

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2020-5647

(P2020-5647A)

(43) 公開日 令和2年1月16日(2020.1.16)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21 Z N A	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 P 7/18 (2006.01)	C 1 2 P 7/18	

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 229 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2019-157532 (P2019-157532)	(71) 出願人	511062818
(22) 出願日	令和1年8月30日 (2019.8.30)		ゲノマチカ, インク.
(62) 分割の表示	特願2017-211474 (P2017-211474) の分割		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 1 サン ディエゴ 4 7 5 7 ネク サス センター ドライブ
原出願日	平成22年6月4日 (2010.6.4)	(74) 代理人	100097456
(31) 優先権主張番号	61/184, 311		弁理士 石川 徹
(32) 優先日	平成21年6月4日 (2009.6.4)	(72) 発明者	ステブヘン ジェイ. ブアン ドイエン
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 1 サン ディエゴ ウアテリドゲ クイルクルエ 1 0 5 2 0
		(72) 発明者	アントホンイ ピー. ブルガルド
			アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 1 サン ディエゴ ウアテリドゲ クイルクルエ 1 0 5 2 0

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 1, 4-ブタンジオールの生成のための微生物体及び関連する方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 商業的な量の 1, 4-ブタンジオール (BOD) 及びその化学前駆体を効果的に製造するための方法の提供。

【解決手段】 BDO生成経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含む非天然微生物体であって、外因性酵素を発現し、好気性呼吸器制御調節系をコードする遺伝子が破壊されている。当該酵素は、スクシニル-CoAシンターゼ、アルファ-ケトグルタレートデカルボキシラーゼ、スクシネートセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ及び4-ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼ並びに場合により4-ヒドロキシブチリル-CoA/アセチル-CoAトランスフェラーゼ、ブチレートキナーゼ及びホスホトランスブチリラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ、4-ヒドロキシブチニールレダクターゼ、ピルベートデヒドロゲナーゼ、NADH非感受性シトレートシンターゼ、ホスホエノールピルベートカルボキシキナーゼである。

【選択図】 図 4 6

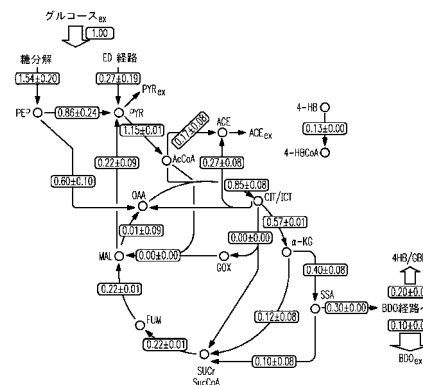


図 46

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1,4-ブタンジオール(BDO)を生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含むBDO経路を有する微生物体を含む非天然微生物体であって、外因性スクシニル-CoAシンテターゼを発現し;外因性アルファ-ケトグルタレートデカルボキシラーゼを発現し、外因性スクシネートセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ及び4-ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼ並びに場合により4-ヒドロキシブチリル-CoA/アセチル-CoAトランスフェラーゼを発現し;外因性ブチレートキナーゼ及びホスホトランスブチリラーゼを発現し;外因性4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼを発現し;外因性4-ヒドロキシブタナールレダクターゼを発現し;外因性ピルベートデヒドロゲナーゼを発現し;好気性呼吸器制御調節系をコードする遺伝子を破壊し;外因性NADH非感受性シトレートシンターゼを発現し;外因性ホスホエノールピルベートカルボキシキナーゼを発現するように遺伝子改変されている、前記非天然微生物体。

10

【請求項 2】

前記スクシニル-CoAシンテターゼが大腸菌sucCD遺伝子によってコードされる、請求項1記載の非天然微生物体。

【請求項 3】

前記アルファ-ケトグルタレートデカルボキシラーゼがウシ結核菌sucA遺伝子によってコードされる、請求項1記載の非天然微生物体。

【請求項 4】

前記スクシネートセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(CoA-依存性)、4-ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼ及び4-ヒドロキシブチリル-CoA/アセチル-CoAトランスフェラーゼがポルフィロモナス・ギンギバリスW83遺伝子によってコードされる、請求項1記載の非天然微生物体。

20

【請求項 5】

前記ブチレートキナーゼ及びホスホトランスブチリラーゼがクロストリジウム・アセトブチリクムbuk1及びptb遺伝子によってコードされる、請求項1記載の非天然微生物体。

【請求項 6】

前記4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼがクロストリジウム・ベイジェリンキーald遺伝子によってコードされる、請求項1記載の非天然微生物体。

30

【請求項 7】

前記4-ヒドロキシブタナールレダクターゼがゲオバシルス・サーモグルコシダシウスadh1遺伝子によってコードされる、請求項1記載の非天然微生物体。

【請求項 8】

前記外因性ピルベートデヒドロゲナーゼがNADH非感受性である、請求項1記載の非天然微生物体。

【請求項 9】

前記外因性ピルベートデヒドロゲナーゼがクレブシエラ肺桿菌lpdA遺伝子によってコードされる、請求項1記載の非天然微生物体。

【請求項 10】

前記微生物のピルベートデヒドロゲナーゼサブユニット遺伝子の1つ以上が、ピルベートホルメートリアーゼプロモーターの制御下にある、請求項1記載の非天然微生物体。

40

【請求項 11】

前記嫌気性呼吸器制御調節系の破壊がarcA遺伝子の破壊である、請求項1記載の非天然微生物体。

【請求項 12】

マレートデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の破壊をさらに含む、請求項1記載の非天然微生物体。

【請求項 13】

NADH非感受性シトレートシンターゼがgltAによってコードされる、請求項1記載の非天

50

然微生物体。

【請求項 1 4】

前記NADH非感受性シトレートシンターゼがgltAのR163L突然変異体によってコードされる、請求項1記載の非天然微生物体。

【請求項 1 5】

前記ホスホエノールピルベートカルボキシキナーゼがヘモフィルス・インフルエンザホスホエノールピルベートカルボキシキナーゼ遺伝子によってコードされる、請求項1記載の非天然微生物体。

【請求項 1 6】

前記外因的に発現される酵素をコードする1つ以上の遺伝子が宿主生物体のfimD座に組み込まれている、請求項1記載の非天然微生物体。

10

【請求項 1 7】

前記生物体为非ホスホトランスフェラーゼスクロース取込み系を発現する、請求項1記載の非天然微生物体。

【請求項 1 8】

前記生物体が、内因性ラクテートデヒドロゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ及びピルベートホルメトリアーゼの破壊をさらに含む、請求項1記載の非天然微生物体。

【請求項 1 9】

前記BDO経路が、4-ヒドロキシブタノエートデヒドロゲナーゼ、スクシニル-CoAシンターゼ、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、4-ヒドロキシブチレート: CoAトランスフェラーゼ、4-ブチレートキナーゼ、ホスホトランスブチリラーゼ、アルファ-ケトグルタレートデカルボキシラーゼ、アルデヒドデヒドロゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ又はアルデヒド/アルコールデヒドロゲナーゼを含む、請求項1記載の非天然微生物体。

20

【請求項 2 0】

前記BDO経路が、4-アミノブチレートCoAトランスフェラーゼ、4-アミノブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-アミノブチレート-CoAリガーゼ、4-アミノブチリル-CoAオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、4-アミノブチリル-CoAトランスアミナーゼ又は4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼを含む、請求項1記載の非天然微生物体。

【請求項 2 1】

前記BDO経路が、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含む、請求項20記載の非天然微生物体。

30

【請求項 2 2】

前記BDO経路が、4-アミノブチレートCoAトランスフェラーゼ、4-アミノブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-アミノブチレート-CoAリガーゼ、4-アミノブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-アミノブチリル-CoAレダクターゼ、4-アミノブタン-1-オールデヒドロゲナーゼ、4-アミノブタン-1-オールオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は4-アミノブタン-1-オールトランスアミナーゼを含む、請求項1記載の非天然微生物体。

【請求項 2 3】

前記BDO経路が、4-アミノブチレートキナーゼ、4-アミノブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)、4-アミノブタン-1-オールデヒドロゲナーゼ、4-アミノブタン-1-オールオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、4-アミノブタン-1-オールトランスアミナーゼ、[(4-アミノブタノリル)オキシ]ホスホン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、[(4-アミノブタノリル)オキシ]ホスホン酸トランスアミナーゼ、4-ヒドロキシブチリルホスフェートデヒドロゲナーゼ又は4-ヒドロキシブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)を含む、請求項1記載の非天然微生物体。

40

【請求項 2 4】

前記BDO経路が1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含む、請求項23記載の非天然微生物体。

50

【請求項 25】

前記BDO経路が、アルファ-ケトグルタレート5-キナーゼ、2,5-ジオキソペンタン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)、2,5-ジオキソペンタン酸レダクターゼ、アルファ-ケトグルタレートCoAトランスフェラーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAヒドロラーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAリガーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAレダクターゼ、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ又は5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱カルボキシル化)を含む、請求項1記載の非天然微生物体。

【請求項 26】

前記BDO経路が、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含む、請求項25記載の非天然微生物体。

【請求項 27】

前記BDO経路が、グルタメートCoAトランスフェラーゼ、グルタミル-CoAヒドロラーゼ、グルタミル-CoAリガーゼ、グルタメート5-キナーゼ、グルタメート-5-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)、グルタミル-CoAレダクターゼ、グルタメート-5-セミアルデヒドレダクターゼ、グルタミル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸トランスアミナーゼ、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱カルボキシル化)を含む、請求項1記載の非天然微生物体。

【請求項 28】

前記BDO経路が、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含む、請求項27記載の非天然微生物体。

【請求項 29】

前記BDO経路が、3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ、3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼ、ビニルアセチル-CoA Δ -イソメラーゼ又は4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼを含む、請求項1記載の非天然微生物体。

【請求項 30】

前記BDO経路が、ホモセリンデアミナーゼ、ホモセリンCoAトランスフェラーゼ、ホモセリン-CoAヒドロラーゼ、ホモセリン-CoAリガーゼ、ホモセリン-CoAデアミナーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAリガーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エノエートレダクターゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ又は4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAレダクターゼを含む、請求項1記載の非天然微生物体。

【請求項 31】

前記BDO経路が、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含む、請求項30記載の非天然微生物体。

【請求項 32】

前記BDO経路が、スクシニル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ又は4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ(リン酸化)を含む、請求項1記載の非天然微生物体。

【請求項 33】

前記BDO経路が、スクシニル-CoAレダクターゼ、4-ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシブチレートキナーゼ、ホスホトランス-4-ヒドロキシブチリラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ

、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含む、請求項32記載の非天然微生物体。

【請求項34】

前記BDO経路が、グルタメートデヒドロゲナーゼ、4-アミノブチレートオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、4-アミノブチレートトランスアミナーゼ、グルタメートデカルボキシラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ又は4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ(リン酸化)を含む、請求項1記載の非天然微生物体。

【請求項35】

前記BDO経路が、アルファ-ケトグルタレートデカルボキシラーゼ、4-ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシブチレートキナーゼ、ホスホトランス-4-ヒドロキシブチリラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含む、請求項34記載の非天然微生物体。

【請求項36】

1,4-ブタンジオール(BDO)を生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含むBDO経路を有する微生物体を含む非天然微生物体であって、表28の菌株3~20のいずれかに記載するように遺伝子改変されている、前記非天然微生物体。

【請求項37】

1,4-ブタンジオール(BDO)を生成するための方法であって、請求項1から36のいずれかに記載の非天然微生物体を、BDOを生成するための条件下で、且つ十分な期間にわたって培養してBDOを生成することを含む、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の背景)

本出願は、内容全体が引用により本明細書中に組み込まれている、2009年6月4日に出願された米国仮出願第61/184,311号の優先権を主張するものである。

【0002】

本発明は、一般には、生物体のインシリコ設計及び生物体工学に関し、より詳細には、1,4-ブタンジオール合成機能を有する生物体に関する。

【背景技術】

【0003】

化合物4-ヒドロキシブタン酸(4-ヒドロキシブタノエート、4-ヒドロキシブチレート、4-HB)は、様々な商品及び特殊化学物質のための構成単位として工業的潜在性を有する4-炭素カルボン酸である。特に、4-HBは、溶媒、樹脂、ポリマー前駆体及び特殊化学物質を含む1,4-ブタンジオール系統の化学物質への新たな入口点として機能する潜在性を有する。1,4-ブタンジオール(BDO)は、約30億lb/年の世界市場を有するポリマー中間体及び工業用溶媒である。BDOは、現在、石油化学前駆体、主にアセチレン、無水マレイン酸及び酸化プロピレンから製造されている。

【0004】

例えば、アセチレンをレッベ合成反応(Kroschwitz及びGrant, Encyclopedia of Chem. Tech., John Wiley and Sons, Inc., New York (1999))で2分子のホルムアルデヒドと反応させた後、触媒水素化を行って1,4-ブタンジオールを形成する。米国で製造されたアセチレンの90%がブタンジオールの製造に消費されることが推定されている。代替的に、それを、ブタンから誘導された無水マレイン酸のエステル化及び水素化によって形成することができる。下流において、ブタンジオールを、例えば、ピロリドン及びN-メチル-ピロリドンにさらに変換することができるγ-ブチロラクトンへの酸化、又はテトラヒドロフランへの水素化分解によってさらに変換することができる。これらの化合物は、ポリマー

中間体、溶媒及び添加剤としての様々な用途を有し、全体ではほぼ20億lb/年の市場を有する。

【0005】

再生可能に石油系供給原料を代用するばかりでなく、より小さいエネルギー及び資本の集約的プロセスを使用する代替的な手段によってこれらの化学物質を製造するための方法を開発することが望ましい。エネルギー省は、ブタンジオール系統の製品を製造するための生物学的に製造される主要な中間体として、1,4-二酸及び特にコハク酸を提案した(DOE Report、「バイオマスからの高付加価値化学物質(Top Value-Added Chemicals from Biomass)」、2004)。しかし、コハク酸は、単離及び精製するのにコストが高く、ブタンジオールへの触媒還元の高い温度及び圧力を必要とする。

10

【0006】

したがって、商業的な量の1,4-ブタンジオール及びその化学前駆体を効果的に製造するための代替的な手段が必要である。本発明は、この必要性を満たすとともに、関連する利点を提供する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

(発明の要旨)

本発明は、1,4-ブタンジオール(BDO)を生成するのに十分な量で発現され、さらにBDOの発現のために最適化されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含むBDO経路を含む非天然微生物体を提供する。本発明は、さらに、当該微生物体を使用してBDOを生成する方法を提供する。

20

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】4-ヒドロキシブチレート(4-HB)及び1,4-ブタンジオール生成への生化学経路を示す概略図である。最初の5つの工程は、大腸菌に対して内因性であり、残りは、非相同的に発現され得る。生合成反応を触媒する酵素は、(1)スクシニル-CoAシンテターゼ;(2)CoA非依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ;(3) α -ケトグルタレートデヒドロゲナーゼ;(4)グルタメート:スクシネートセミアルデヒドトランスアミナーゼ;(5)グルタメートデカルボキシラーゼ;(6)CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ;(7)4-ヒドロキシブタノエートデヒドロゲナーゼ;(8) α -ケトグルタレートデカルボキシラーゼ;(9)4-ヒドロキシブチリルCoA:アセチル-CoAトランスフェラーゼ;(10)ブチレートキナーゼ;(11)ホスホトランスブチリラーゼ(phosphotransbutyrylase);(12)アルデヒドデヒドロゲナーゼ;(13)アルコールデヒドロゲナーゼである。

30

【図2】大腸菌におけるホモセリン生合成を示す概略図である。

【図3】4-HB経路遺伝子の様々な組合せを発現するプラスミドを含む大腸菌株を使用するグルコース最小培地での4-HBの生成を示す図である。(a)液体培地における4-HB濃度;(b)液体培地におけるスクシネート濃度;(c)600nmで測定された培養OD。棒の集合体は、24時間、48時間、及び(測定した場合の)72時間の時点を表す。x軸上の符号は、使用した菌株/プラスミド組合せを示す。第1の指数は、宿主菌株: 1、MG1655 lacI^Q; 2、MG1655 Δ gabD lacI^Q; 3、MG1655 Δ gabD Δ aldA lacI^Qを指す。第2の指数は、使用したプラスミド組合せ: 1、pZE 13-0004-0035及びpZA33-0036; 2、pZE13-0004-0035及びpZA33-0010n; 3、pZE 13-0004-0008及びpZA33-0036; 4、pZE13-0004-0008及びpZA33-0010n; 5、対照ベクターpZE13及びpZA33を指す。

40

【図4】結核菌から α -ケトグルタレートデカルボキシラーゼを発現する大腸菌におけるグルコースからの4-HBの生成を示す図である。菌株1~3は、pZE13-0032及びpZA33-0036を含む。菌株4は、空ベクターpZE13及びpZA33のみを発現する。宿主菌株は、1及び4、MG1655 lacI^Q; 2、MG1655 Δ gabD lacI^Q; 3、MG1655 Δ gabD Δ aldA lacI^Qである。棒は、24及び48時間における濃度を指す。

【図5】組換え大腸菌株における10mM 4-HBからのBDOの生成を示す図である。番号付けし

50

たP.ギンギバリス(*gingivalis*)からcat2を発現するpZA33-0024を含むMG1655lacI^Q、並びにpZE13上に発現される以下の遺伝子:1、なし(対照);2、0002;3、0003;4、0003n;5、0011;6、0013;7、0023;8、0025;9、0008n;10、0035を用いた実験に対応する。遺伝子番号は、表6に規定されている。各位置について、棒は、それぞれ好気性、ミクロ好気性及び嫌気性条件を指す。ミクロ好気性条件は、培養チューブを排気せずに密閉することによって生成された。

【図6】4g/L非標識グルコース(a、c、e及びg)均一標識¹³C-グルコース(b、d、f及びh)が補給されたM9最小培地で成長したMG1655lacI^QpZE13-0004-0035-0002pZA33-0034-0036によって生成された4-HB及びBDOの質量スペクトルを示す図である。(a)及び(b)、2個の炭素原子を含む誘導体化BDOの質量116特異的断片;(c)及び(d)、1個の炭素原子を含む誘導体化BDOの質量177特異的断片;(e)及び(f)、2個の炭素原子を含む誘導体化4-HBの質量117特異的断片;(g)及び(h)、4個の炭素原子を含む誘導体化4-HBの質量233特異的断片。

【図7】γ-ブチロラクトンの生成のためのバイオプロセスの概略流れ図である。パネル(a)は、バッチ式分離を用いた流加発酵を示し、パネル(b)は、連続分離を用いた流加発酵を示す。

【図8A-8B】例示的な1,4-ブタンジオール(BDO)経路を示す図である。図8Aは、スクシニル-CoAからBDO経路を示す図である。図8Bは、アルファケトグルタレートからのBDO経路を示す図である。

【図9A-9C】例示的なBDO経路を示す図である。図9A及び9Bは、4-アミノブチレートからの経路を示す図である。図9Cは、アセトアクチル-CoAから4-アミノブチレートへの経路を示す図である。

【図10】アルファ-ケトグルタレートからの例示的なBDO経路を示す図である。

【図11】グルタメートからの例示的なBDO経路を示す図である。

【図12】アセトアセチル-CoAからの例示的なBDO経路を示す図である。

【図13】ホモセリンからの例示的なBDO経路を示す図である。

【図14A-14C】大腸菌スクシニル-CoAシンテターゼのヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す図である。図14Aは、大腸菌sucCDオペロンのヌクレオチド配列(配列番号)を示す図である。図14B(配列番号)及び図14C(配列番号)は、sucCDオペロンによってコードされるスクシニル-CoAシンテターゼサブユニットのアミノ酸配列を示す図である。

【図15A-15B】ウシ結核菌(*Mycobacterium bovis*)アルファ-ケトグルタレートデカルボキシラーゼのヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す図である。図15Aは、ウシ型結核菌sucA遺伝子のヌクレオチド配列(配列番号)を示す図である。図15B(配列番号)は、ウシ型結核菌アルファ-ケトグルタレートデカルボキシラーゼのアミノ酸配列を示す図である。

【図16】嫌気性(ミクロ好気性)条件下でのアルファ-ケトグルタレートを介する最小培地中でのグルコースからの4-ヒドロキシブチレートの大腸菌における生合成を示す図である。宿主菌株はECKh-401である。実験は、プラスミドpZA33上に存在する上流経路遺伝子に基づいて以下のように標識される。1)4hbd-sucA;2)sucCD-sucD-4hbd;3)sucCD-sucD-4hbd-sucA。

【図17】スクシネート及びアルファ-ケトグルタレートを介する最小培地でのグルコースからの4-ヒドロキシブチレートの大腸菌における生合成を示す図である。宿主菌株は野生型MG1655である。実験は、プラスミドpZE13及びpZA33上に存在する遺伝子に基づいて以下のように標識する。1)エンブティ調節ベクター;2)エンブティpZE13、pZA33-4hbd;3)pZE13-sucA、pZA33-4hbd。

【図18A-18B】図18Aは、ポルフィロモナス・ギンギバリス(*Porphyromonas gingivalis*)からのCoA依存性スクシネートセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(sucD)のヌクレオチド配列(配列番号)を示す図であり、図18Bは、コードされたアミノ酸配列(配列番号)を示す図である。

【図19A-19B】図19Aは、ポルフィロモナス・ギンギバリスからの4-ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼ(4hbd)のヌクレオチド配列(配列番号)を示す図であり、図19B

10

20

30

40

50

は、コードされたアミノ酸配列(配列番号)を示す図である。

【図20A-20B】図20Aは、ポルフィロモナス・ギンギバリスからの4-ヒドロキシブチレートCoAトランスフェラーゼ(cat2)のヌクレオチド配列(配列番号)を示す図であり、図20Bは、コードされたアミノ酸配列(配列番号)を示す図である。

【図21A-21B】図21Aは、クロストリジウム・アセトブチリウム(Clostridium acetobutylicum)からのホスホトランスブチリラーゼ(ptb)のヌクレオチド配列(配列番号)を示す図であり、図21Bは、コードされたアミノ酸配列(配列番号)を示す図である。

【図22A-22B】図22Aは、クロストリジウム・アセトブチリウムからのブチレートキナーゼ(buk1)のヌクレオチド配列(配列番号)を示す図であり、図22Bは、コードされたアミノ酸配列(配列番号)を示す図である。

【図23A-D】C.アセトブチリウム原生配列と比べてより優勢な大腸菌コドンのための変更コドンを含むC.アセトブチリウム020(ホスホトランスブチリラーゼ)についての代替的ヌクレオチド配列を示す図である。図23A~23D(それぞれ020A~020D、配列番号)は、より優勢なコドンで置き換えられた希大腸菌コドンが増加する(A<B<C<D)配列を含む。

【図24A-D】C.アセトブチリウム原生配列と比べてより優勢な大腸菌コドンのための変更コドンを含むC.アセトブチリウム021(ブチレートキナーゼ)についての代替的ヌクレオチド配列を示す図である。図24A~24D(それぞれ021A~021B、配列番号)は、より優勢なコドンで置き換えられた希大腸菌コドンが増加する(A<B<C<D)配列を含む。

【図25A-25B】大腸菌における発現のために最適化されたコドンによるブチレートキナーゼ(butyrate kinase)(BK)及びホスホトランスブチリラーゼ(PTB)の発現の向上を示す図である。図25Aは、タンパク質に対してクーマシーブルーで染色された硫酸ドデシルナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を示す図である(レーン1、インサートを有さない対照ベクター;レーン2、大腸菌におけるクロストリジウム・アセトブチリウム原生配列の発現;レーン3、020B-021Bコドン最適化PTB-BKの発現;レーン4、020C-021Cコドン最適化PTB-BKの発現)。BK及びPTBの位置が示されている。図25Bは、コドン最適化020B-021B(2021B)及び020C-021C(2021C)と比較した原生C.アセトブチリウム配列(2021n)のBK及びPTB活性を示す図である。

【図26】BDO精製酵素:Cat2(034);2021n;2021B;2021Cを発現する様々な菌株におけるBDO及びガンマ-ブチラクトン(gamma-butyrolactone)(GBL)の生成を示す図である。

【図27A-27B】図27Aは、原生クロストリジウム・ベイジェリンキー(Clostridium biejerinckii)ald遺伝子(025n)のヌクレオチド配列(配列番号)を示す図であり、図27Bは、コードされたアミノ酸配列(配列番号)を示す図である。

【図28A-28D】、より優勢なコドンで置き換えられた希コドン数が増加する(A<B<C<D)クロストリジウム・ベイジェリンキーald遺伝子の代替的な遺伝子配列(それぞれ025A-025D、SEQ ID NOS)を示す図である。

【図29】原生C.ベイジェリンキーald遺伝子及びコドン最適化変異体;無インサート(インサートを有さない対照)、025n、025A、025B、025C、025Dの発現を示す図である。

【図30A-30B】様々な菌株におけるBDO又はBDO及びエタノール産生を示す図である。図30Aは、原生C.ベイジェリンキーald遺伝子(025n)又は大腸菌における発現のために最適化されたコドンを含む変異体(025A~025D)を含む菌株におけるBDO生成を示す図である。図30Bは、コドン最適化変異体025Bと比較した、C.アセトブチリウムAdhE2酵素(002C)を発現する菌株におけるエタノール及びBDOの生成を示す図である。第3の集合は、P.ギンギバリス(P. gingivalis)sucD(035)の発現を示す図である。すべての場合において、P.ギンギバリスCat2(034)も発現される。

【図31A-31B】図31Aは、ゲオバシルス・サーモグルコシダシウス(Geobacillus thermoglucosidasius)からのadh1遺伝子のヌクレオチド配列(配列番号)を示す図であり、図31Bは、コードされたアミノ酸配列(配列番号)を示す図である。

【図32A-32B】図32Aは、大腸菌におけるゲオバシルス・サーモグルコシダシウスadh1遺伝子の発現を示す図である。全細胞溶解物又は上澄みをSDS-PAGEによって分析し、インサートを有さないプラスミド、083(ジオトリカム・カピタタム(Geotrichum capitatu

10

20

30

40

50

m)N-ベンジル-3-ピロリジノルデヒドロゲナーゼ)インサート及び084(ゲオバシルス・サーモグルコシダシウスadh1)インサートを有するプラスミドに対してクーマシーブルーで染色した。図32Bは、ブチルアルデヒド(菱形)又は4-ヒドロキシブチルアルデヒド(正方形)を基質とする084の活性を示す図である。

【図33】様々な菌株:インサートを有さないプラスミドにおけるBDOの生成を示す図である。025B、025B-026n; 025B-026A; 025B-026B; 025B-026C; 025B-050; 025B-052; 025B-053; 025B-055; 025B-057; 025B-058; 025B-071; 025B-083; 025B-084; PTSlac0-025B; PTSlac0-025B-026n。

【図34】ベクターpRE119-V2についてのプラスミドマップを示す図である。

【図35】aceF及びlpdA遺伝子を包含するECKh-138領域の配列を示す図である。K.ニューモニエ(K. pneumonia)lpdA遺伝子に下線が引かれ、Glu354Lys突然変異体に変化したコドンが網掛けされている。

【図36】原生大腸菌lpdAと突然変異K.ニューモニエlpdAとのタンパク質配列比較を示す図である。

【図37】菌株AB3、MG1655 Δ ldhA及びECKh-138における4-ヒドロキシブチレート(左棒)及びBDO(右棒)の生成を示す図である。すべての菌株が、大腸菌sucCD、P.ギンギバリスsucCD、P.ギンギバリス4hbdを中コピープラスミドpZA33上に発現し、P.ギンギバリスCat2、C.アセトブチリクムAdhE2を高コピープラスミドpZE13上に発現させた。

【図38】pflB-p6プロモーター及びリボソーム結合部位(RBS)に融合したaceE遺伝子の5'末端のヌクレオチド配列を示す図である。イタリック体の5'配列は、pdhオペロンから反対方向に転写されるaroP遺伝子の出発点を示す。イタリック体の3'配列は、aceE遺伝子の出発点を示す。大文字:pflB RBS。下線:FNR結合部位。太字:pflB-p6プロモーター配列。

【図39】菌株ECKh-456におけるaceF-lpdA領域におけるヌクレオチド配列(配列番号)を示す図である。

【図40】菌株ECKh-439、ECKh-455及びECKh-456の各々についての4-ヒドロキシブチレート、BDO及びピルベート(それぞれ左棒から右棒)の生成を示す図である。

【図41A-41B】図41Aは、mdh遺伝子の欠失に対する組換え部位の概略を示す図である。図41Bは、プラスミドpKD3からのmdh遺伝子のFRT部位及び相同性領域が隣接するクロラムフェニコール抵抗性遺伝子(CAT)の増幅のPCR生成物の配列を示す図である。

【図42】菌株ECKh-401におけるarcA欠失領域の配列を示す図である。

【図43】菌株ECKh-422の突然変異gltA遺伝子を包含する領域の配列を示す図である。

【図44】野生型gltA遺伝子生成物及びR163I突然変異体のシトレートシンターゼ活性を示す図である。アッセイを0.4mMのNADHの不在下(菱形)又は存在下(正方形)で実施した。

【図45】いずれも完全BDO経路に対する遺伝子をプラスミドに発現する菌株ECKh-401及びECKh-422における4-ヒドロキシブチレート(左棒)及びBDO(右棒)の生成を示す図である。

【図46】中心代謝流動及び代謝標識実験からの関連する95%信頼区間を示す図である。値は、1mmol/時のグルコース取込み率に対して正規化されたモル流量である。それらの結果は、炭素流動がシトレートシンターゼを通じて酸化方向に導かれること、及びほとんどの炭素がTCA回路を完了するのでなく、BDO経路に入ることを示している。

【図47】いずれもBDO経路全体をプラスミドに発現する菌株DCKh-138及びECKh-422についての細胞外生成物の形成を示す図である。測定された生成物は、アセテート(Ace)、ピルベート(Pyr)、4-ヒドロキシブチレート(4HB)、1,4-ブタンジオール(BDO)、エタノール、及びガンマ-ブチロラクトン(GBL)、スクシネート及びラクテートを含む他の生成物であった。

【図48】(H.インフルエンザ(H. influenza)ホスホエノールピルベートカルボキシキナーゼ(pepek)でPEPカルボキシラーゼ(ppc)を置き換えた後の領域の配列を示す図である。ppepekコード化領域に下線が引かれている。

【図49】50mMのNaHCO₃を含む最小培地で成長させた進化pepCK菌株の成長を示す図であ

10

20

30

40

50

る。

【図50】P.ギンギバリスCat2及びC.ベイジェリンキーAldをプラスミドpZS*13に発現する菌株ECKh-453における生成物の形成を示す図である。測定された生成物は、1,4-ブタンジオール(BDO)、ピルベート、4-ヒドロキシブチレート(4HB)、アセテート、 γ -ブチロラクトン(GBL)及びエタノールであった。

【図51】2つの菌株ECKh-453及びECKh-432のBDO生成を示す図である。いずれもP.ギンギバリスCat2及びC.ベイジェリンキーAld発現するプラスミドpZS*13を含む。示されるように27又は18ゲージのニードルで穿刺された容器を用いて培養物をミクロ好気性条件下で成長させた。

【図52】プロモーター、sucCD遺伝子、sucD遺伝子、4hbd遺伝子及び終止配列を含むポリシストロンDNA断片の挿入の領域における菌株ECKh-426のゲノムDNAのヌクレオチド配列を示す図である。

【図53】プロモーター、sucA遺伝子、C.クルイベリ(C. kluyveri)4hbd遺伝子及び終止配列を含むポリシストロン配列の挿入の領域における菌株ECKh-432の染色体領域のヌクレオチド配列を示す図である。

【図54】染色体に組み込まれている上流BDO経路コード化遺伝子を有し、下流BDO経路遺伝子を保持するプラスミドを含むECKh-432菌株の最小培地におけるグルコースからのBDO合成を示す図である。

【図55】rrnC領域に対して相同性の領域が隣接する非ホストランスフェラーゼ(非PTS)スクロース利用遺伝子を含むPCR生成物を示す図である。

【図56】rrnCオペロンにおける組込み部位の概略図を示す図である。

【図57】グルコース上で成長された菌株ECKh-432及びスクロース上で成長された菌株ECKh-463の成長の48時間後に培養物OD600に対して正規化された平均生成物濃度を示す図である。いずれもP.ギンギバリスCat2及びC.ベイジェリンキーAldを発現するプラスミドpZS*13を含む。データは、各菌株の6つの複製培養物に対する。測定された生成物は、1,4-ブタンジオール(BDO)、4-ヒドロキシブチレート(4HB)、 γ -ブチロラクトン(GBL)、ピルベート(PYR)及びアセテート(ACE)(それぞれ左棒から右棒)であった。

【発明を実施するための形態】

【0009】

(発明の詳細な説明)

本発明は、4-ヒドロキシブタン酸(4-HB)、 γ -ブチロラクトン及び1,4-ブタンジオール(BDO)の生合成生成機能を有する細胞及び生物体の設計及び生成に向けられる。本発明は、特に、BDO経路酵素をコードする1つ以上の核酸を導入することによってBDOを生成することが可能な微生物体の設計に関する。

【0010】

一実施態様において、本発明は、4-ヒドロキシブタン酸(4-HB)及び1,4-ブタンジオール(BDO)の生合成生成のための代謝設計を特定する大腸菌代謝のインシリコ化学量論モデルを利用する。本明細書に記載されている結果は、代謝経路を設計及び組換え操作して、大腸菌及び他の細胞又は生物体における4-HB並びに1,4-ブタンジオールなどの下流生成物の生合成を達成できることを示す。例えばインシリコ設計のための4-HBの生合成生成物を、設計された代謝遺伝子型を有する菌株を構成することによって確認することができる。これらの代謝操作細胞又は生物体を順応的進化させて、理論的最大成長に近づく条件下を含む4-HB生合成をさらに増強することができる。

【0011】

一部の実施態様において、設計された菌株の4-HB生合成特性は、それらを遺伝的に安定にし、特に、連続バイオプロセスに有用なものとする。異なる非原生又は非相同的反応機能を大腸菌又は他の宿主生物体に組み込んで、CoA非依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、スクシニル-CoAシンテターゼ及びCoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、又はグルタメート:コハク酸セミアルデヒドトランスアミナーゼから代謝経路を生成する4-HB及び1,4-ブタンジオールを得る個別の菌株設計手法が特定された。こ

これらの代謝経路の各々からの大腸菌及び酵母種における4-HBの生合成を生じさせるインシリコ代謝設計が特定された。1,4-ブタンジオール中間体 γ -ブチロラクトンを、pH7.5未満の条件下、特に酸性条件下、例えば、pH5.5未満、例えば、pH7未満、pH6.5未満、pH6未満、特にpH5.5以下での自然環化によって培養で生成することができる。

【0012】

プラットフォームの計算コンポーネントを介して特定された菌株を、4-HB、1,4-ブタンジオール若しくは他の中間体及び/又は下流生成物の生合成生成をもたらす予測代謝変異のいずれかを遺伝子操作することによって実際に生成させることができる。さらなる実施態様において、これらの化合物の生合成生成を示す菌株をさらに適応進化させて、生成物生合成をさらに増強することができる。適応進化の後の生成物生合成収量のレベルを、システムの計算コンポーネントによって予測することができる。

10

【0013】

他の具体的な実施態様において、スクシネートから4-HB及び4-HB-CoAへの酵素工程をコードする4-HB生合成経路を発現するように微生物体を構成した。宿主微生物体におけるスクシネート補酵素Aトランスフェラーゼ、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、NAD依存性4-ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼ及び4-ヒドロキシブチレート補酵素Aトランスフェラーゼの同時発現は、4-HB生合成経路を欠いた宿主微生物体と比較して4-HBの有意な生成をもたらした。さらなる具体的な実施態様において、 α -ケトグルタレートデカルボキシラーゼ及びNAD依存性4-ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼをコードする核酸を導入することによって、 α -ケトグルタレートを基質として利用する4-HB生成微生物体を生成した。

20

【0014】

別の具体的な実施態様において、4-HBの存在下で培養されると1,4-ブタンジオール(BDO)を生合成するBDO生合成経路を含む微生物体を構成した。BDO生合成経路は、多機能性アルデヒド/アルコールデヒドロゲナーゼをコードする核酸、又はアルデヒドデヒドロゲナーゼ及びアルコールデヒドロゲナーゼをコードする核酸からなっていた。4-HB基質上での成長を支持するために、これらのBDO生成微生物体は、ホスホトランスヒドロキシブチラーゼ(phosphotranshydroxybutyrylase)とともに、4-ヒドロキシブチレートCoAトランスフェラーゼ又は4-ブチレートキナーゼをも発現した。さらなる具体的な実施態様において、機能性4-HB生合成経路及び機能性BDO生合成経路をコードする核酸の外因性発現を介してBDOを合成する微生物体を生成した。4-HB生合成経路は、スクシネート補酵素Aトランスフェラーゼ、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、NAD-依存性4-ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼ及び4-ヒドロキシブチレート補酵素Aトランスフェラーゼからなっていた。BDO経路は、多機能性アルデヒド/アルコールデヒドロゲナーゼからなっていた。BDOを生成するためのさらなる経路を本明細書にさらに記載する(図8~13参照)。

30

【0015】

本明細書に使用されているように、「非天然」という用語は、本発明の微生物体又は微生物に関して使用される場合は、微生物体が、記載の種の野生型菌株を含む記載の種の天然菌株に通常は見いだされない少なくとも1つの遺伝子変異を有することを意味することを意図する。遺伝子変異は、例えば、代謝ポリペプチドをコードする発現可能な核酸を導入する修飾、他の核酸付加、核酸除去及び/又は微生物遺伝子材料の他の機能的破壊を含む。当該修飾は、例えば、記載の種についての非相同性、相同性又は非相同性及び相同性ポリペプチドに対するコード化領域及びそれらの機能的断片を含む。さらなる修飾は、例えば、修飾が遺伝子又はオペロンの発現を改変する非コード化規則的領域を含む。例示的な代謝ポリペプチドは、BDO系統の化合物のための生合成経路内の酵素又はタンパク質を含む。

40

【0016】

代謝修飾は、その天然の状態から改変された生化学反応を指す。したがって、非天然微生物は、代謝ポリペプチド又はそれらの機能性断片をコードする核酸に対する遺伝子修飾を有する。例示的な代謝修飾を本明細書に開示する。

50

【0017】

本明細書に使用されているように、「単離された」という用語は、微生物体に関して使用される場合は、記載の微生物体としての少なくとも1つの成分を実質的に含まない生物体が天然に見いだされることを指すことを意図する。該用語は、その天然環境に見いだされる一部又はすべての成分から除去される微生物体を含む。該用語は、微生物体が非天然環境に見いだされるときに、一部又はすべての成分から除去される微生物体を含む。したがって、単離された微生物体は、それが天然に見いだされるとき、又はそれが非天然環境で成長、貯蔵若しくは供給されるときに他の物質から部分的又は完全に分離される。単離微生物体の具体的な例としては、部分的に純粋の微生物、実質的に純粋の微生物及び非天然の培地で培養された微生物が挙げられる。

10

【0018】

本明細書に使用されているように、「微生物(microbial)」、「微生物体」又は「微生物(microorganism)」は、古細菌、細菌又は真核細菌のドメイン内に含まれる微視的細胞として存在する任意の生物体を指すことを意図する。したがって、該用語は、微視的サイズを有する原核又は真核細胞又は生物体を包含することを意図し、あらゆる種類の細菌、古細菌及び真正細菌、並びに酵母及び真菌などの真核微生物を含む。該用語は、生化学物質の生成のために培養することができる任意の種の細胞培養物をも含む。

【0019】

本明細書に使用されているように、「4-ヒドロキシブタン酸」という用語は、化学式 $C_4H_8O_3$ 及び104.11g/mol(そのナトリウム塩については126.09g/mol)の分子質量を有する酪酸の4-ヒドロキシ誘導体を指すことを意図する。化学化合物4-ヒドロキシブタン酸は、当該技術分野において、4-HB、4-ヒドロキシブチレート、ガンマ-ヒドロキシ酪酸又はGHBとしても知られる。該用語は、本明細書で使用されるように、化合物の様々な塩形のいずれかを含み、例えば4-ヒドロキシブタノエート及び4-ヒドロキシブチレートを含むことを意図する。4-HBについての塩形の具体的な例としては、ナトリウム4-HB及びカリウム4-HBが挙げられる。したがって、4-ヒドロキシブタン酸、4-HB、4-ヒドロキシブチレート、4-ヒドロキシブタノエート、ガンマ-ヒドロキシ酪酸及びGHBという用語、並びに他の当該技術分野で認識されている名称は、本明細書において同義的に使用される。

