GmbH	
(86)国際出願番号	PCT/EP2019/073363		ドイツ国 5 3 6 1 9 ラインブライトバ	
(87)国際公開番号	WO2020/048927		ッハ, マールヴェク 3 2	
(87)国際公開日	令和2年3月12日(2020.3.12)		Maarweg 3 2 5 3 6 1 9 Rh	
審査請求日	令和4年9月1日(2022.9.1)		einbreitbach Germa	
(31)優先権主張番号	18192898.7	(74)代理人	100118902	
(32)優先日	平成30年9月6日(2018.9.6)		弁理士 山本 修	
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)	(74)代理人	100106208	
			弁理士 宮前 徹	
		(74)代理人	100196508	
			弁理士 松尾 淳一	
				最終頁に続く

(54)【発明の名称】 混合原料を利用した全発酵によるオリゴ糖の発酵生産

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

ラクトース又はその還元末端にガラクトース-β1,4-グルコース部分を含む目的オリゴ糖の製造法であって、該方法は、

- a) 以下：
- 遊離グルコースがラクトースの細胞内生合成に入手可能になるように、グルコースを培地から微生物細胞の細胞質内に転移させるための少なくとも一つのグルコース輸送体であって、グルコース促進拡散タンパク質及びグルコース転移ペルメアラーゼからなる群から選ばれる、少なくとも一つのグルコース輸送体と；
 - UDP-ガラクトース生合成経路と；
 - 遊離グルコースをガラクトシル化してラクトースを細胞内産生できる少なくとも一つのβ-1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼと；そして
 - 下記i)及びii)の1つ以上と；
- i) フルクトース輸送体、フルクトキナーゼ-6活性及び6-ホスホフルクトキナーゼ-1活性；及び、
- ii) フルクトース特異的ホスホトランスフェラーゼ系、及び1-ホスホフルクトキナーゼを含むように遺伝子操作された、遺伝子操作微生物細胞を提供し；

b) 該微生物細胞を、前記ラクトース又は目的オリゴ糖の産生が可能な培地及び条件下で培養し、ここで、前記培地は、グルコースとフルクトースとの混合物を主炭素源として含有し；そして

c) 培地及び／又は微生物細胞からラクトース又は目的オリゴ糖を回収する各工程を含む方法。

【請求項 2】

目的オリゴ糖が、2'-フコシルラクトース、3'-フコシルラクトース、2', 3-ジフコシルラクトース、3'-シアリルラクトース、6'-シアリルラクトース、3-フコシル-3'-シアリルラクトース、ラクトーN-テトラオース、ラクトーN-ネオテトラオース、ラクトーN-フコペンタオースI、ラクトーN-フコペンタオースII、ラクトーN-フコペンタオースIII、ラクトーN-フコペンタオースV、ラクトーN-ジフコシルヘキソースI、ラクトーN-ジフコシルヘキソースII、ラクトーN-シアリルペンタオースLSTa、LSTb、LSTcからなる群から選ばれるヒトミルクオリゴ糖である、請求項1に記載の方法。

10

【請求項 3】

グルコースとフルクトースの混合物が、スクロースの加水分解によって得られている、請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

前記微生物細胞が外からラクトースを供給せずに培養される、請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

前記微生物細胞が、グルコース輸送体をコードする少なくとも一つの遺伝子を発現又は過剰発現しており、前記少なくとも一つの遺伝子が、glf、galP及びそれらの機能的変異体からなる群から選ばれる、請求項1に記載の方法。

20

【請求項 6】

前記微生物細胞が、ホスホグルコムターゼ、UTP-グルコース-1-リン酸-ウリジルトランスフェラーゼ、及びUDP-グルコース 4-エピメラーゼを有する、請求項1に記載の方法。

【請求項 7】

前記β-1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼが、髄膜炎菌のlgtB、アグレガチバクター・アフロフィルスのlex-1、パスツレラ・ムルトシダのgalTpm1141及びそれらの機能的変異体からなる群から選ばれる遺伝子によってコードされている、請求項1に記載の方法。

【請求項 8】

前記微生物細胞が、少なくとも一つの追加のグリコシルトランスフェラーゼを有する、請求項1に記載の方法。

30

【請求項 9】

前記グリコシルトランスフェラーゼが、フコシルトランスフェラーゼ、シアリルトランスフェラーゼ、グルコサミニルトランスフェラーゼ及びガラクトシルトランスフェラーゼからなる群から選ばれる、請求項8に記載の方法。

【請求項 10】

前記微生物細胞が、グルコース転移ホスホトランスフェラーゼ系を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 11】

前記微生物細胞がフルクトース-1, 6-ビスホスファターゼを含む、請求項1に記載の方法。

40

【請求項 12】

前記微生物細胞が、そのグルコース-6-リン酸イソメラーゼの欠失又は機能的不活化を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 13】

前記追加のグリコシルトランスフェラーゼがフコシルトランスフェラーゼであり、前記微生物細胞が、マンノース-6-リン酸イソメラーゼ、ホスホマンノムターゼ、マンノース-1-リン酸-グアニリルトランスフェラーゼ、GDP-マンノース-4, 6-デヒドラターゼ、GDP-1-フコースシンターゼを有する、請求項8に記載の方法。

50

【請求項 14】

前記微生物細胞が、目的オリゴ糖を細胞から輸送するエキスポータータンパク質又はペルメアーゼを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

前記目的オリゴ糖を細胞から輸送するエキスポータータンパク質又はペルメアーゼが糖排出輸送体である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記微生物細胞が、エシェリキア属、ラクトバチルス属、コリネバクテリウム属、バチルス属、連鎖球菌属、腸球菌属、ラクトコッカス属及びクロストリジウム属の細菌からなる群から選ばれる細菌細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

前記微生物細胞が、大腸菌、コリネバクテリウム・グルタミカム、クロストリジウム・セルロティカム、クロストリジウム・リュングダリイ、クロストリジウム・オートエタノゲナム、クロストリジウム・アセトブチリカム、枯草菌、バチルス・メガテリウム、ラクトバチルス・カゼイ、ラクトバチルス・アシドフィルス、ラクトバチルス・ヘルベティカス、ラクトバチルス・デルブレッキイ、及びラクトコッカス・ラクチスからなる細菌種の群から選ばれる細菌細胞である、請求項 16 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ラクトース又はその還元末端にガラクトース-β1, 4-グルコース部分を含む目的オリゴ糖を産生できる細菌宿主細胞と、ラクトース又は末端ガラクトース-β1, 4-グルコース部分を含む目的オリゴ糖の製造法に関する。

【背景技術】

【0002】

ヒトミルク（人乳）は、糖質（炭水化物）、脂肪、タンパク質、ビタミン、ミネラル及び微量元素の複合混合物で構成される。ヒトミルクの最主要画分は糖質からなる。ヒトミルク中の糖質画分はさらに、（i）ラクトース（乳糖）と（ii）オリゴ糖（ヒトミルクオリゴ糖、HMO）に分けられる。乳児では、ラクトース（ガラクトース-β1, 4-グルコース）はエネルギー源として使用されるが、オリゴ糖は代謝されない。オリゴ糖画分は全糖質画分の最大 1/10 を占め、おそらくは 150 種を超える異なるオリゴ糖で構成されている。これらの複合オリゴ糖の存在及び濃度はヒトに特有であるので、酪農動物を含む他の哺乳動物の乳中に大量に見出すことはできない。

【0003】

最も著明なヒトミルクオリゴ糖は 2'-フコシルラクトースと 3'-フコシルラクトースで、合わせて全 HMO 画分の 1/3 にもなりうる。ヒトミルク中に存在する更なる著明 HMO は、ラクト-N-テトラオース、ラクト-N-ネオテトラオース及びラクト-N-フコペンタオース I である。これらの中性オリゴ糖のほか、ヒトミルク中には、3'-シアリルラクトース、6'-シアリルラクトース及び 3-フコシル-3'-シアリルラクトース、シアリル-ラクト-N-テトラオース、ジシアリル-ラクト-N-テトラオースなどの酸性 HMO も見出すことができる。注目すべきは、大部分の HMO は、それらの還元末端にガラクトース-β1, 4-グルコース部分を含むことである。HMO の構造は、上皮細胞表面複合糖質のエピトープであるルイス x (LeX) のようなルイス式血液型抗原に密接に関連している。HMO と上皮エピトープとの構造的類似性は、HMO の細菌性病原体に対する保護特性の理由を説明する。

【0004】

ヒトミルク中にオリゴ糖が存在することは古くから知られており、これらのオリゴ糖の生理学的機能は何十年もの間、医学研究の対象であった。量が豊富な一部のヒトミルクオリゴ糖に関しては、特定機能が既に確認されている。

【0005】

前述のように腸管における局所作用のほかに、HMOは乳児においては体循環に入ることによって全身作用も発揮することが示されている。また、タンパク質-炭水化物相互作用、例えばセレクチン-白血球結合に対するHMOの作用は、免疫反応を調節し、炎症反応を抑制することができる。さらに、HMOが乳児の微生物叢の発達にとって重要な基質であることの認識もますます高まっている。

【0006】

プレバイオティックオリゴ糖、特にHMOの有益性はよく研究されているが、天然源からの入手性が限られているため、HMOの効率的で商業的な、すなわち大規模な生産が非常に望まれている。

【0007】

個々のヒトミルクオリゴ糖の大規模生産を企図して、これらのオリゴ糖のいくつかに対する化学的経路が開発された。しかしながら、そのような方法は、数種類の有害化学物質を使用するため、最終製品を汚染する危険性がある。少なくとも今日まで化学合成による方法では大規模量はもとより食品用途に十分な量も提供できていない。

【0008】

ヒトミルクオリゴ糖の化学合成に随伴する欠点を回避するために、それらを生産するためのいくつかの酵素法及び発酵法が開発されている。2'-フコシルラクトース、3'-フコシルラクトース、ラクト-N-テトラオース、ラクト-N-ネオテトラオース、3'-シアリルラクトース及び6'-シアリルラクトースなどのいくつかのHMOについては発酵生産法が開発されている。これらの生産法は、典型的には、組換え大腸菌のような遺伝子操作された細菌株を使用する。

【0009】

今日、HMOを製造するためのすべての発酵生産法や生体触媒反応は、外から添加されたラクトースを出発基質とすることに基づくものだけである。そうした方法では、1種又は複数種の単糖類がラクトースに付加される（米国特許第7,521,212 B1号；Albermannら, (2001) Carbohydr. Res. 334 (2) p97-103）。ラクトースへの単糖類の付加は、適切な活性化単糖基質を用いてグリコシルトランスフェラーゼ又はグリコシダーゼによって触媒される。さらに、追加の単糖類はトランスグルコシダーゼ反応によってラクトースに付加することもできる。