20

【0020】

本明細書に使用されているように、「モノマー」という用語は、4-HBに関して使用されるときは、非ポリマー又は非誘導体化形の4-HBを指すことを意図する。ポリマー4-HBの具体的な例としては、ポリ-4-ヒドロキシブタン酸、並びに例えば4-HBと3-HBのコポリマーが挙げられる。4-HBの誘導体化形の具体的な例は、4-HB-CoAである。他のポリマー4-HB形及び4-HBの他の誘導体化形も当該技術分野で既知である。

30

【0021】

本明細書に使用されているように、「 γ -ブチロラクトン」という用語は、化学式 $C_4H_6O_2$ 及び86.089g/molの分子質量を有するラクトンを指すことを意図する。化学化合物 γ -ブチロラクトンは、当該技術分野において、GBL、ブチロラクトン、1,4-ラクトン、4-ブチロラクトン、4-ヒドロキシ酪酸ラクトン及びガンマ-ヒドロキシ酪酸ラクトンとしても既知である。該用語は、本明細書に使用されるときは、化合物の様々な塩形のいずれかを含むことを意図する。

40

【0022】

本明細書に使用されているように、「1,4-ブタンジオール」という用語は、化学式 $C_4H_{10}O_2$ 及び90.12g/molの分子質量を有する、2つのヒドロキシル基を保持するアルカンブタンのアルコール誘導体を指すことを意図する。化学化合物1,4-ブタンジオールは、当該技術分野においてBDOとしても既知であり、本明細書ではBDO系統の化合物と称する系統の化合物に対する化学中間体又は前駆体である。

【0023】

本明細書に使用されているように、「テトラヒドロフラン」という用語は、化学式 C_4H_8O 及び72.11g/molの分子質量を有する芳香族化合物フランの完全水素化類似体に対応する

50

複素環式有機化合物を指すことを意図する。化学化合物テトラヒドロフランは、当該技術分野において、THF、テトラヒドロフラン、1,4-エポキシブタン、酸化ブチレン、酸化シクロテトラメチレン、オキサシクロペンタン、酸化ジエチレン、オキシラン、フラニジン、ヒドロフラン、酸化テトラメチレンとしても既知である。該用語は、それが本明細書に使用されるときは、化合物の様々な塩形のいずれかを含むことを意図する。

【0024】

本明細書に使用されているように、「CoA」又は「補酵素A」という用語は、多くの酵素(アポ酵素)の活性が活性酵素形を形成するのにその存在が必要とされる有機補因子又は配合団(酵素の非タンパク質部分)を指すことを意図する。補酵素Aは、特定の縮合酵素において機能し、アセチル又は他のアシル基転移並びに脂肪酸合成及び酸化、ピルベート酸化及び他のアセチル化において作用する。

10

【0025】

本明細書に使用されているように、「実質的に嫌気性」という用語は、培養又は成長条件に関して使用されるときは、酸素の量が、液体媒体中の溶存酸素について約10%未満の飽和であることを意味することを意図する。該用語は、また、約1%未満の酸素の雰囲気で維持される液体又は固体媒体の密閉チャンバーを含むことを意図する。

【0026】

本発明の非天然微生物体は、変異を低下させることなく、5を超える世代に対して培養することができる微生物を指す安定遺伝子変異を含むことができる。一般に、安定遺伝子変異は、10を超える世代にわたって持続する修飾、特に安定な修飾は、約25を超える世代にわたって持続し、特に、安定な遺伝子修飾は、無限を含めて、50を超える世代にわたって持続することになる。

20

【0027】

当業者は、本明細書に例示される代謝修飾を含む遺伝子変異は、好適な由来生物体、例えば、大腸菌、酵母又は本明細書に開示されている他の生物体、並びにそれらの対応する代謝反応、又は所望の遺伝子材料、例えばそれらの対応する代謝反応のための酵素をコードする遺伝子のための好適な由来生物体に関して記載される。しかし、多種多様な生物体の完全ゲノム配列及びゲノムの分野における高度な技能を考慮すると、当業者は、本明細書に示される教示及び指針を実質的にすべての他の生物体に容易に適用することが可能である。例えば、記載の種意外の種から同一又は類似のコード化核酸を組み込むことによって、本明細書に例示される大腸菌代謝変異を他の種に容易に適用することができる。当該遺伝子変異としては、例えば、概して相同体種の遺伝子変異、及び特にオルソログ、パラログ又は非オルソログ遺伝子置換が挙げられる。

30

【0028】

オルソログは、垂直降下によって関連づけられ、異なる生物体において実質的に同様又は同一の機能に関与する1つ以上の遺伝子である。例えば、マウスエポキシドヒドロラーゼ及びヒトエポキシドヒドロラーゼをエポキシドの加水分解の生物学的機能についてオルソログと見なすことができる。遺伝子は、例えば、それらが相同性であることを示すための十分な量の配列類似性を共有するか、又は共通の祖先からの進化によって関連づけられるときに垂直降下によって関連づけられる。遺伝子が、三次元構造を共有するが、一次配列類似性が識別可能でない程度に、共通の祖先から進化したことを示すための十分な量の配列類似性を必ずしも共有しない場合に、遺伝子をオルソログと見なすこともできる。オルソログである遺伝子は、約25%から100%のアミノ酸配列同一性の配列類似性を有するタンパク質をコードすることができる。25%未満のアミノ酸類似性を共有するタンパク質をコードする遺伝子は、それらの三次元構造も類似性を示す場合に垂直降下によって生じたと見なすこともできる。組織プラスミノゲン活性化剤及びエラスターゼを含むセリンプロテアーゼ系統の酵素の構成要素は、共通の祖先からの垂直降下によって生じたと見なされる。

40

【0029】

オルソログは、例えば進化を介して構造又は全体活性が分岐した遺伝子又はそれらのコ

50

ード化遺伝子生成物を含む。例えば、1つの種が2つの機能を示す遺伝子生成物をコードし、当該機能が第2の種における異なる遺伝子に分けられた場合は、3つの遺伝子及びそれらの対応する生成物がオルソログと見なされる。生化学生成物の成長連結生成では、破壊すべき代謝活性を有するオルソログ遺伝子を非天然微生物の構成に選択すべきであることを当業者は理解するであろう。分離可能な活性を示すオルソログの例は、異なる活性が、2つ以上の種の間又は単一種内の異なる遺伝子生成物に分離された場合である。具体例は、2種類のセリンプロテアーゼ活性であるエラスターゼタンパク質分解とプラスミノゲンタンパク質分解をプラスミノゲン活性化剤及びエラスターゼとしての異なる分子に分離することである。第2の例は、マイコプラズマ5'-3'エキソヌクレアーゼ及びドロソフィラDNAポリメラーゼIII活性の分離である。第1の種からのDNAポリメラーゼは、第2の種からのエキソヌクレアーゼ又はポリメラーゼのいずれか又は両方に対してオルソログであり、且つその逆であると見なすことができる。

10

【0030】

対照的に、パラログは、例えば、複製、そしてその後の進化的分岐によって関連づけられる相同体であり、類似又は共通するが、同一でない機能を有する。パラログは、例えば同一種又は異なる種から由来又は派生し得る。例えば、微生物エポキシドヒドrolラーゼ(エポキシドヒドrolラーゼI)及び可溶性エポキシドヒドrolラーゼ(エポキシドヒドrolラーゼII)は、異なる反応を触媒し、同じ種に2つの異なる機能を有する、共通の祖先から同時進化した2つの異なる酵素を表すため、パラログであると見なすことができる。パラログは、互いに有意な配列類似性を有する同一種のタンパク質であり、それは、それらが相同体であるか、又は共通の祖先からの同時進化を介して関連づけられていることを示唆する。パラログタンパク質システムのグループは、HipA相同体、ルシフェラーゼ遺伝子及びペプチダーゼ等を含む。非オルソログ遺伝子置換は、異なる種における記載の遺伝子機能に代わることができる1つの種からの非オルソログ遺伝子である。置換は、例えば、異なる種における被参照機能と比較して、本来の種における実質的に同様又は類似の機能を実施できることを含む。一般に、非オルソログ遺伝子置換は、被参照機能をコードする既知の遺伝子に構造的に関連するものとして識別可能であるが、構造的関連性が低い、機能的に類似の遺伝子及びそれらの対応する遺伝子生成物も、本明細書に使用されるとき該用語の意味の範囲内に含まれる。機能的類似性は、例えば、置換しようとする機能をコードする遺伝子と比較して、非オルソログ遺伝子の活性部位又は結合領域において少なくともある程度の類似性を必要とする。したがって、非オルソログ遺伝子は、例えば、パラログ又は非関連遺伝子を含む。

20

30

【0031】

したがって、4-HB、GBL及び/又はBDO生合成機能を有する本発明の非天然微生物体を特定及び構成するのに際して、当業者は、本明細書に示される教示及び指針を特定の種に適用すると、代謝修飾の特定が、オルソログの特定及び包含又は不活性化を含むことができることを理解するであろう。パラログ及び/又は非オルソログ遺伝子置換が、類似又は実質的に類似の代謝反応を触媒する酵素をコードする被参照微生物に存在する範囲で、当業者は、これらの進化的に関連する遺伝子を利用することもできる。

【0032】

オルソログ、パラログ及び非オルソログ遺伝子置換を当業者に周知の方法によって測定することができる。例えば、2つのポリペプチドについての核酸又はアミノ酸配列の調査は、比較配列間の配列同一性及び類似性を明らかにすることになる。当該類似性に基づいて、当業者は、タンパク質が共通の祖先からの進化を介して関連することを示すのに類似性が十分に高度なものであるかどうかを判断することができる。Align、BLAST及びClustal W等の当業者に周知のアルゴリズムは、粗配列類似性又は同一性を比較及び判断するとともに、重み又は得点を割り当てることができる配列のギャップの存在又は有意性を判断する。当該アルゴリズムも当該技術分野で既知であり、ヌクレオチド配列類似性又は同一性を判断するのに同様に適用可能である。関連性を判断するための十分な類似性についてのパラメータは、統計的類似性、又はランダムポリペプチドにおける類似の対応を見いだ

40

50

す可能性、及び測定された対応の有意性を計算するための周知の方法に基づいて計算される。望まれる場合は、2つ以上の配列のコンピュータ比較を当業者によって視覚的に最適化することができる。関連遺伝子生成物又はタンパク質は、高い類似性、例えば、25%から100%の配列同一性を有することが期待できる。関連しないタンパク質は、十分なサイズのデータベースを走査した場合に、偶然に生じることが期待される程度(約5%)と実質的に同じである同一性を有し得る。5%から24%の配列は、比較した配列が関連することを結論づけるための十分な相同性を表す場合もあるし、表さない場合もある。データ集合体のサイズが与えられた当該対応の有意性を判断するためのさらなる統計的分析を実施して、これらの配列の関連性を判断することができる。

【0033】

BLASTアルゴリズムを使用して2つ以上の配列の関連性を判断するための例示的なパラメータを、例えば、以下に記載することができる。手短に述べると、BLASTPバージョン2.0.8(Jan-05-1999)及び以下のパラメータ:Matrix:0 BLOSUM62;gap open:11;gap extension:1;x_dropoff:50;expect:10.0;wordsize:3;filter:onを使用して、アミノ酸配列アラインメントを実施することができる。BLASTNバージョン2.0.6(Sept-16-1998)及び以下のパラメータ:Match:1;mismatch:-2;gap open:5;gap extension:2;x_dropoff:50;expect:10.0;wordsize:11;filter:offを使用して、核酸配列アラインメントを実施することができる。例えば比較の厳密さを向上又は低下させ、2つ以上の配列の関連性を判断するために上記パラメータにどのような修正を加えることができるかを当業者は把握するであろう。

【0034】

4-ヒドロキシブタノエートデヒドロゲナーゼ、CoA非依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、スクシニル-CoAシンテターゼ、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、グルタメート:コハク酸セミアルデヒドトランスアミナーゼ、アルファ-ケトグルタレートデカルボキシラーゼ又はグルタメートデカルボキシラーゼをコードする少なくとも1つの外因性核酸を含む4-ヒドロキシブタン酸(4-HB)生合成経路を有する微生物体を含む非天然微生物生触媒又は微生物体であって、該外因性核酸が、モノマー4-ヒドロキシブタン酸(4-HB)を生成するのに十分な量で発現される非天然微生物生触媒が本明細書で開示される。4-ヒドロキシブタノエートデヒドロゲナーゼは、4-ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼ又は4-HBデヒドロゲナーゼとも称する。スクシニル-CoAシンテターゼは、スクシニル-CoAシンターゼ又はスクシニル-CoAリガーゼとも称する。

【0035】

4-ヒドロキシブタノエートデヒドロゲナーゼ、スクシニル-CoAシンテターゼ、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ又は α -ケトグルタレートデカルボキシラーゼをコードする少なくとも1つの外因性核酸を有する4-ヒドロキシブタン酸(4-HB)生合成経路を有する微生物体を含む非天然微生物生触媒又は微生物体であって、該外因性核酸が、モノマー4-ヒドロキシブタン酸(4-HB)を生成するのに十分な量で発現される非天然微生物生触媒も本明細書で開示される。

【0036】

非天然微生物生触媒又は微生物体は、本発明の化合物を生合成生成するための代謝反応の組合せを採用する微生物体を含むことができる。生合成化合物を細胞内で生成し、且つ/又は培地に分布することができる。非天然微生物によって生成される例示的な化合物としては、例えば、4-ヒドロキシブタン酸、1,4-ブタンジオール及び γ -ブチロラクトンが挙げられる。

【0037】

一実施態様において、非天然微生物体は、4-HBを生成するように操作される。この化合物は、1,4-ブタンジオール系列の化合物への1つの有用な入口点である。スクシネートから、又はスクシニル-CoAを介してスクシネートから、又は α -ケトグルタレートから4-HBを形成するための生化学反応を図1の工程1~8に示す。

【0038】

出発化合物からBDO生成物への変換が達成されるのであれば、BDO経路の適切な酵素の任

10

20

30

40

50

意の組合せを使用できることが理解される。したがって、本明細書に開示されている代謝経路のいずれかを利用できること、及び本明細書に開示されているように、所望の経路を達成するために適切な酵素をどのように選択すべきかを当業者が十分理解することが理解される。

【0039】

別の実施態様において、1,4-ブタンジオール(BDO)を生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含むBDO経路を有する微生物体を含む非天然微生物体であって、該BDO経路が、4-アミノブチレートCoAトランスフェラーゼ、4-アミノブチリルCoAヒドロラーゼ、4-アミノブチレート-CoAリガーゼ、4-アミノブチリル-CoAオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、4-アミノブチリル-CoAトランスアミナーゼ又は4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼを含む非天然微生物体が本明細書で開示される(実施例VII表17参照)。BDO経路は、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含むことができる。

【0040】

本明細書に開示されているように、経路の様々な組合せを利用できることが当業者に理解される。例えば、非天然微生物体において、核酸は、4-アミノブチレートCoAトランスフェラーゼ、4-アミノブチリル-CoAヒドロラーゼ又は4-アミノブチレート-CoAリガーゼ;4-アミノブチリル-CoAオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は4-アミノブチリル-CoAトランスアミナーゼ;及び4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼをコードすることができる。他の例示的な組合せを以下に具体的に記載し、図8~13にさらに見いだすことができる。例えば、BDO経路は、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含むことができる。

【0041】

さらに、BDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含むBDO経路を有する微生物体を含む非天然微生物体であって、該BDO経路が、4-アミノブチレートCoAトランスフェラーゼ、4-アミノブチリルCoAヒドロラーゼ、4-アミノブチレート-CoAリガーゼ、4-アミノブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-アミノブチリル-CoAレダクターゼ、4-アミノブタン-1-オールデヒドロゲナーゼ、4-アミノブタン-1-オールオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は4-アミノブタン-1-オールトランスアミナーゼを含む非天然微生物体(実施例VII及び表18)が本明細書で開示され、1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含むことができる。例えば、外因性核酸は、4-アミノブチレートCoAトランスフェラーゼ、4-アミノブチリル-CoAヒドロラーゼ又は4-アミノブチレート-CoAリガーゼ;4-アミノブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成);及び4-アミノブタン-1-オールオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は4-アミノブタン-1-オールトランスアミナーゼをコードすることができる。加えて、核酸は、4-アミノブチレートCoAトランスフェラーゼ、4-アミノブチリル-CoAヒドロラーゼ又は4-アミノブチレートCoAリガーゼ;4-アミノブチリル-CoAレダクターゼ;4-アミノブタン-1-オールデヒドロゲナーゼ;及び4-アミノブタン-1-オールオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は4-アミノブタン-1-オールトランスアミナーゼをコードすることができる。

【0042】

さらに、BDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含むBDO経路を有する微生物体を含む非天然微生物体であって、該BDO経路が、4-アミノブチレートキナーゼ、4-アミノブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)、4-アミノブタン-1-オールデヒドロゲナーゼ、4-アミノブタン-1-オールオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、4-アミノブタン-1-オールトランスアミナーゼ、[(4-アミノブタノリル)オキシ]ホスホン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、[(4-アミノブタノイル)オキシ]ホスホン酸トランスアミナーゼ、4-ヒドロキシブチリル-ホスフェートデヒドロゲナーゼ又は4-ヒドロキシブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)を含む非天

然微生物体が本明細書で開示される(実施例VII及び表19)。例えば、外因性核酸は、4-アミノブチレートキナーゼ;4-アミノブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化);4-アミノブタン-1-オールデヒドロゲナーゼ;及び4-アミノブタン-1-オールオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は4-アミノブタン-1-オールトランスアミナーゼをコードすることができる。代替的に、外因性核酸は、4-アミノブチレートキナーゼ;[(4-アミノブタノリル)オキシ]リン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は[(4-アミノブタノリル)オキシ]ホスホン酸トランスアミナーゼ;4-ヒドロキシブチリル-ホスフェートデヒドロゲナーゼ;及び4-ヒドロキシブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)をコードすることができる。

【0043】

さらに、BDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含むBDO経路を有する微生物体を含む非天然微生物体であって、該BDO経路が、アルファ-ケトグルタレート5-キナーゼ、2,5-ジオキソペンタン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)、2,5-ジオキソペンタン酸レダクターゼ、アルファ-ケトグルタレートCoAトランスフェラーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAヒドロラーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAリガーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAレダクターゼ、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ又は5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱カルボキシル化)を含む非天然微生物体も本明細書で開示される(実施例VIII及び表20)。BDO経路は、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含むことができる。例えば、外因性核酸は、アルファ-ケトグルタレート5-キナーゼ;2,5-ジオキソペンタン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化);2,5-ジオキソペンタン酸レダクターゼ;及び5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼをコードすることができる。代替的に、外因性核酸は、アルファ-ケトグルタレート5-キナーゼ;2,5-ジオキソペンタン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化);2,5-ジオキソペンタン酸レダクターゼ;及び5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱カルボキシル化)をコードすることができる。代替的に、外因性核酸は、アルファ-ケトグルタレートCoAトランスフェラーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAヒドロラーゼ又はアルファ-ケトグルタリル-CoAリガーゼ;アルファ-ケトグルタリル-CoAレダクターゼ、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ;及び5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼをコードすることができる。別の実施態様において、外因性核酸は、アルファ-ケトグルタレートCoAトランスフェラーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAヒドロラーゼ又はアルファ-ケトグルタリル-CoAリガーゼ;アルファ-ケトグルタリル-CoAレダクターゼ、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ及び5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱カルボキシル化)をコードすることができる。代替的に、外因性核酸は、アルファ-ケトグルタレートCoAトランスフェラーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAヒドロラーゼ又はアルファ-ケトグルタリル-CoAリガーゼ;アルファ-ケトグルタリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成);及び5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼをコードすることができる。さらに別の実施態様において、外因性核酸は、アルファ-ケトグルタリル-CoAトランスフェラーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAヒドロラーゼ又はアルファ-ケトグルタリル-CoAリガーゼ;アルファ-ケトグルタリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成);及び5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱カルボキシル化)をコードすることができる。

【0044】

さらに、BDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含むBDO経路を有する微生物体を含む非天然微生物体であって、該BDO経路が、グルタメートCoAトランスフェラーゼ、グルタミル-CoAヒドロラーゼ、グルタミル-CoAリガーゼ、グルタメート5-キナーゼ、グルタメート-5-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)、グルタミル-CoAレダクターゼ、グルタメート-5-セミアルデヒドレダクターゼ、グルタミル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、2-アミノ-5-ヒドロキシペン

タン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸トランスアミナーゼ、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱カルボキシル化)を含む非天然微生物体が本明細書で開示される(実施例IX及び表21参照)。例えば、外因性核酸は、グルタメートCoAトランスフェラーゼ、グルタミル-CoAヒドロラーゼ又はグルタミル-CoAリガーゼ;グルタミル-CoAレダクターゼ;グルタメート-5-セミアルデヒドレダクターゼ;2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸トランスアミナーゼ;及び5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ又は5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱カルボキシル化)をコードすることができる。代替的に、外因性核酸は、グルタメート5-キナーゼ;グルタメート-5-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化);グルタメート-5-セミアルデヒドレダクターゼ;2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸トランスアミナーゼ;及び5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ又は5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱カルボキシル化)をコードすることができる。さらに別の実施態様において、外因性核酸は、グルタメートCoAトランスフェラーゼ、グルタミル-CoAヒドロラーゼ又はグルタミル-CoAリガーゼ;グルタミル-CoAレダクターゼ(アルコール形成);2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸トランスアミナーゼ;及び5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ又は5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱カルボキシル化)をコードすることができる。さらに別の実施態様において、外因性核酸は、グルタメート5-キナーゼ;グルタメート-5-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化);2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸トランスアミナーゼ;5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ又は5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱カルボン酸)をコードすることができる。

【0045】

また、BDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含むBDO経路を有する微生物体を含む非天然微生物体であって、該BDO経路が、3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ、3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼ、ビニルアセチル-CoA Δ -イソメラーゼ又は4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼを含む非天然微生物体が本明細書で開示される(実施例X及び表22参照)。例えば、外因性核酸は、3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ;3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼ;ビニルアセチル-CoA Δ -イソメラーゼ;及び4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼをコードすることができる。

【0046】

さらに、BDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含むBDO経路を有する微生物体を含む非天然微生物体であって、該BDO経路が、ホモセリンデアミナーゼ、ホモセリンCoAトランスフェラーゼ、ホモセリン-CoAヒドロラーゼ、ホモセリン-CoAリガーゼ、ホモセリン-CoAデアミナーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAリガーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エノエートレダクターゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoA-トランスフェラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ又は4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAレダクターゼを含む非天然微生物体が本明細書で開示される(実施例XI及び表23参照)。例えば、外因性核酸は、ホモセリンデアミナーゼ;4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAリガーゼ;4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAレダクターゼをコードすることができる。代替的に、外因性核酸は、ホモセリンCoAトランスフェラーゼ、ホモセリン-CoAヒドロラーゼ又はホモセリン-CoAリガーゼ;ホモセリン-CoAデアミナーゼ;及び4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAレダクターゼをコードすることができる。さらなる実施態様において、

外因性核酸は、ホモセリンデアミナーゼ;4-ヒドロキシブタ2-エノエートレダクターゼ;及び4-ヒドロキシブチリル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ又は4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼをコードすることができる。代替的に、外因性核酸は、ホモセリン-CoAトランスフェラーゼ、ホモセリン-CoAヒドロラーゼ又はホモセリン-CoAリガーゼ;ホモセリン-CoAデアミナーゼ;及び4-ヒドロキシブタ2-エノイル-CoAレダクターゼをコードすることができる。

【0047】

さらに、BDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含むBDO経路を有する微生物体を含む非天然微生物体であって、該BDO経路が、スクシニル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ、4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ(リン酸化)を含む非天然微生物体が本明細書で開示される(表15参照)。当該BDO経路は、スクシニル-CoAレダクターゼ、4-ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシブチレートキナーゼ、ホスホトランス-4-ヒドロキシブチリラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含むことができる。

【0048】

さらに、BDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含むBDO経路を有する微生物体を含む非天然微生物体であって、該BDO経路が、グルタメートデヒドロゲナーゼ、4-アミノブチレートオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、4-アミノブチレートトランスアミナーゼ、グルタメートデカルボキシラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ、4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ(リン酸化)を含む非天然微生物体が本明細書で開示される(表16参照)。当該BDO経路は、アルファ-ケトグルタレートデカルボキシラーゼ、4-ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシブチレートキナーゼ、ホスホトランス-4-ヒドロキシブチリラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含むことができる。

【0049】

上記経路は、単に例示である。当業者は、要望に応じて、本明細書に開示されるものから適切な経路を容易に選択して、好適なBDO経路又は他の代謝経路を得ることができる。

【0050】

本発明は、生成物を増加させるか、又は望ましくない副産物を減少させることによってBDOなどの所望の生成物の生成の向上を可能にする遺伝子改変生物体を提供する。本明細書に開示されているように、本発明は、1,4-ブタンジオール(BDO)を生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含むBDO経路を有する微生物体を含む非天然微生物体を提供する。一実施態様において、微生物体は、外因性スクシニル-CoAシンテターゼを発現するように遺伝子改変されている(実施例XII参照)。例えば、スクシニル-CoAシンテターゼは、大腸菌sucCD遺伝子によってコードすることができる。

【0051】

別の実施態様において、微生物体は、外因性アルファ-ケトグルタレートデカルボキシラーゼを発現するように遺伝子改変されている(実施例XIII参照)。例えば、アルファ-ケトグルタレートデカルボキシラーゼは、ウシ結核菌sucA遺伝子によってコードすることができる。さらに別の実施態様において、微生物体は、外因性スクシネートセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ及び4-ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼ並びに場合により4-ヒドロキシブチリル-CoA/アセチル-CoAトランスフェラーゼを発現するように遺伝子改変されている(実施例XIII参照)。例えば、スクシネートセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(CoA依存性)、4-ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼ及び4-ヒドロキシブチリル-CoA/アセチ

ル-CoAトランスフェラーゼは、ポルフィロモナス・ギンギバリスW83遺伝子によってコードすることができる。さらなる実施態様において、微生物体は、外因性ブチレートキナーゼ及びホスホトランスブチリラーゼを発現するように遺伝子改変されている(実施例XIII参照)。例えば、ブチレートキナーゼ及びホスホトランスブチリラーゼは、クロストリジウム・アセトブチリクムbuk1及びptb遺伝子によってコードすることができる。

【0052】

さらに別の実施態様において、微生物体は、外因性4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼを発現するように遺伝子改変されている(実施例XIII参照)。例えば、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼは、クロストリジウム・ベージェリンキーald遺伝子によってコードすることができる。また、本発明の実施態様において、微生物体は、外因性4-ヒドロキシブタナールレダクターゼを発現するように遺伝子改変されている(実施例XIII参照))。例えば、4-ヒドロキシブタナールレダクターゼは、ゲオバシルス・サーモグルコシダシウスadh1遺伝子によってコードすることができる。別の実施態様において、微生物体は、外因性ピルベートデヒドロゲナーゼサブユニットを発現するように遺伝子改変されている(実施例XIV参照)。例えば、外因性ピルベートデヒドロゲナーゼはNADH非感受性であり得る。ピルベートデヒドロゲナーゼサブユニットは、クレブシエラ肺炎桿菌(*Klebsiella pneumoniae*)lpdA遺伝子によってコード化することができる。特定の実施態様において、微生物体のピルベートデヒドロゲナーゼサブユニット遺伝子にピルベートホルメトリアーゼプロモーターの制御を受けさせることができる。

【0053】

さらに別の実施態様において、微生物体は、好気性呼吸制御調節系をコードする遺伝子を破壊するように遺伝子改変されている(実施例XV参照)。例えば、破壊は、arcA遺伝子の破壊であり得る。当該生物体は、マレートデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の破壊をさらに含むことができる。さらなる実施態様において、微生物体は、外因性NADH非感受性シトレートシンターゼを発現するように遺伝子改変されている(実施例XV参照)。例えば、NADH非感受性シトレートシンターゼは、gltAのR163L突然変異体などのgltAによってコードすることができる。さらに別の実施態様において、微生物体は、外因性ホスホエノールピルベートカルボキシキナーゼを発現するように遺伝子改変されている(実施例XVI参照)。例えば、ホスホエノールピルベートカルボキシキナーゼは、ヘモフィルス・インフルエンザホスホエノールピルベートカルボキシキナーゼ遺伝子によってコードすることができる。

【0054】

本明細書に開示されているいくつかの遺伝子改変のいずれかを単独で、又は本明細書に開示されている遺伝子改変の1つ以上との様々な組み合わせで使用して、BDO生成微生物体におけるBDOの生成を増大させることができることが理解される。特定の実施態様において、微生物体は、BDOの生成の増大をもたらすあらゆる遺伝子改変を含むように遺伝子改変することができる。特定の実施態様において、BDO経路を含む微生物体は、外因性スクシニル-CoAシンテターゼを発現し;外因性アルファ-ケトグルタレートデカルボキシラーゼを発現し;外因性スクシニルセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ及び4-ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼ並びに場合により4-ヒドロキシブチリル-CoA/アセチル-CoAトランスフェラーゼを発現し;外因性ブチレートキナーゼ及びホスホトランスブチリラーゼを発現し;外因性4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼを発現し;外因性4-ヒドロキシブタナールレダクターゼを発現し;外因性ピルベートデヒドロゲナーゼを発現し;好気性呼吸制御調節系をコードする遺伝子を破壊し;外因性NADH非感受性シトレートシンターゼを発現し;外因性ホスホエノールピルベートカルボキシキナーゼを発現するように遺伝子改変することができる。生成の向上のための当該菌株は、実施例XII~XIXに記載されている。したがって、上記改変に加えて、当該菌株は、本明細書に開示されている他の改変をさらに含む得ることが理解される。当該改変としては、内因性ラクテートデヒドロゲナーゼ(ldhA)、アルコールデヒドロゲナーゼ(adhE)及び/又はピルベートホルメトリアーゼ(pflB)の欠失が挙げられるが、それらに限定されない(実施例XII~XIX及び表28参照)。

【0055】

また、外因的に発現される酵素をコードする1つ以上の遺伝子が宿主生物体のfimD座に組み込まれている微生物体が提供される(実施例XVII参照)。例えば、BDO経路酵素をコードする1つ以上の遺伝子を、BDOの生成の増大のためにfimD座に組み込むことができる。さらに、BDOの生成を増大させる非ホスホトランスフェラーゼスクロース取込み系を発現する微生物体が提供される。

【0056】

本明細書に開示されている遺伝子改変微生物体は、特定のBDO経路酵素を含む微生物体で例示されるが、当該改変を、遺伝子改変の存在下での生成の増強に好適なBDO経路を有する任意の微生物体に導入できることが理解される。したがって、本発明の微生物体は、本明細書開示されているBDO経路のいずれかを有することができる。例えば、BDO経路は、4-ヒドロキシブタノエートデヒドロゲナーゼ、スクシニル-CoAシンテターゼ、CoA-依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、4-ヒドロキシブチレート:CoAトランスフェラーゼ、4-ブチレートキナーゼ、ホスホトランスブチリラーゼ、アルファ-ケトグルタレートデカルボキシラーゼ、アルデヒドデヒドロゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ又はアルデヒド/アルコールデヒドロゲナーゼを含むことができる(図1参照)。代替的に、BDO経路は、4-アミノブチレートCoAトランスフェラーゼ、4-アミノブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-アミノブチレート-CoAリガーゼ、4-アミノブチリル-CoAオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、4-アミノブチリル-CoAトランスアミナーゼ又は4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ(表17参照)。当該BDO経路は、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含むことができる。

【0057】

また、BDO経路は、4-アミノブチレートCoAトランスフェラーゼ、4-アミノブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-アミノブチレート-CoAリガーゼ、4-アミノブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-アミノブチリル-CoAレダクターゼ、4-アミノブタン-1-オールデヒドロゲナーゼ、4-アミノブタン-1-オールオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は4-アミノブタン-1-オールトランスアミナーゼを含むことができる(表18参照)。また、BDO経路は、4-アミノブチレートキナーゼ、4-アミノブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)、4-アミノブタン-1-オールデヒドロゲナーゼ、4-アミノブタン-1-オールオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、4-アミノブタン-1-オールトランスアミナーゼ、[(4-アミノブタノリル)オキシ]リン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、[(4-アミノブタノリル)オキシ]リン酸トランスアミナーゼ、4-ヒドロキシブチリル-ホスフェートデヒドロゲナーゼ又は4-ヒドロキシブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)を含むことができる(表19参照)。当該経路は、1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含むことができる。

【0058】

BDO経路は、アルファ-ケトグルタレート5-キナーゼ、2,5-ジオキソペンタン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)、2,5-ジオキソペンタン酸レダクターゼ、アルファ-ケトグルタレートCoAトランスフェラーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAヒドロラーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAリガーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAレダクターゼ、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ又は5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱カルボキシル化)を含むこともできる(表20参照)。当該BDO経路は、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含むことができる。また、BDO経路は、グルタメートCoAトランスフェラーゼ、グルタミル-CoAヒドロラーゼ、グルタミル-CoAリガーゼ、グルタメート5-キナーゼ、グルタメート-5-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)、グルタミル-CoAレダクターゼ、グルタメート-5-セミアルデヒドレダクターゼ、グルタミル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、2-アミノ-5

10

20

30

40

50

-ヒドロキシペンタン酸トランスアミナーゼ、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱カルボキシル化)を含むことができる(表21参照)。当該BDO経路は、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含むことができる。

【0059】

また、BDO経路は、3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ、3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼ、ビニルアセチル-CoA Δ -イソメラーゼ又は4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼを含むことができる(表22参照)。また、BDO経路は、ホモセリンデアミナーゼ、ホモセリンCoAトランスフェラーゼ、ホモセリンCoAヒドロラーゼ、ホモセリンCoAリガーゼ、ホモセリンCoAデアミナーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAリガーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エノエートレダクターゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ又は4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAレダクターゼを含むことができる(表23参照)。当該BDO経路は、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含むことができる。

【0060】

BDO経路は、スクシニル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ又は4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ(リン酸化)をさらに含むことができる(表15参照)。当該経路は、スクシニル-CoAレダクターゼ、4-ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシブチレートキナーゼ、ホスホトランス-4-ヒドロキシブチリラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含むことができる。また、BDO経路は、グルタメートデヒドロゲナーゼ、4-アミノブチレートオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、4-アミノブチレートトランスアミナーゼ、グルタメートデカルボキシラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ又は4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ(リン酸化)を含むことができる(表16参照)。当該BDO経路は、アルファ-ケトグルタレートデカルボキシラーゼ、4-ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシブチレートキナーゼ、ホスホトランス-4-ヒドロキシブチリラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含むことができる。

【0061】

代謝反応、その反応物質又は生成物の一般的言及により、或いは被参照代謝反応、反応物質又は生成物に伴う、又はそれを触媒する酵素をコードする1つ以上の核酸又は遺伝子の具体的言及により本発明を本明細書に記載する。そうでないことが本明細書に明記される場合を除いて、当業者は、反応の言及が、また、反応の反応物質及び生成物の言及を構成することを理解するであろう。同様に、そうでないことが本明細書に明記される場合を除いて、反応物質又は生成物の言及が、また、反応を指し、これらの代謝構成要素のいずれかの言及が、また、被参照反応、反応物質又は生成物を触媒する酵素をコードする1つ以上の遺伝子を指す。同様に、代謝生化学、酵素学及びゲノム解析の周知の分野を考慮すると、本明細書における遺伝子又はコード化核酸の言及は、対応する被コード化酵素及びそれが触媒する反応、並びに該反応の反応物質及び生成物の言及を構成する。

【0062】

本発明の微生物体を使用する生合成様式を介する4-HBの生成は、モノマー4HBを生成することができるため、特に有用である。本発明の非天然微生物並びに4-HB及びBDO系統の化合物のそれらの生合成は、また、4-HB生成物が(1)分泌可能であり、(2)補酵素Aなどの

任意の誘導体化を避けることができ、(3)生合成中の熱力学的変化を回避し、(4)BDOの直接的な生合成を可能にし、(5)酸性pH培地における4-HBの γ -ブチロラクトン(GBL)への自然化学変換を可能にするため、特に有用である。後者の特性は、また、例えば1,4-ブタンジオール及び/又はテトラヒドロフラン(THF)などのBDO系統の化合物の効率的な化学合成又は生合成に特に有用である。

【0063】

微生物体は、一般に、4-HBを合成する能力が欠如しており、したがって、1,4-ブタンジオール系統の化合物の範囲内であることが本明細書に開示されている化合物、又は1,4-ブタンジオール系統の化合物の範囲内であることが当業者に知られる化合物のいずれもが、1,4-ブタンジオール系統の化合物の範囲内にある。さらに、必須の代謝酵素機能のすべてを有する生物体は、記載の酵素及び本明細書に例示される生化学経路から4-HBを生成することが知られていない。むしろ、恐らくは以下にさらに記載されるいくつかの嫌気性微生物を除いては、酵素機能を有する微生物は、4-HBを基質として使用して、例えばスクシネートを生成する。対照的に、本発明の非天然微生物体は、4-HB又はBDOを生成物として生成することができる。上述のように、そのモノマー型における4-HBの生合成は、BDO系統の化合物の化学合成に特に有用であるだけでなく、BDO系統の化合物のさらなる生合成を可能にし、化学合成手順を完全に回避する。

【0064】

4-HB又はBDOを生成することができる本発明の非天然微生物体は、宿主微生物体が、本発明の少なくとも1つの4-HB又はBDO生合成経路の完全な生化学合成のための機能的能力を含むようにすることによって生成される。少なくとも1つの必須の4-HB又はBDO生合成経路を確保することで、4-HB生合成機能が宿主微生物体に付与される。

【0065】

5つの4-HB生合成経路を本明細書に例示し、例示の目的で図1に示す。さらなる4-HB及びBDO経路を図8~13に記載する。1つの4-HB生合成経路は、スクシネート(スクシネート経路)からの4-HBの生合成を含む。この4-HB経路に関係する酵素は、CoA非依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ及び4-ヒドロキシブタノエートデヒドロゲナーゼを含む。この経路において、CoA非依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼは、図1に示される矢印方向に対する逆反応を触媒する。別の4-HB生合成経路は、スクシニル-CoA(スクシニル-CoA経路)を介するスクシネートからの生合成を含む。この4HB経路に関係する酵素は、スクシニル-CoAシンテターゼ、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ及び4-ヒドロキシブタノエートデヒドロゲナーゼを含む。3つの他の4-HB生合成経路は、 α -ケトグルタレート(α -ケトグルタレート経路)からの4-HBの生合成を含む。したがって、第3の4-HB生合成経路は、グルタメート:コハク酸セミアルデヒドトランスアミナーゼ、グルタメートデカルボキシラーゼ及び4-ヒドロキシブタノエートデヒドロゲナーゼを介するコハク酸セミアルデヒドの生合成である。第4の4-HB生合成経路は、 α -ケトグルタレートからの4HBの生合成をも含むが、 α -ケトグルタレートデカルボキシラーゼを利用して、コハク酸セミアルデヒド合成を触媒する。4-ヒドロキシブタノエートデヒドロゲナーゼは、コハク酸セミアルデヒドの4-HBへの変換を触媒する。第5の4-HB生合成経路は、スクシニル-CoAを介する α -ケトグルタレートからの生合成を含み、 α -ケトグルタレートデヒドロゲナーゼを利用して、上記のスクシニル-CoA経路に入り込むスクシニル-CoAを生成する。これらの4-HB生合成経路、それらの基質、反応物質及び生成物のそれぞれを以下の実施例にさらに記載する。本明細書に記載されるように、4-HBを、適切な酵素の封入体によりBDOにさらに生合成変換し、BDOを生成することができる(実施例参照)。したがって、4-HB経路を、4-HBをBDOに変換するための酵素と併用して、BDO経路を生成できることが理解される。

【0066】

1つ以上の4-HB又はBDO生合成経路に関係する酵素の1種以上をコードする発現可能な核酸を導入することによって、本発明の非天然微生物体を生成することができる。生合成のために選択された宿主微生物体に応じて、特定の4-HB又はBDO生合成経路の一部又はすべ

てに対する核酸を発現することができる。例えば、選択された宿主が所望の生合成経路、例えば、スクシネートから4-HBへの経路において1つ以上の酵素を不足する場合は、不足する酵素、例えば、この例ではCoA非依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ及び4-ヒドロキシブタノエートデヒドロゲナーゼの両方が、後の外因性発現のために宿主に導入される。代替的に、選択された宿主がいくつかの経路酵素の外因性発現を示すが、他の酵素を不足する場合は、不足する酵素が4-HB又はBDO生合成を達成するためにコード化核酸が必要になる。例えば、選択された宿主がCoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼを示すが、4-ヒドロキシブタノエートデヒドロゲナーゼを不足する場合は、この酵素が4-HB生合成を達成するためにコード化核酸が必要になる。したがって、外因性酵素又はタンパク質活性を導入して所望の生合成経路を得ることによって、本発明の非天然微生物体を生成することができ、或いは1つ以上の外因性酵素又はタンパク質と一緒に、4-HB又はBDOなどの所望の生成物を生成する1つ以上の外因性酵素又はタンパク質活性を導入することによって所望の生合成経路を得ることができる。

10

【0067】

同様にして、4-HB生合成が、スクシネートからスクシニル-CoA経路(スクシニル-CoA経路)を介して生じるように選択される場合は、酵素スクシニル-CoAシンテターゼ、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ及び/又は4-ヒドロキシブタノエートデヒドロゲナーゼの宿主欠乏に対するコード化核酸が、受容体宿主に外因的に発現されるべきである。 α -ケトグルタレートからコハク酸セミアルデヒド経路(α -ケトグルタレート経路)を介する4-HB生合成の選択は、グルタメート:コハク酸セミアルデヒドトランスアミナーゼ、グルタメートデカルボキシラーゼ及び/又は4-ヒドロキシブタノエートデヒドロゲナーゼ又は α -ケトグルタレートデカルボキシラーゼ及び4-ヒドロキシブタノエートデヒドロゲナーゼについての酵素の1種以上の宿主欠乏に対する外因性発現を利用することができる。当業者は、本明細書に開示されるように、4-HB又はBDOの生成のための経路酵素を容易に決定することができる。

20

【0068】

選択された宿主微生物体の4-HB又はBDO生合成経路構成要素に応じて、本発明の非天然微生物体は、少なくとも1つの外因発現された4-HB又はBDO経路コード化核酸、及び1つ以上の4-HB又はBDO生合成経路のためのすべてのコード化核酸を含むことになる。例えば、4-HB又はBDO生合成を、対応するコード化核酸の外因性発現を介して、経路酵素又はタンパク質が欠乏した宿主に確立することができる。4-HB又はBDO経路のすべての酵素又はタンパク質が欠乏した宿主において、すべての酵素又はタンパク質の外因性発現を含むことができるが、宿主が経路酵素又はタンパク質の少なくとも1つを含む場合でも経路のすべての酵素又はタンパク質を発現できることが理解される。例えば、4-ヒドロキシブタノエートデヒドロゲナーゼコード化核酸の外因性発現を介して、4-ヒドロキシブタノエートデヒドロゲナーゼが欠乏した宿主におけるすべての5つの経路から4-HB生合成を確立することができる。対照的に、CoA非依存性コハク酸デヒドロゲナーゼ、スクシニル-CoAシンテターゼ、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、グルタメート:コハク酸セミアルデヒドトランスアミナーゼ、グルタメートデカルボキシラーゼ、 α -ケトグルタレートデカルボキシラーゼ、 α -ケトグルタレートデヒドロゲナーゼ及び4-ヒドロキシブタノエートデヒドロゲナーゼのすべての8つの酵素の外因性発現を介して、すべての8つの酵素が欠乏した宿主にすべての5つの経路から4-HB生合成を確立することができる。

30

40

【0069】

本明細書に示される教示及び指針を考慮すると、発現可能な形で導入すべきコード化核酸の数は、少なくとも、選択された宿主微生物体の4-HB又はBDO経路欠乏に相応することを当業者は理解するであろう。したがって、本発明の非天然微生物体は、1つ以上の4HB又はBDO生合成経路を構成する、本明細書に開示される酵素をコードする1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ又はすべての核酸を有することができる。いくつかの実施態様において、非天然微生物体は、4-HB又はBDO生合成を促進又は最適化する、或いは他の有用な機能を宿主微生物体に付与する他の遺伝子改変を含むこともできる。1つの当該他の機

50

能は、例えば、スクシネート、スクシニル-CoA、 α -ケトグルタレート、4-アミノブチレート、グルタメート、アセトアセチル-CoA及び/又はホモセリンなどの4-HB経路前駆体の1種以上の合成の増強を含むことができる。

【0070】

一般に、宿主微生物体は、天然生成分子、所望の前駆体の新たな生成、又は宿主微生物体によって自然に生成される前駆体の生成の増大をもたらす操作生成物として、4-HB又はBDO経路の前駆体を生成するように選択される。例えば、スクシニル-CoA、 α -ケトグルタレート、4-アミノブチレート、グルタメート、アセトアセチル-CoA及びホモセリンは、大腸菌などの宿主生物体に自然に生成される。宿主生物体を操作して、本明細書に開示される前駆体の生成を増強することができる。加えて、所望に前駆体を生成するために操作された微生物体を宿主生物体として使用し、さらに操作して、4-HB又はBDO経路の酵素又はタンパク質を発現させることができる。

10

【0071】

いくつかの実施態様において、本発明の非天然微生物体は、4-HB又はBDOを合成する酵素機能を含む宿主から生成される。この特定の実施態様において、4-HB又はBDO経路生成物の合成又は蓄積を増強して、例えば、4-HB又はBDO経路反応を4-HB又はBDOの生成に向けて誘導することが有用であり得る。合成又は蓄積の増強を、例えば、本明細書に開示される4-HB又はBDO経路酵素の1種以上をコードする核酸の過剰発現によって達成することができる。1つ以上の4-HB又はBDO経路酵素の過剰発現は、例えば、1つ以上の内因性遺伝子の外因性発現、或いは1つ以上の非相同性遺伝子の外因性発現を介して起こり得る。したがって、天然生物体を、4-HB又はBDO生合成経路をコードするすべての核酸まで1つ、2つ、3つ、4つ、5つ及び6つ等の核酸の過剰発現を介して、本発明の非天然4-HB又はBDO生成微生物体になるように容易に生成することができる。加えて、4-HB又はBDO生合成経路において酵素の活性を増強させる外因性遺伝子の突然変異によって非天然生物体を生成することができる。

20

【0072】

特に有用な実施態様において、コード化核酸の外因性発現が採用される。外因性発現は、発現及び/又は調節要素を宿主及び用途に合わせて調整して、使用者によって制御される所望の発現レベルを達成する能力を付与する。しかし、例えば、誘導性プロモーター又は他の調節要素と連結されたときに負の調節エフェクターを除外するか、又は遺伝子のプロモーターを誘導することによって、外因性発現を他の実施態様に利用することができる。したがって、天然誘導性プロモーターを有する外因性遺伝子を、適切な誘導剤を供給することによって上方制御することができ、又は外因性遺伝子の調節領域を操作して、誘導性調節要素を組み込むことによって、所望の時間における外因性遺伝子の発現の増強の調節を可能にする。同様に、誘導性プロモーターを、非天然微生物体に導入された外因性遺伝子に対する調節要素として含めることができる(実施例参照)。

30

【0073】

「外因性」は、本明細書に使用されるように、被参照分子又は被参照活性が宿主微生物体に導入されることを意味することを意図する。分子を、例えば、コード化核酸の宿主遺伝子材料への導入、例えば宿主染色体への統合によって、又はプラスミドなどの非染色体遺伝子材料として導入することができる。したがって、該用語は、コード化核酸の発現に関して使用されるときは、コード化核酸の発現可能な形での微生物体への導入を指す。該用語は、生合成活性に関して使用されるときは、宿主参照生物体に導入される活性を指す。源は、例えば、宿主微生物体への導入後に被参照活性を発現する相同性又は非相同性コード化核酸であり得る。したがって、「外因性」という用語は、宿主に存在する被参照分子又は活性を指す。同様に、該用語は、コード化核酸の発現に関して使用されるときは、微生物体内に含まれるコード化核酸の発現を指す。「非相同性」という用語は、被参照種以外の源に由来する分子又は活性を指すのに対して、「相同性」は、宿主微生物体に由来する分子又は活性を指す。よって、本発明のコード化核酸の外因性発現は、非相同性又は相同性コード化核酸のいずれか、又は両方を利用することができる。

40

50

【 0 0 7 4 】

4-HB又はBDO経路酵素のためのコード化核酸の源としては、例えば、被コード化遺伝子生成物が、被参照反応を触媒することが可能であるあらゆる種を挙げることができる。当該種は、古細菌及び真核細菌を含む細菌、並びに酵母、植物、昆虫、動物、及びヒトを含む哺乳類を含む真核生物を含むが、それらに限定されない原核生物体及び真核生物体を含む。当該源の例示的な種としては、例えば、エシェリキア・コリ(*Escherichia coli*)、サッカロミセス・セレビスシアエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、サッカロミセス・クルイベリ(*Saccharomyces kluyveri*)、クロストリジウム・クルイベリ(*Clostridium kluyveri*)、クロストリジウム・アセトブチリウム(*Clostridium acetobutylicum*)、クロストリジウム・ベイジェリンクキー(*Clostridium beijerinckii*)、クロストリジウム・サッカロペルブチルアセトニウム(*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*)、クロストリジウム・ペルFRINGENS(*Clostridium perfringens*)、クロストリジウム・ジフィシレ(*Clostridium difficile*)、クロストリジウム・ボツリヌム(*Clostridium botulinum*)、クロストリジウム・チロブチリウム(*Clostridium tyrobutyricum*)、クロストリジウム・テタノモルフム(*Clostridium tetanomorphum*)、クロストリジウム・テタニ(*Clostridium tetani*)、クロストリジウム・プロピオニウム(*Clostridium propionicum*)、クロストリジウム・アミノブチリウム(*Clostridium aminobutyricum*)、クロストリジウム・スブテルミナレ(*Clostridium subterminale*)、クロストリジウム・スティックランジ(*Clostridium sticklandii*)、ラルストニア・ユートロファ(*Ralstonia eutropha*)、ミコバクテリウム・ボビス(*Mycobacterium bovis*)、ミコバクテリウム・ツベルクローシス(*Mycobacterium tuberculosis*)、ポルフィロモナス・ギンギバリス(*Porphyromonas gingivalis*)、アラビドプシス・タリアナ(*Arabidopsis thaliana*)、テルムス・テルモフィルス(*Thermus thermophilus*)、シュードモナス・アエルギノサ(*Pseudomonas aeruginosa*)、シュードモナス・プチダ(*Pseudomonas putida*)、シュードモナス・スツトゼリ(*Pseudomonas stutzeri*)、シュードモナス・フルオレセンス(*Pseudomonas fluorescens*)を含むシュードモナス(*Pseudomonas*)種、ホモサピエンス(*Homo sapiens*)、オリクトラグス・クニクルス(*Oryctolagus cuniculus*)、ロドバクター・スパエロイデス(*Rhodobacter spaeroides*)、テルモアナエロバクター・ブロッキー(*Thermoanaerobacter brockii*)、メタロスファエラ・セデュラ(*Metallosphaera sedula*)、ロイコノストク・メセンテロイデス(*Leuconostoc mesenteroides*)、クロロフレクスウス・アウランチアクス(*Chloroflexus aurantiacus*)、ロセイフレクスウス・カステンホルジー(*Roseiflexus castenholzii*)、エリトロバクター(*Erythrobacter*)、シモンドシア・キネンシス(*Simmondsia chinensis*)、アシネトバクター・カルコアセトリクス(*Acinetobacter calcoaceticus*)及びアシネトバクター・バイリイ(*Acinetobacter baylyi*)を含むアシネトバクター(*Acinetobacter*)種、ポルフィロモナス・ギンギバリス(*Porphyromonas gingivalis*)、スルホロブス・トコダイ(*Sulfolobus tokodaii*)、スルホロブス・ソルファタリクス(*Sulfolobus solfataricus*)、スルホロブス・アシドカルダリウス(*Sulfolobus acidocaldarius*)、バシルス・スブチリス(*Bacillus subtilis*)、バシルス・セレウス(*Bacillus cereus*)、バシルス・メガテリウム(*Bacillus megaterium*)、バシルス・ブレビス(*Bacillus brevis*)、バシルス・プミルス(*Bacillus pumilus*)、ラツス・ノルベギクス(*Rattus norvegicus*)、クレブシエラ・ニューモニア(*Klebsiella pneumonia*)、クレブシエラ・オキシトカ(*Klebsiella oxytoca*)、ユーグレナ・グラシリス(*Euglena gracilis*)、トレポネマ・デンチコラ(*Treponema denticola*)、ムーレラ・テルモアセチカ(*Moorella thermoacetica*)、テルモトガ・マリチマ(*Thermotoga maritima*)、ハロバクテリウム・サリナルム(*Halobacterium salinarum*)、ゲオバシルス・ステアロテルモフィルス(*Geobacillus stearothermophilus*)、アエロピルム・ペルニクス(*Aeropyrum pernix*)、サス・スクロファ(*Sus scrofa*)、カエノルハブジチス・エレカニス(*Caenorhabditis elegans*)、コリネバクテリウム・グルタミウム(*Corynebacterium glutamicum*)、アシダミノコッカス・フェルメンタンス(*Acidaminococcus fermentans*)、ラクトコッカス・ラクチス(*Lactococcus lactis*)、ラクトバシルス・プランタルム(*Lactobacillus plantarum*)、ストレプトコッカス・テルモフィルス(*Streptococcus thermophilus*)、エンテロバクター・アエロゲネス(*Enterobac*

ter aerogenes)、カンジダ(*Candida*)、アスペルギルス・テレウス(*Aspergillus terreus*)、ペジオコッカス・ペントサセウス(*Pedococcus pentosaceus*)、ジモモナス・モビリス(*Zymomonas mobilis*)、アセトバクター・パステウリアンス(*Acetobacter pasteurians*)、クルイペロマイセス・ラクチス(*Kluyveromyces lactis*)、ユーバクテリウム・バルケリ(*Eubacterium barkeri*)、バクテロイデス・カピロサス(*Bacteroides capillosus*)、アナエロツルンカス・コリホミニス(*Anaerotruncus colihominis*)、ナトラナエロビウス・テルモフィルスム(*Natranaerobius thermophilus*)、カンピロバクター・ジェジュニ(*Campylobacter jejuni*)、ハエモフィルス・インフルエンザエ(*Haemophilus influenzae*)、セラチア・マルセセンス(*Serratia marcescens*)、シトロバクター・アマロナチクス(*Citrobacter amalonaticus*)、ミクシコッカス・キサントス(*Myxococcus xanthus*)、フソバクテリウム・ヌレアツム(*Fusobacterium nucleatum*)、ペニシルム・クリソゲナム(*Penicillium chrysogenum*) マリンガンマプロテオバクテリア、ブチレート生成バクテリア、及び本明細書に開示されている他のバクテリア(実施例参照)を含む。例えば、4-HB又はBDO生合成生成を有する微生物体を、大腸菌及び酵母宿主に関して本明細書に例示する。しかし、今では、395種の微生物ゲノム並びに様々な酵母、真菌、植物及び哺乳類ゲノムを含む550を超える種について完全ゲノム配列が利用可能である(これらの半数超がNCBIなどの公的なデータベースで利用可能である)ため、例えば、既知の遺伝子の相同体、オルソログ、パラログ及び非オルソログ遺伝子置換、並びに生物体間の遺伝子変性の交換を含む、関連又は遠縁種における1つ以上の遺伝子のための必須4-HB又はBDO生合成活性をコードする遺伝子の特定は、当該技術分野において慣例且つ既知である。よって、4-HB又はBDO、及び大腸菌又は酵母などの特定の生物体に関して本明細書に記載されている本発明の他の化合物の生合成を可能にする代謝変性を、原核生物体及び真核生物体を含む他の微生物に容易に適用することができる。本明細書に示される教示及び指針を考慮すると、当業者は、1つの生物において例示される代謝変性を他の生物にも等しく適用できることを把握するであろう。

【0075】

4-HB又はBDO生合成経路が非関連種に存在する場合など、場合によっては、例えば、被参照反応に取って代わる類似するが、非特定の代謝反応を触媒する非関連種からの1つ以上のパラログの外因性発現によって、4-HB又はBDO生合成を宿主種に付与することができる。異なる生物体の間に、代謝ネットワーク間の一定の差異が存在するため、当業者は、異なる生物体の間の実際の遺伝子使用が異なり得ることを理解するであろう。しかし、本明細書に示される教示及び指針を考慮すると、当業者は、モノマー4-HBなどの4-HB又はBDOを合成する対象の種に微生物体を構成するために、本明細書に例示するものに対する同族代謝変性を使用して、本発明の教示及び方法をすべての微生物体に適用することも理解するであろう。

【0076】

例えば、細菌、酵母、真菌、又は発酵処理に適用可能な様々な他の微生物のいずれかから、宿主微生物体を選択し、非天然微生物体をそれらに生成することができる。例示的な細菌としては、エシェリキア・コリ、クレブシエラ・オキシトカ(*Klebsiella oxytoca*)、アナエロビオスピリillum・スクシニシプロデュセンス(*Anaerobiospirillum succiniciproducens*)、アクチノバシルス・スクシノゲネス(*Actinobacillus succinogenes*)、マンヘイミア・スクシニシプロデュセンス(*Mannheimia succiniciproducens*)、リゾビウム・エトリ(*Rhizobium etli*)、バシルス・スブトリリス(*Bacillus subtilis*)、コリネバクテリウム・グルタミクム(*Corynebacterium glutamicum*)、グルコノバクター・オキシダンス(*Gluconobacter oxydans*)、ジモモナス・モビリス(*Zymomonas mobilis*)、ラクトコッカス・ラクチス(*Lactococcus lactis*)、ラクトバシルス・プランタルム(*Lactobacillus plantarum*)、ストレプトマイセス・コエリコロル(*Streptomyces coelicolor*)、クロストリジウム・アセトブチリクム(*Clostridium acetobutylicum*)、シュードモナス・フルオレセンス(*Pseudomonas fluorescens*)及びシュードモナス・プチダ(*Pseudomonas putida*)から選択される種が挙げられる。例示的な酵母又は真菌としては、サッカロマイセス・セレビシアエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、スキゾサッカロマイセス・ボンベ(*Schizosaccharomyces pom*

be)、クルイベロマイセス・ラクチス(*Kluyveromyces lactis*)、クルイベロマイセス・マルキシアニス(*Kluyveromyces marxianus*)、アスペルギルス・テレウス(*Aspergillus terreus*)、アスペルギルス・ニゲル(*Aspergillus niger*)及びピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)から選択される種が挙げられる。大腸菌は、遺伝子工学に好適な十分に特徴づけられた微生物体であるため、特に有用な宿主生物体である。他の特に有用な宿主生物体としては、サッカロマイセス・セレビシアエ(*Saccharomyces cerevisiae*)などの酵母が挙げられる。

【0077】

非天然4-HB又はBDO生成宿主の発現レベルを構成及び試験するための方法を、例えば、当該技術分野で周知の組換え及び検出方法によって実施することができる。当該方法を、例えば、Sambrookら、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York(2001);Ausubelら、*Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, MD(1999)に見い出すことができる。4-HB及びGBLを、例えば、Spherisorb 5 ODS1カラム並びに70%の10mMリン酸緩衝液(pH=7)及び30%メタノールの移動相を使用するHPLCによって分離し、215nmでUV検出器を使用して検出することができる(Hennessyら、2004, *J. Forensic Sci.* 46(6):1-9)。BDOは、ガスクロマトグラフィーによって、又はAminex HPX-87Hカラム及び0.5mM硫酸の移動相を使用するHPLC及び屈折率検出器によって検出される(Gonzalez-Pajueloら、*Met. Eng.* 7:329-336(2005))。

【0078】

4-HB又はBDOの生成のための経路に関係する外因性核酸配列を、接合、電気穿孔、化学変換、形質導入、形質移入及び超音波変換を含むが、それらに限定されない、当該技術分野で周知の技術を用いて安定的又は一過的に宿主細胞に導入することができる。大腸菌又は他の原核細胞における外因性発現では、真核性核酸の遺伝子又はcDNAにおけるいくつかの核酸配列は、望まれる場合は原核宿主細胞への導入前に除去することができるN末端ミトコンドリア又は他のターゲッティングシグナルなどのターゲッティングシグナルをコードすることができる。例えば、ミトコンドリアリーダー配列を除去すると、大腸菌における発現が増強される(Hoffmeisterら、*J. Biol. Chem.* 280:4329-4338(2005))。酵母又は他の真核細胞における外因性発現では、遺伝子を、リーダー配列を加えることなくサイトソルに発現することができ、又はミトコンドリア若しくは他の細胞期間に導くことができ、或いは宿主細胞に好適なミトコンドリアターゲッティング若しくは分泌シグナルなどの好適なターゲッティング配列を加えることによって分泌に導くことができる。したがって、ターゲッティング配列を除去又は包含するための核酸配列に対する適切な修飾を外因性核酸配列に組み込んで、所望の特性を付与することができることが理解される。また、当該技術分野で周知の技術を用いて遺伝子をコドン最適化して、タンパク質の最適化発現を達成することができる。

【0079】

宿主生物体において機能的な発現制御配列に機能的に結合された、本明細書に例示される1つ以上の4-HB生合成経路及び/又は1つ以上のBDO生合成コード化核酸を含むように1つ以上の発現ベクターを構成することができる。本発明の微生物宿主生物体における使用に適用可能な発現ベクターは、例えば、宿主染色体への安定な統合のために機能するベクター及び選択配列又はマーカーを含むプラスミド、ファージベクター、ウイルスベクター、エピソーム及び人工染色体を含む。また、発現ベクターは、1つ以上の選択可能なマーカー遺伝子及び適切な発言制御配列を含むことができる。例えば、抗生物質又は毒素に対する抵抗性を提供し、又は栄養要求欠乏を補完し、又は培地に存在しない重要栄養物を供給する選択可能遺伝子を含むこともできる。発現制御配列は、当該技術分野で周知である構成的及び誘導性プロモーター、転写エンハンサー及び転写ターミネーターを含むことができる。2つ以上の外因性コード化核酸が同時発現されるときは、両核酸を単一の発現ベクター又は個別の発現ベクターに挿入することができる。単一のベクター発現では、コード化核酸を1つの共通の発現制御配列に操作的に結合させるか、又は1つの誘導性プロモータ

ー及び1つの構成的プロモーターなどの異なる発現制御配列に結合させることができる。代謝又は合成経路に関係する外因性核酸配列の変換を、当該技術分野で周知の方法を使用して確認することができる。当該方法は、例えば、ノーザンブロット又はmRNAのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅などの核酸分析、或いは遺伝子生成物の発現のための免疫ブロッキング、或いは導入された核酸配列又はその対応する遺伝子生成物の発現を試験するための他の好適な分析法を含む。外因性核酸が、所望の生成物を生成するのに十分な量で発現されることが理解され、当該技術分野で周知の方法及び本明細書に開示される方法を使用して、発現レベルを最適化して十分な発現を得ることができることがさらに理解される。

【0080】

本発明の非天然微生物体は、モノマー4-HBなどの4-HB又はBDOを生成するのに十分な4-HB又はBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの核酸を外因的に発現するために、本明細書に例示される、当該技術分野で周知の方法を使用して構成される。本発明の微生物体は、4-HB又はBDOを生成するのに十分な条件下で培養されることが理解される。各経路における4-HB酵素についての例示的な発現のレベルを以下の実施例にさらに記載する。本明細書に示される教示及び指針に従って、本発明の非天然微生物体は、モノマー4-HBなどの4-HB又はBDOの生合成を達成して、約0.1~200mM以上、例えば0.1~25mM以上の細胞内濃度を得ることができる。一般に、モノマー4-HBなどの4-HB又はBDOの細胞内濃度は、約10mM、20mM、50mM又は80mM以上を含めて、約3~150mM以上、特に約5~125mM以上、特に約8~100mM以上、例えば約3~20mM、特に約5~15mM以上、特に約8~12mMである。これらの例示的な範囲の各々の間及びそれを超える範囲の細胞内濃度を、本発明の非天然微生物体から達成することができる。特定の実施態様において、本発明の微生物体、特に本明細書に開示されているものなどの菌株(例えば、実施例XII~XIX及び表28参照)は、BDOの生成を増大させ、且つ/又は望ましくない副産物を減少させることによってBDOなどの所望の生成物の生成の向上をもたらすことができる。当該生成量としては、本明細書に開示されている量、及び約1グラムから約25グラム毎リットル、例えば、約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24グラム毎リットル又はさらにそれを超える量を含む量が挙げられるが、それらに限定されない。

【0081】

いくつかの実施態様において、培養条件としては、嫌気性又は実質的に嫌気性成長又は維持条件を含む。例示的な嫌気性条件は、既に記載されており、当該技術分野で周知である。発酵処理の例示的な嫌気性条件は、本明細書に記載されており、例えば、2007年8月10日に出版された米国特許出願第11/891,602号に記載されている。これらの条件のいずれかを、非天然微生物体並びに当該技術分野で周知の他の嫌気性条件とともに採用することができる。当該嫌気性条件下において、4-HB又はBDO生産体は、5~10mM以上の細胞内濃度、並びに本明細書に例示されるすべての他の濃度で4-HB又はBDOを合成することができる。上記記載は細胞内濃度を指すが、4-HB又はBDO生成微生物体は、4-HB又はBDOを細胞内で生成し、且つ/又は生成物を培地に分泌することができる。

【0082】

培養条件は、例えば、液体培養手順、並びに発酵及び他の大規模培養手順を含むことができる。本明細書に記載されるように、本発明の生合成生成物の特に有用な収率を、嫌気性又は実質的に嫌気性培養条件下で得ることができる。

【0083】

本明細書に記載されるように、4-HB又はBDOの生合成を達成するための1つの例示的な成長条件は、嫌気性培養又は発酵条件を含む。一部の実施態様において、本発明の非天然微生物体を、嫌気性又は実質的に嫌気性条件下で維持、培養又は発酵することができる。手短に述べると、嫌気性条件は、酸素が欠乏した環境を指す。実質的に嫌気性条件は、例えば、培地における溶存酸素濃度が飽和の0から10%に維持される培養、バッチ式発酵又は連続発酵を含む。実質的に嫌気性条件は、1%未満の酸素の雰囲気中で維持された密閉チャンバーの内部の液体培地中又は固体寒天上で成長又は休止細胞をも含む。例えば、培養物に

N₂/CO₂混合物又は他の好適な1つ以上の無酸素ガスを散布することによって、酸素の百分率を維持することができる。

【0084】

本発明は、また、4-ヒドロキシブタノエートデヒドロゲナーゼ、CoA非依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、スクシニル-CoAシンテターゼ、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、4-ヒドロキシブチレート:CoAトランスフェラーゼ、グルタメート:コハク酸セミアルデヒドトランスアミラーゼ、グルタメートデカルボキシラーゼ、CoA非依存性アルデヒドデヒドロゲナーゼ、CoA依存性アルデヒドデヒドロゲナーゼ又はアルコールデヒドロゲナーゼをコードする少なくとも1つの外因性核酸を含む4-ヒドロキシブタン酸(4-HB)及び1,4-ブタンジオール(BDO)生合成経路を有する微生物体を含む非天然微生物生触媒であって、該外因性核酸が、1,4-ブタンジオール(BDO)を生成するのに十分な量で発現される非天然微生物生触媒を提供する。4-ヒドロキシブチレート:CoAトランスフェラーゼは、4-ヒドロキシブチリルCoA:アセチル-CoAトランスフェラーゼとしても知られる。さらなる4-HB又はBDO経路酵素も本明細書に開示される(実施例及び図8~13参照)。

10

【0085】

本発明は、4-ヒドロキシブタン酸(4-HB)及び1,4-ブタンジオール(BDO)生合成経路を有する微生物体を含む非天然微生物生触媒であって、該経路が、4-ヒドロキシブタノエートデヒドロゲナーゼ、スクシニル-CoAシンテターゼ、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、4-ヒドロキシブチレート:CoAトランスフェラーゼ、4-ブチレートキナーゼ、ホスホトランスブチリラーゼ、 α -ケトグルタレートデカルボキシラーゼ、アルデヒドデヒドロゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ又はアルデヒド/アルコールデヒドロゲナーゼを含み、該外因性核酸が、1,4-ブタンジオール(BDO)を生成するのに十分な量で発現される非天然微生物生触媒を提供する。

20

【0086】

BDOを生合成する非天然微生物体を生成することもできる。本発明の4-HB生成微生物体のように、BDO生成微生物体は、BDOを細胞内生成するか、又は培地中に分泌することができる。4-HBを合成する微生物体の構成について既に示されている教示及び指針に従って、さらなるBDO経路を4-HB生成微生物体に組み込んで、BDO及び他のBDO系統の化合物を合成する生物体を生成することができる。BDOの化学合成及びその下流生成物は既知である。BDO生合成が可能な本発明の非天然微生物体は、図1に例示される入口点として4-HBを使用して、これらの化学合成を回避する。以下にさらに記載するように、4-HB生産体を使用して、例えば、4-HBをGBLに変換し、次いでBDOをTHFに変換することができる。代替的に、4-HB生産体を、4-HB及び/又はGBLのBDOへの変換のための生合成機能を含むようにさらに修飾することができる。

30

【0087】

4-HB生産体に導入するさらなるBDO経路は、例えば、宿主欠乏背景における外因性発現、或いは工程9~13として図1に例示される酵素の1種以上の過剰発現を含む。1つの当該経路は、例えば、アルデヒド及びアルコールデヒドロゲナーゼが、個別の酵素、又はアルデヒド及びアルコールデヒドロゲナーゼ活性の両方を有する多機能性酵素であり得る、図1に工程9、12及び13として示される反応を実施するのに必要である酵素活性を含む。別の当該経路は、例えば、ここでもアルデヒド及びアルコールデヒドロゲナーゼが、個別の酵素、又はアルデヒド及びアルコールデヒドロゲナーゼ活性の両方を有する多機能性酵素であり得る、図1に工程10、11、12及び13として示される反応を実施するのに必要である酵素活性を含む。よって、4-HB生産体に導入するさらなるBDO経路は、例えば、宿主欠乏背景における外因性発現、又は4-ヒドロキシブチレート:CoAトランスフェラーゼ、ブチレートキナーゼ、ホスホトランスブチリラーゼ、CoA依存性アルデヒドデヒドロゲナーゼ、CoA依存性アルデヒドデヒドロゲナーゼ又はアルコールデヒドロゲナーゼの1つ以上の過剰発現を含む。4-HBを修飾することが可能な外因性アシルCoAシンテターゼの不在下で、非天然BDO生成微生物体は、4-HBに対して選択的な外因性アシル-CoAシンテターゼ、又は4-HB

40

50

の4-HB-CoAへの正味反応変換を有する複数の酵素の組合せをさらに含むことができる。以下の実施例にさらに例示されるように、ブチレートキナーゼ及びホスホトランスブチリラーゼは、BDO経路活性を示し、4-HB基質を用いて図1に例示される変換を触媒する。したがって、これらの酵素は、本明細書では、それぞれ4-ヒドロキシブチレートキナーゼ及びホスホトランスヒドロキシブチリラーゼと称することもできる。

【0088】

4-HBからBDOへのこれらのインビボ変換に使用できる例示的なアルコール及びアルデヒドデヒドロゲナーゼを以下の表1に示す。

【表 1】

表1. 4-HBのBD0への変換のための
アルコール及びアルデヒドデヒドロゲナーゼ

アルコールデヒドロゲナーゼ

ec:1.1.1.1	アルコールデヒドロゲナーゼ	ec:1.1.1.78	メチルグリオキサールレダクターゼ	
ec:1.1.1.2	アルコールデヒドロゲナーゼ(NADP+)	(NADH-依存性)		
ec:1.1.1.4	(R,R)-ブタンジオールデヒドロゲナーゼ	ec:1.1.1.79	グリオキシル酸レダクターゼ(NADP+)	
ec:1.1.1.5	アセトインデヒドロゲナーゼ	ec:1.1.1.80	イソプロパノールデヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.6	グリセロールデヒドロゲナーゼ	(NADP+)		
ec:1.1.1.7	プロパンジオールリン酸	ec:1.1.1.81	ヒドロキシビルビン酸レダクターゼ	
デヒドロゲナーゼ		ec:1.1.1.82	リンゴ酸デヒドロゲナーゼ(NADP+)	
ec:1.1.1.8	グリセロール-3-リン酸	ec:1.1.1.83	D-リンゴ酸デヒドロゲナーゼ	
デヒドロゲナーゼ(NAD+)		(脱炭酸化)		
ec:1.1.1.11	D-アラビニトール4-デヒドロゲナーゼ	ec:1.1.1.84	ジメチルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ	10
ec:1.1.1.12	L-アラビニトール4-デヒドロゲナーゼ	ec:1.1.1.85	3-イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.13	L-アラビニトール2-デヒドロゲナーゼ	ec:1.1.1.86	ケトール酸レダクトイソメラーゼ	
ec:1.1.1.14	D-イジトール2-デヒドロゲナーゼ	ec:1.1.1.87	ホモイソクエン酸デヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.15	D-イジトール2-デヒドロゲナーゼ	ec:1.1.1.88	ヒドロキシメチルグルタリル-CoA	
ec:1.1.1.16	ガラクトール2-デヒドロゲナーゼ	レダクターゼ		
ec:1.1.1.17	マンニトール-1-リン酸5-	ec:1.1.1.90	アリール-アルコールデヒドロゲナーゼ	
デヒドロゲナーゼ		ec:1.1.1.91	アリール-アルコールデヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.18	イノシトール2-デヒドロゲナーゼ	(NADP+)		
ec:1.1.1.21	アルデヒドレダクターゼ	ec:1.1.1.92	オキサログリコール酸レダクターゼ	
ec:1.1.1.23	ヒスチジノールデヒドロゲナーゼ	(脱炭酸化)		
ec:1.1.1.26	グリオキシル酸レダクターゼ	ec:1.1.1.94	グリセロール-3-ホスフェート	
ec:1.1.1.27	L-乳酸デヒドロゲナーゼ	デヒドロゲナーゼ[NAD(P)+]		
ec:1.1.1.28	D-乳酸デヒドロゲナーゼ	ec:1.1.1.95	ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.29	グリセリン酸デヒドロゲナーゼ	ec:1.1.1.97	3-ヒドロキシベンジル-アルコール	20
ec:1.1.1.30	3-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ	デヒドロゲナーゼ		
ec:1.1.1.31	3-ヒドロキシイソ酪酸	ec:1.1.1.101	アシルグリセロン-ホスフェートレダクターゼ	
デヒドロゲナーゼ		ec:1.1.1.103	L-トレオニン3-デヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.35	3-ヒドロキシアシル-CoAデヒドロゲナーゼ	ec:1.1.1.104	4-オキソプロリンレダクターゼ	
ec:1.1.1.36	アセトアセチル-CoAレダクターゼ	ec:1.1.1.105	レチノールデヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.37	リンゴ酸デヒドロゲナーゼ	ec:1.1.1.110	インドール乳酸デヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.38	リンゴ酸デヒドロゲナーゼ	ec:1.1.1.112	インダノールデヒドロゲナーゼ	
(オキサロ酢酸-脱炭酸化)		ec:1.1.1.113	L-キシロース1-デヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.39	リンゴ酸デヒドロゲナーゼ	ec:1.1.1.129	L-トレオニン3-デヒドロゲナーゼ	
(脱炭酸化)		ec:1.1.1.137	リビトール-5-ホスフェート2-	
ec:1.1.1.40	リンゴ酸デヒドロゲナーゼ	デヒドロゲナーゼ		
(オキサロ酢酸-脱炭酸化)(NADP+)		ec:1.1.1.138	マンニトール2-デヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.41	イソクエン酸デヒドロゲナーゼ(NAD+)	(NADP+)		
ec:1.1.1.42	イソクエン酸デヒドロゲナーゼ(NADP+)	ec:1.1.1.140	ソルビトール-6-ホスフェート2-	30
ec:1.1.1.54	アリール-アルコールデヒドロゲナーゼ	デヒドロゲナーゼ		
ec:1.1.1.55	ラクタルデヒドレダクターゼ(NADPH)	ec:1.1.1.142	D-ピニトールデヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.56	リビトール2-デヒドロゲナーゼ	ec:1.1.1.143	セクオイトールデヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.59	3-ヒドロキシプロピオン酸	ec:1.1.1.144	ペリリル-アルコールデヒドロゲナーゼ	
デヒドロゲナーゼ		ec:1.1.1.156	グリセロール2-デヒドロゲナーゼ(NADP+)	
ec:1.1.1.60	2-ヒドロキシ-3-オキソプロピオン酸	ec:1.1.1.157	3-ヒドロキシブチリル-CoA	
レダクターゼ		デヒドロゲナーゼ		
ec:1.1.1.61	4-ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ	ec:1.1.1.163	シクロペンタノールデヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.66	オメガ-ヒドロキシデカン酸	ec:1.1.1.164	ヘキサデカノールデヒドロゲナーゼ	
デヒドロゲナーゼ		ec:1.1.1.165	2-アルキン-1-オールデヒドロゲナーゼ	
ec:1.1.1.67	マンニトール2-デヒドロゲナーゼ	ec:1.1.1.166	ヒドロキシシクロヘキサノールカルボン酸	
ec:1.1.1.71	アルコールデヒドロゲナーゼ[NAD(P)+]	デヒドロゲナーゼ		
ec:1.1.1.72	グリセロールデヒドロゲナーゼ(NADP+)	ec:1.1.1.167	ヒドロキシマロン酸デヒドロゲナーゼ	40
ec:1.1.1.73	オクタノールデヒドロゲナーゼ	ec:1.1.1.174	シクロヘキサノール-1,2-ジオール	
ec:1.1.1.75	(R)-アミノプロパノールデヒドロゲナーゼ	デヒドロゲナーゼ		
ec:1.1.1.76	(S,S)-ブタンジオールデヒドロゲナーゼ	ec:1.1.1.177	グリセロール-3-リン酸1-	
ec:1.1.1.77	ラクタルデヒドレダクターゼ	デヒドロゲナーゼ(NADP+)		
		ec:1.1.1.178	3-ヒドロキシ-2-メチルブチリル-CoA	
		デヒドロゲナーゼ		
		ec:1.1.1.185	L-グリコールデヒドロゲナーゼ	
		ec:1.1.1.190	インドール-3-アセトアルデヒド	
		レダクターゼ(NADH)		
		ec:1.1.1.191	インドール-3-アセトアルデヒド	
		レダクターゼ(NADPH)		

ec:1.1.1.192 長鎖アルコールデヒドロゲナーゼ
表1(続き)

ec:1.1.1.194 コニフェリル-アルコールデヒドロゲナーゼ
ec:1.1.1.195 シンナミル-アルコールデヒドロゲナーゼ
ec:1.1.1.198 (+)-ボルネオールデヒドロゲナーゼ
ec:1.1.1.202 1,3-プロパンジオールデヒドロゲナーゼ
ec:1.1.1.207 (-)-メントールデヒドロゲナーゼ
ec:1.1.1.208 (+)-ネオメントールデヒドロゲナーゼ
ec:1.1.1.216 ファルネソールデヒドロゲナーゼ
ec:1.1.1.217 ベンジル-2-メチル-ヒドロキシ酪酸

デヒドロゲナーゼ

ec:1.1.1.222 (R)-4-ヒドロキシフェニル乳酸

デヒドロゲナーゼ

ec:1.1.1.223 イソビペリテノールデヒドロゲナーゼ

ec:1.1.1.226 4-ヒドロキシシクロヘキサノカルボン酸

デヒドロゲナーゼ

ec:1.1.1.229 ジエチル2-メチル-3-オキソコハク酸

レダクターゼ

ec:1.1.1.237 ヒドロキシフェニルピルビン酸レダクターゼ

ec:1.1.1.244 メタノールデヒドロゲナーゼ

ec:1.1.1.245 シクロヘキサノールデヒドロゲナーゼ

ec:1.1.1.250 D-アラビニトール2-デヒドロゲナーゼ

ec:1.1.1.251 ガラクチトール1-ホスフェート5-

デヒドロゲナーゼ

ec:1.1.1.255 マンニトールデヒドロゲナーゼ

ec:1.1.1.256 フロレン-9-オールデヒドロゲナーゼ

ec:1.1.1.257 4-(ヒドロキシメチル)ベンゼンスルホン酸

デヒドロゲナーゼ

ec:1.1.1.258 6-ヒドロキシヘキサノ酸デヒドロゲナーゼ

ec:1.1.1.259 3-ヒドロキシビメロイル-CoA

デヒドロゲナーゼ

ec:1.1.1.261 グリセロール-1-ホスフェート

デヒドロゲナーゼ[NAD(P)+]

ec:1.1.1.265 3-メチルブタナールレダクターゼ

ec:1.1.1.283 メチルグリオキサールレダクターゼ

(NADPH-依存性)

ec:1.1.1.286 イソクエン酸-ホモイソクエン酸

デヒドロゲナーゼ

ec:1.1.1.287 D-アラビニトールデヒドロゲナーゼ

(NADP+)