【0010】

特に、HMOの発酵生産は効率的であることが分かった。なぜならば、必要ではあるが合成が難しいヌクレオチド活性化単糖類が、使用される微生物細胞の代謝によって供給されるからである。しかしながら、HMOの合成に全細胞（ホールセル）を使用することは、生体触媒的手法と比較して、いくつかの大きな不利益も抱えている。そのような不利益は、細胞膜を通過する輸送過程、代謝副反応、及び微生物細胞によって合成されるオリゴ糖をとりわけ各種ポリオール（例えば炭水化物）、核酸、ポリペプチド、無機物質などを含有する複雑な混合物から精製する必要性に関連する。

【0011】

発酵法にラクトースを使用することに関連する克服せねばならない技術的問題は、特に生産されるオリゴ糖がヒトの食用に使用される場合、ラクトースの熱処理時にラクトース（ベータ-D-ガラクトピラノシル（1→4）-D-グルコース）がラクツロース（ベータ-D-ガラクトピラノシル（1→4）-D-フルクトフラノース）に転位することである。この転位(rearrangement)は、ラクトースの加熱滅菌によって拡大的に起こるので、発酵培地中又はラクトース発酵原料中に存在するラクトースの数パーセントがラクツロースに転位する。もっとも、ラクツロースはヒトにとっては非消化性の糖であり、慢性便秘の治療で便秘薬として広く使用されている。

【0012】

ラクトースからラクツロースへの変換は、望まざるラクツロースの生成をもたらすだけでなく、微生物細胞にグリコシル化反応のための望まざる基質を提供することにもなる。それにより、より複雑なオリゴ糖（例えば2'-フコシル-ラクツロース）が副産物として

10

20

30

40

50

生成する。このように、ラクトースからラクツロースの生成は、所望生成物を密接に関連したオリゴ糖で汚染することになるが、これらは所望生成物から分離するのが困難であるか又は不可能でさえある。

【0013】

さらに、ラクトースは、ベーターガラクトシダーゼ陽性大腸菌株に供給されると、別の望まざる夾雑物であるアロラクトース（ベーターD-ガラクトピラノシルー（1→6）-D-グルコピラノース）に変換される可能性もある（Huberら，“大腸菌からのベーターガラクトシダーゼ生成物の排出(Efflux of beta-galactosidase products from *Escherichia coli*)”（1980）*J. Bacteriol.* 141, 528-533）。

【0014】

さらに、ラクトースの添加は、“ラクトースが誘導する細胞死滅”として知られる、十分に立証された作用も引き起こしうる。この作用は、微生物細胞によるラクトースの過剰取込みと、それに随伴する微生物膜内外のプロトン勾配の破壊によって引き起こされると見られる。特に、ラクトースペルメアーゼ遺伝子（例えば大腸菌のlacY）の過剰発現と、組換え微生物細胞の過剰ラクトースへの暴露との組合せは、組換え菌株の相当な増殖遅延と細胞多糖類の合成増大を引き起こしうる（Grubeら，“ラクトースペルメアーゼを過剰発現している水素生成大腸菌株：ラクトース誘導ストレスのFT-IR分析(Hydrogen-producing *Escherichia coli* strains overexpressing lactose permease: FT-IR analysis of the lactose-induced stress)”（2013）*Biotechnol. Appl. Biochem.* 5, 31）。

【0015】

さらに、今日市販されているあらゆるラクトースは、酪農業の廃棄物である乳清から誘導されている。乳清はチーズ及びカゼインの製造で大量に生じる。従って、酪農業由来であるということは、狂牛病としても広く知られているウシ海綿状脳症（BSE）の原因物質であるプリオンタンパク質でラクトースが汚染されている可能性に関する懸念が残るということである。BSEは、脳及び脊髄の海綿状変性を引き起こすウシの致死性神経変性疾患である。BSEはヒトにも感染する可能性があり、変異型のクロイツフェルトーヤコブ病として知られている。

【0016】

何より、ラクトースは依然として発酵培地の最も高価な成分の一つであるので、グルコース、グリセロール、スクロースなどでそれを置換できたら、HMOのより費用効率的な生産がもたらされることになるう。

【0017】

上記欠点を克服するために、HMOを生産するための改良された手段及び方法が開発されている。例えば、WO2015/150328 A1には、末端ガラクトースー（1→4）-グルコース二糖を含むオリゴ糖を産生できる細菌宿主細胞が開示されている。前記細菌宿主細胞は、遊離したグルコース単糖をガラクトシル化して細胞内でラクトースを生成できるβ-1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼをコードする少なくとも一つの組換え核酸配列を発現し、そして、フコシルトランスフェラーゼ、シアリルトランスフェラーゼ、グルコサミルトランスフェラーゼ又はガラクトシルトランスフェラーゼをコードする少なくとも一つの組換え核酸配列も含有及び発現している。前記細菌宿主細胞はラクトースを外から添加することなくオリゴ糖を生成できるので、該細菌宿主細胞はラクトースを外から添加しない培地中で培養して前記オリゴ糖を産生することができる。さらに詳しくは、WO2015/150328 A1には、スクロース又はグルコースとスクロースの組合せを炭素源として利用して2'-フコシルラクトースを産生するために遺伝子操作された大腸菌株が開示されている。スクロースを利用する場合、前記大腸菌株は、大腸菌W株のcsc-遺伝子群の4個の遺伝子、すなわち、スクロースペルメアーゼ（cscB）、フルクトキナーゼ（cscK）、スクロースヒドロラーゼ（cscA）、及び転写リプレッサー（cscR）をコードする遺伝子が発現するように遺伝子操作されている。

【0018】

しかしながら、前記遺伝子操作された大腸菌株によってスクロースを唯一の炭素源及びエネルギー源として使用して２’－ＦＬを生産することには、相当程度の加水分解や望まざる副産物の形成なしにスクロースを加熱滅菌することが困難であるという欠点もある。代わりにスクロース溶液の滅菌濾過が使用されてもよいが、滅菌濾過は特に大規模発酵においては発酵の外来的な増殖物による汚染のリスクが高い。

【００１９】

さらに、ＨＭＯの生産のために微生物細胞を炭素源としてスクロースの存在下で培養することは、そこでは前記微生物細胞がスクロースを構成するモノマーが全く別な代謝経路で使われるように分割代謝(split metabolism)を有するように遺伝子操作されているので、おそらくは細胞内スクロース加水分解から生成するモノマーの化学量論のために（別個の経路における異なるモノマーの量的ニーズと合致しない）、微生物細胞培養物の望まざる増殖特性をもたらす。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【００２０】

【文献】米国特許第７，５２１，２１２ Ｂ１号

【文献】国際特許公開第２０１５／１５０３２８ Ａ１号

【非特許文献】

【００２１】

【文献】Albermannら，（２００１） Carbohydr. Res. 334 (2) p 97-103

20

【文献】Huberら，（１９８０） J. Bacteriol. 141, 528-533

【文献】Gruberら，（２０１３） Biotechnol. Appl. Biochem. 5, 31

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【００２２】

上記欠点を克服するために、主な炭素源及びエネルギー源として混合単糖原料上で、外からのラクトース添加なしに培養された場合に、ガラクトース-β 1, 4-グルコース部分をその還元末端に含む目的オリゴ糖を産生できる遺伝子操作された微生物細胞を提供する。

30

【課題を解決するための手段】

【００２３】

第一の側面において、ラクトース又はその還元末端にガラクトース-β 1, 4-グルコース部分を含む目的オリゴ糖を製造するために遺伝子操作された微生物細胞を提供する。ここで、前記微生物細胞は、外からのラクトース添加なしに培養された場合、前記ラクトースをデノボ産生又は前記目的オリゴ糖を産生することができる。

【００２４】

第二の側面において、ラクトース又はその還元末端にガラクトース-β 1, 4-グルコース部分を含む目的オリゴ糖を製造するために遺伝子操作された微生物宿主細胞の使用を提供する。

40

【００２５】

第三の側面において、ラクトース又はその還元末端にガラクトース-β 1, 4-グルコース部分を含む目的オリゴ糖の製造法を提供する。該方法は、遺伝子操作された微生物細胞をグルコースを含有する混合原料の存在下で培養し、目的オリゴ糖を回収することによる。

【図面の簡単な説明】

【００２６】

【図１】図１は、本発明に従って２’－Ｆコシルラクトースを製造するために遺伝子操作された微生物細胞の例示的態様の略図を示す。

50

【図 2】図 2 は、本発明に従って 2'-フコシルラクトースを製造するために遺伝子操作された微生物細胞の別の例示的態様の略図を示す。

【図 3】図 3 は、本発明に従って 2'-フコシルラクトースを製造するために遺伝子操作された微生物細胞の更なる例示的態様の略図を示す。

【図 4】図 4 は、唯一の炭素源及びエネルギー源として、グルコース（A）又はグルコースとフルクトースからなる混合単糖原料（B）上で培養中の大腸菌株の増殖特性を示す。

【発明を実施するための形態】

【0027】

第一の側面に従って、ラクトース又はその還元末端にガラクトース-β1,4-グルコース部分を含む目的オリゴ糖を製造するために遺伝子操作された微生物細胞を提供する。ここで、前記微生物細胞は、グルコースを培地から微生物細胞の細胞質内に転移させるための少なくとも一つのグルコース輸送体、UDP-ガラクトースの細胞内生合成のためのUDP-ガラクトース生合成経路、及び細胞内遊離グルコースをガラクトシル化して細胞内的にラクトースを産生できる少なくとも一つのガラクトシルトランスフェラーゼを有している。

10

【0028】

遺伝子操作された微生物細胞はラクトースを産生できる。一定の態様において、微生物細胞は、ガラクトース-β1,4-グルコース部分をその還元末端に持つ目的オリゴ糖を産生するために、自身によって産生されたラクトースを利用できる。前記目的オリゴ糖の製造のために、微生物細胞にラクトースを外から供給する必要はない。

20

【0029】

遺伝子操作された微生物細胞は、前記微生物細胞が培養されている培地からグルコースを微生物細胞の細胞質内に転移させるための少なくとも一つのグルコース輸送体を有しているので、遊離グルコースがラクトースの細胞内生合成のために利用可能になる。

【0030】

典型的には、遺伝子操作された微生物細胞は、グルコース（Glu）を培地から細胞の細胞質内に転移させることができる前記グルコース輸送体をコードする少なくとも一つの機能遺伝子を含む。