ブタノールデヒドロゲナーゼ

アルデヒドデヒドロゲナーゼ

ec:1.2.1.2 ギ酸デヒドロゲナーゼ

ec:1.2.1.3 アルデヒドデヒドロゲナーゼ(NAD+)

ec:1.2.1.4 アルデヒドデヒドロゲナーゼ(NADP+)

ec:1.2.1.5 アルデヒドデヒドロゲナーゼ

[NAD(P)+]

ec:1.2.1.7 ベンズアルデヒドデヒドロゲナーゼ

(NADP+)

ec:1.2.1.8 ベタイン-アルデヒドデヒドロゲナーゼ

ec:1.2.1.9 グリセルアルデヒド-3-ホスフェート

デヒドロゲナーゼ(NADP+)

ec:1.2.1.10 アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ

(アセチル化)

ec:1.2.1.11 アスパラギン酸セミアルデヒド

デヒドロゲナーゼ

ec:1.2.1.12 グリセルアルデヒド-3-ホスフェート

デヒドロゲナーゼ(リン酸化)

ec:1.2.1.13 グリセルアルデヒド-3-ホスフェート

デヒドロゲナーゼ(NADP+)(リン酸化)

ec:1.2.1.15 マロン酸セミアルデヒド

デヒドロゲナーゼ

ec:1.2.1.16 コハク酸セミアルデヒド

デヒドロゲナーゼ[NAD(P)+]

ec:1.2.1.17 グリオキシル酸デヒドロゲナーゼ

(アシル化)

ec:1.2.1.18 マロン酸セミアルデヒド

デヒドロゲナーゼ(アセチル化)

ec:1.2.1.19 アミノブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ

ec:1.2.1.20 グルタル酸セミアルデヒド

デヒドロゲナーゼ

ec:1.2.1.21 グリコールアルデヒドデヒドロゲナーゼ

ec:1.2.1.22 ラクトアルデヒドデヒドロゲナーゼ

ec:1.2.1.23 2-オキソアルデヒドデヒドロゲナーゼ

(NAD+)

ec:1.2.1.24 コハク酸セミアルデヒド

デヒドロゲナーゼ

ec:1.2.1.25 2-オキソイソ吉草酸デヒドロゲナーゼ

(アシル化)

ec:1.2.1.26 2,5-ジオキソ吉草酸デヒドロゲナーゼ

ec:1.2.1.27 メチルマロン酸セミアルデヒド

デヒドロゲナーゼ(アシル化)

ec:1.2.1.28 ベンズアルデヒドデヒドロゲナーゼ

(NAD+)

ec:1.2.1.29 アリール-アルデヒドデヒドロゲナーゼ

ec:1.2.1.30 アリール-アルデヒドデヒドロゲナーゼ

(NADP+)

ec:1.2.1.31 L-アミノアジピン酸-セミアルデヒド

デヒドロゲナーゼ

ec:1.2.1.32 アミノムコン酸セミアルデヒド

デヒドロゲナーゼ

ec:1.2.1.36 レチナールデヒドロゲナーゼ

ec:1.2.1.39 フェニルアセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ

ec:1.2.1.41 グルタミン酸-5-セミアルデヒド

デヒドロゲナーゼ

ec:1.2.1.42 ヘキサデカナールデヒドロゲナーゼ

(アシル化)

ec:1.2.1.43 ギ酸デヒドロゲナーゼ(NADP+)

ec:1.2.1.45 4-カルボキシ-2-ヒドロキシムコン酸-6-

セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ

ec:1.2.1.46 ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ

ec:1.2.1.47 4-トリメチルアンモニオブチルアルデヒド

デヒドロゲナーゼ

ec:1.2.1.48 長鎖アルデヒドデヒドロゲナーゼ

ec:1.2.1.49 2-オキソアルデヒドデヒドロゲナーゼ

(NADP+)

ec:1.2.1.51 ピルビン酸デヒドロゲナーゼ(NADP+)

ec:1.2.1.52 オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ

(NADP+)

ec:1.2.1.53 4-ヒドロキシフェニルアセトアルデヒド

デヒドロゲナーゼ

ec:1.2.1.57 ブタナールデヒドロゲナーゼ 表1

(続き)

ec:1.2.1.58 フェニルグリオキシル酸デヒドロゲナーゼ

(アシル化)

ec:1.2.1.59 グリセルアルデヒド-3-ホスフェート

デヒドロゲナーゼ(NAD(P)+)(リン酸化)

ec:1.2.1.62 4-ホルミルベンゼンスルホン酸

デヒドロゲナーゼ

ec:1.2.1.63 6-オキソヘキサノ酸デヒドロゲナーゼ

10

20

30

40

ec:1.2.1.64 4-ヒドロキシベンズアルデヒド
デヒドロゲナーゼ ec:1.2.1.65 サリチルアルデヒド
デヒドロゲナーゼ
ec:1.2.1.66 マイコチオール依存性ホルムアルデヒド
デヒドロゲナーゼ
ec:1.2.1.67 バニリンデヒドロゲナーゼ
ec:1.2.1.68 コニフェリル-アルデヒドデヒドロゲナーゼ
ec:1.2.1.69 フルオロアセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ
ec:1.2.1.71 スクシニルグルタミン酸セミアルデヒド
デヒドロゲナーゼ

【0089】

10

他の例示的な酵素及び経路を本明細書に開示する(実施例参照)。また、基質が天然基質でない反応を実施するために酵素を利用できることが理解される。非天然基質の活性は天然基質より低くてよいが、当該酵素を天然酵素として、又は本明細書に開示されるように指向性進化若しくは順応性進化を使用して修飾された酵素として利用できることが理解される(実施例も参照)。

【0090】

本明細書に開示される経路のいずれかを介するBDO生成は、部分的に、前駆体のBDOへの変換のための適切な酵素の特定に基づく。それらの反応工程のいくつかに対する多くの具体的な酵素が特定された。反応前駆体に特異的な酵素が特定されていない変換では、反応工程を触媒するのに最も適する酵素候補が特定された。酵素は、以下に記載するように、広範な基質に対して作用することが証明されている。加えて、タンパク質操作の分野における進歩は、天然基質でなくても、基質に対して効率的に作用するように酵素を変質することを実現可能にする。BDO経路に好適な多様なクラスの広範な特異性の酵素、並びに酵素を非天然基質に対して作用するように発展させるために使用された方法のいくつかの例を以下に記載する。

20

【0091】

BDO経路における主要なクラスの酵素は、ケトン又はアルデヒドをアルコール(1.1.1)に相互変換するオキシドレダクターゼである。このクラスにおける多くの例示的な酵素は、広範な基質に対して作用することができる。土壌細菌ブレヴィバクテリウム(*Brevibacterium*)属KU 1309(Hiranoら、J. Biosc. Bioeng. 100:318-222(2005))から精製されたアルコールデヒドロゲナーゼ(1.1.1.1)は、高度な活性を有する過剰の脂肪族並びに芳香族アルコールに対して作用することが証明された。表2は、異なるアルコールに対する酵素の活性及びその K_m を示す。酵素は、可逆的であり、いくつかのアルデヒドに対しても高い活性を有する(表3)。

30

【表 2】

表 2. プレバクテリウム種 KU 由来のアルコールデヒドロゲナーゼの、各種アルコールを酸化する相対的活性

基質	相対的活性 (%)	K _m (mM)
2-フェニルエタノール	100*	0.025
(S)-2-フェニルプロパノール	156	0.157
(R)-2-フェニルプロパノール	63	0.020
ベンジルアルコール	199	0.012
3-フェニルプロパノール	135	0.033
エタノール	76	
1-ブタノール	111	
1-オクタノール	101	
1-ドデカノール	68	
1-フェニルエタノール	46	
2-プロパノール	54	

*19.2U/mgに相当する2-フェニルエタノールの活性を100%とした。

【表 3】

表3. プレバクテリウム種KUI309由来のアルコールデヒドロゲナーゼの、各種カルボニル化合物を還元する相対的活性

基質	相対的活性 (%)	K _m (mM)
フェニルアセトアルデヒド	100	0.261
2-フェニルプロピオンアルデヒド	188	0.864
1-オクチルアルデヒド	87	
アセトフェノン	0	

【0092】

ラルストニア・ユーロファ (*Ralstonia eutropha*) からのラクテートデヒドロゲナーゼ (1.1.1.27) は、2-オキソブチレート、2-オキソペンタノエート及び2-オキソグルタレート (2-オキソアジペートに類似のC5化合物) などのいくつかの2-オキソ酸に対して高い活性を有する (Steinbuchel 及び Schlegel, Eur. J. Biochem. 130:329-334(1983))。表4の第2欄は、異なる基質に対するR.ユーロファ (以前にはA.ユーロファ) のldhAの活性を示す (Steinbuchel 及び Schlegel、前出、1983)。

【表 4】

表4 ピルビン酸と比較した様々な基質における*R.ユートロファ* *ldhA*(Steinbuechel
及びSchlegel, supra, 1983)のインビトロ活性

基質	A.ユートロファス 由来の L(+)-乳酸 デヒドロゲナーゼ	ウサギ筋肉 由来の L(+)-乳酸 デヒドロゲナーゼ	L.レイクマニ 由来の D(-)-乳酸 デヒドロゲナーゼ
グリオキシル酸	8.7	23.9	5.0
ピルビン酸	100.0	100.0	100.0
2-オキソ酪酸	107.0	18.6	1.1
2-オキソ吉草酸	125.0	0.7	0.0
3-メチル-2- オキソ酪酸	28.5	0.0	0.0
3-メチル-2- オキソ吉草酸	5.3	0.0	0.0
4-メチル-2- オキソペンタン酸	39.0	1.4	1.1
オキサロ酢酸	0.0	33.1	23.1
2-オキソグルタル酸	79.6	0.0	0.0
3-フルオロピルビン酸	33.6	74.3	40.0

【0093】

2-オキソ酸をそれらのアシルCoA対応物(1.2.1)に変換できるオキシドレダクターゼも複数の基質を許容することが証明された。例えば、2-オキソイソバレレートデヒドロゲナーゼ(1.2.1.25)としても知られる分枝鎖2-ケト酸デヒドロゲナーゼ複合体(BCKAD)は、分枝鎖アミノ酸分解経路に参加して、バリン、ロイシン及びイソロイシンの2-ケト酸誘導体をそれらのアシル-CoA誘導体及びCO₂に変換する。ラッタス・ノルベギクス(*Rattus norvegicus*)(Paxtonら、*Biochem. J.* 234:295-303(1986))及びサッカロマイセス・セレビシアエ(*Saccharomyces cerevisiae*)(Sinclairら、*Biochem. Mol Biol. Int.* 32:911-922(1993))を含むいくつかの生物において、この複合体は、分枝鎖アミノ酸前駆体に加えて、2-オキソブタノエート及びアルファ-ケトグルタレートなどの直鎖状オキソ酸を含む広い基質範囲を有することが証明された。

【0094】

別のクラスの酵素、即ちアミノトランスフェラーゼ(2.6.1)の構成要素は、複数の基質に対して作用することが報告された。大腸菌に発現されるピロコッカス・フルシオウス(*Pyrococcus fursiosus*)のアスパルテートアミノトランスフェラーゼ(aspAT)が特定され、組換えタンパク質は、酵素がアスパルテート及びアルファ-ケトグルタレートに対して最も高い活性を有し、アラニン、グルタメート及び芳香族アミノ酸に対してより低いながらも有意な活性を有することを証明するように特徴づけられた(Wardら、*Archaea* 133-141(2002))。別の場合において、レイシュマニア・メキシカナ(*Leishmania mexicana*)から特定され、大腸菌に発現されるアミノトランスフェラーゼ(Vernalら、*FEMS Microbiol. Lett.* 229:217-222(2003))は、それぞれチロシン(チロシンに対して100%と考えられる活性)、フェニルアラニン(90%)、トリプトファン(85%)、アスパルテート(30%)、ロイシン(25%)及びメチオニン(25%)に対して広い基質特異性を有することが報告された(Vernalら、*Mol. Biochem. Parasitol* 96:83-92(1998))。同様の広い特異性が、トリパノソマ・クルジ(*Trypanosoma cruzi*)からのチロシン・アミノトランスフェラーゼについて報告されているが、これらの酵素は、いずれも配列相同性が6%にすぎない。後者の酵素は、効率的なアミノ供与体として、ロイシン、メチオニン、並びにチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン及びアラニンを許容することができる(Nowickiら、*Biochem. Biophys. Acta* 1546: 268-2

81(2001))。

【0095】

CoAトランスフェラーゼ(2.8.3)は、1つを超える基質に対して作用する能力を有することが証明された。具体的には、CoAトランスフェラーゼは、クロストリジウム・アセトブチリウム(*Clostridium acetobutylicum*)から精製され、アセテート、プロピオネート及びブチレートに対して最も高い活性を有することが報告された。それは、バレレート、イソブチレート及びクロトネートに対しても有意な活性を有していた(Wiesenbornら、*Appl. Environ. Microbiol.* 55:323-329(1989))。別の研究において、アセテート-CoAトランスフェラーゼ(EC2.8.3.8)としても知られる大腸菌アシル-CoA:アセテート-CoAトランスフェラーゼは、イソブチレート(Matthies及びSchink、*App. Environm. Microbiol.* 58:1435-1439(1992))、バレレート(Vanderwinkelら、*Biochem. Biophys. Res Commun.* 33:902-908(1968b)、及びブタノエート(Vanderwinkelら、*Biochem. Biophys. Res Commun.* 33:902-908(1968a))を含む様々な分枝状及び直鎖状アシル-CoA基質からCoA部分をアセテートに転移することが証明された。

10

【0096】

他の酵素クラスは、酵素に対する広い基質特異性をさらに支持する。いくつかのイソメラーゼ(5.3.3)も複数の基質に対して作用することが証明された。シュードモナス・ツツェリ(*Pseudomonas stutzeri*)のL-ラムノースイソメラーゼは、様々なアルデヒド及びケトンの間の異性を触媒する(Yoshidaら、*J. Mol. Biol.* 365:1505-1516(2007))。これらは、L-ラムノースとL-ラムヌロース、L-マンノースとL-フルクトース、L-キシロースとL-キシルロース、D-リボースとD-リブロース及びD-アロースとD-ブシコースの間の異性を含む。

20

【0097】

さらに別のクラスの酵素において、ホスホトランスフェラーゼ(2.7.1)、L-ホモセリンをリン酸L-ホモセリンに変換する大腸菌のホモセリンキナーゼ(2.7.1.39)は、多くのホモセリン類似体をリン酸化することが判明した。これらの基質において、R位のカルボキシル官能基が、エステル又はヒドロキシメチル基によって置き換えられた(Huo及びViola、*Biochemistry* 35:16180-16185(1996))。表5は、このキナーゼに対する広い基質特異性を実証する。

【表 5】

表5. ホモセリンキナーゼの基質特異性

基質	k_{cat}	% k_{cat}	K_m (mM)	k_{cat}/K_m
L-ホモセリン	18.3 ± 0.1	100	0.14 ± 0.04	184 ± 17
D-ホモセリン	8.3 ± 1.1	32	31.8 ± 7.2	0.26 ± 0.03
L-アスパラギン酸 β -セミアルデヒド	2.1 ± 0.1	8.2	0.28 ± 0.02	7.5 ± 0.3
L-2-アミノ-1,4- ブタンジオール	2.0 ± 0.5	7.9	11.6 ± 6.5	0.17 ± 0.06
L-2-アミノ-5- ヒドロキシ吉草酸	2.5 ± 0.4	9.9	1.1 ± 0.5	2.3 ± 0.3
L-ホモセリン メチルエステル	14.7 ± 2.6	80	4.9 ± 2.0	3.0 ± 0.6
L-ホモセリン エチルエステル	13.6 ± 0.8	74	1.9 ± 0.5	7.2 ± 1.7
L-ホモセリン イソプロピルエステル	13.6 ± 1.4	74	1.2 ± 0.5	11.3 ± 1.1
L-ホモセリン <i>n</i> - プロピルエステル	14.0 ± 0.4	76	3.5 ± 0.4	4.0 ± 1.2
L-ホモセリン イソブチルエステル	16.4 ± 0.8	84	6.9 ± 1.1	2.4 ± 0.3
L-ホモセリン <i>n</i> -ブチル エステル	29.1 ± 1.2	160	5.8 ± 0.8	5.0 ± 0.5

【0098】

BDO経路に有用な別のクラスの酵素は、酸-チオールリガーゼ(6.2.1)である。他のクラスにおける酵素と同様に、このクラスにおける特定の酵素は、広い基質特異性を有することが確認された。例えば、シュードモナス・プチダのアシルCoAリガーゼは、酢酸、プロピオン酸、酪酸、吉草酸、ヘキサノ酸、ヘプタン酸及びオクタン酸を含むいくつかの脂肪酸基質、並びにフェニル酢酸及びフェノキシ酢酸などの芳香族化合物に対して作用することが証明された(Fernandez-Valverdeら、Appl. Environ. Microbiol. 59:1149-1154(1993))。関連酵素、リゾビウム・トリフォリ(Rhizobium trifoli)のマロニルCoAシンテターゼ(6.3.4.9)は、いくつかの二酸、即ちマロン酸エチル、マロン酸プロピル、マロン酸アリル、マロン酸イソプロピル、マロン酸ジメチル、マロン酸シクロプロピル、マロン酸シクロプロピルメチレン、マロン酸シクロブチル及びマロン酸ベンジルをそれらの対応するモノチオエステルに変換することが可能であった(Pohlら、J. Am. Chem. Soc. 123:5822-5823 (2001))。同様に、デカルボキシラーゼ(4.1.1)も広い基質範囲を有することが判明した。ケト-酸デカルボキシラーゼとも呼ばれるピルベートデカルボキシラーゼ(PDC)は、ピルベートのアセトアルデヒドへの脱カルボキシル化を触媒するアルコール発酵における主要な酵素である。サッカロマイセス・セレビシアエから単離された酵素は、2-ケトブチレート、2-ケトバレレート及び2-フェニルピルベートを含む脂肪酸2-ケト酸に対して広い基質範囲を有する(Li及びJordan、Biochemistry 38:10004-10012 (1999))。同様に、ベンゾイルホルメートデカルボキシラーゼは、広い基質範囲を有し、酵素工学の研究のターゲットであった。シュードモナス・プチダの酵素が広範囲に研究され、この酵素の結晶構造が利用可能である(Polovnikovaら、Biochemistry 42:1820-1830 (2003); Hassonら、Biochemistry 37:9918-9930 (1998))。分枝鎖アルファ-ケト酸デカルボキシラーゼ(BCKA)は、3から6個の炭素原子の鎖長が異なる様々な化合物に対して作用することが証明された(Oku及びKaneda、J. Biol. Chem. 263:18386-18396 (1998); Smitら、Appl. Environ. Microbiol. 71:303-311 (2005b))。ラクトコッカス・ラクチスの酵素は、2-オキソブタノエート、2-オキソヘキサノエート、2-オキソペンタノエート、3-メチル-2-オキソブタノエート、4

-メチル-2-オキシブタノエート及びイソカプロエートを含む様々な分枝状及び直鎖状基質に対して特徴づけられた(Smitら、Appl. Environ. Microbiol、71:303-311(2005a))。

【0099】

興味深いことに、1つの主要な活性を有することが知られる酵素は、全く異なる機能を触媒することも報告された。例えば、バシルス・ステアロテルモフィルス及びバシルス・スブチリスの共同因子依存性ホスホグリセレートムターゼ(5.4.2.1)は、ホスファターゼとしても機能することが知られる(Rigdenら、Protein Sci. 10:1835:1846(2001))。B.ステレオテルモフィルスの酵素は、3-ホスホグリセレート、アルファ-ナフチルホスフェート、p-ニトロフェニルホスフェート、AMP、フルクトース-6-ホスフェート、リボース-5-ホスフェート及びCMPを含むいくつかの基質に対して活性を有することが知られる。

10

【0100】

酵素が自然に広い基質特異性を有するこれらの例と対照的に、多くの酵素が、それらの非天然基質に対するそれらの特異性を広げるために、指向性進化を使用して修飾された。代替的に、指向性進化を使用して、酵素の基質嗜好性を変化させた。したがって、天然基質に対する効率的な機能、例えば機能の向上、又は非天然基質に対する効率的な機能、例えば機能の拡大のために所与の酵素を操作することが実現可能である。例えば、シュードモナス・アエルギノサのリパーゼのエナンチオ選択性が有意に向上したことが報告されている(Reetzら、Agnew. Chem. Int. Ed Engl. 36:2830-2832(1997))。この酵素は、(S)-酸のために、エナンチオマー過剰が2%にすぎない2-メチルデカン酸p-ニトロフェニルを加水分解した。しかし、4回の連続的な誤りがちな変異誘発及びスクリーニングの後に、81%eeで必須の反応を触媒する変異体が生成された(Reetzら、Agnew. Chem. Int. Ed Engl. 36:2830-2832(1997))。

20

【0101】

酵素を多くの非天然基質のアレイに対して機能するように修飾するために、指向性進化法が使用された。P.アエルギノサにおけるリパーゼの基質特異性が、活性部位付近のアミノ酸残渣の無作為化によって拡大された。これは、この酵素によるアルファ置換カルボン酸の許容を可能にした(Reetzら、Agnew. Chem. Int. Ed Engl. 44:4192-4196(2005))。酵素の別の成功裡の修飾において、野生型酵素によってあまり許容されないβ-分枝状基質を許容するエシェリキア・コリアミノトランスフェラーゼを生成するためにDNAシャフリングが採用された(Yanoら、Proc. Nat. Acad. Sci U.S.A. 95:5511-5515 (1998))。具体的には、4回のシャフリングの終了時に、バリン及び2-オキシバリンに対するアスパルテートアミノトランスフェラーゼの活性が5倍程度まで増加したのに対して、天然基質、アスパルテートに対する活性を30分の1まで低下させた。最近、非天然及び無生物基質、4-ヒドロキシ-4-(6-メトキシ-2-ナフチル)-2-ブタノエートにおける炭素-炭素結合開裂を触媒するのに使用することが可能であるニトロ-アルドラーゼを設計するためのアルゴリズムが使用された(Jiangら、Science 319:1387-1391(2008))。これらのアルゴリズムは、新しい酵素を設計するために4つの異なる触媒モチーフの組合せを使用し、実験的特徴づけのための選択された設計の20種は、触媒されていない反応と比較して速度が4倍向上した(Jiangら、Science 319:1387-1391(2008))。これらの工学的アプローチは、酵素が作用できる基質のアレイを拡大することが可能であるだけでなく、非常に効率的な酵素の設計及び構成を可能にする。例えば、DNAシャフリングの方法(過渡的な鋳型又はRACHITT上の無作為キメラ生成)は、複合基質上の脱硫化の速度が向上するとともに、非天然基質の変換率が20倍である操作モノオキシゲナーゼをもたらすことが報告された(Cocoら、Nat. Biotechnol. 19:354-359(2001))。同様に、緩慢な変異体トリオセホスフェートイソメラーゼ酵素の特定の活性が、1.3倍から19倍まで向上された(Hermesら、Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 87:696-700 (1990))。特定の活性のこの向上は、タンパク質の全長に対して無作為変異誘発を使用することによって達成され、6つのアミノ酸残基の変異に対して向上を追跡することが可能であった。

30

40

【0102】

所望の基質に対する酵素の基質特異性を改変するためのタンパク質操作アプローチの効

50

果は、いくつかの研究においても実証された。テルムス・テルモフィルスのイソプロピルマレートデヒドロゲナーゼは、それが次に基質としてのマレート及びD-ラクテートに対して作用することが可能になるように、活性部位に近い残基を変化させることによって修飾された(Fujitaら、Biosci. Biotechnol. Biochem. 65:2695-2700(2001))。この研究並びに他の研究において、1つ又はいくつかの残基を修飾して基質特異性を改変できることが指摘された。例えば、単一のアミノ酸が推定基質結合領域において変化したジヒドロフラボノール4-レダクターゼは、ジヒドロカエムプフェロールを優先的に還元することが可能であった(Johnsonら、Plant. J. 25:325-333(2001))。エシェリキア・コリの非常に特異的なイソシトレートデヒドロゲナーゼの基質特異性は、活性部位における1つの残基を変化させることによってイソシトレートからイソプロピルマレートに変化した(Doyleら、Biochemistry 40:4234-4241(2001))。同様に、NAD⁺依存性1,5-ヒドロキシプロスタグランジンデヒドロゲナーゼの共同因子特異性は、N末端付近のいくつかの残基を変化させることによって、NADP⁺に改変された(Choら、Arch. Biochem. Biophys. 419:139-146(2003))。配列分析及び分子モデル化分析を使用して、修飾のための主要残基が特定され、それらが部位指向性変異誘発によってさらに調査された。

【0103】

酵素の天然基質と比較して非天然基質に有利になるように酵素の機能を変化させた多くの例が、多様なクラスの酵素にわたって存在する。フコシダーゼが、DNAシャフリング及びスクリーニングによって大腸菌のガラクトシダーゼから進化された(Zhangら、Proc. Natl Acad. Sci U.S.A. 94:4504-4509 (1997))。同様に、大腸菌のアスパルテートアミノトランスフェラーゼが、相同性モデル化及び部位指向性変異誘発を使用して、トリオシニアミノトランスフェラーゼに変換された(Onuffer及びKirsch Protein Sci., 4:1750-1757(1995))。P. プチダのベンゾイルホルメートデカルボキシラーゼの活性部位における2つの残基の部位指向性変異誘発は、天然及び非天然基質に対する親和性(K_m)を変性することが報告された(Siegiertら、Protein Eng Des Sel 18:345-357 (2005))。サッカロマイセス・セレビシアエのシトクロムcペルオキシダーゼ(CCP)を指向性分子進化させて、従来のペルオキシダーゼ基質グアイアコールに対する活性が増強された変異体を生成することで、CCPの基質特異性をタンパク質シトクロムcから小器官分子に変化させた。3回のDNAシャフリング及びスクリーニングの後に、グアイアコールに対する活性が300倍に増大し、天然基質に対するものと比較してこの基質に対する特異性が1000倍まで増大した変異体が単離された(Ifflandら、Biochemistry 30:10790-10798(2000))。

【0104】

いくつかの場合において、親酵素のいずれとも異なる基質嗜好性を有する酵素が得られた。例えば、ポリ塩素化ビフェニルのビフェニルジオキシゲナーゼ媒介分解が、2つの細菌、即ちシュードモナス・シュードアルカルゲンス(*Pseudomonas pseudoalcaligenes*)及びブルクホルデリア・セパシア(*Burkholderia cepacia*)の遺伝子をシャフリングすることによって促進された(Kumamaruら、Nat. Biotechnol. 16:663-666(1998))。得られたキメルビフェニルジオキシゲナーゼは、いずれの親酵素とも異なる基質嗜好性を示し、その酵素にとって本来は劣った基質である関連ビフェニル化合物並びにトルエン及びベンゼンなどの単一芳香族環炭化水素に対する分解活性を高めた。

【0105】

酵素特異性を変化させるに加えて、酵素が本質的に低活性を有する基質に対する活性を高めることも可能である。1つの研究は、(リジン、アルギニン、アラニン、セリン、メチオニン、システイン、ロイシン及びヒスチジン等に対する)広い基質特異性を有するが、トリプトファンに対する活性が低いP. プチダのアミノ酸ラセマーゼをランダム変異誘発によって有意に向上させることが可能であることを実証した(Kinoら、Appl. Microbiol. Biotechnol. 73:1299-1305(2007))。同様に、ウシBCKADの活性部位が、代替的な基質のアセチル-CoAに有利になるように操作された(Meng及びChuang、Biochemistry 33:12879-12885(1994))。これらのアプローチの興味深い側面は、ランダム法を適用して、効果的な活性を有する変異酵素を生成しても、活性の向上を付与する正確な変異又は構造変化を特

定できることである。例えば、前記研究において、トリプトファンに対する活性の向上を促進する変異が2つの異なる位置に対して追跡された。

【0106】

発現するのが困難であるタンパク質を発現させるために指向性進化も使用された。例えば、セイヨウワサビペルオキシダーゼにランダム変異誘発及び遺伝子組換えさせることによって、野生型と比較して14倍を超える活性を有する変異体が特定された(Linら、Biotechnol. Prog. 15:467-471(1999))。

【0107】

指向性進化の別の例は、一連の所望の機能を達成するために酵素に施すことができる大規模な修飾を示す。バシルス・ステアロテルモフィルスの酵素ラクテートデヒドロゲナーゼが部位指向性変異誘発され、異なるヒドロキシ酸に対する特異性を決定づけると考えられる部位において3つのアミノ酸代用物が作製された(Clarkeら、Biotechnol. Biophys. Commun. 148:15-23(1987))。これらの変異の後に、ピルベートと比較したオキサロアセテートに対する特異性が、オキサロアセテートと比較したピルベートに対する触媒特性が1000である野生型酵素と対照的に500まで高められた。この酵素は、分枝鎖置換ピルベートに対する活性を有するように、部位指向性変異誘発を使用してさらに操作された(Wilksら、Biochemistry 29:8587-8591(1990))。具体的には、酵素は、アルファ-ケトイソカプロレートに対する K_{cat} が55倍に高められた。3つの構造修飾を同じ酵素に施して、その基質特異性をラクテートからマレートに変化させた。酵素は、活性が高く、マレートに対して特異的であった(Wilksら、Science 242:1541-1544(1988))。続いて、B.ステアロテルモフィルスの同じ酵素が、アンモニウム基を含むものなどの、正に帯電した側鎖を有するアルファ-ケト酸に対して高度な触媒活性を有するように操作された(Hoganら、Biochemistry 34:4225-4230(1995))。酵素の102位置に導入された酸性アミノ酸を有する変異体は、当該側鎖アンモニウム基の結合に有利であった。得られた結果は、オメガ-アミノ-アルファ-ケト酸基質に対する k_{cat}/K_m 値の25倍までの向上を示すことを証明した。興味深いことに、この酵素は、また、ラクテートデヒドロゲナーゼの代わりにフェニルラクテートデヒドロゲナーゼとして機能するように構造的に修飾された(Wilksら、Biochemistry 31:7802-7806 1992)。制限部位が、遺伝子の領域を励起することを可能にする酵素に対する遺伝子に導入された。この領域は、通常はバルク溶媒から活性部位をシールし、基質特異性の主たる決定因子であるポリペプチド(残基98~110)の移動表面ループに対してコードされる。基質特異性が変化したヒドロキシ酸デヒドロゲナーゼが生成されるように、可変長及び配列ループが挿入された。より長いループ構成の場合は、ピルベートに対する活性が100万分の1に低下したが、フェニルピルベートに対する活性はほとんど変化しなかった。390000倍の特異性(k_{cat}/K_m)の切替が達成された。ピルベートと比較したフェニルピルベートに対するこの酵素の1700:1の選択性は、フェニルラクテートデヒドロゲナーゼに必要とされる選択性である。上記研究は、酵素工学の様々なアプローチを使用して、本明細書に開示されるBDO経路のための酵素を得ることができることを示している。

【0108】

本明細書に開示されているように、アセチル-CoA、スクシニル-CoA、アルファ-ケトグルタレート、グルタメート、4-アミノブチレート及びホモセリンを含む多くの中心的代謝中間体から1,4-ブタンジオールへの生合成経路を利用することができる。アセチル-CoA、スクシニル-CoA及びアルファ-ケトグルタレートは、細胞呼吸のために酸素を利用するほぼすべての生細胞にその全体が存在し、多くの嫌気性生物体に切断された形で存在する一連の反応物であるトリカルボン酸(TCA)回路の共通の中間体である。グルタメートは、グルタメートデヒドロゲナーゼ又は多くの伝達反応物のいずれかを介してアルファ-ケトグルタレートから誘導されるアミノ酸である(図8B参照)。4-アミノブチレートをグルタメートの脱カルボキシル化(図8B参照)によって、又は図9Cに開示される経路を介してアセトアセチル-CoAから形成することができる。アセトアセチル-CoAは、酵素、アセチル-補酵素Aアセチルトランスフェラーゼ、又は同等にアセトアセチル-補酵素Aチオラーゼによる2つのアセチル-CoA分子の縮合から誘導される。ホモセリンは、アスパルテートを介してオキ

サロアセテートから形成される、トレオニン及びメチオニン代謝における中間体である。オキサロアセテートのホモセリンへの変換には、NADH、2つのNADPH及び1つのATPが必要である。

【0109】

以上に例示した経路以外の経路を採用して、非天然微生物生物体にBDOの生合成を生成することができる。一実施態様において、L-ホモセリンからBDOへの経路を使用して生合成を達成することができる(図13)。この経路は、還元当量の可溶性によって制限されると思われる0.90モル/モルグルコースのモル収率を有する。第2の経路は、アセトアセチル-CoAからBDOを合成し、1.091モル/モルグルコースの最大理論収率を達成することが可能である(図9参照)。いずれかの経路の実装を、2つの外因性酵素を大腸菌などの宿主生物体に導入することによって達成することができ、両経路は、スクシニル-CoAを介してBDO生成をさらに補完することができる。経路酵素、熱力学、理論的収率及び全体的な実現可能性を以下にさらに記載する。

【0110】

ホモセリン経路を、BDO生成微生物体を生成するように操作することもできる。ホモセリンは、アスパルテートを介してオキサロアセテートから形成されるトレオニン及びメチオニン代謝における中間体である。オキサロアセテートのホモセリンへの変換には、NADH、2つのNADPH及び1つのATPが必要である(図2)。形成されると、ホモセリンは、トレオニン及びメチオニンの両方のための生合成回路に供給される。たいていの生物体において、高量のトレオニン又はメチオニンが逆戻りして、ホモセリン生合成経路を抑圧する(Caspiら、Nucleic Acids Res. 34:D511-D516(1990))。

【0111】

ホモセリンの4-ヒドロキシブチレート(4-HB)への変換を本明細書に開示される2つの酵素工程で達成することができる。この経路の第1の工程は、推定上のアンモニアリアーゼによるホモセリンの脱アミノ化である。工程2において、生成物アルケン、4-ヒドロキシブタ2-エノエートが、1つのNADHを消費して推定上のレダクターゼにより4-HBに還元される。次いで、4-HBをBDOに変換することができる。

【0112】

上記変換を触媒するために利用可能な酵素が本明細書に開示されている。例えば、経路の工程1におけるアンモニアリアーゼは、アスパルターゼ(アスパルターゼ)の化学的性質に酷似している。アスパルターゼは、微生物における広範に及ぶ酵素であり、広く特徴づけられてきた(Viola, R.E., Mol. Biol. 74:295-341(2008))。大腸菌アスパルターゼの結晶構造が解明された(Shiら、Biochemistry 36:9136-9144(1997))ため、その基質特異性を、ホモセリンを含むように改変する酵素の活性部位における変異を直接操作することが可能である。工程2におけるオキシドレダクターゼは、大腸菌TCA回路にフマレートレダクターゼを含むいくつかの十分に特徴づけられた酵素に類似する化学的性質を有する。この反応の熱力学が極めて好ましいため、広い基質特異性を有する外因性レダクターゼは、4-ヒドロキシブタ2-エノエートを還元できる可能性が高い。嫌気性条件下でのこの経路の収率は、グルコース1モル当たり0.9モルのBDOである。

【0113】

スクシニル-CoA経路は、よりエネルギー的に効率が高いため、より高い収率を有することが判明した。ホモセリン回路を介する1つのオキサロアセテート分子のBDOへの変換には、2つのATP同等物の消費が必要になる。PEPカルボキシキナーゼが可逆的であると想定すると、グルコースの2つのオキサロアセテート分子への変換が最大で3つのATP分子を生成することができるため、ホモセリンを介するグルコースのBDOへの全変換は、負のエネルギー収率を有する。推定されるように、エネルギーが呼吸を介して生成され得ると想定すると、ホモセリン経路の最大収率は、スクシニル-CoA経路収率の96%であるグルコース1モル当たり1.05モルまで増加する。スクシニル-CoA経路は、炭素流の一部を、ピルベートデヒドロゲナーゼ及びTCA回路の酸化性分枝を介して誘導して、エネルギー消費を伴わずに還元当量及びスクシニル-CoAの両方を生成することができる。したがって、流れのすべて

がオキサロアセテートを介してスクシニル-CoAからBDOに誘導されることがないため、それは、ホモセリン経路と同じエネルギー上の問題に遭遇しない。全体にわたり、ホモセリン経路はBDOへの高収率経路を示す。

【0114】

アセトアセチル-CoA経路を操作して、BDO生成微生物体を生成することもできる。アセトアセチル-CoAを、アセチル-CoAアセチルトランスフェラーゼ及びアセトアセチル-CoAトランスフェラーゼを含む、脂肪酸代謝に関与する酵素によってアセチル-CoAから形成することができる。アセトアセチル-CoAを介する生合成経路は、また、一酸化炭素、二酸化炭素又はメタノールなどの単一の炭素化合物を代謝させてアセチル-CoAを形成することができる微生物体に特に有用である。

10

【0115】

アセトアセチル-CoAから4-アミノブチレートへの3工程経路(図9C参照)を使用して、アセトアセチル-CoAを介してBDOを合成することができる。図8Bに示されるように、4-アミノブチレートをコハク酸セミアルデヒドに変換することができる。スクシニル-CoAから除去された1つの還元工程又は α -ケトグルタレートから除去された1つの脱カルボキシル化工程であるコハク酸セミアルデヒドを、3つの還元工程に従ってBDOに変換することができる(図1)。手短に述べると、この経路の工程1は、例えば、atoA及びatoD遺伝子によってコードされた大腸菌アセトアセチル-CoAによるアセトアセチル-CoAのアセトアセチル-CoAへの変換を含む(Hanaiら、Appl. Environ. Microbiol. 73:7814-7818(2007))。アセトアセチル-CoA生合成の工程2は、 ω -アミノトランスフェラーゼによるアセトアセチル-CoAの3-アミノブタノエートへの変換を含む。アルカリゲンス・デニトリフィカンス(*Alcaligenes denitrificans*)の ω -アミノ酸:ピルベートアミノトランスフェラーゼ(ω -APT)は、大腸菌に過剰発現され、インピトロで3-アミノブタノエートに対する高い活性を有することが証明された(Yunら、Appl. Environ. Microbiol. 70:2529-2534(2004))。

20

【0116】

工程2において、推定上のアミノムターゼは、アミン基を炭素骨格の3位から4位にシフトさせる。3-アミノブタノエートに対してこの機能を果たすアミノムターゼは、特徴づけられていないが、クロストリジウム・スティックランジ(*Clostridium sticklandii*)の酵素は、極めて類似したメカニズムを有する。酵素D-リジン-5,6-アミノムターゼは、リジン生合成に関与する。

30

【0117】

アセトアセチル-CoAからBDOへの合成経路は、通常、グルタメートの脱カルボキシル化から形成される大腸菌における代謝物質であるアミノブタノエートを通る。4-アミノブタノエートは、形成されると、生化学的に特徴づけられた酵素である4-アミノブタノエートトランスアミナーゼ(2.6.1.19)によってコハク酸セミアルデヒドに変換され得る。

【0118】

この経路における候補酵素を選択するための1つの検討事項は、工程2及び3に関与する酵素の立体選択性である。アルカリゲンス・デニトリフィカンスの ω -ABTは、3-アミノブタノエートのL-立体異性体に特異的であり、D-リジン5,6-アミノムターゼは、D-立体異性体を必要とする可能性が高い。相補的な立体選択性を有する酵素が最初に見いだされないか、又は操作されない場合は、L-3-アミノブタノエートをD-3アミノブタノエートに変換することができるラセマーゼ活性を有する第3の酵素を経路に加えることができる。アミノ酸ラセマーゼは普及しているが、これらの酵素が ω -アミノ酸に対して機能できるかどうかは未知である。