【0031】

本明細書中で使用されている“機能遺伝子”という用語は、タンパク質又はポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、そしてまたタンパク質又はポリペプチドをコードする該ヌクレオチド配列が、前記機能遺伝子を持つ微生物細胞において／によって発現できるように、前記タンパク質コードヌクレオチド配列に動作可能に連結された調節配列も含有する核酸分子を指す。従って、機能遺伝子の発現が可能な条件で培養すると、前記機能遺伝子は発現され、前記機能遺伝子を発現している微生物細胞は、典型的には、該機能遺伝子のタンパク質コード領域によってコードされているタンパク質又はポリペプチドを含む。本明細書中で使用されている“核酸”及び“ポリヌクレオチド”という用語は、一本鎖又は二本鎖型いずれかのデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドポリマーを指し、別途制限されない限り、天然ヌクレオチドに類似した様式で核酸にハイブリダイズする天然ヌクレオチドの公知類似体も包含する。別段の指示がない限り、特定の核酸配列はその相補配列を含む。

30

40

【0032】

本明細書中で使用されている“動作可能に連結された(operably linked)”という用語は、核酸発現調節配列（例えば、プロモーター、シグナル配列、又は一連の転写因子結合部位）と第二の核酸配列との間の機能的連結を意味するものとし、発現調節配列は、第二の配列に対応する核酸の転写及び／又は翻訳に影響を及ぼす。従って、用語“プロモーター”は、通常DNAポリマー中の遺伝子に“先行”し、mRNAへの転写の開始部位を提供するDNA配列を指す。“レギュレーター”DNA配列も通常、所与のDNAポリマー中の遺伝子の“上流”にある（すなわち先行する）もので、転写開始の頻度（又は速度）を決定するタンパク質を結合している。まとめて“プロモーター／レギュレーター”又は“調節”DNA

50

配列と呼ばれ、機能性DNAポリマー中の選択された遺伝子（又は一連の遺伝子）に先行するこれらの配列は、遺伝子の転写（そして最終的には発現）を起こすかどうかを決定するために協働している。DNAポリマー中の遺伝子の“後に続き”、mRNAへの転写終結のためのシグナルを提供するDNA配列は、転写“ターミネーター”配列と呼ばれる。

【0033】

細菌宿主細胞に関連して本明細書中で使用されている用語“組換え”とは、細菌細胞が異種核酸を複製する、又は異種核酸（すなわち“前記細胞に対して外来の”配列）によってコードされたペプチド又はタンパク質を発現することを示す。組換え細胞は、その細胞の天然（非組換え）形の中には見出されない遺伝子を含む。組換え細胞は、その細胞の天然形に見出される遺伝子が人工的な手段によって改変され、細胞内に再導入されている遺伝子も含むことができる。該用語には、細胞に内在する（内因性）核酸で、細胞から取り出さずに改変された核酸を含む細胞も包含される。そのような改変は、遺伝子置換、部位特異的変異、及び関連技術によって得られたものなどである。従って、“組換えポリペプチド”は、組換え細胞によって産生されたものである。本明細書においては、“異種配列”又は“異種核酸”は、特定宿主細胞に対して外来の供給源由来のもの（例えば異なる種由来）であるか、又は同じ供給源由来の場合、その原形から改変されているものである。従って、プロモーターに動作可能に連結された異種核酸は、プロモーターが由来する供給源とは異なる供給源由来であるか、又は同じ供給源由来の場合、その原形から改変されている。異種配列は、例えば、トランスフェクション、形質転換、接合、又はトランスダクション（形質導入）によって宿主微生物細胞のゲノムに安定的に導入できる。この場合、配列が導入される宿主細胞に応じた技術が適用される。当業者には様々な技術が公知で、例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989)に開示されている。

【0034】

従って、“遺伝子操作された微生物細胞”は、外因性のポリヌクレオチド配列によって形質転換もしくはトランスフェクトされている、又は形質転換もしくはトランスフェクションが可能である微生物細胞と理解される。

【0035】

従って、本発明で使用される核酸配列は、例えば、宿主微生物細胞に安定的に形質転換／トランスフェクトされるか又は他の方法で導入されるベクターに含まれる。

非常に様々な発現系が本発明のポリペプチドの産生に使用できる。そのようなベクターは、とりわけ、染色体ベクター、エピソーマルベクター及びウイルス由来ベクター、例えば、細菌プラスミド由来、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来、酵母エピソーム由来、挿入配列(insertion elements)由来、酵母染色体因子(chromosomal elements)由来、ウイルス由来の各ベクター、及びそれらの組合せ由来のベクター、例えば、コスミド及びファージミドのようなプラスミドとバクテリオファージの遺伝因子に由来するベクターなどである。発現系構築物は、発現を引き起こすだけでなく調節もする制御領域を含む。一般的に、宿主においてポリヌクレオチドを維持、増幅又は発現し、そしてポリペプチドを合成するのに適切な任意の系又はベクターが、本件に関連する発現に使用できる。適切なDNA配列は、例えば上記Sambrookらによる文献に示されているような任意の様々な周知技術及び常用技術によって発現系に挿入できる。

【0036】

当該技術分野においては、選択された宿主生物の形質転換に使用するために遺伝物質を単離、合成、精製及び増幅するための“組換えDNA”方法論に関する特許及び文献出版が数多くある。ゆえに、選択された外因性（すなわち、外来又は“異種”）のDNA配列を含む“ハイブリッド”のウイルス性又は環状プラスミドDNAを用いて宿主生物を形質転換することは一般的な知識となっている。当該技術分野で公知の手順は、まず、環状のウイルス性又はプラスミドDNAを酵素的に切断して線状DNA鎖を形成することにより、形質

転換ベクターを作製することを含む。所望のタンパク質産物をコードする配列を通常含む選択外来DNA鎖も同一／類似酵素を使用して線形に作製される。線形のウイルス性又はプラスミドDNAを外来DNAとともに、復元過程を実行できる連結酵素の存在下でインキュベートし、ウイルス性又は環状DNAプラスミドに“スプライスされた”選択外来DNAセグメントを含む“ハイブリッド”ベクターが形成される。

【0037】

“...をコードするヌクレオチド配列”という用語は、一般的に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（未修飾RNAもしくはDNA、又は修飾RNAもしくはDNAでありうる）のことを言い、一般的に特定のポリペプチド又はタンパク質をコードする遺伝子の部分を表す。該用語には、一本鎖及び二本鎖DNA、一本鎖及び二本鎖領域又は一本鎖、二本鎖及び三本鎖領域の混合物であるDNA、一本鎖及び二本鎖RNA、ならびに一本鎖及び二本鎖領域の混合物であるRNA、一本鎖又はより典型的には二本鎖、又は三本鎖領域でありうる、又は一本鎖と二本鎖領域の混合物でありうるDNA及びRNAを含むハイブリッド分子が含まれるが、これらに限定されない。該用語には、ポリペプチドをコードする単一の連続領域又は不連続領域（例えば、統合ファージ又は挿入配列又は編集によって分断されている）とともに、コード配列及び／又は非コード配列も含有しうる追加領域を含むポリヌクレオチドも包含される。

【0038】

態様において、適切なグルコース輸送体はグルコース促進拡散タンパク質(glucose facilitated diffusion protein)である。適切なグルコース促進融合タンパク質は、ザイモナス・モビリス亜種モビリス(*Zymomonas mobilis subsp. mobilis*) (ATCC株 31821 / ZM4 / CP4) の *glf* 遺伝子によってコードされている。

【0039】

追加及び／又は代替の態様において、別の適切なグルコース輸送体は、グルコース転移(translocation)ペルメアーゼである。適切なグルコース転移ペルメアーゼは、大腸菌K-12株の *galP* 遺伝子によってコードされている。グルコース転移ペルメアーゼは、ガラクトースプロトン共輸送体又はガラクトースペルメアーゼとしても知られているが、同じく細胞膜を介してグルコースを取り込む。

【0040】

従って、追加及び／又は代替の態様において、遺伝子操作された微生物細胞は、ザイモナス・モビリス亜種モビリス(ATCC株 31821 / ZM4 / CP4) の *glf* 遺伝子、大腸菌K-12株の *galP* 遺伝子又はそれらの機能的変異体のタンパク質コード領域を含む少なくとも一つの遺伝子を含み、そして発現している。

【0041】

本明細書中で使用されている用語“変異体”は、基準のポリヌクレオチド又はポリペプチドとは異なるが、基準のポリヌクレオチド又はポリペプチドの本質的（酵素的）特性を保持しているポリヌクレオチド又はポリペプチドをそれぞれ指す。ポリヌクレオチドの典型的な変異体は、ヌクレオチド配列が、別の基準ポリヌクレオチドとは異なる。変異体のヌクレオチド配列の変化は、基準ポリヌクレオチドによってコードされているポリペプチドのアミノ酸配列を変更することも又はしないこともある。ヌクレオチドの変化は、以下で論ずるように、基準配列によってコードされているポリペプチドのアミノ酸の置換、付加、欠失、融合及び切断(truncation)をもたらしうる。ポリペプチドの典型的な変異体は、アミノ酸配列が、別の基準ポリペプチドとは異なる。一般的に、差異は限定的であるので、基準ポリペプチドと変異体の配列は、概して非常に類似しており、多くの領域では同一である。変異体と基準ポリペプチドは、アミノ酸配列が、任意の組合せの一つ又は複数の置換、付加、欠失だけ異なりうる。置換又は挿入アミノ酸残基は、遺伝子コードによってコードされているものであることも又はしないこともある。ポリヌクレオチド又はポリペプチドの変異体は、対立遺伝子変異体のように天然に存在することも、又は天然に存在することが知られていない変異体のこともある。ポリヌクレオチド及びポリペプチドの非天然型変異体は、突然変異誘発技術によって、直接合成によって、及び当業者に公知のその他

10

20

30

40

50

の組換え法によって作製することができる。

【0042】

本発明の範囲内においては、野生型タンパク質によってコードされるポリペプチドに対して約60%を超えるアミノ酸配列同一性、65%、70%、75%、80%、85%、90%、好ましくは91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%以上のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を、好ましくは少なくとも約25、50、100、200、500、1000、又はそれ以上のアミノ酸の領域にわたって有している核酸／ポリヌクレオチド及びポリペプチドの多形変異体、対立遺伝子、突然変異体、及び種間相同体もそれらの用語に含まれる。

【0043】

従って、本明細書において開示されているいずれかの遺伝子／タンパク質の“機能的変異体”は、それぞれのフラグメントが誘導された元の遺伝子又はタンパク質と同じ活性又はわずかに劣る活性を依然保持している遺伝子／タンパク質の配列変異体を指すものとする。

【0044】

遺伝子操作された微生物細胞は、UDP-ガラクトースの効率的供給がラクトースの細胞内合成に必要であるので、GDP-ガラクトース（GDP-Gal）の細胞内形成のためのUDP-ガラクトース生合成経路を有している。

【0045】

追加及び／又は代替の態様において、UDP-ガラクトースは、微生物細胞自身の代謝、すなわち、ホスホグルコムターゼ、UTP-グルコース-1-リン酸-ウリジルトランスフェラーゼ及びUDP-グルコース-4-エピメラーゼの活性から得ることができる。