40

【0119】

嫌気性条件下でのこの経路の最大理論モル収率は、グルコース1モル当たり1.091モルである。アセトアセチル-CoAからBDOへの流れを生成するために、アセチル-CoA:アセトアセチル-CoAトランスフェラーゼが可逆的であると想定することが必要であった。大腸菌におけるこの酵素の機能は、最初にそれらをチオエステルに変換することによって短鎖脂肪酸を代謝させることである。

50

【0120】

アセテートを消費する方向のアセチル-CoA:アセトアセチル-CoAトランスフェラーゼの作用は、大腸菌において実験的に実証されていないが、他の生物体における類似の酵素に関する研究は、この反応が可逆的であることを裏づけている。腸細菌ロセブリア種及びF. プラスニツィの酵素ブチリル-CoA:アセテート:CoAトランスフェラーゼは、アセテートを利用する方向に作用して、ブチレートを生成する(Duncanら、Appl. Environ. Microbiol 68:5186-5190(2002))。別の極めて類似する酵素、即ちトリパノソマ・ブルセイ(Trypanosoma brucei)のアセチル:スクシナートCoAトランスフェラーゼもアセテートを利用する方向に作用する。この反応は、平衡に近い $\Delta_{rxn}G$ を有するため、高濃度のアセテートは、対象となる方向に反応を誘導し得る可能性が高い。グルコース1モル当たり1.09モルの最大理論BDO生成速度では、大腸菌は、発酵副産物を伴わずにグルコース1モル当たり1.098モルのATPを生成できることがシミュレーションによって想定される。このATP収率は、細胞の成長、維持及び生成に十分なものである必要がある。アセトアセチル-CoA生物経路は、アセチル-CoAからBDOへの高収量経路である。

10

【0121】

したがって、選択された宿主に4-HB生成を確立するための既に例示した様々な修飾のいずれかに加えて、BDO生成微生物体は、4-HB経路代謝修飾の先述の組合せ及び置換のいずれか、並びにCoA非依存性アルデヒドデヒドロゲナーゼ、CoA依存性アルデヒドデヒドロゲナーゼ若しくはアルコールデヒドロゲナーゼ、又はGBL及び/又はBDOのための生合成経路を生成する本明細書に開示される他の酵素の発現のいずれかの組合せを含むことができる。したがって、本発明のBDO生産体は、例えば、本明細書に開示される4-HB経路のいずれか及び/又はBDO経路のいずれかに対応する1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ又はすべての酵素の外因性発現を有することができる。

20

【0122】

遺伝子修飾微生物体の設計及び構成は、BDOを生成するための十分な量の発現を達成するための当該技術分野で周知の方法を使用して実施される。特に、本発明の非天然微生物体は、上述のように、約0.1~25mM以上などの約0.1~200mM以上の細胞内濃度をもたらすBDOの生合成を達成することができる。例えば、BDOの細胞内濃度は、約3~20mM、特に約5~15mM以上、特に約10mM以上を含む約8~12mMである。これらの例示的な範囲の各々の間又はそれを超える細胞内濃度を本発明の非天然微生物体から達成することができる。4-HB生産体の場合と同様に、BDO生産体を嫌気性条件下で維持、培養又は発酵することができる。

30

【0123】

本発明は、さらに、4-HBを生成するための方法を提供する。該方法は、4-ヒドロキシブタノエートデヒドロゲナーゼ、CoA非依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、スクシニル-CoAシンテターゼ、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、グルタメート:コハク酸セミアルデヒドトランスアミナーゼ、アルファ-ケトグルタレートデカルボキシラーゼ若しくはグルタメートデカルボキシラーゼを、モノマー4-ヒドロキシブタン酸(4-HB)を生成するのに十分な時間にわたって実質的に嫌気性条件下でコードする少なくとも1つの外因性核酸を含む4-ヒドロキシブタン酸(4-HB)生合成経路を有する非天然微生物体を培養することを含む。該方法は、例えば、4-HBのGBL及びBDO又はTHFへの化学変換をさらに含むことができる。

40

【0124】

また、4-HBを生成するための方法が提供される。該方法は、4-ヒドロキシブタノエートデヒドロゲナーゼ、スクシニル-CoAシンテターゼ、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ又はアルファ-ケトグルタレートデカルボキシラーゼを、モノマー4-ヒドロキシブタン酸(4-HB)を生成するのに十分な時間にわたって実質的に嫌気性条件下でコードする少なくとも1つの外因性核酸を含む4-ヒドロキシブタン酸(4-HB)生合成経路を有する非天然微生物体を培養することを含む。4-HB生成物を培地に分泌させることができる。

【0125】

50

さらに、BDOを生成するための方法が提供される。該方法は、4-ヒドロキシブタノエートデヒドロゲナーゼ、スクシニル-CoAシンテターゼ、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、4-ヒドロキシブチレート:CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシブチレートキナーゼ、ホスホトランスヒドロキシブチリラーゼ、 α -ケトグルタレートデカルボキシラーゼ、アルデヒドデヒドロゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ又はアルデヒド/アルコールデヒドロゲナーゼを、1,4-ブタンジオール(BDO)を生成するのに十分な時間にわたってコードする少なくとも1つの外因性核酸を含む4-ヒドロキシブタン酸(4-HB)及び1,4-ブタンジオール(BDO)生合成経路を有する微生物体を含む非天然微生物生触媒又は微生物体を培養することを含む。BDO生成物を培地に分泌させることができる。

【0126】

10

また、本発明のBDO経路を有する非天然微生物体を培養することによってBDOを生成するための方法が提供される。BDO経路は、BDOを生成するための条件下で、且つ十分な時間にわたってBDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含むことができ、該BDO経路は、4-アミノブチレートCoAトランスフェラーゼ、4-アミノブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-アミノブチレート-CoAリガーゼ、4-アミノブチリル-CoAオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、4-アミノブチリル-CoAトランスアミナーゼ、又はヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼを含む。(実施例VII及び表17参照)。

【0127】

20

代替的に、BDO経路は、BDOを生成するための条件下で、且つ十分な時間にわたってBDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含むことができ、該BDO経路は、4-アミノブチレートCoAトランスフェラーゼ、4-アミノブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-アミノブチレート-CoAリガーゼ、4-アミノブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-アミノブチリル-CoAレダクターゼ、4-アミノブタン-1-オールデヒドロゲナーゼ、4-アミノブタン-1-オールオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は4-アミノブタン-1-オールトランスアミナーゼを含む(実施例VII及び表18参照)。

【0128】

30

加えて、本発明は、BDOを生成するための方法であって、BDOを生成するための条件下で、且つ十分な時間にわたってBDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、4-アミノブチレートキナーゼ、4-アミノブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)、4-アミノブタン-1-オールデヒドロゲナーゼ、4-アミノブタン-1-オールオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、4-アミノブタン-1-オールトランスアミナーゼ、[(4-アミノブタノイル)オキシ]リン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、[(4-アミノブタノイル)オキシ]リン酸トランスアミナーゼ、4-ヒドロキシブチリル-ホスフェートデヒドロゲナーゼ又は4-ヒドロキシブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)を含むBDO経路を有する非天然微生物体を培養することを含む方法を提供する(実施例VII及び表19参照)。

【0129】

40

本発明は、さらに、BDOを生成するための方法であって、BDOを生成するための条件下で、且つ十分な時間にわたってBDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、アルファ-ケトグルタレート5-キナーゼ、2,5-ジオキソペンタン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)、2,5-ジオキソペンタン酸レダクターゼ、アルファ-ケトグルタレートCoAトランスフェラーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAヒドロラーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAリガーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAレダクターゼ、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ又は5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱カルボキシル化)を含むBDO経路を有する非天然微生物体を培養することを含む方法を提供する(実施例VIII及び表20参照)。

【0130】

50

本発明は、さらに、BDOを生成するための方法であって、BDOを生成するための条件下で、且つ十分な時間にわたってBDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、グルタメートCoAトランスフェラーゼ、グルタミル-CoAヒドロラーゼ、グルタミル-CoAリガーゼ、グルタメート5-キナーゼ、グルタメート-5-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)、グルタミル-CoAレダクターゼ、グルタメート-5-セミアルデヒドレダクターゼ、グルタミル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸トランスアミナーゼ、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱カルボキシル化)を含むBDO経路を有する非天然微生物体を培養することを含む方法を提供する(実施例IX及び表21参照)。

10

【0131】

本発明は、さらに、BDOを生成するための方法であって、BDOを生成するための条件下で、且つ十分な時間にわたってBDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ、3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼ、ビニルアセチル-CoA Δ -イソメラーゼ又は4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼを含むBDO経路を有する非天然微生物体を培養することを含む方法を含む(実施例X及び表22参照)。

【0132】

また、BDOを生成するための方法であって、BDOを生成するための条件下で、且つ十分な時間にわたってBDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、ホモセリンデアミナーゼ、ホモセリンCoAトランスフェラーゼ、ホモセリンCoA-ヒドロラーゼ、ホモセリン-CoAリガーゼ、ホモセリン-CoAデアミナーゼ、4-ヒドロキシブタ2-エノイル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシブタ2-エノイル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブタ2-エノイル-CoAリガーゼ、4-ヒドロキシブタ2-エノエートレダクターゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ又は4-ヒドロキシブタ2-エノイル-CoAレダクターゼを含むBDO経路を有する非天然微生物体を培養することを含む方法が提供される(実施例XI及び表23参照)。

20

【0133】

本発明は、さらに、BDOを生成するための方法であって、BDOを生成するための条件下で、且つ十分な時間にわたってBDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、スクシニル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ、4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ(リン酸化)を含むBDO経路を有する非天然微生物体を培養することを含む方法を提供する。

30

当該BDO経路は、スクシニル-CoAレダクターゼ、4-ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシブチレートキナーゼ、ホスホトランス-4-ヒドロキシブチリラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含むことができる。

40

【0134】

また、BDOを生成するための方法であって、BDOを生成するための条件下で、且つ十分な時間にわたってBDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、グルタメートデヒドロゲナーゼ、4-アミノブチレートオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、4-アミノブチレートトランスアミナーゼ、グルタメートデカルボキシラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ、4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ(リン酸化)を含むBDO経路を有する非天然微生物体を培養することを含む方法が提供される。

【0135】

50

本発明は、また、生成物を増加させるか、又は望ましくない副産物を減少させることによってBDOなどの所望の生成物の生成の向上を可能にする、本明細書に開示されている遺伝子改変生物体を使用して所望の生成物を生成する方法を提供する。したがって、本発明は、1,4-ブタンジオール(BDO)を生成するための方法であって、本明細書に開示されている非天然微生物体を、BDOを生成するための条件下で、且つ十分な時間にわたって培養することを含む方法を提供する。一実施態様において、本発明は、非天然微生物体を使用して1,4-ブタンジオール(BDO)を生成する方法であって、BDOを生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含むBDO経路を有する微生物体を含む方法を提供する。一実施態様において、微生物体は、外因性スクシニル-CoAシンテターゼを発現するように遺伝子改変されている(実施例XII参照)。例えば、スクシニル-CoAシンテターゼは、大腸菌sucCD遺伝子によってコードすることができる。

10

【0136】

別の実施態様において、微生物体は、外因性アルファ-ケトグルタレートデカルボキシラーゼを発現するように遺伝子改変されている(実施例XIII参照)。例えば、アルファ-ケトグルタレートデカルボキシラーゼは、ウシ結核菌sucA遺伝子によってコードすることができる。さらに別の実施態様において、微生物体は、外因性スクシネートセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ及び4-ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼ並びに場合により4-ヒドロキシブチリル-CoA/アセチル-CoAトランスフェラーゼを発現するように遺伝子改変されている(実施例XIII参照)。例えば、スクシネートセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(CoA依存性)、4-ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼ及び4-ヒドロキシブチリル-CoA/アセチル-CoAトランスフェラーゼは、ポルフィロモナス・ギンギバリスW83遺伝子によってコードすることができる。さらなる実施態様において、微生物体は、外因性ブチレートキナーゼ及びホスホトランスブチリラーゼを発現するように遺伝子改変されている(実施例XIII参照)。例えば、ブチレートキナーゼ及びホスホトランスブチリラーゼは、クロストリジウム・アセトブチリクムbuk1及びptb遺伝子によってコードすることができる。

20

【0137】

さらに別の実施態様において、微生物体は、外因性4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼを発現するように遺伝子改変されている(実施例XIII参照)。例えば、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼは、クロストリジウム・ベイジェリンキーald遺伝子によってコードすることができる。また、本発明の実施態様において、微生物体は、外因性4-ヒドロキシブタナールレダクターゼを発現するように遺伝子改変されている(実施例XIII参照)。例えば、4-ヒドロキシブタナールレダクターゼは、ゲオバシルス・サーモグルコシダシウスadh1遺伝子によってコードすることができる。別の実施態様において、微生物体は、外因性ピルベートデヒドロゲナーゼサブユニットを発現するように遺伝子改変されている(実施例XIV参照)。例えば、外因性ピルベートデヒドロゲナーゼはNADH非感受性であり得る。ピルベートデヒドロゲナーゼサブユニットは、クレブシエラ肺炎桿菌(*Klebsiella pneumoniae*)lpdA遺伝子によってコードすることができる。特定の実施態様において、微生物体のピルベートデヒドロゲナーゼサブユニット遺伝子にピルベートホルメトリアーゼプロモーターの制御を受けさせることができる。

30

【0138】

さらに別の実施態様において、微生物体は、好気性呼吸制御調節系をコードする遺伝子を破壊するように遺伝子改変されている(実施例XV参照)。例えば、破壊は、arcA遺伝子の破壊であり得る。当該生物体は、マレートデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の破壊をさらに含むことができる。さらなる実施態様において、微生物体は、外因性NADH非感受性シトレートシンターゼを発現するように遺伝子改変されている(実施例XV参照)。例えば、NADH非感受性シトレートシンターゼは、gltAのR163L突然変異体などのgltAによってコードすることができる。さらに別の実施態様において、微生物体は、外因性ホスホエノールピルベートカルボキシキナーゼを発現するように遺伝子改変されている(実施例XVI参照)。例えば、ホスホエノールピルベートカルボキシキナーゼは、ヘモフィルス・インフルエンザホスホエノールピルベートカルボキシキナーゼ遺伝子によってコードすることがで

40

50

きる。BDOの生成の向上のための本明細書に例示される菌株を、適切な変更を加えて同様に使用して、他の所望の生成物、例えば、4-ヒドロキシブチレート又は本明細書に開示されている他の所望の生成物を生成することができることが理解されよう。

【0139】

本発明の方法において、1つ以上の外因性核酸のいずれかを微生物体に導入して、本発明の非天然微生物体を生成できることが理解される。例えば、4-HB、BDO、THF又はGBL生合成経路を微生物体に付与するように核酸を導入することができる、代替的に、コード化核酸を導入して、4-HB、BDO、THF又はGBL生合成機能を付与するための必要な反応のいくつかを触媒する生合成機能を有する中間微生物体を生成することができる。例えば、4-HB生合成経路を有する非天然微生物体は、4-ヒドロキシブタノエートデヒドロゲナーゼと α -ケトグルタレートデカルボキシラーゼ;4-ヒドロキシブタノエートデヒドロゲナーゼとCoA非依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ;4-ヒドロキシブタノエートデヒドロゲナーゼとCoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ;CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼとスクシニル-CoAシンテターゼ;及びスクシニル-CoAシンテターゼとグルタメートデカルボキシラーゼ等の組合せなどの所望の酵素をコードする少なくとも2つの外因性核酸を含むことができる。したがって、生合成経路の2つ以上の酵素の任意の組合せを本発明の非天然微生物体に含めることができることが理解される。同様に、所望の生合成経路の酵素の組合せが対応する所望の生成物の生成をもたらすのであれば、要望に応じて、生合成経路の3つ以上の酵素、例えば、4-ヒドロキシブタノエートデヒドロゲナーゼと α -ケトグルタレートデカルボキシラーゼとCoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ;CoA非依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼとスクシニル-CoAシンテターゼ;及び4-ヒドロキシブタノエートデヒドロゲナーゼとCoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼとグルタメート:コハク酸セミアルデヒドトランスアミナーゼ等の任意の組合せを本発明の非天然微生物体に含めることができることが理解される。

【0140】

同様に、例えば、BDO生成を付与するために導入される任意の1つ以上の外因性核酸に関して、BDO生合成経路を有する非天然微生物体は、4-ヒドロキシブタノエートデヒドロゲナーゼと α -ケトグルタレートデカルボキシラーゼ;4-ヒドロキシブタノエートデヒドロゲナーゼと4-ヒドロキシブチリルCoA:アセチル-CoAトランスフェラーゼ;4-ヒドロキシブタノエートデヒドロゲナーゼとブチレートキナーゼ;4-ヒドロキシブタノエートデヒドロゲナーゼとホスホトランスブチリラーゼ;4-ヒドロキシブチリルCoA:アセチル-CoAトランスフェラーゼとアルデヒドデヒドロゲナーゼ;4-ヒドロキシブチリルCoA:アセチル-CoAトランスフェラーゼとアルコールデヒドロゲナーゼ;4-ヒドロキシブチリルCoA:アセチル-CoAトランスフェラーゼとアルデヒド/アルコールデヒドロゲナーゼ、4-アミノブチレート-CoAトランスフェラーゼと4-アミノブチリル-CoAトランスアミナーゼ;及び4-アミノブチレートキナーゼと4-アミノブタン-1-オールオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)等の組合せなどの所望の酵素をコードする少なくとも2つの外因性核酸を含むことができる。したがって、生合成経路の2つ以上の酵素の任意の組合せを本発明の非天然微生物体に含めることができることが理解される。同様に、生合成経路の3つ以上の酵素、例えば、4-ヒドロキシブタノエートデヒドロゲナーゼと α -ケトグルタレートデカルボキシラーゼと4-ヒドロキシブチリルCoA:アセチル-CoAトランスフェラーゼ;4-ヒドロキシブタノエートデヒドロゲナーゼとブチレートキナーゼとホスホトランスブチリラーゼ;4-ヒドロキシブタノエートデヒドロゲナーゼと4-ヒドロキシブチリルCoA:アセチル-CoAトランスフェラーゼとアルデヒドデヒドロゲナーゼ;4-ヒドロキシブチリルCoA:アセチル-CoAトランスフェラーゼとアルコールデヒドロゲナーゼ;ブチレートキナーゼとホスホトランスブチリラーゼとアルデヒド/アルコールデヒドロゲナーゼ;4-アミノブチリル-CoAヒドロラーゼと4-アミノブチリル-CoAレダクターゼと4-アミノブタン-1-オールトランスアミナーゼ;及び3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼと3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼと4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼ等の任意の組合せを本発

明の非天然微生物体に含めることができることが理解される。同様に、所望の生合成経路の酵素の組合せが対応する所望の生成物を生成させるのであれば、要望に応じて、本明細書に開示される生合成経路の4つ又は5つ以上の酵素を本発明の非天然微生物に含めることができる。

【0141】

本明細書に記載の非天然微生物体のいずれかを培養して、本発明の生合成生成物を生成及び/又は分泌させることができる。例えば、4-HB生産体を4-HBの生合成生成のために培養することができる。4-HBを上記のように単離又は処理して、GBL、THF及び/又はBDOを生成することができる。同様に、BDO生産体をBDOの生合成生成のために培養することができる。本明細書に開示されるように、BDO系統の化合物の化学合成のために単離又はさらに

10

【0142】

成長培地は、例えば、炭素源を非天然微生物に供給することができる任意の炭水化物源を含むことができる。当該源は、例えば、グルコース、スクロース、キシロース、アラビノース、ガラクトース、マンノース、フルクトース及びデンプンなどの糖を含む。他の炭水化物源は、例えば、再生可能な原料及びバイオマスを含む。本発明の方法において原料として使用できる例示的な種類のバイオマスは、セルロース系バイオマス、ヘミセルロース系バイオマス及びリグニン原料又は原料の部分を含む。当該バイオマス原料は、例えば、グルコース、スクロース、キシロース、アラビノース、ガラクトース、マンノース、フルクトース及びデンプンなどの炭素源として有用な炭水化物基質を含む。本明細書に示さ

20

【0143】

よって、本明細書に示される教示及び指針を考慮すると、当業者は、炭水化物などの炭素源上で成長させると本発明の生合成化合物を分泌する非天然微生物体を生成できることを理解するであろう。当該化合物は、例えば、4-HB、BDO、並びに4-HB経路、BDO経路及び/又は4-HBとBDO経路の組合せにおける中間体代謝物質を含む。必要なことは、図1に示される1つ以上の酵素活性を操作して、例えば、4-HB及び/又はBDO生合成経路の一部又はすべてを含む所望の化合物又は中間体の生合成を達成することだけである。よって、本発明

30

【0144】

いくつかの実施態様において、培養条件は、嫌気性又は実質的に嫌気性の成長又は維持条件を含む。例示的な嫌気性条件は、既に記載されており、当該技術分野で周知である。発酵処理のための例示的な嫌気性条件を以下の実施例に記載する。これらの条件のいずれかを、非天然微生物体並びに当該技術分野で周知の他の嫌気性条件とともに採用することができる。当該嫌気性条件下において、4-HB及びBDO生産体は、5~10mM以上の細胞内濃度、並びに既に例示されたすべての他の濃度でそれぞれモノマー4-HB又はBDOを合成することができる。

40

【0145】

本発明の4-HB及びBDO生成非天然微生物体のための多くの下流化合物を生成することもできる。本発明の4-HB生成微生物体に関して、モノマー4-HB及びGBLが培地に平衡状態で存在する。4-HBのGBLへの変換を、例えば、微生物体を酸性pH培地で培養することによって効率的に達成することができる。7.5以下のpH、特に5.5以下のpHは、自然に4-HBをGBLに変換する。

50

【0146】

当該技術分野で周知の様々な方法を使用して、得られたGBLを4-HB及び他の成分から分離することができる。当該分離方法は、例えば、実施例に例示される抽出手順、並びに連続液液抽出、浸透気化、メンブレン濾過、メンブレン分離、逆浸透、電気透析、蒸留、結晶化、遠心、抽出濾過、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー及び限外濾過を含む方法を含む。上記方法のすべてが当該技術分野で周知である。分離GBLを例えば蒸留によってさらに精製することができる。

【0147】

本発明の4-HB生成非天然微生物体から生成することができる別の下流化合物は、例えばBDOを含む。この化合物を例えばGBLの化学的水素化によって合成することができる。化学的水素化反応は、当該技術分野で既知である。1つの例示的な手順は、1,4-ブタンジオールを生成するために、異種又は同種水素化触媒を水素、又は化学量論的若しくは触媒的に使用される水素化物系還元剤とともに使用して、培養物に由来する4-HB及び/又はGBL或いはこれらの2つの成分の混合物を化学的に還元することを含む。

【0148】

当該技術分野で周知の他の手順も上記化学反応に等しく適用可能であり、例えば、酸化銅及び酸化亜鉛触媒による蒸気相でのガンマ-ブチロラク톤の水素化分解が記載されている国際公開第82/03854号(Bradleyら)を含む。英国特許第1,230,276号には、酸化銅-酸化クロム触媒を使用するガンマ-ブチロラク톤の水素化が記載されている。水素化は、液相で実施される。高い反応器全圧を有するバッチ反応も例示されている。反応器における反応物質及び生成物分圧は、それぞれの露点を十分に上回る。英国特許第1,314,126号には、酸化ニッケル-コバルト-トリウム触媒による液相でのガンマ-ブチロラク톤の水素化が記載されている。バッチ反応が、高い反応器全圧、及びそれぞれの成分の露点を十分に上回る成分分圧を有するものとして例示されている。英国特許1,344,557号には、酸化銅-酸化クロム触媒による液相でのガンマ-ブチロラク톤の水素化が記載されている。蒸気相又は蒸気含有混合相が、場合によっては好適であることが示される。高い反応器全圧を使用する連続流管状反応器が例示されている。英国特許第1,512,751号には、酸化銅-酸化クロム触媒による液相でのガンマ-ブチロラク톤の1,4-ブタンジオールへの水素化が記載されている。高い反応器全圧を有し、確定可能な場合は、それぞれの露点を十分に上回る反応物質及び生成物分圧を有するバッチ反応が例示されている。米国特許第4,301,077号には、Ru-Ni-Co-Zn触媒によるガンマ-ブチロラク톤の1,4-ブタンジオールへの水素化が記載されている。反応を液相又は気相或いは気液混合相で実施することができる。反応器全圧が高く、反応器生産性が比較的低い連続流液相反応が例示されている。米国特許第4,048,196号には、酸化銅-酸化亜鉛触媒を用いたガンマ-ブチロラク톤の液相水素化による1,4-ブタンジオールの製造が記載されている。さらに、高い反応器全圧並びに高い反応物質及び生成物分圧で動作する連続流管状反応器が例示されている。また、米国特許第4,652,685号には、ラク톤のグリコールへの水素化が記載されている。

【0149】

本発明の4-HB生成微生物体から生成できるさらなる下流化合物は、例えばTHFを含む。この化合物を例えばGBLの化学的水素化によって合成することができる。GBLのTHFへの変換のために適用可能な当該技術分野で周知の1つの例示的な手順は、例えば、同種又は異種水素化触媒を水素、又は化学量論的若しくは触媒的に使用される水素化物系還元剤とともに使用して、培養物に由来する4-HB及び/又はGBL或いはこれらの2つの成分の混合物を化学的に還元して、テトラヒドロフランを生成することを含む。当該技術分野で周知の他の手順も上記化学反応に等しく適用可能であり、例えば、大表面積ゾル-ゲル経路調製水素化触媒が記載されている米国特許第6,686,310号を含む。マレイン酸のテトラヒドロフラン(THF)及び1,4-ブタンジオール(BDO)への還元、並びにガンマブチロラク톤からテトラヒドロフラン及び1,4-ブタンジオールへの還元のための方法も記載されている。

【0150】

培養条件は、例えば、液体培養手順並びに発酵及び他の大規模培養手順を含むことがで

きる。以下の実施例にさらに記載されるように、嫌気性又は実質的に嫌気性培養条件下で本発明の生合成生成物の特に有用な収率を得ることができる。

【0151】

4-HB又はBDOの生成について試験する好適な精製及び/又はアッセイを、周知の方法を使用して実施することができる。好適な反復培養物、例えば三通り培養物を、試験すべき各操作菌株について成長させることができる。例えば、操作生成宿主における生成物及び副産物の形成を監視することができる。最終生成物及び中間体並びに他の有機化合物を、HPLC(高速液体クロマトグラフィー)、GC-MS(ガスクロマトグラフィー-質量分光分析)及びLC-MS(液体クロマトグラフィー-質量分光分析)、又は当該技術分野で周知の慣例の手順を使用する他の好適な分析法などの方法によって分析することができる。発酵肉汁への生成物の放出を、培養上澄みを用いて試験することもできる。例えば、グルコース及びアルコールに対しては屈折率検出器を使用し、有機酸に対してはUV検出器を使用するHPLC(Linら、Biotechnol. Bioeng. 90:775-779(2005))、又は当該技術分野で周知の他の好適なアッセイ及び検出方法によって、副産物及び残留グルコースを定量することができる。外因性DNA配列の個々の酵素又はタンパク質活性を、当該技術分野で周知の方法を使用してアッセイすることもできる。

【0152】

当該技術分野で周知の様々な方法を使用して、4-HB又はBDO生成物を培養物における他の成分から分離することができる。当該分離方法は、例えば、抽出手順、並びに連続液液抽出、浸透気化、メンブレン濾過、メンブレン分離、逆浸透、電気透析、蒸留、結晶化、遠心、抽出濾過、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー及び限外濾過を含む方法を含む。上記方法のすべてが当該技術分野で周知である。

【0153】

本発明は、さらに、4-HBを製造する方法を提供する。該方法は、4-ヒドロキシブタノエートデヒドロゲナーゼ、CoA非依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、スクシニル-CoAシンテターゼ、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、グルタメート:コハク酸セミアルデヒドトランスアミラーゼ、 α -ケトグルタレートデカルボキシラーゼ又はグルタメートデカルボキシラーゼを、モノマー4-ヒドロキシブタン酸(4-HB)を生成するのに十分な時間にわたって実質的に嫌気性条件下でコードする少なくとも1つの外因性核酸を含む4-ヒドロキシブタン酸(4-HB)生合成経路を有する非天然微生物体を発酵させることを含み、そのプロセスは、流加発酵及びバッチ分離:流加発酵及び連続分離、又は連続発酵及び連続分離を含む。

【0154】

4-HB、GBL、BDO及び/又はTHFの製造のために、上記培養及び化学的水素化をスケールアップし、連続的に成長させることができる。例示的な成長手順は、例えば、流加発酵及びバッチ分離;流加発酵及び連続分離、又は連続発酵及び連続分離を含む。これらのプロセスのすべてが当該技術分野で周知である。4-HB生産体を採用すると、上記水素化手順を発酵などの連続培養法と同時に採用することによって、4-HB生合成とGBL、BDO及び/又はTHFへの化学的変換を同時に行うことが可能になる。他の水素化手順も当該技術分野で周知であり、本発明の方法に等しく適用され得る。

【0155】

発酵手順は、商業的な量の4-HB及び/又はBDOの生合成生成に特に有用である。概して、且つ非連続培養手順と同様に、連続的及び/又はほぼ連続的な4-HB又はBDOの生成は、対数期の成長を維持及び/又はほぼ維持するための十分な栄養物及び培地で本発明の非天然4-HB又はBDO生成生物体を培養することを含む。当該条件下の連続培養は、例えば、1日、2日、3日、4日、5日、6日又は7日以上を含むことができる。また、連続培養は、1週間、2週間、3週間、4週間又は5週間以上及び数カ月までを含むことができる。代替的に、本発明の生物体を、特定の用途に好適であれば数時間培養することができる。連続的及び/又はほぼ連続的な培養条件は、これらの例示的な時間の間すべての時間間隔を含むこともでき

ることが理解されるべきである。本発明の微生物体を培養する時間は、所望の目的のための十分な量の生成物を生成するのに十分な時間に対応することがさらに理解される。

【0156】

発酵手順は、当該技術分野で周知である。手短に述べると、本発明の4-HB、BDO又は他の4-HB誘導生成物の生合成生成のための発酵を、例えば、流加発酵及びバッチ分離；流加発酵及び連続分離、又は連続発酵及び連続分離に利用することができる。当該技術分野で周知のバッチ及び連続発酵手順を、以下の実施例にさらに例示する。

【0157】

それぞれ実質的な量のモノマー4-HB及びBDOの連続生成のために本発明の4-HB又はBDO生産体を使用する上記発酵手順に加えて、4-HB生産体に、例えば、モノマー4HBの例えばGBL、BDO及び/又はTHFへの化学的変換のための先述の化学合成手順を同時に施すことができる。同様に、BDO生産体に、例えば、BDOの例えばTHF、GBL、ピロリドン及び/又は他のBDO系統の化合物への化学的変換のための先述の化学合成手順を同時に施すことができる。加えて、4-HB及びBDO生産体の生成物を発酵培養物から分離し、続いて本明細書に開示されるように化学変換させることができる。

【0158】

手短に述べると、発酵肉汁におけるGBLの水素化を、Frostら、Biotechnology Progress 18:201-211(2002)に記載されているように実施することができる。発酵時の水素化のための別の手順は、例えば、米国特許第5,478,952号に記載されている方法を含む。この方法を以下の実施例にさらに例示する。

【0159】

したがって、本発明は、また、 γ -ブチロラクトン(GBL)、テトラヒドロフラン(THF)又は1,4-ブタンジオール(BDO)を製造する方法を提供する。該方法は、4-ヒドロキシブタン酸(4-HB)及び/又は1,4-ブタンジオール(BDO)生合成経路を有する非天然微生物体を発酵することを含み、該経路は、4-ヒドロキシブタノエートデヒドロゲナーゼ、CoA非依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、スクシニル-CoAシンテターゼ、CoA依存性セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、4-ヒドロキシブチレート:CoAトランスフェラーゼ、グルタメート:コハク酸セミアルデヒドトランスアミラーゼ、 α -ケトグルタレートデカルボキシラーゼ、グルタメートデカルボキシラーゼ、4-ヒドロキシブタノエートキナーゼ、ホスホトランスブチリラーゼ、CoA非依存性1,4-ブタンジオールセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、CoA依存性1,4-ブタンジオールセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、CoA非依存性1,4-ブタンジオールアルコールデヒドロゲナーゼ又はCoA依存性1,4-ブタンジオールアルコールデヒドロゲナーゼを、1,4-ブタンジオール(BDO)、GBL又はTHFを生成するための十分な時間にわたって実質的に嫌気性条件下でコードする少なくとも1つの外因性核酸を含み、該発酵は、流加発酵及びバッチ分離；流加発酵及び連続分離、又は連続発酵及び連続分離を含む。

【0160】

4-HB、BDO及び本明細書に記載の本発明の他の生成物に加えて、本発明の非天然微生物体及び方法を、互いの組合せ、及び当該技術分野で周知の他の微生物体及び方法との組合せで利用して、他の経路による生成物生合成を達成することができる。例えば、4-HB生産体及び化学的工程の使用、又はBDO生産体の直接的な使用以外のBDOを生成するための1つの別法は、4HB又は本明細書に例示される4-HB生成物をBDOに変換することが可能な別の微生物体を添加することによるものである。

【0161】

1つの当該手順は、例えば、以上及び以下に記載されている、4HBを生成するための本発明の4-HB生成微生物体の発酵を含む。次いで、4-HBを例えばBDO、GBL及び/又はTHFに変換する第2の微生物体に対する基質として使用することができる。4-HBを第2の生物体の別の培養物にそのまま添加するか、又は例えば細胞分離によって4-HB生産体の本来の培養物からこれらの微生物体を除去し、次いで第2の生物体の発酵肉汁への後の添加を利用して、中間精製工程を経ずに、最終生成物を生成することができる。BDOへの変換のために基質

として4-HBを生化学的に利用する能力を有する1つの例示的な第2の生物体は、例えばクロストリジウム・アセトブチリウムである(例えば、Jewellら、Current Microbiology、13: 215-19(1986)参照)。

【0162】

他の実施態様において、本発明の非天然微生物体及び方法を多種多様な小経路にて組み合わせ、例えば、記載の4-HB及び/又はBDOの生合成を達成することができる。これらの実施態様において、本発明の所望の生成物のための生合成経路を異なる微生物体に分離することができ、それらの異なる微生物体を同時培養して、最終生成物を生成することができる。当該生合成スキームにおいて、1つの微生物体の生成物は、最終生成物が合成されるまで第2の微生物体に対する基質である。例えば、1つの経路中間体を別の経路中間体又は生成物に変換する、例えば、外因性スクシネートなどの基質を、4-HBを介して最終生成物BDOに変換するための生合成経路を含む微生物体を変換することによって、BDOの生合成を先述のように達成することができる。代替的に、同じ容器内の2つの生物体を使用する同時培養又は同時発酵によりBDOを微生物体から生合成生成することもできる。第1の微生物体は、4-HBをコハク酸から生成する遺伝子を有する4-HB生産体であり、第2の微生物体は、4-HBをBDOに変換する遺伝子を有するBDO生産体である。

10

【0163】

本明細書に示される教示及び指針を考慮すると、当業者は、小経路を有する他の非天然微生物体の同時培養、並びに本発明の4-HB、BDO、GBL及びTHF生成物を生成するための当該技術分野で周知の他の化学及び/又は生化学的手順の組合せによる、他の微生物体とともに本発明の非天然微生物体及び方法に対する多種多様な組合せ及び置換が存在することを理解するであろう。

20

【0164】

より良好な生産体を生成するために、代謝モデル化を利用して成長条件を最適化することができる。モデル化を使用して、経路の利用をさらに最適化する遺伝子ノックアウトを設計することもできる(例えば、米国特許公開第2002/0012939号、同第2003/0224363号、同第2004/0029149号、同第2004/0072723号、同第2003/0059792号、同第2002/0168654号及び同第2004/0009466号並びに米国特許第7,127,379号参照)。モデル化分析は、代謝をBDOのより効率的な生成にシフトさせることの細胞成長に対する影響の確実な予測を可能にする。

30

【0165】

所望の生成物の生合成に有利である代謝変性を特定及び設計するための方法は、OptKnock計算フレームワークである(Burgardら、Biotechnol. Bioeng. 84:647-657(2003))。OptKnockは、目標生成物を過剰生成する遺伝子的に安定な微生物をもたらす遺伝子破壊又は欠失手法を示唆する代謝モデル化及びシミュレーションプログラムである。具体的には、該フレームワークは、所望の生化学物質を細胞成長の必須副産物にする遺伝子操作を示唆するために、微生物の完全代謝及び/又は生化学ネットワークを調査する。生化学的生成と細胞成長とを、戦略的に配置された遺伝子欠失又は他の機能的遺伝子破壊を介して組み合わせることによって、バイオリアクターにおける長時間の後に操作菌株に加えられた成長選択圧力は、強制的成長廉潔性化学的生成の結果として性能を向上させる。最後に、遺伝子欠失が構築されると、OptKnockによって選択された遺伝子がゲノムから完全に除去されることになるため、設計された菌株がそれらの野生型状態に復帰する可能性が無視できる。したがって、この計算手法は、所望の生成物の生合成をもたらす代替的経路を特定するために使用され得るか、又は所望の生成物の生合成のさらなる最適化のために非天然微生物体と併用され得る。

40

【0166】

手短に述べると、OptKnockは、本明細書では、細胞代謝をモデル化するための計算方法及びシステムを指すように使用される用語である。OptKnockプログラムは、特定の制約を流れ均衡分析(FBA)モデルに組み込むモデル及び方法のフレームワークに関する。これらの制約は、例えば、定性的動力学情報、定性的制御情報及び/又はDNAマイクロアレイ実験

50

データを含む。OptKnockは、また、例えば、流れ均衡モデルを介して誘導された流れ境界を緻密化し、続いて遺伝子付加又は欠失の存在下で代謝ネットワークの性能限界を探索することによって、様々な代謝上の問題に対する解を計算する。OptKnock計算フレームワークは、代謝ネットワークの性能限界の効果的な問い合わせを可能にするモデル公式の構築を可能にし、得られた混合整数線形プログラミング問題を解くための方法を提供する。本明細書においてOptKnockと称する代謝モデル化及びシミュレーション方法は、例えば、2002年1月10日に出願された米国公開第2002/0168654号、2002年1月10日に出願された国際特許第PCT/US02/00660号、及び2007年8月10日に出願された米国特許出願第11/891,602号に記載されている。

【0167】

生成物の生合成生成に有利である代謝変性を特定及び設計するための別の計算方法は、SimPheny(登録商標)という名称の代謝モデル化及びシミュレーションシステムである。この計算方法及びシステムは、例えば、2002年6月14日に出願された米国公開第2003/0233218号、及び2003年6月13日に出願された国際特許出願第PCT/US03/18838号に記載されている。SimPheny(登録商標)は、ネットワークモデルインシリコを生成し、生物系の化学反応を介して質量、エネルギー又は電荷の流れをシミュレートして、系における化学反応のあらゆる可能な官能基を含む溶液空間を画定することによって、生物系のための許容活性の範囲を決定するために使用できる計算システムである。この手法は、含まれる反応物の既知の化学量論組成などの制約、並びに反応を介する最大限の流れに伴う反応の熱力学及び容量の制約によって溶液空間が画定されるため、制約ベースのモデル化と呼ばれる。これらの制約によって画定される空間を調べて、生物系又はその生化学的成分の表現型機能及び挙動を確認することができる。

【0168】

これらの計算手法は、生物系が柔軟であり、多くの異なる方式で同じ結果に到達できるため、生物学的現実と一致する。生物系は、すべての生態系が直面しなければならない基本的な制約によって制限された進化的メカニズムを介して設計される。したがって、制約ベースのモデル化手法は、これらの包括的な現実を包含する。さらに、制約の緻密化を介してネットワークモデルに対してさらなる制限を連続的に加える能力は、溶液空間のサイズの縮小をもたらすことによって、生理学的性能又は表現型を予測できる精度を向上させる。

【0169】

本明細書に示される教示及び指針を考慮すると、当業者は、宿主微生物体において所望の化合物の生合成を設計及び実装する代謝モデル化及びシミュレーションのための様々な計算フレームワークを適用することが可能になる。当該代謝モデル化及びシミュレーション方法は、例えば、SimPheny(登録商標)及びOptKnockとして以上に例示した計算システムを含む。本発明を例示するために、モデル化及びシミュレーションのためのOptKnock計算フレームワークに関していくつかの方法を本明細書に記載する。当業者は、OptKnockを使用する代謝変性の特定、設計及び実装を当該技術分野で周知の当該他の代謝モデル化及びシミュレーション計算フレームワークのいずれかに適用する方法を把握するであろう。