【0046】

GDP-ガラクトースの細胞内供給は、ホスホグルコムターゼ活性、UDP-グルコース-1-リン酸-ウリジルトランスフェラーゼ活性及びUDP-グルコース-4-エピメラーゼ活性をそれぞれ示すポリペプチドをコードする遺伝子の一つ又は複数の発現又は過剰発現といった遺伝子改変によって改良できる。

【0047】

本明細書中で使用されている用語“過剰発現”又は“過剰発現された”とは、酵素又はポリペプチド発現のレベルが、遺伝子的に改変されていない宿主細胞と同じ種の野生型細胞で測定されるものより大きいことを言う。

【0048】

ホスホグルコムターゼは、 α -D-グルコースモノマー上で1'から6'位又は6'から1'位へと、グルコース-1-リン酸からグルコース-6-リン酸への相互変換を促進する酵素である。適切なホスホグルコムターゼをコードする遺伝子の例は、大腸菌K-12株のpgm遺伝子（GenBank：U08369.1）である。従って、追加及び／又は代替の態様において、遺伝子操作された微生物細胞は、ホスホグルコムターゼをコードする遺伝子を含み、そして発現／過剰発現し、該遺伝子は好ましくは大腸菌のpgm遺伝子又はその変異体のタンパク質コード領域を含む。

【0049】

GalU又はその機能的変異体などのUTP-グルコース-1-リン酸-ウリジルトランスフェラーゼは、UTPを利用して α -D-グルコース-1-リン酸からUDP-グルコースへの変換を触媒する。適切なUTP-グルコース-1-リン酸-ウリジルトランスフェラーゼをコードする遺伝子の例は、大腸菌K-12株のgalU遺伝子（GenBank：M98830.1）である。従って、追加及び／又は代替の態様において、遺伝子操作された微生物細胞は、UTP-グルコース-1-リン酸-ウリジルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を含み、そして発現／過剰発現し、該遺伝子は好ましくは大腸菌のgalU遺伝子又はその変異体のタンパク質コード領域を含む。

【0050】

GalE又はその機能的変異体などのUDP-グルコース-4-エピメラーゼは、UDP-グルコースからUDP-ガラクトースへのエピマー化を触媒する。UDP-グルコ

10

20

30

40

50

ースー４－エピメラーゼをコードする遺伝子の例は、大腸菌 K-12 株の galE 遺伝子である。従って、追加及び／又は代替の態様において、遺伝子操作された微生物細胞は、UDP-グルコースー４－エピメラーゼをコードする遺伝子を含み、そして発現／過剰発現し、該遺伝子は好ましくは大腸菌の galE 遺伝子又はその変異体のタンパク質コード領域を含む。

【0051】

追加及び／又は代替の態様において、UDP-ガラクトース生合成経路はさらに、フルクトースー６－リン酸をグルコースー６－リン酸に、及びその逆にも変換するグルコースー６－リン酸イソメラーゼの酵素活性を含む。グルコースー６－リン酸イソメラーゼをコードする遺伝子の例は、大腸菌 K-12 株の pg i 遺伝子である。従って、追加及び／又は代替の態様において、遺伝子操作された微生物細胞は、グルコースー６－リン酸イソメラーゼをコードする遺伝子を含み、そして発現／過剰発現し、該遺伝子は好ましくは大腸菌の pg i 遺伝子又はその変異体のタンパク質コード領域を含む。

10

【0052】

あるいは、UDP-ガラクトースは、培地から微生物細胞にガラクトースを供給することによって得ることもできる。ガラクトースは細胞に取り込まれ、リン酸化されてガラクトースー１－リン酸になり、次にそれがUDP-ガラクトースに変換される。必要な酵素活性を有する酵素をコードする遺伝子は文献で知られている (Groissoidら, “Leloir Pathway を介したガラクトース利用に参与するラクトコッカス・ラクチスの galPMKTE 遺伝子の特徴付け、発現、及び変異 (Characterization, Expression, and Mutation of the Lactococcus lactis galPMKTE Genes, Involved in Galactose Utilization via the Leloir Pathway)” (2003) J. Bacteriol. 185 (3) 870-878)。

20

【0053】

遺伝子操作された微生物細胞は、遊離グルコース単糖をガラクトシル化できる β -1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼを含む。追加及び／又は代替の態様において、適切な β -1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼは、髄膜炎菌 (Neisseria meningitidis)、アグレガチバクター・アフロフィルス (Aggregatibacter aphrophilus) 又はパストツレラ・ムルトシダ (Pasteurella multocida) から誘導され、好ましくは、髄膜炎菌の lgtB 遺伝子によって、アグレガチバクター・アフロフィルスの lex-1 遺伝子によって又はパストツレラ・ムルトシダの β -1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子 galTpm1141 (GenBank: AEC04686) によってコードされた β -1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼである。従って、追加及び／又は代替の態様において、遺伝子操作された微生物細胞は、 β -1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を含み、そして発現／過剰発現し、該遺伝子は好ましくは髄膜炎菌の lgtB 遺伝子、アグレガチバクター・アフロフィルスの lex-1 遺伝子、パストツレラ・ムルトシダの galTpm1141 遺伝子又はそれらの変異体のタンパク質コード領域を含む。

30

【0054】

β -1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼは、ガラクトース部分を遊離グルコース単糖に転移するための基質としてUDP-ガラクトースを使用することによってガラクトースー β 1, 4-グルコース二糖、すなわちラクトースを合成する。

40

【0055】

追加及び／又は代替の態様において、遺伝子操作された微生物細胞は、前記 β -1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼに加えて、少なくとも一つの追加のグリコシルトランスフェラーゼを含む。

【0056】

一般的に、そして本開示全体を通じて、用語“グリコシルトランスフェラーゼ活性”又は“グリコシルトランスフェラーゼ”は、二糖、オリゴ糖及び多糖の生合成を担う酵素を指し、及び包含し、それらの酵素は活性化されたヌクレオチド単糖／糖 (“グリコシル供与体”) からグリコシル受容体分子への単糖部分の転移を触媒する。

50

【0057】

好適な態様において、少なくとも一つの追加のグリコシルトランスフェラーゼは、フコシルトランスフェラーゼ、シアリルトランスフェラーゼ、グルコサミニルトランスフェラーゼ又はガラクトシルトランスフェラーゼであり、さらに好ましくは、少なくとも一つの追加のグリコシルトランスフェラーゼは、下記、すなわちアルファー1, 2-フコシルトランスフェラーゼ、アルファー1, 3-フコシルトランスフェラーゼ、ベータ-1, 3-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、ベータ-1, 3-ガラクトシルトランスフェラーゼ、アルファー2, 3-シアリルトランスフェラーゼ、アルファー2, 6-シアリルトランスフェラーゼ、ベータ-1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼ又はベータ-1, 6-ガラクトシルトランスフェラーゼの少なくとも一つから選ばれる。

10

【0058】

少なくとも一つの追加のグリコシルトランスフェラーゼの酵素活性は、ラクトースを追加のグリコシルトランスフェラーゼの活性の受容体として使用することにより、ガラクトース- β -1, 4-グルコース部分をそれらの還元末端に含む目的オリゴ糖の生産を可能にする。表1に、本明細書中に開示された微生物細胞及び方法によって目的オリゴ糖として生産できる最も豊富なHMOを示す。

【0059】

20

30

40

50

【表 1 - 1】

名称	略称	構造
2'-フコシルラクトース	2'-FL	Fuc(α1-2)Gal(β1-4)Glu
3-フコシルラクトース	3-FL	Gal(β1-4)Glu Fuc(α1-3)
2',3-ジフコシルラクトース	DF-L	Fuc(α1-2)Gal(β1-4)Glu Fuc(α1-3)
ラクト-N-トリオース II	LNT II	GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glu
ラクト-N-テトラオース	LNT	Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glu
ラクト-N-ネオテトラオース	LNnT	Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glu
ラクト-N- フコペンタオース I	LNFP I	Fuc(α1-2)Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glu
ラクト-N- ネオフコペンタオース I	LNnFP I	Fuc(α1-2)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glu
ラクト-N- フコペンタオース II	LNFP II	Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glu Fuc(α1-4)
ラクト-N- フコペンタオース III	LNFP III	Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glu Fuc(α1-3)
ラクト-N- フコペンタオース V	LNFP V	Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glu Fuc(α1-3)
ラクト-N- ネオフコペンタオース V	LNnFP V	Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glu Fuc(α1-3)
ラクト-N- ジフコヘキサオース I	LNDH I	Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glu Fuc(α1-2) Fuc(α1-4)
ラクト-N- ジフコヘキサオース II	LND	Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glu Fuc(α1-4) Fuc(α1-3)
6'-ガラクトシルラクトース	6'-GL	Gal(β1-6)Gal(β1-4)Glu

【 0 0 6 0 】

10

20

30

40

50

【表 1-2】

名称	略称	構造
3'-ガラクトシルラク トース	3'-GL	Gal(β1-3)Gal(β1-4)Glu
ラク ト- <i>N</i> -ヘキサオース	LNH	Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6)Gal(β1-4)Glu Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)
ラク ト- <i>N</i> -ネオヘキサオース	LNnH	Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6)Gal(β1-4)Glu Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)
パラ-ラク ト- <i>N</i> -ヘキサオース	paraLNT	Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glu
パラ-ラク ト- <i>N</i> -ネオヘキサオース	paraLNnH	Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glu
ジフコシル-ラク ト- <i>N</i> -ネオヘキサオース	DF-LNnH	Fuc(α1-3) Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6)Gal(β1-4)Glu Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3) Fuc(α1-3)
3'-シアリルラク トース	3'-SL	Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-4)Glu
6'-シアリルラク トース	6'-SL	Neu5Ac(α2-6)Gal(β1-4)Glu
ラク ト- <i>N</i> -シアリルペンタオース a	LST-a	Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glu
ラク ト- <i>N</i> -シアリルペンタオース b	LST-b	Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glu Neu5Ac(α2-6)
ラク ト- <i>N</i> -シアリルペンタオース c	LST-c	Neu5Ac(α2-6)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glu
フコシル-ラク ト- <i>N</i> -シアリルペンタオース a	F-LST-a	Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glu Fuc(α1-4)
フコシル-ラク ト- <i>N</i> -シアリルペンタオース b	F-LST-b	Fuc(α1-2)Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glu Neu5Ac(α2-6)
フコシル-ラク ト- <i>N</i> -シアリルペンタオース c	F-LST-c	Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glu Fuc(α1-3)
ジシアリル-ラク ト- <i>N</i> -テトラオース	DS-LNT	Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glu Neu5Ac(α2-6)
ジシアリル-ラク ト- <i>N</i> -フコペンタオース	DS-LNFP V	Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glu Neu5Ac(α2-6) Fuc(α1-3)
3-フコシル-3'-シアリルラク トース	3F-3'-SL	Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-4)Glu Fuc(α1-3)
3-フコシル-6'-シアリルラク トース	3F-6'-SL	Neu5Ac(α2-6)Gal(β1-4)Glu Fuc(α1-3)