【0170】

上記方法は、破壊する代謝反応の1つの集合体を提供することになる。その集合体又は代謝修飾内の各反応を消滅させると、生物体の成長期を通じて、必須生成物としての所望の生成物を得ることができる。反応が既知であるため、二層のOptKnock問題の解は、また、反応物の集合体内の各反応を触媒する1つ以上の酵素をコードする1つ以上の付随遺伝子を提供することになる。反応の集合体、及び各反応に参加する酵素をコードするそれらの対応する遺伝子の特定は、一般には、酵素と符号化遺伝子との関係を有する反応データベースによる反応の関連づけを介して実施される。

【0171】

いったん特定されると、所望の生成物の生成を達成するために破壊されることになる反応の集合体が、集合体内の各代謝反応をコードする少なくとも1つの遺伝子の機能的破壊

10

20

30

40

50

によって標的細胞又は生物体に実装される。反応集合体の機能的破壊を達成する1つの特に有用な手段は、各コード化遺伝子の除去によるものである。しかし、場合によっては、例えば、プロモーターなどの制御領域又は制御因子に対するシス結合部位の変異、除去を含む他の遺伝子異常によって、或いは多くの箇所のいずれかにおけるコード化配列の切断によって反応を破壊することが有益であり得る。例えば、生成物の連結の迅速な評価が所望される場合、又は遺伝子逆転が起こりそうもない場合に、遺伝子を完全に破壊させないこれらの後者の異常が有益であり得る。

【0172】

所望の生成物の成長連結生合成を含む生合成をもたらすことができる、破壊すべき反応又は代謝修飾のさらなる集合体を招く上記二層OptKnock問題に対するさらなる生産的解を特定するために、整数カットという名称の最適化方法を実施することができる。この方法は、各回において整数カットと呼ばれる追加的な制約を組み込みながら、以上に例示したOptKnock問題を反復的に解くことによって進行する。整数カット制約は、解法手順が、生成物生合成を成長に強制的に連結させる、任意の先の回において特定された全く同一の反応集合体を選択するのを効果的に防止する。例えば、既に特定された成長連結代謝修飾が、破壊のための反応1、2及び3を指定すると、次の制約は、後の解に同じ反応が同時に考慮されることを防止する。整数カット法は、当該技術分野で周知であり、例えば、Burgardら、Biotechnol. Prog. 17:791-797(2001)に見いだされ得る。代謝モデル化及びシミュレーションのためのOptKnock計算フレームワークとそれらの併用に関して本明細書に記載されているすべての方法と同様に、反復的計算分析における冗長性を低減する整数カット法を、例えばSimPheny(登録商標)を含む当該技術分野で周知の他の計算フレームワークに適用することができる。

【0173】

本明細書に例示される方法は、特定された遺伝子変性を含むように操作された細胞又は生物体の成長に対する標的生化学生成物の生成の強制連結を含む、所望の生成物を生合成生成する細胞及び生物体の構築を可能にする。したがって、本明細書に記載の計算方法は、OptKnock又はSimPheny(登録商標)から選択されるインシリコ法によって特定される代謝修飾の特定及び実現を可能にする。代謝修飾の集合体は、例えば、1つ以上の生合成経路酵素の添加、及び/又は例えば遺伝子欠失による破壊を含む1つ以上の代謝反応の機能的破壊を含むことができる。

【0174】

上述のように、1つのOptKnock手法は、変異微生物ネットワークが、長時間の成長選択に曝されると、それらの計算により推定された最大成長表現型の方に進化し得ることを前提として開発された。換言すると、そのアプローチは、選択的圧力下で自己最適化する生物体の能力を強化する。OptKnockフレームワークは、ネットワーク化学量論組成に基づく生化学的生成と細胞成長との連結を強制する遺伝子欠失の組合せの網羅的列挙を可能にする。最適遺伝子/反応ノックアウトの特定は、得られたネットワークに対する最適な成長溶液が興味深い生化学物質を過剰生成するように活性反応の集合体を選択する二層最適化問題の解を必要とする(Burgardら、Biotechnol. Bioeng. 84:647-657(2003))。

【0175】

大腸菌代謝のインシリコ化学量論モデルを採用して、既に例示されており、且つ例えば、米国特許公開第2002/0012939号、同第2003/0224363号、同第2004/0029149号、同第2004/0072723号、同第2003/0059792号、同第2002/0168654号及び同第2004/0009466号並びに米国特許第7,127,379号に記載されている代謝経路のための必須遺伝子を特定することができる。本明細書に開示されるように、OptKnock数理フレームワークを適用して、所望の生成物の成長連結生成をもたらす遺伝子欠失を正確に指摘することができる。さらに、二層OptKnock問題の解は、欠失の1つの集合体のみを提供する。すべての有意味の解、即ち成長連結生成形成をもたらすノックアウトのすべての集合体を列挙するために、整数カットという名称の最適化技術を実施することができる。これは、上述のように、各回において整数カットと称する追加的な制約を組み込みながらOptKnock問題を反復的に解くことを含

む。

【0176】

以上に例示された方法及び以下の実施例にさらに示される方法は、特定された遺伝子変性を含むように操作された細胞又は生物体の成長に対する標的生化生成物の強制連結性を含む生合成生成を行う細胞及び生物体の構築を可能にする。この点において、代謝変性は、4-HB及び1,4-ブタンジオールの生合成をもたらす代謝変性が特定された。特定された代謝変性を用いて構築された微生物株は、非修飾微生物体と比較して、高量の4-HB又はBDOを生成する。これらの菌株を、有利には、例えば、負の選択圧力に曝すことなく、4-HB、BDO、THF及びGBLの商業的生産に使用することができる。

【0177】

したがって、本明細書に記載の計算方法は、OptKnock又はSimPheny(登録商標)から選択されるインシリコ法によって特定される代謝修飾の特定及び実現を可能にする。代謝修飾の集合体は、例えば、1つ以上の生合成経路酵素の付加、及び/又は例えば遺伝子欠失による破壊を含む1つ以上の代謝反応の機能的破壊を含むことができる。

【0178】

本発明の様々な実施態様の活性に実質的に影響を与える修飾も本明細書に示される本発明の定義内に含まれることが理解される。よって、以下の実施例は、本発明を例示することを意図し、限定するものではない。

【0179】

本明細書に記載の非天然微生物体のいずれかを培養して、本発明の生合成生成物を生成及び/又は分泌することができる。例えば、BDO生産体をBDOの生合成生成のために培養することができる。

【0180】

BDOの生成のために、組換え菌株を炭素源及び他の必須栄養物とともに培地で培養する。プロセス全体のコストを低減するために発酵槽に嫌気性条件を維持することが大いに望ましい。例えば、最初に培地に窒素を散布し、次いでフラスコを核膜及びクリンプキャップで密栓することによって当該条件を得ることができる。嫌氣的に成長が観察されない菌株では、限定された通気のために核膜に小穴をあけることによって微好気性条件を適用することができる。例示的な嫌気性条件は、既に記載されており、当該技術分野で周知である。例示的な好気性及び嫌気性条件は、例えば、2007年8月10日に出願された米国出願公開第2009/0047719号に記載されている。発酵を、本明細書に開示されているように、バッチ式、流加又は連続法で実施することができる。

【0181】

望まれる場合は、培地を望ましいpHに維持する必要に応じて、NaOH又は他の塩基などの塩基或いは酸を添加することによって培地のpHを所望のpH、特に7付近のpHなどの中性のpHに維持することができる。分光光度計(600nm)を使用して光学密度を測定することによって成長速度を測定し、経時的な炭素源消耗を監視することによってグルコース取込み速度を測定することができる。

【0182】

以上に例示されているものなどの再生可能原料に加えて、本発明のBDO生成微生物体とその炭素源としてのシンガス上での成長のために修飾することができる。この具体的な実施態様において、1つ以上のタンパク質又は酵素をBDO生成生物体に発現させて、シンガス又は他の気体炭素源を利用するための代謝経路を提供する。

【0183】

シンガス又は生産体ガスとしても既知である合成ガスは、石炭、並びに農業作物及び残留物を含むバイオマス材料などの炭素質材料のガス化の主な生成物である。シンガスは、主に、 H_2 とCOの混合物であり、石炭、石炭油、天然ガス、バイオマス及び廃棄有機物を含むが、それらに限定されない任意の有機原料のガス化から得ることが可能である。ガス化は、一般には、高い燃料対酸素比の下で実施される。多くが H_2 及びCOであるが、シンガスは、 CO_2 及び他のガスを少量で含むこともできる。したがって、合成ガスは、CO及びさら

10

20

30

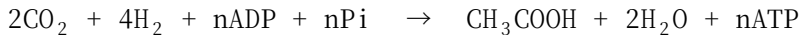
40

50

にはCO₂などのコスト効率の高い気体炭素源を提供する。

【0184】

Wood-Ljungdahl経路は、CO及びH₂のアセチル-CoA及びアセテートなどの他の生成物への変換を触媒する。CO及びシンガスを利用することが可能な生物体は、一般には、Wood-Ljungdahl経路によって包含される酵素及び形質転換の同じ集合体を介してCO₂及びCO₂/H₂混合物を利用する能力をも有する。微生物によるCO₂のアセテートへのH₂依存性変換は、COを同じ生物体によって利用することも可能であること、及び同じ経路が関与することが明らかになったのは前にも認識されていた。多くのアセトゲンは、CO₂の存在下で成長し、必要な還元当量を供給するための水素が存在する限りアセテートなどの化合物を生成することが証明された(例えば、Drake、Acetogenesis、pp. 3-60 Chapman及びHall、New York、(1994)参照)。これを以下の式で要約することができる。



したがって、Wood-Ljungdahl経路を有する非天然微生物は、アセチル-CoA及び他の所望の生成物を生成するためにCO₂とH₂の混合物をも利用することができる。

【0185】

Wood-Ljungdahl経路は、当該技術分野で周知であり、2つのブランチ、即ち(1)メチルブランチ及び(2)カルボニルブランチに分けることができる12の反応からなる。メチルブランチは、シンガスをメチル-テトラヒドロホレート(メチル-THF)に変換するのに対して、カルボニルブランチは、メチル-THFをアセチル-CoAに変換する。メチルブランチにおける反応は、以下の酵素又はタンパク質:フェレドキシンオキシドレダクターゼ、ホルメートデヒドロゲナーゼ、ホルミルテトラヒドロホレートシンテターゼ、メチニルテトラヒドロホレートシクロデヒドラターゼ、メチレンテトラヒドロホレートデヒドロゲナーゼ及びメチレンテトラヒドロホレートレダクターゼによって順に触媒される。カルボニルブランチにおける反応は、以下の酵素又はタンパク質:メチルテトラヒドロホレート:コリノイドタンパク質メチルトランスフェラーゼ(例えばAcsE)、コリノイド鉄-硫黄タンパク質、ニッケル-タンパク質アセンブリタンパク質(例えばAcsF)、フェレドキシン、アセチル-CoAシンテターゼ、一酸化炭素デヒドロゲナーゼ及びニッケル-タンパク質アセンブリタンパク質(例えばCooC)によって順に触媒される。BDO経路を生成するための十分な数のコード化核酸を導入するための本明細書に示される教示及び指針に従って、当業者は、少なくとも、宿主生物体に存在しないWood-Ljungdahl酵素又はタンパク質をコードする核酸を導入することに関して、同じ操作設計を実施できることを理解するであろう。したがって、修飾生物体が完全なWood-Ljungdahl経路を含むように、1つ以上のコード化核酸を本発明の微生物体に導入するとシンガス利用能力が付与されることになる。

【0186】

よって、本明細書に示される教示及び指針を考慮して、当業者は、炭水化物などの炭素源上で成長させると、本発明の生合成化合物を分泌する非天然微生物体を生成できることが理解される。当該化合物は、例えば、BDO及びBDO経路における中間代謝物質のいずれかを含む。必要なことは、必要とされる酵素又はタンパク質活性の1種以上を操作して、例えば、BDO生合成経路の一部又はすべてを含む所望の化合物又は中間体の生合成を達成することだけである。よって、本発明は、炭水化物又は他の炭素源上で成長させると生成及び/又は分泌し、炭水化物又は他の炭素源上で成長させるとBDO経路に示される中間代謝物質のいずれかを生成及び/又は分泌する非天然微生物体を提供する。本発明のBDO生成微生物体は、本明細書に開示されるように、BDO経路における中間体から合成を開始することができる。

【0187】

より良好な生産体を生成するために、代謝モデル化を利用して成長条件を最適化することができる。モデル化を使用して、経路の利用をさらに最適化する遺伝子ノックアウトを設計することもできる(例えば、米国特許公開第2002/0012939号、同第2003/0224363号、同第2004/0029149号、同第2004/0072723号、同第2003/0059792号、同第2002/0168654号及び同第2004/0009466号並びに米国特許第7,127,379号参照)。モデル化分析は、代謝をBDO

のより効率的な生成にシフトさせることの細胞成長に対する影響の確実な予測を可能にする。

【0188】

所望の生成物の生合成に有利である代謝変性を特定及び設計するための方法は、OptKnock計算フレームワークである(Burgardら、Biotechnol. Bioeng. 84:647-657(2003))。OptKnockは、目標生成物を過剰生成する遺伝子的に安定な微生物をもたらす遺伝子欠失手法を示唆する代謝モデル化及びシミュレーションプログラムである。具体的には、該フレームワークは、所望の生化学物質を細胞成長の必須副産物にする遺伝子操作を示唆するために、微生物の完全代謝及び/又は生化学ネットワークを調査する。生化学的生成と細胞成長とを、戦略的に配置された遺伝子欠失又は他の機能的遺伝子破壊を介して組み合わせることによって、バイオリアクターにおける長時間の後に操作菌株に加えられた成長選択圧力は、強制成長廉潔性化学的生成の結果として性能を向上させる。最後に、遺伝子欠失が構築されると、OptKnockによって選択された遺伝子がゲノムから完全に除去されることになるため、設計された菌株がそれらの野生型状態に復帰する可能性が無視できる。したがって、この計算手法は、所望の生成物の生合成をもたらす代替的経路を特定するために使用され得るか、又は所望の生成物の生合成のさらなる最適化のために非天然微生物体と併用され得る。

10

【0189】

手短に述べると、OptKnockは、本明細書では、細胞代謝をモデル化するための計算方法及びシステムを指すように使用される用語である。OptKnockプログラムは、特定の制約を流れ均衡分析(FBA)モデルに組み込むモデル及び方法のフレームワークに関する。これらの制約は、例えば、定性的動力学情報、定性的制御情報及び/又はDNAマイクロアレイ実験データを含む。OptKnockは、また、例えば、流れ均衡モデルを介して誘導された流れ境界を緻密化し、続いて遺伝子付加又は欠失の存在下で代謝ネットワークの性能限界を探索することによって、様々な代謝上の問題に対する解を計算する。OptKnock計算フレームワークは、代謝ネットワークの性能限界の効果的な問い合わせを可能にするモデル公式の構築を可能にし、得られた混合整数線形プログラミング問題を解くための方法を提供する。本明細書においてOptKnockと称する代謝モデル化及びシミュレーション方法は、例えば、2002年1月10日に出願された米国公開第2002/0168654号、2002年1月10日に出願された国際特許第PCT/US02/00660号、及び2007年8月10日に出願された米国特許出願第11/891,602号に記載されている。

20

30

【0190】

生成物の生合成生成に有利である代謝変性を特定及び設計するための別の計算方法は、SimPheny(登録商標)という名称の代謝モデル化及びシミュレーションシステムである。この計算方法及びシステムは、例えば、2002年6月14日に出願された米国公開第2003/0233218号、及び2003年6月13日に出願された国際特許出願第PCT/US03/18838号に記載されている。SimPheny(登録商標)は、ネットワークモデルインシリコを生成し、生物系の化学反応を介して質量、エネルギー又は電荷の流れをシミュレートして、系における化学反応のあらゆる可能な官能基を含む溶液空間を画定することによって、生物系のための許容活性の範囲を決定するために使用できる計算システムである。この手法は、含まれる反応物の既知の化学量論組成などの制約、並びに反応を介する最大限の流れに伴う反応の熱力学及び容量の制約によって溶液空間が画定されるため、制約ベースのモデル化と呼ばれる。これらの制約によって画定される空間を調べて、生物系又はその生化学的成分の表現型機能及び挙動を確認することができる。

40

【0191】

これらの計算手法は、生物系が柔軟であり、多くの異なる方式で同じ結果に到達できるため、生物学的現実と一致する。生物系は、すべての生態系が直面しなければならない基本的な制約によって制限された進化的メカニズムを介して設計される。したがって、制約ベースのモデル化手法は、これらの包括的な現実を包含する。さらに、制約の緻密化を介してネットワークモデルに対してさらなる制限を連続的に加える能力は、溶液空間のサイ

50

ズの縮小をもたらすことによって、生理学的性能又は表現型を予測できる精度を向上させる。

【0192】

本明細書に示される教示及び指針を考慮すると、当業者は、宿主微生物体において所望の化合物の生合成を設計及び実装する代謝モデル化及びシミュレーションのための様々な計算フレームワークを適用することが可能になる。当該代謝モデル化及びシミュレーション方法は、例えば、SimPheny(登録商標)及びOptKnockとして以上に例示した計算システムを含む。本発明を例示するために、モデル化及びシミュレーションのためのOptKnock計算フレームワークに関していくつかの方法を本明細書に記載する。当業者は、OptKnockを使用する代謝変性の特定、設計及び実装を当該技術分野で周知の当該他の代謝モデル化及びシミュレーション計算フレームワークのいずれかに適用する方法を把握するであろう。

10

【0193】

上記方法は、破壊する代謝反応の1つの集合体を提供することになる。その集合体又は代謝修飾内の各反応を消滅させると、生物体の成長期を通じて、必須生成物としての所望の生成物を得ることができる。反応が既知であるため、二層のOptKnock問題の解は、また、反応物の集合体内の各反応を触媒する1つ以上の酵素をコードする1つ以上の付随遺伝子を提供することになる。反応の集合体、及び各反応に参加する酵素をコードするそれらの対応する遺伝子の特定は、一般には、酵素と符号化遺伝子との関係を有する反応データベースによる反応の関連づけを介して実施される。

20

【0194】

いったん特定されると、所望の生成物の生成を達成するために破壊されることになる反応の集合体が、集合体内の各代謝反応をコードする少なくとも1つの遺伝子の機能的破壊によって標的細胞又は生物体の実装される。反応集合体の機能的破壊を達成する1つの特に有用な手段は、各コード化遺伝子の除去によるものである。しかし、場合によっては、例えば、プロモーターなどの制御領域又は制御因子に対するシス結合部位の変異、除去を含む他の遺伝子異常によって、或いは多くの箇所のいずれかにおけるコード化配列の切断によって反応を破壊することが有益であり得る。例えば、生成物の迅速な評価が所望される場合、又は遺伝子逆転が起こりそうもない場合に、遺伝子を完全に破壊させないこれらの後者の異常が有益であり得る。

30

【0195】

所望の生成物の成長連結生合成を含む生合成をもたらすことができる、破壊すべき反応又は代謝修飾のさらなる集合体を招く上記二層OptKnock問題に対するさらなる生産的解を特定するために、整数カットという名称の最適化方法を実施することができる。この方法は、各回において整数カットと呼ばれる追加的な制約を組み込みながら、以上に例示したOptKnock問題を反復的に解くことによって進行する。整数カット制約は、解法手順が、生成物生合成を成長に強制的に連結させる、任意の先の回において特定された全く同一の反応集合体を選択するのを効果的に防止する。例えば、既に特定された成長連結代謝修飾が、破壊のための反応1、2及び3を指定すると、次の制約は、後の解に同じ反応が同時に考慮されることを防止する。整数カット法は、当該技術分野で周知であり、例えば、Burgardら、Biotechnol. Prog. 17:791-797(2001)に見いだされ得る。代謝モデル化及びシミュレーションのためのOptKnock計算フレームワークとそれらの併用に関して本明細書に記載されているすべての方法と同様に、反復的計算分析における冗長性を低減する整数カット法を、例えばSimPheny(登録商標)を含む当該技術分野で周知の他の計算フレームワークに適用することができる。

40

【0196】

本明細書に例示される方法は、特定された遺伝子変性を含むように操作された細胞又は生物体の成長に対する標的生化学生成物の生成の強制連結を含む、所望の生成物を生合成生成する細胞及び生物体の構築を可能にする。したがって、本明細書に記載の計算方法は、OptKnock又はSimPheny(登録商標)から選択されるインシリコ法によって特定される代謝修飾の特定及び実現を可能にする。代謝修飾の集合体は、例えば、1つ以上の生合成経路

50

酵素の添加、及び/又は例えば遺伝子欠失による破壊を含む1つ以上の代謝反応の機能的破壊を含むことができる。

【0197】

上述のように、1つのOptKnock手法は、変異微生物ネットワークが、長時間の成長選択に曝されると、それらの計算により推定された最大成長表現型の方に進化し得ることを前提として開発された。換言すると、そのアプローチは、選択的圧力下で自己最適化する生物体の能力を強化する。OptKnockフレームワークは、ネットワーク化学量論組成に基づく生化学的生成と細胞成長との連結を強制する遺伝子欠失の組合せの網羅的列挙を可能にする。最適遺伝子/反応ロックアウトの特定は、得られたネットワークに対する最適な成長溶液が興味深い生化学物質を過剰生成するように活性反応の集合体を選択する二層最適化問題の解を必要とする(Burgardら、Biotechnol. Bioeng. 84:647-657(2003))。

10

【0198】

大腸菌代謝のインシリコ化学量論モデルを採用して、既に例示されており、且つ例えば、米国特許公開第2002/0012939号、同第2003/0224363号、同第2004/0029149号、同第2004/0072723号、同第2003/0059792号、同第2002/0168654号及び同第2004/0009466号並びに米国特許第7,127,379号に記載されている代謝経路のための必須遺伝子を特定することができる。本明細書に開示されるように、OptKnock数理フレームワークを適用して、所望の生成物の成長連結生成をもたらす遺伝子欠失を正確に指摘することができる。さらに、二層OptKnock問題の解は、欠失の1つの集合体のみを提供する。すべての有意味の解、即ち成長連結生成形成をもたらすロックアウトのすべての集合体を列挙するために、整数カットという名称の最適化技術を実施することができる。これは、上述のように、各回において整数カットと称する追加的な制約を組み込みながらOptKnock問題を反復的に解くことを含む。

20

【0199】

本発明の様々な実施態様の活性に実質的に影響を与えない修飾も、本明細書に示される発明の定義内で提供されることが理解される。よって、以下の実施例は、本発明を例示するものであり、限定しないことを意図する。

【実施例】

【0200】

(実施例I)

30

(4-ヒドロキシブタン酸の生合成)

本実施例では、4-HB生成のための例示的な生化学合成経路について記載する。

【0201】

微生物における4-HB合成についてのこれまでの報告は、生分解性プラスチックヒドロキシアルカノエート(PHA)の製造における中間体としてのこの化合物に焦点をおいていた(米国特許第6,117,658号)。ポリ-3-ヒドロキシブチレートポリマー(PHB)に対して4-HB/3-HBコポリマーを使用すると、より脆性の小さいプラスチックを得ることができる(Saito及びDoi、Intl. J. Biol. Macromol, 16:99-104 (1994))。本明細書に記載のモノマー4-HBの製造は、いくつかの理由で基本的に独特の方法である。(1)生成物は、細胞内で生成され、細胞に留まるPHAと異なり分泌される。(2)ヒドロキシブタノエートポリマーを生成する生物体では、遊離4-HBが生成されず、補酵素A誘導体がポリヒドロキシアルカノエートシンターゼによって使用される。(3)ポリマーの場合は、顆粒状生成物の形成が熱力学を変化させる。(4)細胞外pHは、ポリマーの生成にとって重要でないが、4-HBが遊離酸の状態で存在するか共役塩基状態で存在するかということ、並びに4-HBとGBLの平衡に影響を与えることになる。

40

【0202】

4-HBを、コハク酸セミアルデヒドを中間体として、TCA回路の中心代謝物質であるスクシネートから2つの酵素還元工程で生成することができる(図1)。これらの酵素の第1の酵素、即ちコハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼは、NADH及びNADPH依存性酵素が見いだされた大腸菌を含む多くの生物体に固有である(Donnelly及びCooper、Eur. J. Biochem

50

. 113:555-561(1981);Donnelly及びCooper、J. Bacteriol. 145:1425-1427(1981);Marek 及びHenson、J. Bacteriol 170:991-994(1988))。S.セレビスシアエにおけるコハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を上げる証拠も存在し(Ramosら、Eur. J. Biochem. 149:401-404(1985))、配列相同性によって推定上の遺伝子が特定された。しかし、たいていの報告は、この酵素が、図1に示されるスクシネート合成の方向に進み(Donnelly及びCooper、前出;Lutke-Eversloh及びSteinbuchel、FEMS Microbiol. Lett.181:63-71(1999))、4-HB及びガンマ-アミノブチレートの分解経路に参加することを示している。

コハク酸セミアルデヒドは、また、グルタメート:コハク酸セミアルデヒドトランスアミナーゼ及びグルタメートデカルボキシラーゼの2つの酵素の作用によりTCA回路中間体 α -ケトグルタレートを紹介して大腸菌などの特定の微生物体によって自然に生成される。スクシネートを分解するために必須の嫌気性菌クロストリジウム・クルイベリによって使用される代替的経路は、スクシネートをスクシニル-CoAに活性化させ、次いでこの方向に機能することが知られる代替的コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼを使用してスクシニル-CoAをコハク酸セミアルデヒドに変換する(Sohling及びGottschalk、Eur. J. Biochem. 212:121-127(1993))。しかし、この経路は、スクシネートをスクシニル-CoAに変換するのに必要とされるATPのエネルギーコストを有する。

【0203】

経路の第2の酵素、即ち4-ヒドロキシブタノエートデヒドロゲナーゼは、大腸菌又は酵母に固有でなく、C.クルイベリ及びラルストニア・ユートロファなどの様々な細菌に見いだされる(Lutke-Eversloh及びSteinbuchel、前出;Sohling及びGottschalk、J. Bacteriol . 178:871-880(1996);Valentinら、Eur. J. Biochem. 227:43-60(1995);Wolff及びKenealy、Protein Expr. Purif. 6:206-212(1995))。これらの酵素は、NADH依存性であることが知られるが、NADPH依存型も存在する。アルファ-ケトグルタレートから4-HBへのさらなる経路が大腸菌においてポリ(4-ヒドロキシ酪酸)を蓄積させることが実証された(Songら、W ei Sheng Wu Xue. Bao. 45:382-386(2005))。組換え菌株は、2つの原生大腸菌遺伝子:グルタメート:コハク酸セミアルデヒドトランスアミナーゼ及びグルタメートデカルボキシラーゼとともに、3つの異種遺伝子:PHAシンターゼ(R.ユートロファ)、4-ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼ(R.ユートロファ)及び4-ヒドロキシブチレート:CoAトランスフェラーゼ(C.クルイベリ)の過剰発現を必要とした。代替的に、図1の工程4及び5を、ユーグレナ・グラシリスに特定されるものなどのアルファ-ケトグルタレートデカルボキシラーゼによって実施することができる(Shigeokaら、Biochem. J. 282(Pt2):319-323(1992);Shigeoka及びNakano、Arch. Biochem. Biophys. 288:22-28(1991);Shigeoka及びNakano、Biochem J. 292(Pt 2):463-467(1993))。しかし、この酵素は既に適用されて、何らかの生物体における4-HB又は関連ポリマーの生成に影響を及ぼした。

【0204】

各生物体のインシリコ代謝モデルを使用して、エシェリキア・コリ及びサッカロマイセス・セレビスシアエの2つの微生物における微生物の4-ヒドロキシブチレートの生成機能を調べた。4-HBへの潜在的な経路は、スクシネート、スクシニル-CoA、又は図1に示されるアルファ-ケトグルタレート中間体を介して進行する。

【0205】

スクシネートからの4-HB生成経路における第1の工程は、NADH又はNADPH依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼを介するスクシネートのコハク酸セミアルデヒドへの変換を含む。大腸菌において、gabDは、NADP依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼであり、4-アミノブチレート取込み及び分解に関与する遺伝子集団の一部である(Niegemannら、Arch. Microbiol. 160:454-460(1993);Schneiderら、J.Bacteriol. 184:6976-6986(2002))。sadは、NAD依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性(Marek及びHenson、前出)に対する酵素をコードすると考えられる。S.セレビスシアエは、サイトソルに集まる、推定上UGA2に割り当てられたNADPH依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼのみを含む(Huhら、Nature 425:686-691(2003))。大腸菌及びS.セレビスシアエの両方における4-HBへのスクシネート経路を想定する最大収率計算は、非原生4-HBデヒドロゲナ

ーゼがそれらの代謝ネットワークに加えられたという前提のみを必要とする。

【0206】

スクシニル-CoAから4-ヒドロキシブチレートへの経路が、4-ヒドロキシブチレートモノマー単位を含むポリヒドロキシアルカノエートを製造するための方法の一部として、米国特許第6,117,658号に記載された。クロストリジウム・クルイベリは、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有することが知られる1つの生物体の例である(Sohling及びGottschalk、前出;Sohling及びGottschalk、前出)。この調査において、C.クルイベリ又は別の生物体のこの酵素は、スクシニル-CoAから4-HBへの経路を完成するために非原生又は異種4-HBデヒドロゲナーゼとともに大腸菌又はS.セレビスシアエに発現される。4-HBへのアルファ-ケトグルタレートの経路は、大腸菌においてポリ(4-ヒドロキシ酪酸)を乾燥細胞重量の30%まで蓄積させることが証明された(Songら、前出)。大腸菌及びS.セレビスシアエは、グルタメート:コハク酸セミアルデヒドトランスアミナーゼ及びグルタメートデカルボキシラーゼを自然又は内因的に有するため(Colemanら、J. Biol. Chem. 276:244-250(2001))、非原生4-HBデヒドロゲナーゼが存在することのみを想定することによって、AKGから4-HBへの経路を両方の生物体に完成することができる。

10

【0207】

(実施例II)

(スクシネート及びアルファ-ケトグルタレートからの1,4-ブタンジオールの生合成)

本実施例では、微生物体からの4-HB及びBDOの構築及び生合成生成を例示する。4-HB及びBDOのための経路は、本明細書に開示されている。

20

【0208】

上記経路に利用できるいくつかの代替的な酵素が存在する。スクシネートをスクシニル-CoAに変換するための原生又は内因性酵素(図1の工程1)の代わりに、工程9と同様に機能する、cat1遺伝子C.クルイベリによってコードされたCoAトランスフェラーゼを使用することができる(Sohling及びGottschalk、Eur. J Biochem. 212:121-127(1993))。しかし、この酵素によるアセテートの生成は、それがアセチル-CoAに逆変換されるのではなく、分泌され得るため、最適であり得ない。この点において、工程9におけるアセテート形成を除外することも有利であり得る。CoAトランスフェラーゼに対する1つの代替として、4-HBを最初にATPによってリン酸化し、次いでアセテートのアセチルCoAへの変換のための大腸菌におけるアセテートキナーゼ/ホスホトランスアセチラーゼ経路と同様にCoA誘導体に変換するメカニズムを採用することができる。この経路の正味のコストは、アセチル-CoAをアセテートから再生するのに必要とされるのと同じである1つのATPである。酵素ホスホトランスブチリラーゼ(ptb)及びブチレートキナーゼ(bk)は、C.アセトブチリクムにおけるブチレート生成のために非ヒドロキシル化分子に対してこれらの工程を実施することが知られる(Caryら、Appl Environ Microbiol 56:1576-1583(1990);Valentine, R. C.及びR. S. Wolfe、J Biol Chem. 235:1948-1952(1960))。これらの酵素は可逆的であり、合成が4-HBの方向に進行することを可能にする。

30

【0209】

スクシネートに加えて、又はスクシネートの代わりにアルファ-ケトグルタレートを介してBDOを生成することもできる。既に記載し、以下にさらに例示するように、生成物生合成を実施するための1つの経路は、内因性酵素を使用して、 α -ケトグルタレートを介してコハク酸セミアルデヒドを生成することである(図1、工程4~5)、別法は、この変換を1つの工程で実施することができる α -ケトグルタレートデカルボキシラーゼを使用することである(図1、工程8;Tianら、Proc Natl Acad Sci US. A 102:10670-10675(2005))。

40

【0210】

BDO生成微生物体の異なる菌株を構築するために、確認のために適用可能な遺伝子の一覧を結集させた。手短に述べると、4-HB及び/又はBDO生合成経路内の1つ以上の遺伝子を利用可能な文献情報源、NCBI遺伝子データベース及び同族体検索を使用して、図1に示される完全なBDO生合成経路の工程毎に特定した。この研究でクローン化及び評価された遺伝子を、ポリペプチド配列の適切な文献及びURL引用とともに以下の表6に示す。さらに以

50

下に記載されるように、いくつかの遺伝子をコドン最適化のために合成し、他の遺伝子を、原生又は野生型生物体のゲノムDNAからPCRを介してクローン化した。遺伝子によっては、両方のアプローチを使用した。この場合、原生遺伝子は、実験に使用される際に、遺伝子識別番号に対する添字「n」によって示される。DNA配列のみが相違し、タンパク質は同一であることに留意されたい。

【表 6】

表6. 宿主BDO産生微生物において発現される遺伝子

遺伝子ID 番号	反応番号 (図1)	遺伝子 名	微生物源	酵素名	タンパク質配列のリンク先	参照番号
0001	9	Cat2	クロストリジウム クルイペリ DSM555	4-ヒドロキシ酪酸 補酵素A トランスフェラーゼ	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?db=nucore&id= 1228100	1
0002	12/13	adhE	クロストリジウム アセトブチリウム ATCC824	アルデヒド/アルコール デヒドロゲナーゼ	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?db=protein&val= 15004739	2
0003	12/13	adhE2	クロストリジウム アセトブチリウム ATCC824	アルデヒド/アルコール デヒドロゲナーゼ	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?val=NP_149325. 1	2
0004	1	Cat1	クロストリジウム クルイペリ DSM555	コハク酸 補酵素A トランスフェラーゼ	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?db=nucore&id= 1228100	1
0008	6	sucD	クロストリジウム クルイペリ DSM555	コハク酸 セミアルデヒド デヒドロゲナーゼ (CoA-依存性)	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?db=nucore&id= 1228100	1
0009	7	4-HBd	ラリストニア ユートロファH16	4-ヒドロキシ酪酸 デヒドロゲナーゼ (NAD-依存性)	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?val=YP_726053. 1	2
0010	7	4-HBd	クロストリジウム クルイペリ DSM555	4-ヒドロキシ酪酸 デヒドロゲナーゼ (NAD-依存性)	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?db=nucore&id= 1228100	1
0011	12/13	adhE	<i>E.コリ</i>	アルデヒド/アルコール デヒドロゲナーゼ	www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/pe c/genes.List.DetailAction.do?f romListFlag=true&featureTyp e=1&orfId=1219	
0012	12/13	yqhD	<i>E.コリ</i>	アルデヒド/アルコール デヒドロゲナーゼ	www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/pe c/genes.List.DetailAction.do	
0013	13	bdhB	クロストリジウム アセトブチリウム ATCC824	ブタノール デヒドロゲナーゼII	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?val=NP_349891. 1	2
0020	11	ptb	クロストリジウム アセトブチリウム ATCC824	ホスホトランス ブチラーゼ	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?db=protein&id=1 5896327	2
0021	10	buk1	クロストリジウム アセトブチリウム ATCC824	酪酸キナーゼI	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?db=protein&id=2 0137334	2
0022	10	buk2	クロストリジウム アセトブチリウム ATCC824	酪酸キナーゼII	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?db=protein&id=2 0137415	2
0023	13	adhEm	嫌気性汚水 消化微生物 コンソーシアの メタライブラリ から単離	アルコール デヒドロゲナーゼ		(37)d}
0024	13	adhE	クロストリジウム テルモセルム	アルコール デヒドロゲナーゼ	www.genome.jp/dbget- bin/www_bget?cth:Cthe_0423	
0025	13	ald	クロストリジウム ベージェリンキー	補酵素 A-アシル化アルデヒド デヒドロゲナーゼ	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?db=protein&id=4 9036681	(31)d}
0026	13	bdhA	クロストリジウム アセトブチリウム ATCC824	ブタノール デヒドロゲナーゼ	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?val=NP_349892. 1	2

10

20

30

40

遺伝子ID 番号	反応番号 (図1)	遺伝子 名	微生物源	酵素名	タンパク質配列のリンク先	参照番号
0027	12	bld	クロストリジウム サッカロベル ブチル アセトニウム	ブチルアルデヒド デヒドロゲナーゼ	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?db=protein&id=3 1075383	4
0028	13	bdh	クロストリジウム サッカロベル ブチル アセトニウム	ブタノール デヒドロゲナーゼ	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?db=protein&id=1 24221917	4
0029	12/13	adhE	クロストリジウム テタニ	アルデヒド/アルコール デヒドロゲナーゼ	www.genome.jp/dbget- bin/www_bget?ctc:CTC01366	
0030	12/13	adhE	クロストリジウム ペルブリゲンス	アルデヒド/アルコール デヒドロゲナーゼ	www.genome.jp/dbget- bin/www_bget?cpe:CPE2531	
0031	12/13	adhE	クロストリジウム ジフィシレ	アルデヒド/アルコール デヒドロゲナーゼ	www.genome.jp/dbget- bin/www_bget?cdf:CD2966	
0032	8	sucA	ミコバクテリウム ボビス BCU, パスツール	α -ケトグルタル酸 デカルボキシラーゼ	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?val=YP_977400. 1	5
0033	9	cat2	クロストリジウム アミノブチリウム	4-ヒドロキシ酪酸 補酵素A トランスフェラーゼ	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?db=protein&val= 6249316	
0034	9	cat2	ボルフィロモナス ギンギバリス W83	4-ヒドロキシ酪酸 補酵素A トランスフェラーゼ	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?db=protein&val= 34541558	
0035	6	sucD	ボルフィロモナス ギンギバリス W83	コハク酸 セミアルデヒド デヒドロゲナーゼ (CoA-依存性)	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?val=NP_904963. 1	
0036	7	4-HBd	ボルフィロモナス ギンギバリス W83	NAD-依存性 4-ヒドロキシ酪酸 デヒドロゲナーゼ	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?val=NP_904964. 1	
0037	7	gbd	培養されなかった バクテリア	4-ヒドロキシ酪酸 デヒドロゲナーゼ	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ viewer.fcgi?db=nucleotide&id= 5916168	6
0038	1	sucCD	E.コリ	スクシニル-CoA シンターゼ	www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/pe c/genes.List.DetailAction.do	

¹Sohling 及び Gottschalk, *Eur. J. Biochem.* 212:121-127 (1993); Sohling 及び Gottschalk, *J. Bacteriol.* 178:871-880 (1996)

²Nolling ら, J., *J. Bacteriol.* 183:4823-4838 (2001)

³Pohlmann ら, *Nat. Biotechnol.* 24:1257-1262 (2006)

⁴Kosaka ら, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71:58-68 (2007)

⁵Brosch ら, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104:5596-5601 (2007)

⁶Henne ら, *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3901-3907 (1999)

【 0 2 1 1 】

BDO経路のための発現ベクターの構築. ベクター骨格及びいくつかの菌株をDr. Rolf Lutz of Expressys(www.expressys.de/)から得た。ベクター及び菌株は、Dr. Rolf Lutz及びProf. Hermann Bujard(Lutz, R. 及びH. Bujard, *Nucleic Acids Res* 25:1203-1210(1997))によって開発されたpZ発現システムに基づく。得られたベクターは、pZE13luc、pZA33luc、pZS*13luc及びpZE22lucであり、スタッファー断片としてルシフェラーゼ遺伝子を含んでいた。ルシフェラーゼスタッファー断片を、適切な酵素部位によって側面が固められたlacZ-アルファ断片で置き換えるために、ルシフェラーゼスタッファー断片を、最初にEcoRI及びXbaIによる消化によって各ベクターから除去した。lacZ-アルファ断片は、以下のプライマーpUC19からPCR増幅された。

10

20

30

40

【化1】

lacZ α -RI

5'GACGAATTTCGCTAGCAAGAGGAGAAGTCGACATGTCCAATTCACTGGCCGTCGT
TTTAC3'

lacZ α 3'BB

5'-GACCCTAGGAAGCTTTCTAGAGTCGACCTATGCGGCATCAGAGCAGA-3'.