10

20

30

40

【 0 0 6 1 】

【表 1-3】

名称	略称	構造
ラクト- <i>N</i> - ネオジフコヘキサオース I	LNnDFH I	$ \begin{array}{ccccc} \text{Gal}(\beta 1-4) & \text{GalNAc}(\beta 1-3) & \text{Gal}(\beta 1-4) & \text{Glu} & \\ & & & & \\ \text{Fuc}(\alpha 1-3) & & & \text{Fuc}(\alpha 1-3) & \end{array} $

【 0 0 6 2 】

50

表1：本明細書中に記載の遺伝子操作された微生物細胞及び／又は方法を用いて生産できる目的オリゴ糖の一覧

追加及び／又は代替の態様において、微生物細胞はグルコース転移ホスホトランスフェラーゼ系(glucose-translocating phosphotransferase system) (P t s G)を含む。グルコース転移ホスホトランスフェラーゼ系は、入ってくるグルコースのリン酸化と同時に、細胞膜を通過するその転移も触媒する。

【0063】

P t s系の一般的機序は次の通りである。ホスホエノールピルビン酸(P E P)のホスホリル基(リン酸基)がシグナル伝達経路を介して酵素I(E I)に転移され、次にこの酵素がそれをホスホリル担体であるヒスチジンタンパク質(H P r)に転移する。ホスホーH P rは次にホスホリル基(リン酸基)を糖特異的ペルメアーゼである酵素2(E II)として知られる膜結合複合体に転移し、この酵素が糖を細胞内に輸送する。E IIは、少なくとも三つの構造的に別個のドメインII A、II B及びII Cからなる。これらは、単一のポリペプチド鎖と一緒に融合されていることも、又はかつて酵素II(E II)及びIII(E III)と呼ばれていた二つ又は三つの相互作用鎖として存在することもある。

【0064】

第一のドメイン(II A又はE II A)は、第一のペルメアーゼ特異的リン酸化部位であるヒスチジンをもち、これがホスホーH P rによってリン酸化される。第二のドメイン(II B又はE II B)は、輸送される糖に応じてシステイニル又はヒスチジル残基上でホスホーII Aによってリン酸化される。最後に、ホスホリル基(リン酸基)はII Bドメインから糖基質に転移されると同時にII Cドメインによって糖の取込みが処理される。この第三のドメイン(II C又はE II C)は、転移チャネル及び特異的基質結合部位を形成する。

【0065】

このように、P t s G系は外界の(外因性)グルコースを獲得し、微生物細胞中にグルコース-6-リン酸を提供する。グルコース-6-リン酸は、UDP-ガラクトース生合成経路に利用されるか、及び／又はフルクトース-6-リン酸に変換されるかのいずれかでありうるが、フルクトース-6-リン酸は次いで中央代謝におけるエネルギー豊富な三リン酸の生成に使用されるか、及び／又は例えばGDP-フコースなどのヌクレオチド活性化糖の生合成に使用されることもある。

【0066】

追加及び／又は代替の態様において、微生物細胞のグルコキナーゼ遺伝子(一つ又は複数)は、微生物細胞がグルコキナーゼ活性を有する何らかのポリペプチドを持たないように欠失又は機能的に不活化されている。グルコキナーゼ(G l k) bは、遊離グルコースをその炭素原子6でリン酸化し、グルコース-6-リン酸を生成する。グルコキナーゼ活性がない場合、微生物細胞の細胞質内に転移された遊離グルコースは β 1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼの基質として利用可能になってラクトースが生成するが、P t s G活性から得られたグルコース-6-リン酸はUDP-ガラクトース形成又は他の代謝経路のために利用できる。

【0067】

追加及び／又は代替の態様において、遺伝子操作された微生物細胞は、フルクトース(F r u)を培地から微生物細胞の細胞質内に転移するためのフルクトース輸送体を含む。遊離フルクトースを取り込むための適切なフルクトース輸送体は、K o r n b e r gらによってP N A S 97:1808-1812(2000)に記載されているようなアイソフォーム(P t s G-F)である。

【0068】

細胞内に取り込まれたフルクトースは次いで、フルクトキナーゼ(F r K)によってリン酸化されてフルクトース-6-リン酸(F r u-6-P)を提供できる。フルクトース-6-リン酸は、UDP-ガラクトース生合成経路及び／又は中央代謝でエネルギー豊富な三リン酸を生成するような他の代謝経路、及び／又は例えばGDP-フコースなどのヌクレオチド活性化糖の生合成に利用できる。

【0069】

追加及び／又は代替の態様において、遺伝子操作された微生物細胞は、フルクトキナーゼー6活性を示すポリペプチド及び6-ホスホフルクトキナーゼー1活性（FruK又はホスホフルクトキナーゼ）を示すポリペプチドを含み、細胞内に取り込まれたフルクトースからフルクトースー6-リン酸を経てフルクトースー1，6-ニリン酸への代謝経路を提供する。

【0070】

追加及び／又は代替の態様において、遺伝子操作された微生物細胞は、フルクトース転移ホスホトランスフェラーゼ系（PtsF）を含む。フルクトース転移ホスホトランスフェラーゼ系は、入ってくるフルクトースのリン酸化と同時に、細胞膜を通過するその転移も触媒する。

10

【0071】

このように、PtsF系は外界の（外因性）フルクトースを獲得し、微生物細胞中にフルクトースー1-リン酸を提供する。PtsF系は、膜貫通タンパク質FruA、1-ホスホフルクトースキナーゼ（FruK）及びジホスホリル転移タンパク質FruBを含む。フルクトースは、FruA及びFruBによって転移されて細胞質中にフルクトースー1-リン酸を提供する。フルクトースー1-リン酸はホスホフルクトキナーゼ（FruK）によってさらにリン酸化されてフルクトースー1，6-ニリン酸となる。微生物細胞は次にこれを使用して中央代謝でエネルギー豊富な三リン酸を生成することができる。

【0072】

20

別の適切なPtsF系は、LevD、LevE、LevF及びLevGを含む。LevDは、フルクトース特異的ホスホトランスフェラーゼ酵素IIAの構成要素である。LevEは、フルクトース特異的ホスホトランスフェラーゼ酵素IIBの構成要素である。LevFは、フルクトースペルメアーゼIICの構成要素であり、LevGは、フルクトースペルメアーゼIIDの構成要素である。対応遺伝子LevD、LevE、LevF及びLevGは、例えば枯草菌（*Bacillus subtilis*）（菌株168）から知られている。前記PtsF系は細胞中にフルクトースー1-リン酸を提供する。

【0073】

追加及び／又は代替の態様において、遺伝子操作された微生物細胞は少なくとも一つの1-ホスホフルクトキナーゼ（FruK）を含む。

30

追加及び／又は代替の態様において、遺伝子操作された微生物細胞は、フルクトースー1，6-ビスホスファターゼ（GlpX）を含む。前記フルクトースー1，6-ビスホスファターゼは、フルクトースー1，6-ニリン酸を脱リン酸化してフルクトースー6-リン酸を提供する。フルクトースー6-リン酸は、微生物細胞によってGDP-ガラクトース生合成経路又は別の代謝経路、例えばGDP-フコースなどのヌクレオチド活性化糖の生合成に使用できる。

【0074】

好ましくは、微生物細胞は、そのホスホフルクトキナーゼ遺伝子（一つ又は複数）の欠失又は機能的不活化も含む。ホスホフルクトキナーゼ遺伝子（一つ又は複数）の欠失又は機能的不活化の結果、ホスホフルクトキナーゼ活性を欠く微生物細胞がもたらされ、Fru-6-PからFru-1，6-ビスPへの変換が防止される。大腸菌にはPfkA及びPfkBと呼ばれるホスホフルクトキナーゼの二つのアイソフォームが存在する。対応遺伝子はpfkA及びpfkBである。

40

【0075】

追加及び／又は代替の態様において、遺伝子操作された微生物細胞は、GDP-ラーフコース生合成経路を有する。追加及び／又は代替の態様において、GDP-フコース生合成経路は、マンノースー6-リン酸イソメラーゼ（ManA）、ホスホマンノムターゼ（ManB）、マンノースー1-リン酸-グアニリル転移ホスホトランスフェラーゼ（ManC）、GDP-マンノースー4，6-デヒドラターゼ（Gmd）、GDP-ラーフコースシンターゼ（WcaG）を含む。好ましくは、GDP-ラーフコース生合成経路を有する微生物細胞

50

胞はフコシルトランスフェラーゼも含む。

【0076】

追加及び／又は代替の態様において、微生物細胞は、目的オリゴ糖を細胞から輸送するエキスポータータンパク質(exporter protein)又はペルメアーゼ、好ましくは糖排出輸送体(sugar efflux transporter)を含む。

【0077】

追加及び／又は代替の態様において、遺伝子操作された微生物細胞は、微生物細胞がグルコース-6-リン酸イソメラーゼ活性を持たないように、そのグルコース-6-リン酸イソメラーゼ遺伝子の欠失又は機能的不活化を含む。グルコース-6-リン酸イソメラーゼ(大腸菌ではPgiと呼ばれる)は、グルコース-6-リン酸をフルクトース-6-リン酸に変換する。グルコース-6-リン酸遺伝子(一つ又は複数)の欠失により又はそれらの発現の不活化により、微生物細胞の細胞質中に存在するあらゆるグルコース-6-リン酸をラクトースの生産に向けることができる。

【0078】

追加及び／又は代替の態様において、微生物細胞は、エシェリキア属(*Escherichia*)、ラクトバチルス属(*Lactobacillus*)、コリネバクテリウム属(*Corynebacterium*)、バチルス属(*Bacillus*)、連鎖球菌属(*Streptococcus*)、腸球菌属(*Enterococcus*)、ラクトコッカス属(*Lactococcus*)及びクロストリジウム属(*Clostridium*)の細菌からなる群から選ばれる細菌細胞、好ましくは、大腸菌(*Escherichia coli*)、コリネバクテリウム・グルタミカム(*Corynebacterium glutamicum*)、クロストリジウム・セルロティカム(*Clostridium cellulolyticum*)、クロストリジウム・リュングダリイ(*Clostridium ljungdahlii*)、クロストリジウム・オートエタノゲナム(*Clostridium autoethanogenum*)、クロストリジウム・アセトブチリカム(*Clostridium acetobutylicum*)、枯草菌(*Bacillus subtilis*)、バチルス・メガテリウム(*Bacillus megaterium*)、ラクトバチルス・カゼイ(*Lactobacillus casei*)、ラクトバチルス・アシドフィルス(*Lactobacillus acidophilus*)、ラクトバチルス・ヘルベティカス(*Lactobacillus helveticus*)、ラクトバチルス・デルブレッキイ(*Lactobacillus delbrueckii*)、及びラクトコッカス・ラクチス(*Lactococcus lactis*)からなる細菌種の群から選ばれる細菌細胞である。別の態様において、微生物細胞は大腸菌である。当業者には本開示を読めばこれ以外の細菌株も明らかであろう。

【0079】

第二の側面に従って、ラクトース又はその還元末端にガラクトース-β1,4-グルコース部分を含むオリゴ糖を製造するために、本明細書中に記載のような遺伝子操作された微生物細胞の使用を提供する。追加及び／又は代替の態様において、遺伝子操作された微生物細胞は、ラクトース又はその還元末端にガラクトース-β1,4-グルコース部分を含むオリゴ糖を製造するために使用され、ここで、該微生物細胞は、グルコースと少なくとも一つの追加炭素源とを含む混合原料の存在下で培養される。前記追加炭素源は、フルクトース、ガラクトース、マンノース、キシロース、ラムノース、グリセロール、コハク酸、ピルビン酸及びリンゴ酸からなる群から選ぶことができる。好ましくは、混合原料はグルコースとフルクトースの混合物、さらに好ましくはグルコースとフルクトースの等モル混合物、最も好ましくは加水分解スクロースを含む又は加水分解スクロースからなる。

【0080】

第三の側面に従って、ラクトース又はその還元末端にガラクトース-β1,4-グルコース部分を含む目的オリゴ糖を製造するための方法を提供する。該方法は、

- a) 本明細書中に記載のような遺伝子操作された微生物細胞を提供し；
- b) 該微生物細胞を、前記ラクトース又は目的オリゴ糖の産生が可能な培地及び条件下で培養し、ここで、前記培地は、グルコースと、フルクトース、ガラクトース、マンノース、キシロース、ラムノース、グリセロール、コハク酸、ピルビン酸及びリンゴ酸から選ばれる少なくとも一つの追加化合物との混合物を主炭素源として含有し；そして
- c) 培地及び／又は微生物細胞からラクトース又は目的オリゴ糖を回収する各工程を含む。

【0081】

追加及び／又は代替の態様において、目的オリゴ糖は、2'-フコシルラクトース、3'-フコシルラクトース、2', 3-ジフコシルラクトース、3'-シアリルラクトース、6'-シアリルラクトース、3'-フコシル-3'-シアリルラクトース、ラクト-N-テトラオース、ラクト-N-ネオテトラオース、ラクト-N-フコペンタオースI、ラクト-N-フコペンタオースII、ラクト-N-フコペンタオースIII、ラクト-N-フコペンタオースV、ラクト-N-ジフコシルヘキソースI、ラクト-N-ジフコシルヘキソースII、ラクト-N-シアリルペンタオースLSTa、LSTb、LSTcからなる群から選ばれるヒトミルクオリゴ糖である。

【0082】

好ましくは、グルコースと少なくとも一つの追加単糖との混合物は、好ましくはスクロースの加水分解によって得られるグルコースとフルクトースの混合原料である。

追加及び／又は代替の態様において、微生物細胞は、特に目的オリゴ糖の産生のために培養される場合、外からラクトースを供給せずに培養される。

【0083】

本発明の態様には、以下も含まれる。

態様1 ラクトース又はその還元末端にガラクトース- β 1, 4-グルコース部分を含む目的オリゴ糖を製造するために遺伝子操作された微生物細胞であって、前記微生物細胞は、
- グルコースを培地から微生物細胞の細胞質内に転移させるための少なくとも一つのグルコース輸送体と；

- UDP-ガラクトース生合成経路と；そして

- 遊離グルコースをガラクトシル化してラクトースを細胞内産生できる少なくとも一つの β -1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼと

を有する遺伝子操作された微生物細胞。

態様2 前記少なくとも一つのグルコース輸送体が、グルコース促進拡散タンパク質及びグルコース転移ペルメアーゼからなる群から選ばれる、態様1に記載の遺伝子操作された微生物細胞。

態様3 前記微生物細胞が、グルコース輸送体をコードする少なくとも一つの遺伝子、好ましくは、glf、galP及びそれらの機能的変異体からなる群から選ばれる少なくとも一つの遺伝子を発現又は過剰発現している、態様1又は2に記載の遺伝子操作された微生物細胞。

態様4 前記微生物細胞が、ホスホグルコムターゼ、UTP-グルコース-1-リン酸-ウリジルトランスフェラーゼ、及びUDP-グルコース 4-エピメラーゼを有する、態様1～3のいずれかに記載の遺伝子操作された微生物細胞。

態様5 前記 β -1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼが、髄膜炎菌のlgdB、アグレガチバクター・アフロフィルスのlex-1、パスツレラ・ムルトシダのgalTpm1141及びそれらの機能的変異体からなる群から選ばれる遺伝子によってコードされている、態様1～4のいずれかに記載の遺伝子操作された微生物細胞。

態様6 前記微生物細胞が、少なくとも一つの追加のグリコシルトランスフェラーゼ、好ましくは、フコシルトランスフェラーゼ、シアリルトランスフェラーゼ、グルコサミニルトランスフェラーゼ及びガラクトシルトランスフェラーゼからなる群から選ばれるグリコシルトランスフェラーゼを有する、態様1～5のいずれかに記載の遺伝子操作された微生物細胞。

態様7 前記微生物細胞が、グルコース転移ホスホトランスフェラーゼ系を含む、態様1～6のいずれかに記載の遺伝子操作された微生物細胞。

態様8 前記微生物細胞がフルクトース輸送体を有する、態様1～7のいずれかに記載の遺伝子操作された微生物細胞。

態様9 前記微生物細胞がフルクトース特異的ホスホトランスフェラーゼ系を有し、該細胞がさらに1-ホスホフルクトキナーゼを含む、態様1～8のいずれかに記載の遺伝子操作された微生物細胞。

10

20

30

40

50

態様 10 前記微生物細胞が、フルクトキナーゼ 6 活性と 6-ホスホフルクトキナーゼ 1 活性を含む、態様 8 に記載の遺伝子操作された微生物細胞。

態様 11 前記微生物細胞がフルクトース 1, 6-ビスホスファターゼを含む、態様 9 に記載の遺伝子操作された微生物細胞。

態様 12 前記微生物細胞が、そのグルコース 6-リン酸イソメラーゼの欠失又は機能的不活化を含む、態様 9 又は 11 に記載の遺伝子操作された微生物細胞。

態様 13 前記追加のグリコシルトランスフェラーゼがフコシルトランスフェラーゼであり、前記微生物細胞が、マンノース 6-リン酸イソメラーゼ、ホスホマンノムターゼ、マンノース 1-リン酸-グアニリルトランスフェラーゼ、GDP-マンノース 4, 6-デヒドラターゼ、GDP-ルーフコースシンターゼを有する、態様 6~12 のいずれかに記載の遺伝子操作された微生物細胞。

10

態様 14 前記微生物細胞が、目的オリゴ糖を細胞から輸送するエキスポータータンパク質又はペルメアーゼ、好ましくは糖排出輸送体を含む、態様 1~13 のいずれかに記載の遺伝子操作された微生物細胞。

態様 15 前記微生物細胞が、エシェリキア属、ラクトバチルス属、コリネバクテリウム属、バチルス属、連鎖球菌属、腸球菌属、ラクトコッカス属及びクロストリジウム属の細菌からなる群から選ばれる細菌細胞、好ましくは、大腸菌、コリネバクテリウム・グルタミカム、クロストリジウム・セルロティカム、クロストリジウム・リュングダリイ、クロストリジウム・オートエタノゲナム、クロストリジウム・アセトブチリウム、枯草菌、バチルス・メガテリウム、ラクトバチルス・カゼイ、ラクトバチルス・アシドフィルス、ラクトバチルス・ヘルベティカス、ラクトバチルス・デルブレッキイ、及びラクトコッカス・ラクチスからなる細菌種の群から選ばれる細菌細胞である、態様 1~14 のいずれかに記載の遺伝子操作された微生物細胞。

20

態様 16 ラクトース又はその還元末端にガラクトース- β 1, 4-グルコース部分を含むオリゴ糖を製造するための、態様 1~15 のいずれかに記載の遺伝子操作された微生物細胞の使用。

態様 17 ラクトース又はその還元末端にガラクトース- β 1, 4-グルコース部分を含む目的オリゴ糖の製造法であって、該方法は、

a) 態様 1~15 のいずれかに記載の遺伝子操作された微生物細胞を提供し；

b) 該微生物細胞を、前記ラクトース又は目的オリゴ糖の産生が可能な培地及び条件下で培養し、ここで、前記培地は、グルコースと、フルクトース、ガラクトース、マンノース、キシロース、ラムノース、グリセロール、コハク酸、ピルビン酸及びリンゴ酸から選ばれる少なくとも一つの追加化合物との混合物を主炭素源として含有し；そして

30

c) 培地及び／又は微生物細胞からラクトース又は目的オリゴ糖を回収する各工程を含む方法。

態様 18 目的オリゴ糖が、2'-フコシルラクトース、3'-フコシルラクトース、2', 3-ジフコシルラクトース、3'-シアリルラクトース、6'-シアリルラクトース、3'-フコシル-3'-シアリルラクトース、ラクト-N-テトラオース、ラクト-N-ネオテトラオース、ラクト-N-フコペンタオースI、ラクト-N-フコペンタオースII、ラクト-N-フコペンタオースIII、ラクト-N-フコペンタオースV、ラクト-N-ジフコシルヘキソースI、ラクト-N-ジフコシルヘキソースII、ラクト-N-シアリルペンタオースLSTa、LSTb、LSTcからなる群から選ばれるヒトミルクオリゴ糖である、態様 17 に記載の方法。

40

態様 19 グルコースと少なくとも一つの追加の単糖との混合物が、グルコースとフルクトースの混合原料であり、好ましくはスクロースの加水分解によって得られたグルコースとフルクトースの混合原料である、態様 17 又は 18 に記載の方法。

態様 20 前記微生物細胞が外からラクトースを供給せずに培養される、態様 17~19 のいずれかに記載の方法。

本発明を、特定の態様に関し、図面も参照しながら説明するが、本発明は、それらに限定されるのではなく、特許請求の範囲によってのみ限定される。さらに、説明文及び特許

50

請求の範囲における第一、第二などの用語は、類似の要素を区別するために使用されているのであって、必ずしも、時間的、空間的、ランキング又は任意のその他の様式における順序を記述しているのではない。そのように使用された用語は、適切な状況下で交換可能であること、そして本明細書中に記載された発明の態様は本明細書中に記載又は例示されている以外の他の順序で動作可能であることは理解されるはずである。