【0212】

10

これにより、EcoRI部位、NheI部位、リボソーム結合部位、SalI部位及び開始コドンの5'末端を有する断片が生成された。断片の3'末端には、停止コドン、XbaI、HindIII及びAvrII部位が含まれていた。PCR生成物をEcoRI及びAvrIIにより消化させ、EcoRI及びXbaIにより消化された塩基ベクターに結合した(XbaI及びAvrIIは、相溶性末端を有し、非部位を生成する)。NheI及びXbaI制限酵素部位は、互いに結合させることができる相溶性末端を生成する(ただし、いずれの酵素によっても消化されないNheI/XbaI非部位を生成する)ため、ベクターにクローン化された遺伝子は、互いに「バイオブリック」され得る([http://openwetware.org/wiki/Synthetic Biology:BioBricks](http://openwetware.org/wiki/Synthetic_Biology:BioBricks))。手短に述べると、遺伝子の間の部位が各添加後に破壊されるため、この方法は、(部位が遺伝子に対して内在的でなければ)同じ2つの制限部位を使用して、無数の遺伝子をベクターに接合することを可能にする。

20

【0213】

すべてのベクターは、pZ記号の後に、複製起点、抗生物質抵抗マーカー及びプロモーター/制御単位を示す文字及び数字が続く。複製起点は、第2の文字であり、起源に基づいて、ColE1に対するE、p15Aに対するA及びpSC101に対するSによって表される。第1の数字は、抗生物質抵抗マーカーを表す。(アンピシリンに対する1、カナマイシンに対する2、クロラムフェニコールに対する3、スペクチノマイシンに対する4及びテトラサイクリンに対する5)。最後の数字は、対象となる遺伝子を制御したプロモーターを規定する($P_{LtetO-1}$ に対する1、 $P_{LlacO-1}$ に対する2、 $P_{AllacO-1}$ に対する3及び $P_{lac/ara-1}$ に対する4)。MCS及び対象となる遺伝子は、直後に続く。ここに述べる研究では、上記バイオブリック挿入のために修飾された2つの塩基ベクター、pZA33及びpZE13を採用した。対象となる遺伝子をそれらにクローン化すると、表6に示される4桁の遺伝子コードを使用して、得られたプラスミドを例えばpZA33-XXXX-YYYYのように表す。

30

【0214】

宿主菌株の構築. 本明細書に記載のすべての研究における親菌株は、大腸菌K-12菌株MG1655である。adhE、gabD及びaldAにおける無マーカー欠失株を、redET法(Datsenko, K. A. 及びB. L. Wanner, Proc Natl Acad Sci U S A 97:6640-6645(2000))を使用して、第三者によるサービス契約に基づいて構築した。次の菌株を、バクテリオファージP1媒介形質導入(Miller, J. Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratories, New York(1973))を介して構築した。菌株C600Z1($lacI^q$ 、PN25-tetR、 Sp^R 、 $lacY1$ 、 $leuB6$ 、 $mcrB^+$ 、 $supE44$ 、 $thi-1$ 、 $thr-1$ 、 $tonA21$)をExpressysから入手し、P1形質導入のための $lacI^q$ 対立遺伝子源として使用した。バクテリオファージP1virを、 $lacI^q$ に結合したスペクチノマイシン抵抗遺伝子を有するC600Z1大腸菌株上で成長させた。C600Z1上で成長したP1溶菌液を使用して、スペクチノマイシン抵抗についての選択によりMG1655を感染させた。次いで、スペクチノマイシン抵抗コロニーを、 $P_{AllacO-1}$ プロモーターに結合した遺伝子の発現を抑制する形質導入体の能力を測定することによって、結合した $lacI^q$ について選別した。得られた菌株をMG1655 $lacI^q$ と命名した。同様の手順を使用して、 $lacI^Q$ を欠失菌株に導入した。

40

【0215】

スクシネートからの4-HBの生成. スクシネートから4-HB生産体を構築するために、以下

50

に記載するように、スクシネートから4-HB及び4-HB-CoAまでの工程(図1の1、6、7及び9)をコードする遺伝子をpZA33及びpZE13上に集めた。様々な遺伝子の組合せ、並びに対照として不完全な経路を保持する構築物を評価した(表7及び8)。次いで、イソプロピル β -D-1-チオガラクトピラノシド(IPTG)を添加することによって、誘発性発現を可能にする、lacI^Qを含む宿主菌株にプラスミドを変換した。野生型、及び原生コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子が欠失した宿主の両方(図1の工程2)を試験した。

【0216】

最初に、経路遺伝子を含むプラスミド構築物に対して、宿主として菌株MG1655 lacI^Qを使用して、異種酵素の活性をインビトロアッセイで試験した。細胞を、構築物毎に適切な抗生物質を含むLB培地(Difco)にて好気性条件で成長させ、光学密度(OD600)が約0.5になったときに1mMのIPTGを添加することによって誘発させた。細胞を6時間後に収穫し、以下に記載するように酵素アッセイを実施した。

【0217】

インビトロ酵素アッセイ. 活性アッセイのための粗抽出物を得るために、細胞を、10分間にわたる4500rpmの遠心(Beckman-Coulter、Allegera X-15R)によって収穫した。ペレットを、ベンゾナーゼ及びライソザイムを含む0.3mLのBugBuster(Novagen)に再懸濁させ、静かに振盪しながら室温で15分間溶解させた。無細胞溶菌液を、4℃にて30分間にわたって14000rpmで遠心させること(Eppendorf遠心器5402)によって得た。サンプルにおける細胞タンパク質を、Bradfordら、Anal. Biochem. 72:248-254(1976)の方法を使用して測定し、特定の酵素アッセイを以下に記載するように実施した。活性を、活性の単位が、1 μ mの基質を室温にて1分間で変換するのに必要とされる酵素の量で定義されるタンパク質1mg当たりの単位で報告する。概して、報告された値は、少なくとも3回のアッセイの平均値である。

【0218】

既に記載したSohling及びGottschalk、J. Bacteriol. 178:871-880(1996)の手順に従って、スクシニル-CoA及びアセテートからのアセチル-CoAの形成を監視することによって、スクシニル-CoAトランスフェラーゼ(Cat1)活性を測定した。ATPの存在下でのスクシネート及びCoAからのスクシニル-CoAの形成を追従することによってスクシニル-CoAシンテターゼ(SucCD)活性を測定した。実験は、Cha及びParks、J. Biol. Chem. 239:1961-1967(1964)に記載される手順に従った。スクシネートセミアルデヒド及びCoAの存在下における340nmでのNADのNADHへの変換(Sohling及びGottschalk、Eur. J. Biochem. 212:121-127(1993))を追従することによってCoA依存性スクシネートセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(SucD)活性を測定した。スクシネートセミアルデヒドの存在下における340nmでのNADHのNADへの酸化を監視することによって4-HBデヒドロゲナーゼ(4-HBd)酵素活性を測定した。Scherf及びBuckel、Appl. Environ. Microbiol. 57:2699-2702(1991)からの改良手順を使用して、4-HB CoAトランスフェラーゼ(Cat2)活性を測定した。アセチル-CoA及び4-HB又はブチレートからの4-HB-CoA又はブチリル-CoAの形成を、HPLCを使用して測定した。

【0219】

アルコール(ADH)及びアルデヒド(ALD)デヒドロゲナーゼを、いくつかの文献情報源から適用された手順(Durreら、FEMS Microbiol. Rev. 17:251-262(1995);Palosaari及びRogers、J. Bacteriol. 170:2971-2976(1988)及びWelchら、Arch. Biochem. Biophys. 273:309-318(1989))を使用して、還元方向にアッセイした。NADHの酸化の後に、室温にて全体で240秒間にわたって4秒毎に340nmにおける吸光度を読み取った。還元アッセイを(KOHでpH7.5に調整された)100mMのMOPS、0.4mMのNADH及び1から50 μ lの細胞抽出物にて実施した。ADHに対する100 μ lの100mMアセトアルデヒド又はブチルアルデヒド或いはALDに対する100 μ lの1mMアセチル-CoA又はブチリル-CoAの試薬を添加することによって反応を開始させる。分光高度計を迅速にブランクにし、次いで動力学的読取りを開始する。340nm(6000)におけるNAD(P)Hのモル吸光係数及び抽出物のタンパク質濃度とともに、毎分340nmの吸光度における得られた還元勾配を使用して、比活性を測定することができる。

【0220】

PTBの酵素活性を、Caryら、J. Bacteriol. 170:4613-4618(1988)に記載されているようにブチリル-CoAからブチリル-ホスフェートへの方で測定する。それは、変換のための無機ホスフェートを提供し、5.5'-ジチオビス-(2-ニトロ安息香酸)又はDTNBによる遊離CoAの増加を追従する。DTNBは、遊離CoAなどのチオール基と反応して、 14140Mcm^{-1} のモル吸光係数を有する、412nmで吸収する黄色の2-ニトロ-5-メルカプト安息香酸(TNB)を放出する。アッセイ緩衝液は、pH7.4の150mMリン酸カリウム、0.1mMのDTNB及び0.2mMブチリル-CoAを含んでおり、2から50 μL の細胞抽出物を添加することによって反応を開始させた。ATPを消費するブチレートからブチリル-ホスフェートの形成の方でBKの酵素活性を測定する。手順は、Roseら、J. Biol. Chem. 211:737-756(1954)に既に記載されているアセテートキナーゼに対するアッセイと同様である。しかし、Sigmaによって提供された別のアセテートキナーゼ酵素アッセイがより有用且つ高感度であることを見いだした。このアッセイは、アセテートキナーゼによるATPのADPへの変換を、ピルベートキナーゼによるADP及びピルビン酸ホスホエノール(PEP)のATP及びピルベートへの変換に連結した後、ラクテートデヒドロゲナーゼによってピルベート及びNADHをラクテート及びNAD⁺に変換する。ブチレートをアセテートに代用することは、アッセイがBK酵素活性を追従することを可能にするための唯一の主たる改変である。アッセイ混合物は、pH7.6の80mMのトリエタノールアミン緩衝液、200mM酪酸ナトリウム、10mMのMgCl₂、0.1mMのNADH、6.6mMのATP、1.8mMホスホピルベートを含んでいた。ピルベートキナーゼ、ラクテートデヒドロゲナーゼ及びミオキナーゼを製造者の説明書に従って添加した。2から50 μl の細胞抽出物を添加することによって反応を開始させ、NADH酸化を示す340nmの吸光度の低下に基づいて反応を監視した。

10

20

【0221】

HPLCによるCoA誘導体の分析. 補酵素A(CoA)転移を含む酵素反応を監視するためにHPLCに基づくアッセイを開発した。開発された方法は、インビトロ反応混合物に存在するCoA、アセチルCoA(AcCoA)、ブチリルCoA(BuCoA)及び4-ヒドロキシブチレートCoA(4-HBCoA)の定量測定によって特徴づけられる酵素活性を可能にした。低 μM への感度の低下、並びに対象となるすべてのCoA誘導体の優れた分解能が達成された。

【0222】

化学物質及びサンプルの調製を以下のように実施した。手短に述べると、CoA、AcCoA、BuCoA及びすべての他の化学物質をSigma-Aldrichから入手した。溶媒、即ちメタノール及びアセトニトリルは、HPLCグレードであった。標準検量線は、0.01~1mg/mL濃度範囲で優れた直線性を示した。酵素反応混合物は、100mMのTris HCl緩衝液(pH7)を含み、アリコットを異なる時点で採取し、ギ酸(0.04%の最終濃度)で失活させ、HPLCによって直接分析した。

30

【0223】

二元ポンプ、デガッサー、恒温自動サンプラー及びカラム区画室を備えたAgilent 1100 HPLCシステムを使用してHPLC分析を実施し、ダイオードアレイ検出器(DAD)を分析に使用した。4.6×150mmの逆相カラムKromasil 100 5 μm C18(Peeke Scientific)を採用した。25 mMのリン酸カリウム(pH7)及びメタノール又はアセトニトリルを1mL/分の流量で水性及び有機溶媒として使用した。2つの方法:十分に分解されたCoA、AcCoA及びBuCoAの分析のためのより急速な勾配を用いる短い方法、並びに緊密に溶離するAcCoAと4-HBCoAとを区別するためのより長い方法を開発した。短い方法では、アセトニトリル勾配(0分-5%、6分-30%、6.5分-5%、10分-5%)を採用し、CoA、AcCoA及びBuCoAに対してそれぞれ2.7、4.1及び5.5分の滞留時間を得た。長い方法では、メタノールを0分-5%、20分-35%、20.5分-5%、25分-5%の直線勾配で使用した。CoA、AcCoA、4-HBCoA及びBuCoAに対する滞留時間は、それぞれ5.8、8.4、9.2及び16.0分であった。注入容量は、5 μL であり、カラム温度は30℃であり、UV吸光度は260nmで監視した。

40

【0224】

結果は、4つの経路工程の各々の活性を示したが(表7)、活性は、明らかに、遺伝資源、ベクターにおける遺伝子の位置、及びそれが発現される他の遺伝子の状況に依存する。例

50

えば、遺伝子0035は、0008によってコードされるものより活性なコハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードし、0036及び0010nは、0009より活性な4-HBデヒドロゲナーゼ遺伝子である。同じオペロン上でそれに先行する別の遺伝子が存在する場合により良好な4-HBデヒドロゲナーゼ活性も存在すると思われる。

表7. 4-HB-CoA経路における遺伝子を発現するプラスミドを含むMG1655lacI^Q由来の細胞抽出液のインビトロ酵素活性。活性は単位/mgタンパク質で記載した。活性の単位は、1分間に室温で1 μ molの基質を変換するのに必要な酵素量として定義した。

【表7】

試料番号	pZE13 (a)	pZA33 (b)	OD600	Cell Prot (c)	Cat1	SucD	4HBd	Cat2
1	cat1 (0004)		2.71	6.43	1.232	0.00		
2	cat1 (0004)-sucD (0035)		2.03	5.00	0.761	2.57		
3	cat1 (0004)-sucD (0008)		1.04	3.01	0.783	0.01		
4	sucD (0035)		2.31	6.94		2.32		
5	sucD (0008)		1.10	4.16		0.05		
6		4hbd (0009)	2.81	7.94	0.003		0.25	
7		4hbd (0036)	2.63	7.84			3.31	
8		4hbd (0010n)	2.00	5.08			2.57	
9	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0009)	2.07	5.04	0.600	1.85	0.01	
10	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0036)	2.08	5.40	0.694	1.73	0.41	
11	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0010n)	2.44	4.73	0.679	2.28	0.37	
12	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0009)	1.08	3.99	0.572	-0.01	0.02	
13	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0036)	0.77	2.60	0.898	-0.01	0.04	
14	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0010n)	0.63	2.47	0.776	0.00	0.00	
15		cat2 (0034)	2.56	7.86				1.283
16		cat2(0034)-4hbd(0036)	3.13	8.04			24.86	0.993
17		cat2(0034)-4hbd(0010n)	2.38	7.03			7.45	0.675
18		4hbd(0036)-cat2(0034)	2.69	8.26			2.15	7.490
19		4hbd(0010n)-cat2(0034)	2.44	6.59			0.59	4.101

colEI起点及びアンピシリン耐性を有する高複製プラスミドpZE13におけるPlacから発現される遺伝子。遺伝子番号はテーブル6に示される。

pACYC起点及びクロラムフェニコール耐性を有する中複製プラスミドpZA33におけるPlacから発現される遺伝子

(c)mgタンパク質/ml抽出液として与えられた細胞タンパク質

【0225】

次いで、4-HB経路に遺伝子を含む組換え菌株を、中心代謝中間体から4-HBをインビトロで生成する能力について評価した。細胞を約0.4のOD600までLB培地中にて嫌気性条件で成長させ、次いで1mMのIPTGで誘発した。1時間後、コハク酸ナトリウムを10mMまで添加し、さらに24及び48時間後に分析のためにサンプルを採取した。培養肉汁における4-HBを以下に記載されるようにGC-MSによって分析した。それらの結果は、組換え菌株が24時間後に2mMを超える4-HBを生成できるのに対して、対照菌株では実質的に0であることを示している(表8)。

表8. 4-HB経路遺伝子の各種組合せを発現するプラスミドを含むE. コリ株におけるコハク酸からの4-HBの産生

【表 8】

試料番号	宿主株	pZE13	pZA33	24時間			48時間		
				OD600	4HB, μ M	4HB norm. (a)	OD600	4HB, μ M	4HB norm. (a)
1	MG1655 lacIq	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0009)	0.47	487	1036	1.04	1780	1711
2	MG1655 lacIq	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0027)	0.41	111	270	0.99	214	217
3	MG1655 lacIq	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0036)	0.47	863	1835	0.48	2152	4484
4	MG1655 lacIq	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0010n)	0.46	956	2078	0.49	2221	4533
5	MG1655 lacIq	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0009)	0.38	493	1296	0.37	1338	3616
6	MG1655 lacIq	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0027)	0.32	26	81	0.27	87	323
7	MG1655 lacIq	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0036)	0.24	506	2108	0.31	1448	4672
8	MG1655 lacIq	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0010n)	0.24	78	324	0.56	233	416
9	MG1655 lacIq gabD	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0009)	0.53	656	1237	1.03	1643	1595
10	MG1655 lacIq gabD	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0027)	0.44	92	209	0.98	214	218
11	MG1655 lacIq gabD	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0036)	0.51	1072	2102	0.97	2358	2431
12	MG1655 lacIq gabD	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0010n)	0.51	981	1924	0.97	2121	2186
13	MG1655 lacIq gabD	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0009)	0.35	407	1162	0.77	1178	1530
14	MG1655 lacIq gabD	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0027)	0.51	19	36	1.07	50	47
15	MG1655 lacIq gabD	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0036)	0.35	584	1669	0.78	1350	1731
16	MG1655 lacIq gabD	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0010n)	0.32	74	232	0.82	232	283
17	MG1655 lacIq	ベクターのみ	ベクターのみ	0.8	1	2	1.44	3	2
18	MG1655 lacIq gabD	ベクターのみ	ベクターのみ	0.89	1	2	1.41	7	5

(a) 規準化した4-HB濃度 (μ M/OD600 単位)

【0226】

CoAトランスフェラーゼ(cat1)を使用して、スクシネートからスクシニル-CoAを生成することに対する別法は、スクシニル-CoAシンテターゼをコードする原生大腸菌sucCD遺伝子を使用することである。この遺伝子集団を、4-HBに対する残りの工程のための候補遺伝子とともにpZE13上にクローン化して、pZE13-0038-0035-0036を生成した。

【0227】

グルコースからの4-HBの生成. 上記実験は、中心代謝中間体(スクシネート)から4-HBへの機能的経路を実証しているが、工業的方法では、グルコース又はスクロースなどの低コスト炭水化物からの化学物質の生成が必要になる。したがって、次の実験群は、グルコース上での成長時に細胞によって生成された内因性スクシネートが、4-HB経路を供給し得るかどうかを判断することを目的とした。20g/Lのグルコース、緩衝能力を向上させるための100mMの3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸(MOPS)、10 μ g/mLのチアミン及び適切な抗生物質が補給されたM9最小培地(6.78g/LのNa₂HPO₄、3.0g/LのKH₂PO₄、0.5g/LのNaCl、1.0g/LのNH₄Cl、1mMのMgSO₄、0.1mMのCaCl₂)にて嫌気性条件で細胞を成長させた。OD600が約0.2に達したときに0.25mMのIPTGを添加し、誘発後24時間毎に4-HB分析のためにサンプルを採取した。いずれの場合も、最良の菌株において約1mMの最大値で4-HBが24時間後に安定水準に達した(図3a)のに対して、スクシネート濃度は上昇し続けた(図3b)。これは、経路へのスクシネートの供給が恐らくは限定的でないこと、及びボトルネックが酵素そのものの活性又はNADH利用能にあり得ることを示している。0.035及び0.036は、明らかに、それぞれCoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ及び4-HBデヒドロゲナーゼの最良の遺伝子候補である。既知(gabD)又は推定上(aldA)の原生コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の一方又は双方を除外しても性能に対する影響がほとんどなかった。最後に、細胞は、対照より4-HB生成菌株においてはるかに低いODまで成長したことに留意されたい(図3c)。

【0228】

グルコースから4-HBの生成のための代替的経路は、ケトグルタレートを紹介する。結核菌の α -ケトグルタレートデカルボキシラーゼの使用(Tianら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:10670-10675(2005))を利用して、 α -ケトグルタレートからコハク酸セミアルデヒドを直接生成した(図1の工程8)。この遺伝子(0032)がインビボで機能的であることを実証するために、pZA33上の4-HBデヒドロゲナーゼ(遺伝子0036)としてそれを同じ宿主におけるpZE13上に発現させた。この菌株は、1mMのIPTGによる誘発後の24時間以内に1.0mMを超える4-HBを生成することが可能であった(図4)。この菌株は、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼを発現しないため、スクシニル-CoAを紹介するコハク酸セミアルデヒド

の生成の可能性が排除される。コハク酸セミアルデヒドの生成に関与する原生遺伝子がこの経路で機能し得る可能性もある(図1の工程4及び5)、しかし、pZE13-0032プラスミドが宿主の外に出たときに生成される4-HBの量は無視できる。

【0229】

4-HBからのBDOの生成.4-HBからのBDOの生成には、デヒドロゲナーゼによって触媒される2つの還元工程が必要であった。アルコール及びアルデヒドデヒドロゲナーゼ(それぞれADH及びALD)は、ともに分子上のカルボン酸基をアルコール基に還元できる、又は逆にアルコールのカルボン酸への酸化を実施できるNAD⁺/H及び/又はNADP⁺/H依存性酵素である。この生体内変換は、野生型クロストリジウム・アセトブチリウムにおいて実証されたが(Jewellら、Current Microbiology、13:215-19(1986))、関与する酵素も関与する遺伝子も特定されなかった。加えて、4-HB-CoAに対する活性化が最初に必要なかどうか(図1の工程9)、又はアルデヒドデヒドロゲナーゼ(工程12)が4-HBに対して直接作用できるかが把握されていない。4-HB及び経路中間体に対する非ヒドロキシ化類似体による既知の活性に基づいて、又はこれらの特徴づけられた遺伝子に対する類似性により、C. アセトブチリウム及び関連生物体からの候補酵素の一覧を作成した(表6)。これらの候補の一部は多官能価デヒドロゲナーゼであるため、それらは、潜在的に酸(又はCoA誘導体)のアルデヒドへの、且つアルデヒドのアルコールへのNAD(P)H依存性還元を両方を触媒する。大腸菌におけるこれらの遺伝子を用いた研究を開始する前に、C. アセトブチリウムATCC8244を使用して、上記の結果を最初に検証した。30℃にて10%CO₂、10%H₂及び80%N₂の嫌気性雰囲気中で、10mMの4-HBが補給されたSchaedler肉汁(Accumedia、ミシガン州Lansing)で細胞を成長させた。定期的な培養サンプルを採取し、遠心し、以下に記載されるように肉汁をGC-MSによってBDOについて分析した。0.1mM、0.9mM及び1.5mMのBDO濃度をそれぞれ1日後、2日後及び7日後に検出した。4-HBを添加せずに成長した培養物にはBDOが検出されなかった。生成されたBDOがグルコースから誘導されることを実証するために、最良のBDO生成菌株MG1655lacI^QpZE13-0004-0035-0002pZA33-0034-0036を、4g/Lの均一標識¹³C-グルコースが補給されたM9最小培地で成長させた。細胞を1mMのIPTGで0.67のODにおいて誘発し、サンプルを24時間後に採取した。培養上澄みの分析を質量分析によって実施した。

【0230】

次に、4-HBからBDOの変換経路のための遺伝子候補を、大腸菌宿主MG1655lacI^Qに発現されたときの活性について試験した。pZA33に発現された各遺伝子を含む組換え菌株を、37℃にて4時間にわたって0.25mMのIPTGの存在下で成長させて、酵素の発現を十分に誘導した。誘発の4時間後、細胞を収穫し、上記のようにADH及びALD活性についてアッセイした。4-HB-CoA及び4-ヒドロキシブチルアルデヒドは商業的に入手可能でないため、非ヒドロキシ化基質を使用してアッセイを実施した(表9)。C. アセトブチリウムadhE2(2002)及び大腸菌adhE(0011)についての4炭素基質と2炭素基質との活性の比率は、文献(Atsumiら、Biochem. Biophys. Acta. 1207-1-11(1994))に既に報告されているものと同様であった。

表9. アルデヒド及びアルコールデヒドロゲナーゼの遺伝子候補を発現するpZA33を含むMG1655lacI^Q由来の細胞抽出液のインビトロ酵素活性。活性を、 $\mu\text{mol分}^{-1}$ 細胞タンパク質⁻¹で表す。N.D., 決定せず。

【表 9】

		アルデヒドデヒドロゲナーゼ		アルコールデヒドロゲナーゼ	
遺伝子	基質	ブチリル-CoA	アセチル-CoA	ブチルアルデヒド	アセトアルデヒド
0002		0.0076	0.0046	0.0264	0.0247
0003n		0.0060	0.0072	0.0080	0.0075
0011		0.0069	0.0095	0.0265	0.0093
0013		N.D.	N.D.	0.0130	0.0142
0023		0.0089	0.0137	0.0178	0.0235
0025		0	0.0001	N.D.	N.D.
0026		0	0.0005	0.0024	0.0008

【0 2 3 1】

BDO生成実験では、ポルフィロモナス・ギンギバリスW83(遺伝子0034)からのcat2を、4-HBの4-HB-CoAへの変換のためにpZA33上に含め、候補デヒドロゲナーゼ遺伝子をpZE13上に発現させた。宿主菌株は、MG1655 lacI^Qであった。アルコール及びアルデヒドデヒドロゲナーゼ候補とともに、基質の類似性により、この工程で機能するCoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(sucD)の能力をも試験した。細胞を、10mMの4-HBが補給されたLB培地中で約0.5のODまで成長させ、1mMのIPTGで誘発し、24時間後に培養肉汁を採取し、以下に記載されるようにBDOについて分析した。C. アセトブチリクムのadhE2、C. クルイベリのsucD又はP. ギンギバリスのsucDを使用すると最良のBDO生成が生じた(図5)。興味深いことに、生成されたBDOの絶対量は、好気性条件下の方が大きかった。しかし、これは、主として、嫌気性培養物においてより低い細胞密度が達成されたことによる。細胞ODに対して正規化すると、単位バイオマス当たりのBDO生成量は、嫌気性条件下の方が大きい(表10)。

表10. C. アセトブチリクム由来adhE2、C. クルイベリ由来sucD、又はP. ギンギバリス由来sucD(図3の実験2、9及び10からのデータ)を発現する細胞の培養液、並びにネガティブコントロール(実験1)からの絶対的及び規準化BDO濃度

【表 1 0】

発現された遺伝子	条件	BDO (μM)	OD (600nm)	BDO/OD
なし	好気性	0	13.4	0
なし	微好気性	0.5	6.7	0.09
なし	嫌気性	2.2	1.26	1.75
0002	好気性	138.3	9.12	15.2
0002	微好気性	48.2	5.52	8.73
0002	嫌気性	54.7	1.35	40.5
0008n	好気性	255.8	5.37	47.6
0008n	微好気性	127.9	3.05	41.9
0008n	嫌気性	60.8	0.62	98.1
0035	好気性	21.3	14.0	1.52
0035	微好気性	13.1	4.14	3.16
0035	嫌気性	21.3	1.06	20.1

【0 2 3 2】

上述のように、副産物としてアセテートを生成しない、4-HBを4-HB-CoAに変換するための経路を使用することが有利であり得る。この目的で、図1の工程10及び11を介してこの

変換を実施するためのC.アセトブチリクムのホストランスポチリラーゼ(ptb)及びブチレートキナーゼ(bk)の使用を試験した。C.アセトブチリクムの原生ptb/bkオペロン(遺伝子0020及び0021)をクローン化し、pZA33に発現させた。得られた構築物を含む細胞の抽出物を採取し、2つの酵素活性についてアッセイした。BKの比活性は約65U/mgであり、PTBの比活性は約5U/mgであった。活性の一単位(U)は、室温における1分間の1 μ Mの基質の変換率と定義される。最後に、構築物を4-HBのBDOへの変換への関与について試験した。宿主菌株を上記pZA33-0020-0021構築物及びpZE13-0002で変換し、以上の図5に使用された好気性手順を使用するBDO生成におけるcat2の使用と比較した。BK/PTB菌株は、cat2を使用した場合に2mMであるのに対して1mMのBDOを生成した(表11)。興味深いことに、それらの結果は、宿主菌株が原生adhE遺伝子の欠失を含むかどうかによって左右されていた。

表11. P.ギンギバリス(0034)由来cat2又はpZA33におけるC.アセトブチリクム由来PTB/BK遺伝子のいずれかとともにpZE13におけるC.アセトブチリクム由来adhE2を発現する、細胞の培養液からの絶対的及び規準化BDO濃度。宿主株は、MG1655lacI^Q、又はMG1655 Δ adhE lacI^Qである。

【表 1 1】

遺伝子	宿主株	BDO (μ M)	OD (600nm)	BDO/OD
0034	MG1655 lacI ^Q	0.827	19.9	0.042
0020+0021	MG1655 lacI ^Q	0.007	9.8	0.0007
0034	MG1655 Δ adhE lacI ^Q	2.084	12.5	0.166
0020+0021	MG1655 Δ adhE lacI ^Q	0.975	18.8	0.052

【 0 2 3 3 】

グルコースからのBDOの生成経路確認の最終工程は、大腸菌における経路の4-HB及びBDO部分の両方を発現し、グルコース最小培地におけるBDOの生成を実証することである。すべての必要な遺伝子が2つのプラスミドに適合するように新たなプラスミドを構築した。概して、cat1、adhE及びsucD遺伝子をpZE13から発現させ、cat2及び4-HBdをpZA33から発現させた。遺伝子源及び遺伝子順序の様々な組合せをMG1655lacI^Qバックグラウンドで試験した。20g/Lのグルコース、緩衝能力を向上させるための100mMの3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸(MOPS)、10 μ g/mLのチアミン及び適切な抗生物質が補給されたM9最小培地(6.78g/LのNa₂HPO₄、3.0g/LのKH₂PO₄、0.5g/LのNaCl、1.0g/LのNH₄Cl、1mMのMgSO₄、0.1mMのCaCl₂)にて嫌気性条件で細胞を成長させた。摂取の約15時間後に0.25mMのIPTGを添加し、BDO、4-HBについて培養上澄みサンプルを採取し、誘発の24及び48時間後にスクシネート分析を行った。BDOの生成量は、遺伝子順序への依存性を示すように思われた(表12)。pZA33上に最初にcat2を発現させた後に4-HBdを発現させ、pZE13上にcat1を発現させた後にP.ギンギバリスsucDを発現させると、0.5mMを超える最大のBDO生成量が得られた。C.アセトブチリクムadhE2をpZE13上の最後の位置に添加すると、わずかな向上がもたらされた。4-HB及びスクシネートもより高い濃度で生成された。

表12. 20g/Lグルコースで補充した最小培地で成長させた、BDO経路遺伝子の組合せを発現する組換えEコリ株におけるBDO、4-HB、及びコハク酸の産生。濃度は、mMである。

【表 1 2】

試料	pZE13	pZA33	導入OD	24時間				48時間			
				OD600nm	Su	4HB	BDO	OD600nm	Su	4HB	BDO
1	cat1(0004)-sucD(0035)	4hbd (0036)-cat2(0034)	0.92	1.29	5.44	1.37	0.240	1.24	6.42	1.49	0.280
2	cat1(0004)-sucD(0008N)	4hbd (0036)-cat2(0034)	0.36	1.11	6.90	1.24	0.011	1.06	7.63	1.33	0.011
3	adhE(0002)-cat1(0004)-sucD(0035)	4hbd (0036)-cat2(0034)	0.20	0.44	0.34	1.84	0.050	0.60	1.93	2.67	0.119
4	cat1(0004)-sucD(0035)-adhE(0002)	4hbd (0036)-cat2(0034)	1.31	1.90	9.02	0.73	0.073	1.95	9.73	0.82	0.077
5	adhE(0002)-cat1(0004)-sucD(0008N)	4hbd (0036)-cat2(0034)	0.17	0.45	1.04	1.04	0.008	0.94	7.13	1.02	0.017
6	cat1(0004)-sucD(0008N)-adhE(0002)	4hbd (0036)-cat2(0034)	1.30	1.77	10.47	0.25	0.004	1.80	11.49	0.28	0.003
7	cat1(0004)-sucD(0035)	cat2(0034)-4hbd(0036)	1.09	1.29	5.63	2.15	0.461	1.38	6.66	2.30	0.520
8	cat1(0004)-sucD(0008N)	cat2(0034)-4hbd(0036)	1.81	2.01	11.28	0.02	0.000	2.24	11.13	0.02	0.000
9	adhE(0002)-cat1(0004)-sucD(0035)	cat2(0034)-4hbd(0036)	0.24	1.99	2.02	2.32	0.106	0.89	4.85	2.41	0.186
10	cat1(0004)-sucD(0035)-adhE(0002)	cat2(0034)-4hbd(0036)	0.98	1.17	5.30	2.08	0.569	1.33	6.15	2.14	0.640
11	adhE(0002)-cat1(0004)-sucD(0008N)	cat2(0034)-4hbd(0036)	0.20	0.53	1.38	2.30	0.019	0.91	8.10	1.49	0.034
12	cat1(0004)-sucD(0008N)-adhE(0002)	cat2(0034)-4hbd(0036)	2.14	2.73	12.07	0.16	0.000	3.10	11.79	0.17	0.002
13	ベクターのみ	ベクターのみ	2.11	2.62	9.03	0.01	0.000	3.00	12.05	0.01	0.000

10

【0 2 3 4】

GCMSによるBDO、4-HB及びスクシネートの分析. 発酵及び細胞培養サンプルにおけるBDO、4-HB及びスクシネートをシリル化によって誘導体化し、文献報告から採用された方法(Simonovら、J. Anal Chem. 59:965-971(2004))を使用してGCMSにより定量分析した。開発された方法は、1 μ Mまでの良好な感度、少なくとも25mMまでの直線性、並びに優れた選択性及び再現性を示した。

【0 2 3 5】

サンプル調製を以下のように実施した。100 μ Lの濾過(0.2 μ m又は0.45 μ mシリンジフィルター)サンプル、例えば発酵肉汁、細胞培養物又は標準溶液をスピード・バク・コンセンレータ(Savant SVC-100H)にて室温で約1時間にわたって乾燥させた後、ジメチルホルムアミド中内部標準としての20 μ Lの10mMシクロヘキサノール溶液を添加した。混合物を、均質になるように、水浴(Branson 3510)にて15分間にわたって渦攪拌及び音波処理した。100 μ Lのシリル化誘導体化試薬、即ち1%トリメチルクロロシランを含むN,O-ビス(トリメチルシリル)トリフルオロ-アセトイミド(BSTFA)を添加し、混合物を70℃で30分間インキュベートした。誘導体化サンプルを5分間にわたって遠心し、透明溶液をGCMSに直接注入した。すべての化学物質及び試薬は、J. T. Bakerから購入したBDOを除いて、Sigma-Aldrichからのものであった。

20

【0 2 3 6】

GCMSを、電子衝撃イオン化(EI)モードで動作される質量選択性検出器(MSD)5973Nにインターフェース連結されたAgilentガスクロマトグラフ6890Nで実施されるGCMSを分析に使用した。30m $\times$ 0.25mm(内径) $\times$ 0.25 μ m(膜厚)のDB-5MS毛管カラム(J&W Scientific、Agilent Technologies)を使用した。20:1の分割比で1 μ Lのサンプルを導入する分割注入モードでGCを動作させた。注入ポート温度は、250℃であった。ヘリウムをキャリアガスとして使用し、流量を1.0mL/分に維持した。対象となる分析物の良好な分解能及び最小のマトリックス干渉を確保するように、温度勾配プログラムを最適化した。オーブンを最初に1分間にわたって80℃に保持し、次いで2℃/分で120℃まで昇温させた後、100℃/分で320℃まで高速昇温させ、最終的に6分間にわたって320℃に保持した。MSインターフェース転送ラインを280℃に維持した。「小質量」MS同調設定及び30~400m/z質量範囲走査を使用するデータを取得した。全分析時間は、3分間の溶媒遅延を含む29分間であった。滞留時間は、BSTFA誘導体化シクロヘキサノール、BDO、4-HB及びスクシネートに対してそれぞれ5.2、10.5、14.0及び18.2分に対応する。定量分析では、以下の比質量フラグメントを選択した(抽出イオンクロマトグラム)。m/zを内部標準シクロヘキサノールに対して157、BDOに対して116、4-HB及びスクシネートの両方に対して147とした。サンプルマトリックスをできるだけ調和させるために、対応する細胞培養又は発酵培地に分析物溶液を使用して、標準検量線を作成した。環境データ分析ChemStationソフトウェア(Agilent Technologies)を使用してGCMSデータを処理した。

30

40

【0 2 3 7】

それらの結果は、生成された4-HB及びBDOのほとんどが¹³Cで標識されていることを示していた(図6、右側)。非標識グルコースで成長された並行培養物からの質量スペクトルを

50

比較のために示す(図6、左側)。認められるピークは、代謝物質からの異なる数の炭素原子を含む誘導体化分子のフラグメントに対するものであることに留意されたい。誘導体化試薬は、天然標識分布するいくつかの炭素及び珪素原子をも与えるため、結果は、厳密に定量的でない。

【0238】

代替的経路を使用する4-HBからのBDOの生成. また、様々な代替的経路をBDO生成について試験した。これは、スクシネートをスクシニル-CoA(表13、第2～3列)に変換する原生大腸菌SucCD酵素の使用、 α -ケトグルタレート経路における α -ケトグルタレートデカルボキシラーゼの使用(表13、第4列)、及び4HBのCoA誘導体を生成するための代替的手段としてのPTB/BKの使用を含む。これらの変異体を包含する、表13に示される遺伝子を発現するプラスミドを含む菌株を構築した。それらの結果は、すべての場合において、4-HB及びBDOの生成が生じたことを示している(表13)。

表13. 20g/Lグルコースで補充した最小培地で嫌氣的に成長させ、かつ0.1mM IPTG導入の24時間後に集菌した、種々のBDO経路変異のための組換えEコリ株遺伝子におけるBDO、4-HB、及びコハク酸の産生。濃度は、mMである。

【表13】

pZE13の遺伝子	pZA33の遺伝子	コハク酸	4-HB	BDO
0002+0004+0035	0020n-0021n-0036	0.336	2.91	0.230
0038+0035	0034-0036	0.814	2.81	0.126
0038+0035	0036-0034	0.741	2.57	0.114
0035+0032	0034-0036	5.01	0.538	0.154

【0239】

(実施例III)

(4-ヒドロキシブタン酸、 γ -ブチロラクトン及び1,4-ブタンジオールの生合成)

本実施例では、発酵及び他のバイオプロセスを使用する4-ヒドロキシブタン酸、 γ -ブチロラクトン及び1,4-ブタンジオールの生合成生成について記載する。

【0240】

4-HB発酵工程を、精製GBL、1,4-ブタンジオール(BDO)及びテトラヒドロフラン(THF)を生成するための完全なプロセスに統合するための方法を以下に記載する。4-HB及びGBLは平衡であるため、発酵肉汁は、両化合物を含むことになる。低いpHにおいて、この平衡は、GBLに有利になるようにシフトする。したがって、発酵は、pH7.5以下、一般にはpH5.5以下で作用することができる。バイオマスの除去後、生成物の流れは、GBLを除去し、4-HBが豊富な残留流れをリサイクルする分離工程に入る。最後に、GBLを蒸留して、あらゆる不純物を除去する。該プロセスは、3つの方法:1)流加発酵及びバッチ分離;2)流加発酵及び連続分離;3)連続発酵及び連続分離の1つで進める。これらの方式の最初の2つを図7に概略的に示す。以下に記載される統合発酵手順は、また、BDO及び後続のBDO系統の生成物の生合成のための本発明のBDO生成細胞に使用される。