【0084】

特許請求の範囲において使用されている“含む(comprising)”という用語は、その後に掲載されている手段に限定されないと解釈されるべきであり；他の要素又は工程を除外しないことに注意する。従って、記述された特徴、整数、工程又は要素の存在を具体化していると解釈されるべきではあるが、一つ又は複数のその他の特徴、整数、工程又は要素、又はそれらのグループの存在又は追加を排除しない。従って、“手段A及びBを含む装置”という表現の範囲は、要素A及びBのみからなる装置に限定されるべきではなく、本発明に関して、装置の単なる関連要素がA及びBであることを意味する。

10

【0085】

本明細書全体を通じて、“一態様”又は“態様”への参照は、その態様に関連して記載されている特定の特徴(feature)、構造又は特徴(characteristic)が、本発明の少なくとも一つの態様に含まれることを意味する。従って、本明細書全体の様々な場所で、“一態様において”又は“態様において”という語句の出現は、必ずしもすべて同じ態様を参照しているとは限らないが、参照していることもある。さらに、特定の特徴(feature)、構造又は特徴(characteristic)は、本開示から当業者には明らかなように、一つ又は複数の態様において任意の適切な様式で組み合わせることができる。

20

【0086】

同様に、本発明の例示的態様の記載において、本発明の様々な特徴は、開示内容を簡素化するため及び様々な発明的側面の一つ又は複数の理解を助けるために、単一の態様、図面又はその説明に一緒にまとめられることもあることは理解されるべきである。しかしながら、この開示の方法は、特許請求されている発明は各請求項に明示的に記述されているよりも多くの特徴を必要とするという意図を反映していると解釈されるべきでない。むしろ、以下の特許請求の範囲に反映されている通り、発明的側面は、前述の開示された単一の態様のすべての特徴よりも少ない特徴にある。従って、詳細な説明に続く特許請求の範囲は、これによって明示的にこの詳細な説明に取り込まれ、各請求項は、本発明の別の態様として自立している。

30

【0087】

さらに、本明細書中に記載の一部の態様は、他の態様に含まれる一部の特徴（他の特徴ではない）を含むが、異なる態様の特徴の組合せは、当業者には分かる通り、本発明の範囲内であることを意味し、そして異なる態様を形成する。例えば、以下の特許請求の範囲において、特許請求されている態様のいずれも任意の組合せで使用できる。

【0088】

さらに、実施態様のいくつかは、コンピュータシステムのプロセッサによって又はその機能を実施するその他の手段によって実施できる方法又は方法の要素の組合せとして本明細書に記載されている。従って、プロセッサは、そのような方法又は方法の要素を実施するために必要な指示と共に、方法又は方法の要素を実施するための手段を形成する。さらに、装置態様の本明細書中に記載の要素は、本発明を実施するために、該要素によって実施される機能を実行するための手段の例である。

40

【0089】

本明細書中に提供されている説明及び図面には、多数の具体的な詳細が示されている。しかしながら、本発明の態様は、これらの具体的な詳細がなくても実施できることは理解されるはずである。他の例では、周知の方法、構造及び技術は、本説明の理解を曖昧にしないために詳細には示されなかった。

【0090】

次に、本発明を、本発明のいくつかの態様を詳細に記載することによって説明する。本

50

発明の他の態様は、本発明の真の精神又は技術的教示から逸脱することなく、当業者の知識に従って構成することができ、本発明は添付の特許請求の範囲の条項によってのみ限定されることは明白である。

【0091】

態様において、遺伝子型 $lacY^-$ 、 $lacZ^-$ 、 $fucIK^-$ 、 $wcaJ^-$ を有する大腸菌株は、主たる炭素源及びエネルギー源として混合単糖原料（例えば加水分解スクロース）を用いる全発酵によって2'-フコシルラクトースを効率的に産生するように、代謝的に改変されている。従って、グルコキナーゼ遺伝子 glk 及び／又はグルコースデヒドロゲナーゼ遺伝子 gcd 及び／又はグルコースPTSペルメアーゼ遺伝子 $ptsG$ の発現は低減及び／又は停止されている。さらに、グルコースペルメアーゼ遺伝子は、前記大腸菌株においては発現又は過剰発現されている。

10

【0092】

さらに、大腸菌遺伝子 $manA$ 、 $manC$ 、 $manB$ 、 gmd 、 $wcaG$ 、 pgm 、 $galU$ 及び $galE$ の少なくとも一つ、ならびにガラクトースをUDP-ガラクトースからグルコースに転移してラクトースを生成できる異種 $\beta-1, 4$ -ガラクトシルトランスフェラーゼ、及びフコースをGDP-フコースからラクトースに転移して2'-フコシルラクトースを生成できる $\alpha-1, 2$ -フコシルトランスフェラーゼの発現も発現／過剰発現されている。

【0093】

好適な態様において、当該産生株はさらに、ホスホフルクトキナーゼ遺伝子 $pfkA$ 及び／又は $pfkB$ 、及び／又はグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 zwf 、及び／又はグルコース-6-リン酸イソメラーゼ遺伝子 pgi の発現を低減及び／又は減弱することによる改変もなされている。この更なる遺伝子改変により、このように改変された産生株は、主な炭素源及びエネルギー源として混合単糖原料（例えば加水分解スクロース）上で、菌株の代謝を妨害しないようにしながら全発酵による2'-フコシルラクトース産生のために前駆体供給（グルコース及びフルクトース-6-リン酸及びグルコース-6-リン酸）を増加させながら培養することが可能になる。

20

【0094】

図1を参照すると、本発明の例示的な微生物細胞が図式的に示されている。前記微生物細胞は、グルコース ($Glucose$) とフルクトース ($Fructose$) からなる混合原料上で培養されると2'-FLを産生できるが、この混合原料はラクトース ($Lactose$) を含有していない。微生物細胞は、グルコース及びフルクトースを細胞内にそれぞれ取り込むためのグルコース輸送体 ($Glucose$ transporter) 及びフルクトース輸送体をコードするポリヌクレオチドを発現している。グルコースキナーゼ $Glucose$ kinase の発現は、 glk 遺伝子（一つ又は複数）の欠失又は機能的な不活化によって停止されているので、細胞によって取り込まれるすべてのグルコースは、ラクトース ($Lactose$) を細胞内で生成するためのUDP-ガラクトース生合成経路により $\beta-1, 4$ -ガラクトシルトランスフェラーゼ $GalTpm1141$ の基質として利用可能になる。

30

【0095】

取り込まれたフルクトースは細胞のフルクトース-6キナーゼによってリン酸化され、細胞内 $Fructose-6-P$ プールを生成する。 $Fructose-6-P$ プールの一部は“UDP-Gal生合成経路”で使用されてUDP-Galが細胞内で合成され、それが $GalTpm1141$ ガラクトシルトランスフェラーゼのGal供与体として機能し、 $Lactose$ を生成する。 $Fructose-6-P$ プールの別の部分はGDP- L -フコース産生のための“GDP- L -Fucose生合成経路”で使用される。前記GDP- L -フコースは2'-フコシルトランスフェラーゼ $WbgL$ のフコース供与体として機能する。さらに $Fructose-6-P$ プールの第三の部分は、その $Fructose-6-P$ が細胞のホスホフルクトキナーゼ $PfkA$ 及び／又は $PfkB$ によって $Fructose-1, 6-bisP$ に変換されるという点において、エネルギー及びバイオマス生成のために使用される。

40

【0096】

50

図2に、グルコース（G l u）とフルクトース（F r u）からなる混合原料上で培養されると2'-F Lを産生できる本発明の別の例示的微生物細胞を図式的に示す。この場合も混合原料はラクトース（L a c）を含有していない。図1に示された例示的微生物細胞に加えて、当該微生物細胞はさらにグルコース特異的P t s系（P t s G）も含む。前記P t s G系は、G l uを取り込み、リン酸化して細胞の細胞質ゾル中にG l u-6-Pを提供する。前記G l u-6-Pは、微生物細胞によってU D P-G a l又はF r u-6-Pを生成するために利用されうる。微生物細胞の変異体（図示せず）では、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ（P g i）をコードする細胞のp g i遺伝子（一つ又は複数）を欠失させてある。g l k遺伝子の欠失と併せて、微生物細胞は、G l fによって獲得された遊離グルコースモノマーが β 1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼの基質として利用できるように遺伝子操作されているが、P t s Gによって獲得されたすべてのG l u-6-PもU D P-G a l生合成のために利用できるようになる。

【0097】

図3に、グルコース（G l u）とフルクトース（F r u）からなる混合原料上で培養されると2'-F Lを産生できる本発明の別の例示的微生物細胞を図式的に示す。この場合も混合原料はラクトース（L a c）を含有していない。図2に示された例示的微生物細胞に加えて、当該微生物細胞はさらにフルクトース特異的P t s系（P t s F）も含む。前記P t s F系は、F r uを取り込み、リン酸化してF r u-1-Pを提供する。F r u-1-Pは、F r u Kによってリン酸化されてF r u-1, 6-ビスPを提供する。微生物細胞はフルクトース-1, 6-ビスホスファターゼ（G l p X）活性を有する。それによって、遺伝子操作された微生物細胞は、フルクトース及び／又はフルクトース-1-Pが細胞によってU D P-G a l生合成のために利用できるように代謝的に改変されている。

【0098】

さらに、ホスホフルクトキナーゼ遺伝子（一つ又は複数）は、細胞がホスホフルクトキナーゼ（P f k A／P f k B）活性を持たないように欠失又は機能的に不活化されている。ホスホフルクトキナーゼ遺伝子の欠失又は機能的な不活化は、F r u-6-PからF r u-1, 6-Pへの変換を障害するので、エネルギー豊富な三リン酸生成のためにF r u-6-Pが利用されることが阻止され、2'-F Lの産生が増強される。

【実施例】

【0099】

実施例1－混合単糖原料の調製

500 gのスクロースを水中に溶解することによって50%（w／v）のスクロース溶液を調製した。溶液の最終体積は1リットルであった。30℃～35℃の温度で96%（v／v）硫酸を使用してpHを調整した。その後、溶液を縦型オートクレーブ（S y s t e c V X-65、ドイツ・リンデン）中、121℃で45分間滅菌した。サンプルは加熱滅菌の前後に採取し、高速液体クロマトグラフィー（H P L C）による分析まで凍結保存した。H P L Cは、S h i m a d z u H P L Cシステムに接続されたR I D-10A屈折率検出器（S h i m a d z u社、ドイツ）及びW a t e r s X B r i d g eアミドカラム3.5 μ m（250×4.6mm）（ドイツ・エシュボルン）を用いて実施した。30%溶媒A（再蒸留水中50%（v／v）アセトニトリル、0.1%（v／v）N H₄ O H）と70%溶媒B（再蒸留水中80%（v／v）アセトニトリル、0.1%（v／v）N H₄ O H）のアイソクラチック溶離を35℃及び流速1.4 mL／分で実施した。サンプルはイオン交換マトリックス（S t r a t a A B W、P h e n o m e n e x社）上での固相抽出によって清澄化した。10マイクロリットルのサンプル（希釈1：5）をカラムに適用した。最後に、検出された糖の相対量を決定した。表1に示されているように、スクロースから単糖のグルコース及びフルクトースへの変換は、熱処理前の溶液のpH値が低下するにつれて増加した。完全なスクロース切断は、酸性化が硫酸で実施された場合のpH値 $\leq$ 3.50で観察された。

【0100】

【化 1】

pH	相対組成 [%]		
	スクロース	グルコース	フルクトース
加熱滅菌前			
3.50 - 7.10	100	-	-
加熱滅菌後			
7.10 (酸性化されて いない)	100	-	-
pH 5.50	87.55	6.30	6.15
pH 5.05	68.25	16.62	15.13
pH 3.87	13.90	45.05	41.06
pH 3.50	-	51.68	48.32

10

【0101】

20

表 1：pH調整された50%（w/v）スクロース溶液中で加熱滅菌前後に検出された糖の相対量。pH調整は96%（v/v）硫酸を用いて行われた。示されているのはHPLCによって検出された糖のパーセント量である（曲線下面積、AUC）。

【0102】

実施例 2－各種遺伝子欠失株の原料依存性増殖

大腸菌BL21（DE3）株（野生型）のほか、変異株の大腸菌pfkA⁻（ΔpfkA）、大腸菌pfkB⁻（ΔpfkB）、大腸菌pfkA⁻ pfkB⁻（ΔpfkA ΔpfkB）の増殖挙動を比較した。ゲノム欠失は、Datsenko及びWannerの方法に従って実施した（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:6640-6645（2000））。すべての菌株を、20mLの無機塩培地入りの100mL振盪フラスコ中30℃で培養した。前記培地は、7g・L⁻¹のNH₄H₂PO₄、7g・L⁻¹のK₂HPO₄、2g・L⁻¹のKOH、0.3g・L⁻¹のクエン酸、2g・L⁻¹のMgSO₄×7・H₂O及び0.015g・L⁻¹のCaCl₂×6・H₂Oを含有し、1mL・L⁻¹の微量元素溶液（54.4g・L⁻¹のクエン酸第二鉄アンモニウム、9.8g・L⁻¹のMnCl₂×4・H₂O、1.6g・L⁻¹のCoCl₂×6・H₂O、1g・L⁻¹のCuCl₂×2・H₂O、1.9g・L⁻¹のH₃BO₃、9g・L⁻¹のZnSO₄×7・H₂O、1.1g・L⁻¹のNa₂MoO₄×2・H₂O、1.5g・L⁻¹のNa₂SeO₃、1.5g・L⁻¹のNiSO₄×6・H₂O）を補充され、そして2%（m/v）グルコース（A）又は1%（w/v）グルコース／1%（w/v）フルクトース（B）のいずれかを炭素源として含有していた。培養物はOD₀.1まで植菌され、増殖の進展を26時間にわたりOD₆₀₀の測定によってモニターした。図2に示されているように、大腸菌pfkA⁻ pfkB⁻は、グルコースが唯一の炭素源及びエネルギー源として供給された場合にはほとんど増殖を示さなかったが、混合単糖原料が利用できた場合、その増殖は野生型菌株や単一欠失変異体と見分けがつかないほどであった。

30

40

【0103】

実施例 3－混合単糖原料上で増殖中の改変大腸菌株による2'-フコシルラクトースの全発酵

遺伝子型pfkA⁻、lacZ⁻、fucIK⁻、wcaJ⁻、glk⁻、gcd⁻、ptsG⁻を示す大腸菌BL21（DE3）株をさらに、GDP-フコースをデノボ合成するための酵素（ManB、ManC、Gmd、WcaG）、2'-フコシルトランスフェラ

50

ーゼ遺伝子 *wbgL* (大腸菌 O126 由来)、糖排出輸送体遺伝子 *yberc0001_9420* (エルシニア・ベルコビエリ(*Yersinia bercovieri*) ATCC 43970 由来)、グルコース輸送促進体(*glucose facilitator*)遺伝子 *glf* (ザイモナス・モビリス 由来)、 β -1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子 *galTpm1141* (パスツレラ・ムルトシダ (GenBank: AEC04686) 由来)、ならびに UDP-グルコース 4-エピメラーゼ及びホスホグルコムターゼをそれぞれコードする大腸菌遺伝子 *galE* 及び *pgm* の過剰発現によって遺伝子操作した。ゲノム欠失は、Datsenko 及び Wanner の方法に従って実施した (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 6640-6645 (2000))。異種遺伝子のゲノム組込は転位(*transposition*)によって実施した。EZ-Tn5TM トランスポザーゼ (米国 Epicentre 社) を用いて線状 DNA フラグメントを組み込むか又はマリナートランスポザーゼ (*mariner transposase*) *Himar1* の高活性 C9-変異体 (Proc. Natl. Acad. Sci. 1999, USA 96: 11428-11433) を使用して転位を実施した。遺伝子は大腸菌での発現のためにコドン最適化され、GenScript 社の協力により、合成的に調製された。

【0104】

得られた大腸菌株を 3 L の発酵槽 (New Brunswick 社、米国エディソン) 中、30°C で培養した。開始時の 1000 mL 無機塩培地は、 $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ の $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 、 $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ の K_2HPO_4 、 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ の KOH 、 $0.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ のクエン酸、 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ の $\text{MgSO}_4 \times 7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 及び $0.015 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ の $\text{CaCl}_2 \times 6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ を含有し、 $1 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ の微量元素溶液 ($54.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ のクエン酸第二鉄アンモニウム、 $9.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ の $\text{MnCl}_2 \times 4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、 $1.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ の $\text{CoCl}_2 \times 6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ の $\text{CuCl}_2 \times 2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、 $1.9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ の H_3BO_3 、 $9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ の $\text{ZnSO}_4 \times 7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、 $1.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ の $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、 $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ の Na_2SeO_3 、 $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ の $\text{NiSO}_4 \times 6 \cdot \text{H}_2\text{O}$) を補充され、そして 2% (m/v) の加水分解スクロースを炭素源として含有していた。培養は、同じ培地中で増殖させた前培養物からの 2.5% (v/v) 接種菌の添加により開始された。バッチ段階の終了は溶存酸素濃度の上昇によって特徴付けられた。バッチ段階を離脱後即座に、 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ の $\text{MgSO}_4 \times 7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、 $0.015 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ の $\text{CaCl}_2 \times 6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 及び $1 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ の微量元素溶液を補充された完全加水分解スクロースからなる炭素原料が適用された。開始体積を基準に、 $12.0 \sim 15.0 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ の供給速度が適用された。エアレーションは 3 L/分に維持された。溶存酸素は攪拌速度を制御することにより 20~30% 飽和に維持された。pH は 25% アンモニア溶液を添加することにより 6.7 に維持された。培養は 86 時間続き、培養上清中に相当量の 2'-FL が得られた。

10

20

30

40

50

【図面】

【図 1】

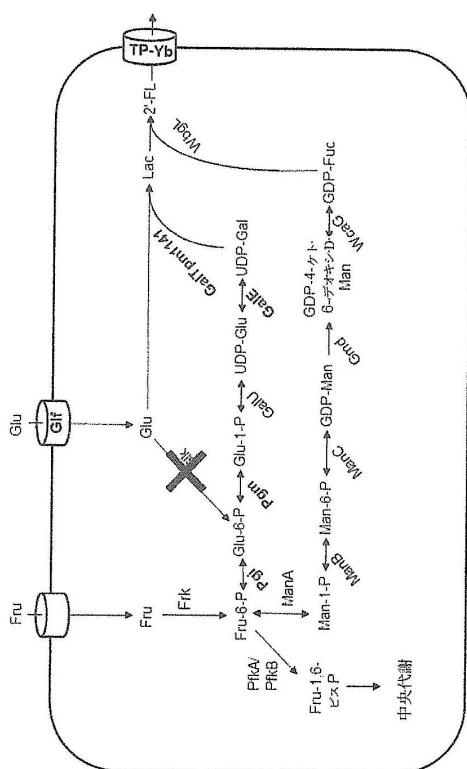
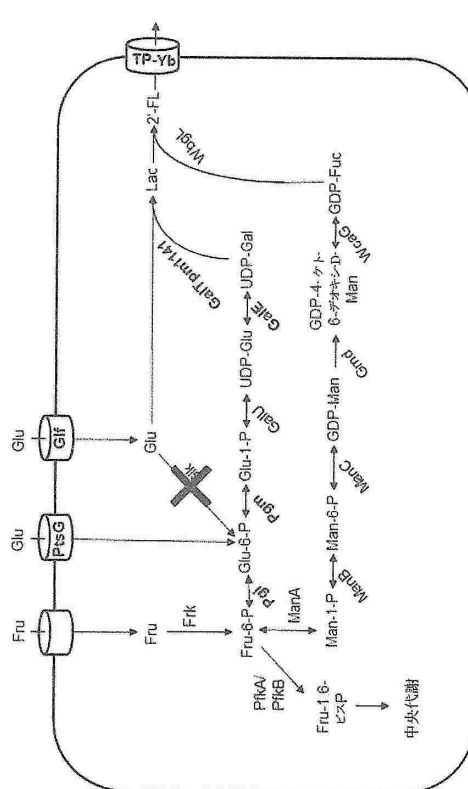


Fig. 1

【圖 2】



2.2.2

フロントページの続き

(74)代理人 100106080

弁理士 山口 晶子

(72)発明者 イェンネワイン, シュテファン

ドイツ国 5 3 6 0 5 バート・ホンネフ, ビヒフリートベーク 1 4

(72)発明者 バルテンベルク, ディルク

ドイツ国 5 5 4 3 5 ガウーアルゲスハイム, アン・デア・ライエンミューレ 3 4

(72)発明者 パルシャト, カトヤ

ドイツ国 5 3 1 7 3 ボン, ヤーンアレー 4 3

審査官 戸来 幸男

(56)参考文献 特表 2 0 1 7 - 5 0 9 3 4 6 (J P , A)

特表 2 0 0 3 - 5 0 4 0 7 2 (J P , A)

特開 2 0 1 8 - 1 2 1 6 4 1 (J P , A)

特表 2 0 1 6 - 5 1 8 1 4 5 (J P , A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 / 0 0 - 1 / 3 8

C 1 2 P 1 9 / 0 0 - 1 9 / 6 4

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

C a p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

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

G o o g l e