【0241】

4-HB/GBLを生成するための発酵プロトコル(バッチ):5g/Lのリン酸カリウム、2.5g/Lの塩化アンモニウム、0.5g/Lの硫酸マグネシウム及び30g/Lのコーンステープリッカーを含む5Lの肉汁並びに20g/Lの初期グルコース濃度を使用して、 N_2/CO_2 混合物が散布された10Lバイオリアクターにて生成生物体を成長させる。細胞が成長し、グルコースを利用すると、さらなる70%のグルコースを、グルコース消費量をほぼ均衡化させる速度でバイオリアクターに供給する。バイオリアクターの温度を摂氏30度に維持する。4-HBが20～200g/Lの濃度に達し、細胞密度が5から10g/Lになるまで成長を約24時間続ける。pHは制御されず、典型的には実験の終了時までpH3～6まで低下することになる。培養時間が終了すると、発酵槽内容物を細胞分離ユニット(例えば遠心器)に通して、細胞及び細胞細片を除去し

、発酵肉汁を生成物分離ユニットに移す。4-HB/GBLの有機溶液を得るために、不水溶性有機溶媒(例えばトルエン)を使用する液液抽出などの、有機生成物を希釈水溶液から分離するために当該技術分野で採用される標準分離手順によって、4-HB及び/又はGBLの単離を行うことになる。次いで、得られた溶液に標準的な蒸留法を施して、有機溶媒を除去及びリサイクルするとともに、精製液として単離されるGBL(沸点204~205℃)を得る。

【0242】

4-HB/GBLを生成するための発酵プロトコル(完全連続):初期グルコース濃度を30~50g/Lにすることを除いては、上記の装置及び培地組成を使用して生成生物体を最初にバッチ方式で成長させる。グルコースを使い果たすと、同じ組成の供給培地を0.5L/時及び1L/時の速度で連続的に供給し、液体を同じ速度で回収する。バイオリアクターにおける4-HB濃度を30~40g/Lの一定値に維持し、細胞密度を3~5g/Lの一定値に維持する。温度を摂氏30度に維持し、必要に応じて濃NaOH及びHClを使用してpHを4.5に維持する。バイオリアクターを1カ月間にわたって連続的に動作させ、4-HBの濃度の一貫性を確認するためにサンプルを毎日採取する。連続方式では、新たな供給培地が供給される毎に発酵槽内容物を除去する。次いで、細胞、培地並びに生成物4-HB及び/又はGBLを含む排出流に、細胞及び細胞細片を除去する、又は除去しない連続生成物分離手順を施し、4-HB/GBLの有機溶液を得るために、不水溶性有機溶媒(例えばトルエン)を使用する連続液液抽出などの、有機生成物を希釈水溶液から分離するために当該技術分野で採用される標準分離手順によって行うことになる。続いて、得られた溶液に標準連続蒸留法を施して、有機溶媒を除去及びリサイクルするとともに、精製液として単離されるGBL(沸点204~205℃)を得る。

【0243】

GBL還元プロトコル:GBLを上記のように単離及び精製すると、それに当該技術分野で周知のもの(引用参考文献)などの還元プロトコルを施して、1,4-ブタンジオール又はテトラヒドロフラン(THF)或いはそれらの混合物を生成する。水素圧下でGBLと組み合わせられた異種又は同種水素化触媒は、生成物1,4-ブタンジオール又はテトラヒドロフラン(THF)又はそれらの混合物を与えることが周知である。GBL単離及び精製の前に、上記のように発酵肉汁から分離された4-HB/GBL生成物混合物にこれらの同じ還元プロトコルを施して、生成物1,4-ブタンジオール又はテトラヒドロフラン又はそれらの混合物を得ることができる。次いで、得られた生成物の1,4-ブタンジオール及びTHFを、当該技術分野で周知の手順によって単離及び精製する。

【0244】

BDO又はTHFを直接生成するための発酵及び水素化プロトコル(バッチ):5g/Lのリン酸カリウム、2.5g/Lの塩化アンモニウム、0.5g/Lの硫酸マグネシウム及び30g/Lのコーンスティープリッカーを含む5Lの肉汁並びに20g/Lの初期グルコース濃度を使用して、N₂/CO₂混合物が散布された10Lバイオリアクターにて細胞を成長させる。細胞が成長し、グルコースを利用すると、さらなる70%のグルコースを、グルコース消費量をほぼ均衡化させる速度でバイオリアクターに供給する。バイオリアクターの温度を摂氏30度に維持する。4-HBが20~200g/Lの濃度に達し、細胞密度が全般的に5から10g/Lになるまで成長を約24時間続ける。pHは制御されず、典型的には実験の終了時までpH3~6まで低下することになる。培養時間が終了すると、発酵槽内容物を細胞分離ユニット(例えば遠心器)に通して、細胞及び細胞細片を除去し、発酵肉汁を還元ユニット(例えば水素化容器)に移し、そこで4-HB/GBL混合物を1,4-ブタンジオール又はTHF又はそれらの混合物に直接還元する。還元手順の完了後に、反応器内容物を生成物分離ユニットに移す。1,4-ブタンジオール及び/又はTHFの有機溶液を得るために、不水溶性有機溶媒(例えばトルエン)を使用する液液抽出などの、有機生成物を希釈水溶液から分離するために当該技術分野で採用される標準分離手順によって、1,4-ブタンジオール及び/又はTHFの単離を行うことになる。次いで、得られた溶液に標準的な蒸留法を施して、有機溶媒を除去及びリサイクルするとともに、精製液として単離される1,4-ブタンジオール及び/又はTHFを得る。

【0245】

BDO又はTHFを直接生成するための発酵及び水素化プロトコル(完全連続):初期グルコー

ス濃度を30～50g/Lにすることを除いては、上記の装置及び培地組成を使用して細胞を最初にバッチ方式で成長させる。グルコースを使い果たすと、同じ組成の供給培地を0.5L/時及び1L/時の速度で連続的に供給し、液体を同じ速度で回収する。バイオリアクターにおける4-HB濃度を30～40g/Lの一定値に維持し、細胞密度を3～5g/Lの一定値に維持する。温度を摂氏30度に維持し、必要に応じて濃NaOH及びHClを使用してpHを4.5に維持する。バイオリアクターを1カ月間にわたって連続的に動作させ、4-HBの濃度の一貫性を確認するためにサンプルを毎日採取する。連続方式では、新たな供給培地が供給される毎に発酵槽内容物を除去する。次いで、細胞、培地並びに生成物4-HB及び/又はGBLを含む排出流を細胞分離ユニット(例えば遠心器)に通して、細胞及び細胞細片を除去し、発酵肉汁を連続還元ユニット(例えば水素化容器)に移し、そこで4-HB/GBL混合物を1,4-ブタンジオール又はTHF又はそれらの混合物に直接還元する。還元手順の完了後に、反応器内容物を連続生成物分離ユニットに移す。1,4-ブタンジオール及び/又はTHFの有機溶液を得るために、不水溶性有機溶媒(例えばトルエン)を使用する液液抽出などの、有機生成物を希釈水溶液から分離するために当該技術分野で採用される標準連続分離手順によって、1,4-ブタンジオール及び/又はTHFの単離を行うことになる。次いで、得られた溶液に標準的な蒸留法を施して、有機溶媒を除去及びリサイクルするとともに、精製液として単離される1,4-ブタンジオール及び/又はTHFを得る。

10

【0246】

BDOを直接生成するための発酵プロトコル(バッチ):5g/Lのリン酸カリウム、2.5g/Lの塩化アンモニウム、0.5g/Lの硫酸マグネシウム及び30g/Lのコーンステープリッカーを含む5Lの肉汁並びに20g/Lの初期グルコース濃度を使用して、N₂/CO₂混合物が散布された10Lバイオリアクターにて生成生物体を成長させる。細胞が成長し、グルコースを利用すると、さらなる70%のグルコースを、グルコース消費量をほぼ均衡化させる速度でバイオリアクターに供給する。バイオリアクターの温度を摂氏30度に維持する。BDOが20～200g/Lの濃度に達し、細胞密度が全般的に5から10g/Lになるまで成長を約24時間続ける。培養時間が終了すると、発酵槽内容物を細胞分離ユニット(例えば遠心器)に通して、細胞及び細胞細片を除去し、発酵肉汁を生成物分離ユニットに移す。BDOの有機溶液を得るために、不水溶性有機溶媒(例えばトルエン)を使用する液液抽出などの、有機生成物を希釈水溶液から分離するために当該技術分野で採用される標準分離手順によって、BDOの単離を行うことになる。次いで、得られた溶液に標準的な蒸留法を施して、有機溶媒を除去及びリサイクルするとともに、精製液として単離されるBDO(沸点228～229℃)を得る。

20

30

【0247】

BDOを直接生成するための発酵プロトコル(完全連続):初期グルコース濃度を30～50g/Lにすることを除いては、上記の装置及び培地組成を使用して生成生物体を最初にバッチ方式で成長させる。グルコースを使い果たすと、同じ組成の供給培地を0.5L/時及び1L/時の速度で連続的に供給し、液体を同じ速度で回収する。バイオリアクターにおけるBDO濃度を30～40g/Lの一定値に維持し、細胞密度を3～5g/Lの一定値に維持する。温度を摂氏30度に維持し、必要に応じて濃NaOH及びHClを使用してpHを4.5に維持する。バイオリアクターを1カ月間にわたって連続的に動作させ、BDOの濃度の一貫性を確認するためにサンプルを毎日採取する。連続方式では、新たな供給培地が供給される毎に発酵槽内容物を絶えず除去する。次いで、細胞、培地並びに生成物BDOを含む排出流に、細胞及び細胞細片を除去する、又は除去しない連続生成物分離手順を施し、BDOの有機溶液を得るために、不水溶性有機溶媒(例えばトルエン)を使用する連続液液抽出などの、有機生成物を希釈水溶液から分離するために当該技術分野で採用される標準分離手順によって行うことになる。続いて、得られた溶液に標準連続蒸留法を施して、有機溶媒を除去及びリサイクルするとともに、精製液として単離されるBDO(沸点228～229℃)を得る(融点20℃)。

40

【0248】

(実施例IV)

(例示的なBDO経路)

本実施例では、1,4-ブタンジオール(BDO)合成経路についての例示的な酵素及び対応す

50

る遺伝子を記載する。

【0249】

例示的なBDO合成経路を図8～13に示す。図8～13に示される経路は、共通の中心代謝中間体から1,4-ブタンジオールまでである。図8～13に示されるすべての変換は、表14に示される変換の18の一般的範疇に含まれる。各範疇のいくつかの生化学的に特徴づけられた候補遺伝子を以下に記載する。宿主生物体においてクローン化及び発現されると図9～13の適切な変換を触媒するために適用できる遺伝子を具体的に列挙する。図9～13の主要工程の各々についての上から3つの例示的遺伝子を表15～23に示す(以下参照)。図8に示される経路のために提供された例示的な遺伝子は、本明細書に記載されている。

表14. 共通の主要代謝中間体を1,4-ブタンジオールに変換するのに必要な酵素種。各ラベルの最初の3つの数字は、最初の3つの酵素コミッション番号に対応する。コミッション番号の数字は、基質特異性に非依存的な一般的な変換の種類を示す。

【表14】

ラベル	機能
1.1.1.a	オキシドレダクターゼ(ケトンからヒドロキシル、又はアルデヒドからアルコール)
1.1.1.c	オキシドレダクターゼ(2工程、アシル-CoAからアルコール)
1.2.1.b	オキシドレダクターゼ(アシル-CoAからアルデヒド)
1.2.1.c	オキシドレダクターゼ(2-オキソ酸からアシル-CoA、脱炭酸)
1.2.1.d	オキシドレダクターゼ(リン酸化/脱リン酸化)
1.3.1.a	CH-CHドナーに作用するオキシドレダクターゼ
1.4.1.a	アミノ酸に作用するオキシドレダクターゼ
2.3.1.a	アシルトランスフェラーゼ(リン酸基を転移する)
2.6.1.a	アミトランスフェラーゼ
2.7.2.a	ホスホトランスフェラーゼ、カルボキシル基アクセプター
2.8.3.a	補酵素-Aトランスフェラーゼ
3.1.2.a	チオールエステル ヒドロラーゼ(CoA特異的)
4.1.1.a	カルボキシリアーゼ
4.2.1.a	ヒドロリアーゼ
4.3.1.a	アンモニアリアーゼ
5.3.3.a	イソメラーゼ
5.4.3.a	アミノムターゼ
6.2.1.a	酸-チオールリガーゼ

【0250】

(1.1.1.a-オキシドレダクターゼ(アルデヒドからアルコール又はケトンからヒドロキシル))

アルデヒドからアルコール、アルデヒドからアルコールの変換を触媒する酵素、即ちアルコールデヒドロゲナーゼ又は同等にアルデヒドレダクターゼをコードする例示的な遺伝子は、C2～C14の中鎖アルコールデヒドロゲナーゼをコードするalrA(Taniら、Appl. Environ. Microbiol. 66:5231-5235(2000))、サッカロマイセス・セレビシアエのADH2(Atsumiら、Nature 451:86-89(2008))、C(3)より長い分子を選択する大腸菌のyqhD(Sulzenbacherら、Journal of Molecular Biology 342:489-502(2004))ブチリアルデヒドをブタノールに変換するC.アセトブチリクムのbdhI及びbdhII(Walterら、Journal of Bacteriology 174:7149-7158(1992))を含む。これらの例示的な遺伝子生成物の各々についてのタンパク質配列を、入手可能であれば、以下のGenBank受入番号を使用して見いだすことができる。

【表 1 5】

<i>alrA</i>	BAB12273.1	アシネトバクター種M-1株
<i>ADH2</i>	NP_014032.1	サッカロミセス セレビシアエ
<i>yqhD</i>	NP_417484.1	エシェリキア コリ
<i>bdh I</i>	NP_349892.1	クロストリジウム アセトブチリウム
<i>bdh II</i>	NP_349891.1	クロストリジウム アセトブチリウム

【0 2 5 1】

4-ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼ活性を示す酵素(EC 1.1.1.61)もこの範疇に含まれる。当該酵素は、ラルストニア・ユートロファ(Bravoら、J. Forensic Sci 49:379-387(2004))、クロストリジウム・クルイベリ(Wolffら、Protein Expr. Purif. 6:206-212 (1995)及びアラビドプシス・タリアナ(Breitkreuzら、J. Biol. Chem. 278:41552-41556 (2003))において特徴づけられた。

【表 1 6】

<i>4hbd</i>	YP_726053.1	ラルストニア ユートロファH16
<i>4hbd</i>	L21902.1	クロストリジウム クルイベリDSM555
<i>4hbd</i>	Q94B07	アラビドプシス タリアナ

【0 2 5 2】

別の例示的な酵素は、3-ヒドロキシイソブチレートのメチルマロネートセミアルデヒドへの可逆的酸化を触媒する3-ヒドロキシイソブチレートデヒドロゲナーゼである。この酵素は、バリン、ロイシン及びイソロイシン分解に関与し、細菌、真核生物及び哺乳類において特定された。テルムス・テルモフィルスHB8のP84067によってコードされた酵素を構造的に特徴づけた(Lokanathら、J Mol Biol 352:905-17(2005))。同位体標識基質を使用して、ヒト3-ヒドロキシイソブチレートデヒドロゲナーゼの可逆性を実証した(Manningら、Biochem J 231:481-484(1985))。この酵素をコードするさらなる遺伝子は、ホモサピエンス(Hawesら、Methods Enzymol. 324:218-228(2000))及びオリクトラグス・クニクルス(Chowdhuryら、Biosci. Biotechnol Biochem. 60:2043-2047(1996); Hawesら、Methods Enzymol. 324:218-228(2000))の3hidh、シュードモナス・アエルギノサのmmsb及びシュードモナス・プチダ(Aberhartら、J Chem. Soc. [Perkin 1] 6:1404-1406(1979); Chowdhuryら、Biosci. Biotechnol Biochem. 67:438-441(2003); Chowdhuryら、Biosci. Biotechnol Biochem. 60:2043-2047(1996))のdhatを含む。

【表 1 7】

<i>P84067</i>	P84067	テルムス テルモフィルス
<i>mmsb</i>	P28811.1	シュードモナス アエルギノサ
<i>dhat</i>	Q59477.1	シュードモナス プチダ
<i>3hidh</i>	P31937.2	ホモ サピエンス
<i>3hidh</i>	P32185.1	オリクトラグス クニクルス

【0 2 5 3】

いくつかの3-ヒドロキシイソブチレートデヒドロゲナーゼ酵素は、また、マロン酸セミアルデヒドを3-ヒドロキシプロピオン酸(3-HP)に変換することが証明された。この活性を示す3つの遺伝子候補は、シュードモナス・アエルギノサPA01(62)のmmsβ、シュードモナス・プチダKT2440(Liaoら、US Publication 2005/0221466)のmmsβ及びシュードモナス・プチダE23(Chowdhuryら、Biosci. Biotechnol. Biochem. 60:2043-2047(1996))のmmsβである。アルカリゲネス・ファエカリス(*Alcaligenes faecalis*)M3Aにおける3-ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼ活性を有する酵素も特定された(Gokamら、米国特許第7,393,676号; Liaoら、米国公開第2005/0221466号)。ロドバクター・スパエロイデスを含む他の生物体からのさらなる遺伝子候補を配列類似性によって推定することができる。

【表 18】

<i>mmsB</i>	AAA25892.1	シュードモナス アエルギノサ
<i>mmsB</i>	NP_252259.1	シュードモナス アエルギノサ PA01
<i>mmsB</i>	NP_746775.1	シュードモナス ブチダ KT2440
<i>mmsB</i>	JC7926	シュードモナス ブチダ E23
<i>orfB1</i>	AAL26884	ロドバクター スパエロイデス

【0254】

マロン酸セミアルデヒドの3-HPへの変換を2つの他の酵素:NADH依存性3-ヒドロキシプロピオネートデヒドロゲナーゼ及びNADPH依存性マロネートセミアルデヒドレダクターゼによって実施することもできる。NADH依存性3-ヒドロキシプロピオネートデヒドロゲナーゼは、細菌及び植物におけるプロピオネートからのベータ-アラニン生合成に関与すると考えられる(Rathinasabapathi、B. Journal of Plant Pathology 159:671-674(2002);Stadtman, E. R. J. Am. Chem. Soc. 77:5765-5766(1955))。この酵素は、今日まで生物体における遺伝子と対応づけられなかった。NADPH依存性マロネートセミアルデヒドレダクターゼは、独立栄養性CO₂固定細菌における逆反応を触媒する。酵素活性は、メタロスファエラ・セデュラにおいて検出されたが、遺伝子の特異性は把握されていない(Alberら、J. Bacteriol. 188:8551-8559(2006))。

【0255】

ケトンからヒドロキシル、ケトンをヒドロキシル官能基に変換するいくつかの例示的なアルコールデヒドロゲナーゼが存在する。大腸菌の2つの当該酵素をマレートデヒドロゲナーゼ(mdh)及びラクテートデヒドロゲナーゼ(ldhA)によってコードする。加えて、ラルストニア・ユートロファのラクテートデヒドロゲナーゼは、ラクテート、2-オキシブチレート、2-オキシペンタノエート及び2-オキシグルタレートなどの様々な鎖長の基質に対して高度な活性を示すことが証明された(Steinbuchel, A. 及び H. G. Schlegel Eur. J. Biochem. 130:329-334(1983))。アルファ-ケトアジペートのアルファ-ヒドロキシアジペートへの変換を、ラット及びヒト胎盤に見いだされることが報告された酵素である2-ケトアジペートレダクターゼによって触媒することができる(Sudaら、Arch. Biochem. Biophys. 176:610-620(1976);Sudaら、Biochem. Biophys. Res. Commun. 77:586-591(1977))。この工程のためのさらなる候補は、クローン化され、特徴づけられたヒト心臓のミトコンドリア3-ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼ(bdh)である(Marksら、J. Biol. Chem. 267:15459-15463(1992))。この酵素は、3-ヒドロキシ酸に対して作用するデヒドロゲナーゼである。別の例示的なアルコールデヒドロゲナーゼは、C. ベイジェリンキー (beijerinckii) において示されたように、アセトンをイソプロパノールに変換する(Ismaielら、J. Bacteriol. 175:5097-5105(1993))及びT. brockii (Lamedら、Biochem. J. 195:183-190(1981);Peretz及びBurstein Biochemistry 28:6549-6555(1989))。

【表 19】

<i>mdh</i>	AAC76268.1	エシェリキア コリ
<i>ldhA</i>	NP_415898.1	エシェリキア コリ
<i>ldh</i>	YP_725182.1	ラルストニア ユートロファ
<i>bdh</i>	AAA58352.1	ホモ サピエンス
<i>adh</i>	AAA23199.2	クロストリジウム ベイジェリンキー NRRL B593
<i>adh</i>	P14941.1	テルモアナエロバクター ブロッキー HTD4

【0256】

アセトアセチル-CoAを3-ヒドロキシブチリル-CoAに変換する例示的な3-ヒドロキシアシルデヒドロゲナーゼは、C. アセトブチリウム (Boyntonら、Journal of Bacteriology 178:3015-3024(1996))のhbd、C. ベイジェリンキー (Colbyら、Appl Environ. Microbiol 58:3297-3302(1992))のhbd及びメタロファエラ・セデュラ (Bergら、Archaea. Science. 318:1782-1786(2007))のいくつかの類似酵素を含む。

【表 2 0】

<i>hbd</i>	NP_349314.1	クロストリジウム	アセトブチリウム
<i>hbd</i>	AAM14586.1	クロストリジウム	ベージェリンキー
<i>Msed_1423</i>	YP_001191505	メタロスファエラ	セデュラ
<i>Msed_0399</i>	YP_001190500	メタロスファエラ	セデュラ
<i>Msed_0389</i>	YP_001190490	メタロスファエラ	セデュラ
<i>Msed_1993</i>	YP_001192057	メタロスファエラ	セデュラ

【0 2 5 7】

(1.1.1.c-オキシドレダクターゼ(2工程、アシル-CoAからアルコール))

10

アシル-CoAをアルコールに変換する例示的な2工程オキシドレダクターゼは、基質を変換するもの、例えば、アセチル-CoAをエタノールに変換するもの(例えば、大腸菌の*adhE*(Kesskerら、FEBS. Lett. 281:59-63(1991))及びブチリル-CoAをブタノールに変換するもの(例えば、C.アセトブチリウム(Fontaineら、J. Bacteriol. 184:821-830(2002)))を含む。アセチル-CoAをエタノールに還元することに加えて、ロイコノストク・メセンテロイデスにおける*adhE*によってコードされる酵素は、分枝鎖化合物イソブチルアルデヒドをイソブチリル-CoAに酸化することが証明された(Kazahayaら、J. Gen. Appl. Microbiol. 18: 43-55(1972); Kooら、Biotechnol Lett. 27:505-510(2005))。

【表 2 1】

<i>adhE</i>	NP_415757.1	エシェリキア	コリ
<i>adhE2</i>	AAK09379.1	クロストリジウム	アセトブチリウム
<i>adhE</i>	AAV66076.1	ロイコノストク	メセンテロイデス

20

【0 2 5 8】

別の例示的な酵素は、マロニル-CoAを3-HPに変換することができる。この活性を有するNADPH依存性酵素は、それが3-ヒドロキシプロピオネート回路に参与するクロロフレクサス・アウランチクスにおいて特徴づけられた(Huglerら、J. Bacteriol. 184:2404-2410(2002); Strauss及びFuchs、Eur. J. Biochem. 215:633-643(1993))。300kDaの質量を有するこの酵素は、基質特異性が高く、他の既知のオキシドレダクターゼとの配列類似性をほとんど示さない(Huglerら、J. Bacteriol. 184:2404-2410(2002))。他の生物体におけるこの酵素もこの特異的反応を触媒することが示されなかった。しかし、他の生物体が類似の経路を有し得る生命情報科学的証拠が存在する(Klattら、Environ. Microbiol. 9:2067-2078(2007))。ロセイフレクサス・カステンホルジ(*Roseiflexus castenholzii*)、エリスロバクター(*Erythrobacter*)属*NAP1*及びマリガンマプロテオバクテリアHTCC2080を含む他の生物の酵素候補を配列類似性によって推定することができる。

30

【表 2 2】

<i>mcr</i>	AAS20429.1	クロロフレクスウス	アウランチアクス
<i>Rcas_2929</i>	YP_001433009.1	ロセイフレクスス	カステンホルジー
<i>NAP1_02720</i>	ZP_01039179.1	エリトロバクター種	<i>NAP1</i>
<i>MGP2080_00535</i>	ZP_01626393.1	マリガンマ	プロテオバクテリア HTCC2080

40

【0 2 5 9】

より長い鎖アシル-CoA分子を、アルコール形成脂肪酸-CoAレダクターゼをコードするホバ(シモンドシア・キネンシス)FARなどの酵素によって還元することができる。大腸菌におけるその過剰発現は、FAR活性及び脂肪酸の蓄積をもたらした(Metzら、Plant Physiology 122:635-644(2000))。

【表 2 3】

FAR

AAD38039.1

シモンドシア キネンシス

【0 2 6 0】

(1.2.1.b-オキシドレダクターゼ(アシル-CoAからアルデヒド))

いくつかのアシル-CoAデヒドロゲナーゼは、アシル-CoAを、その対応するアルデヒドに還元することが可能である。当該酵素をコードする例示的な遺伝子は、脂肪アシル-CoAレダクターゼをコードするアシネトバクター・カルコアセチクス(*Acinetobacter calcoaceticus*) *acr1* (Reiser及びSomerville, J. Bacteriology 179:2969-2975(1997))、アシネトバクター属M-1脂肪アシル-CoAレダクターゼ (Ishigeら、Appl. Environ. Microbiol. 68:1192-1195(2002))、並びにクロストリジウム・クルイベリにおける *sucD* 遺伝子によってコードされるCoA及びNADP依存性スクシネートセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ (Sohling及びGottschalk J Bacteriol 178:871-80(1996);Sohling及びGottschalk J Bacteriol. 178:871-880 (1996))を含む。P.ギンギバリスの *SucD* は、別のスクシネートセミアルデヒドデヒドロゲナーゼである (Takahashiら、J. Bacteriol. 182:4704-4710 (2000))。 *bphG* によってコード化される、シュードモナス属におけるアセトアルデヒドデヒドロゲナーゼをアシル化する酵素は、アセトアルデヒド、プロピオンアルデヒド、ブチルアルデヒド、イソブチルアルデヒド及びホルムアルデヒドを酸化及びアシル化することが証明されたため、さらに別の酵素である (Powlowskiら、J Bacteriol. 175:377-385(1993))。

【表 2 4】

<i>acr1</i>	YP_047869.1	アシネトバクター カルコアセチクス
<i>acr1</i>	AAC45217	アシネトバクター バイリイ
<i>acr1</i>	BAB85476.1	アシネトバクター種M-1株
<i>sucD</i>	P38947.1	クロストリジウム クルイベリ
<i>sucD</i>	NP_904963.1	ボルフィロモナス ギンギバリス
<i>bphG</i>	BAA03892.1	シュードモナス種

【0 2 6 1】

アシル-CoAをその対応するアルデヒドに変換するさらなる酵素型は、マロニル-CoAをマロン酸セミアルデヒドに変換するマロニル-CoAレダクターゼである。マロニル-CoAレダクターゼは、好熱酸性古細菌における3-ヒドロキシプロピオネート回路を介する独立栄養性炭素固定における主要酵素である (Bergら、Science 318:1782-1786 (2007);Thauer, R. K. Science 318:1732-1733 (2007))。酵素は、NADPHを共同因子として利用し、メタロスファエラ及びスルホロブス属において特徴づけられた (Alberら、J. Bacteriol. 188:8551-8559(2006);Huglerら、J. Bacteriol. 184:2404-2410(2002))。該酵素は、メタロスファエラ・セデュラにおける *Msed_0709* によってコードされる (Alberら、J. Bacteriol. 188:8551-8559(2006);Bergら、Science 318:1782-1786(2007))。スルホロブス・トコダイのマロニル-CoAをコードする遺伝子をクローン化し、大腸菌に非相同的に発現させた (Alberら、J. Bacteriol. 188:8551-8559 (2006))。これらの酵素のアルデヒドデヒドロゲナーゼ機能性は、クロロフレクサス・アウランチアクスの二機能性デヒドロゲナーゼに類似するが、配列類似性がほとんどない。両マロニル-CoAレダクターゼ酵素候補は、アスパルチル-4-ホスフェートのアスパルテートセミアルデヒドへの還元及び同時脱リン酸化を触媒する酵素であるアスパルテート-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼとの高度な類似性を有する。スルホロブス・ソルファタリクス及びスルホロブス・アシドカルダリウスを含む他の生物体におけるタンパク質に対する配列相同性によってさらなる遺伝子候補を見いだすことができる。

【表 2 5】

<i>Msed_0709</i>	YP_001190808.1	メタロスファエラ セデュラ
<i>mcr</i>	NP_378167.1	スルホロブス トコダイ
<i>asd-2</i>	NP_343563.1	スルホロブス ソルフアタリクス
<i>Saci_2370</i>	YP_256941.1	スルホロブス アシドカルダリウス

【0 2 6 2】

(1.2.1.c-オキシドレダクターゼ(2-オキソ酸からアシル-CoA、脱カルボキシル化))

この系統の酵素は、1)分枝鎖2-ケト酸デヒドロゲナーゼ、2)アルファ-ケトグルタレートデヒドロゲナーゼ及び3)ピルベートデヒドロゲナーゼ多酵素複合体(PDHC)を含む。これらの酵素は、2-ケト酸の酸化性脱カルボキシル化をもたらす一連の部分反応を触媒する多酵素複合体である。2-ケト酸デヒドロゲナーゼ複合体のそれぞれは、中間的代謝における主要位置を占め、酵素活性は、典型的には厳密に制御される(Friesら、Biochemistry 42:6996-7002(2003))。それらの酵素は、アルファ-ケト酸デカルボキシラーゼ(E1)、ジヒドロリポアミドアシルトランスフェラーゼ(E2)及びジヒドロリポアミドデヒドロゲナーゼ(E3)の3つの触媒成分の多数の複製物で構成された複雑であるが、共通の構造体を共有する。E3成分は、生物体におけるすべての2-ケト酸デヒドロゲナーゼ複合体の間で共有され、E1及びE2成分は、異なる遺伝子によってコードされる。酵素成分は、複合体に多くの複製物で存在し、基質チャネリングを介して反応の指向性配列を触媒するために多数の共同因子を利用する。これらのデヒドロゲナーゼ複合体の全体的なサイズは非常に大きく、分子質量は、4から1000万Daである(即ち、リボソームより大きい)。

【0 2 6 3】

2-ケト酸デヒドロゲナーゼ系統における酵素の活性は、通常、大腸菌における嫌気性条件下では低く、又は限定される。NADH(又はNADPH)の生成が増加すると、酸化還元不均衡を招く可能性があり、NADHそのものは、酵素機能に対する阻害薬として働く。工学技術的試みによって、大腸菌ピルベートデヒドロゲナーゼ複合体の嫌気性活性が高められた(Kimら、Appl.Environ.Microbiol. 73:1766-1771(2007);Kimら、J. Bacteriol. 190:3851-3858(2008);Zhouら、Biotechnol.Lett. 30:335-342(2008))。例えば、NADHの阻害効果を、E3成分におけるH322Y変異を操作することによって克服することができる(Kimら、J. Bacteriol. 190:3851-3858(2008))。個々の成分、及びそれらが複合体において如何に協働するかということについての構造的な研究は、この系統における酵素の触媒メカニズム及び構造への洞察を与える(Aevarssonら、Nat.Struct.Biol. 6:785-792(1999);Zhouら、Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 98:14802-14807(2001))。デヒドロゲナーゼ複合体の基質特異性は、それぞれの生物体で異なるが、一般に、分枝鎖ケト酸デヒドロゲナーゼは、最も広い基質範囲を有する。

【0 2 6 4】

アルファ-ケトグルタレートデヒドロゲナーゼ(AKGD)は、アルファ-ケトグルタレートをスクシニル-CoAに変換し、TCA回路を介する代謝の流れの制御の主たる部位である(Hansford, R. G. Curr. Top. Bioenerg. 10:217-278(1980))。大腸菌における遺伝子sucA、sucB及びlpdによってコードされると、AKGD遺伝子発現は、嫌気性条件下で、且つグルコース上での成長時に下方制御される(Parkら、Mol. Microbiol. 15:473-482(1995))。AKGDの基質範囲は狭いが、E2成分の触媒的中核の構造的な研究により、基質特異性に関与する特異的残基が正確に指摘されている(Knappら、J. Mol. Biol. 280:655-668(1998))。odhAB(E1及びE2)並びにpdhD(E3、共有領域)によってコードされるバシルス・スプチリスAKGDは、転写レベルで制御され、生物体の炭素源及び成長段階に依存する(Resnekovら、Mol. Gen. Genet. 234:285-296(1992))。酵母において、E3成分をコードするLPD1遺伝子は、グルコースによって転写レベルで制御される(Roy及びDawes J. Gen. Microbiol. 133:925-933(1987))。KGD1によってコードされるE1成分もグルコースによって制御され、HAP2及びHAP3の生成物によって活性化される(Repetto及びTzagoloff Mol. Cell Biol. 9:2695-2705(1989))。NADH及びスクシニル-CoAによって阻害されるAKGD酵素複合体は、その阻害された機能

がいくつかの神経疾患に関連づけられてきたように、哺乳類系において十分に研究されている(Tretter及びdam-Vizi Philos.Trans.R.Soc.LondB Biol. Sci. 360:2335-2345(2005))。

【表 2 6】

<i>sucA</i>	NP_415254.1	エシェリキア コリ K12株 MG1655亜株
<i>sucB</i>	NP_415255.1	エシェリキア コリ K12株 MG1655亜株
<i>lpd</i>	NP_414658.1	エシェリキア コリ K12株 MG1655亜株
<i>odhA</i>	P23129.2	バシルス スブチリス
<i>odhB</i>	P16263.1	バシルス スブチリス
<i>pdhD</i>	P21880.1	バシルス スブチリス
<i>KGD1</i>	NP_012141.1	サッカロミセス セレビシアエ
<i>KGD2</i>	NP_010432.1	サッカロミセス セレビシアエ
<i>LPD1</i>	NP_116635.1	サッカロミセス セレビシアエ

10

【0 2 6 5】

2-オキシソバレートデヒドロゲナーゼとしても知られる分枝鎖2-ケト酸デヒドロゲナーゼ複合体(BCKAD)は、分枝鎖アミノ酸分解経路に関与して、バリン、ロイシン及びイソロイシンの2-ケト酸をそれらのアシル-CoA誘導体及びCO₂に変換する。バシルス・スブチリス(Wangら、Eur. J. Biochem. 213:1091-1099(1993))、ラツス・ノルベギクス(Nambaら、J.Biol.Chem. 244:4437-4447(1969))及びシュードモナス・プチダ(Sokatch J.Bacteriol. 148:647-652(1981))を含む多くの生物体における複合体が研究された。バシルス・スブチリスにおいて、酵素は、遺伝子pdhD(E3成分)、bfmBB(E2成分)、bfmBAA及びbfmBAB(E1成分)によってコードされる(Wangら、Eur. J. Biochem. 213:1091-1099(1993))。哺乳類において、複合体は、特定のホスファターゼ及びタンパク質キナーゼによるリン酸化によって制御される。複合体は、ラット肝細胞において研究されており(Chiccoら、J. Biol. Chem. 269:19427-19434(1994))、遺伝子Bckdha(E1アルファ)、Bckdhb(E1ベータ)、Dbt(E2)及びDld(E3)によってコードされる。シュードモナス・プチダBCKAD複合体のE1及びE3成分が結晶化され(Aevarssonら、Nat. Struct. Biol. 6:785-792(1999);Mattevi Science 255:1544-1550(1992))、酵素複合体の研究が行われた(Sokatchら、J.Bacteriol.148:647-652 (1981))。P. プチダBCKAD遺伝子の転写は、bkdRの遺伝子生成物によって活性化される(Hesterら、Eur.J.Biochem. 233:828-836(1995))。ラッタス・ノルベギクス(Paxtonら、Biochem. J. 234:295-303(1986))及びサッカロマイセス・セレビシアエ(Sinclairら、Biochem. Mol. Biol. Int. 31:911-922(1993))を含むいくつかの生物体において、この複合体は、分枝鎖アミノ酸前駆体に加えて、2-オキシブタノエート及びアルファ-ケトグルタレートなどの直鎖状オキシ酸を含む広い基質範囲を有することが証明された。ウシBCKADの活性部位を代替的基質アセチル-CoAに有利になるように操作した(Meng及びChuang、Biochemistry 33:12879-12885(1994))。

20

30

【表 2 7】

<i>bfmBB</i>	NP_390283.1	バシルス スブチリス
<i>bfmBAA</i>	NP_390285.1	バシルス スブチリス
<i>bfmBAB</i>	NP_390284.1	バシルス スブチリス
<i>pdhD</i>	P21880.1	バシルス スブチリス
<i>lpdV</i>	P09063.1	シュードモナス プチダ
<i>bkdB</i>	P09062.1	シュードモナス プチダ
<i>bkdA1</i>	NP_746515.1	シュードモナス プチダ
<i>bkdA2</i>	NP_746516.1	シュードモナス プチダ
<i>Bckdha</i>	NP_036914.1	ラツス ノルベギクス
<i>Bckdhb</i>	NP_062140.1	ラツス ノルベギクス
<i>Dbt</i>	NP_445764.1	ラツス ノルベギクス
<i>Dld</i>	NP_955417.1	ラツス ノルベギクス

40

50

【0266】

ピルベートのアセチル-CoAへの変換を触媒するピルベートデヒドロゲナーゼ複合体についても広範囲に研究が行われた。大腸菌酵素において、E1成分における特異的残基が、基質特異性に関与する(Bissswanger, H. J Biol Chem. 256:815-822(1981);Bremer, J. Eur. J Biochem. 8:535-540(1969);Gongら、J Biol Chem. 275:13645-13653(2000))。既に述べたように、酵素工学技術の試みにより、嫌気性条件下での大腸菌PDH酵素活性が向上した(Kimら、Appl.Environ.Microbiol. 73:1766-1771(2007);Kim J.Bacteriol.190:3851-3858(2008);Zhouら、Biotechnol.Lett. 30:335-342(2008))。大腸菌PDHとは対照的に、B.スブチリス複合体は活性であり、嫌気性条件下での成長に必要とされる(Nakano J.Bacteriol. 179:6749-6755 (1997))。グリセロール上での成長時に特徴づけられたクレブシエラ・ニューモニアエPDHも嫌気性条件下で活性である。ウシ腎臓の酵素複合体(Zhouら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:14802-14807(2001))及びアゾトバクター・ビネランジ(*Azotobacter vinelandii*)のE2触媒領域の結晶構造が入手可能である(Matteviら、Science 255:1544-1550(1992))。いくつかの哺乳類PDH酵素複合体は、2-オキソブタノエートなどの代替的基質上で反応することができるが、ラッタス・ノルベギクスPDH及びBCKADの相対的動力学は、BCKADが、基質としての2-オキソブタノエート上でより高い活性を有することを示している(Paxtonら、Biochem. J. 234:295-303(1986))。

【表28】

<i>aceE</i>	NP_414656.1	エシェリキア コリ K12株 MGH1655亜株
<i>aceF</i>	NP_414657.1	エシェリキア コリ K12株 MGH1655亜株
<i>lpd</i>	NP_414658.1	エシェリキア コリ K12株 MGH1655亜株
<i>pdhA</i>	P21881.1	バシルス スブチリス
<i>pdhB</i>	P21882.1	バシルス スブチリス
<i>pdhC</i>	P21883.2	バシルス スブチリス
<i>pdhD</i>	P21880.1	バシルス スブチリス
<i>aceE</i>	YP_001333808.1	クレブシエラ ニューモニアMGH78578
<i>aceF</i>	YP_001333809.1	クレブシエラ ニューモニアMGH78578
<i>lpdA</i>	YP_001333810.1	クレブシエラ ニューモニアMGH78578
<i>PdhA1</i>	NP_001004072.2	ラツス ノルベギクス
<i>PdhA2</i>	NP_446446.1	ラツス ノルベギクス
<i>Dlat</i>	NP_112287.1	ラツス ノルベギクス
<i>Dld</i>	NP_955417.1	ラツス ノルベギクス

【0267】

上記大きな多酵素2-ケト酸デヒドロゲナーゼ複合体の代替として、いくつかの嫌気性生物体は、2-ケト酸オキシドレダクターゼ系統(OFOR)の酵素を利用して、2-ケト酸のアシル化酸化性脱カルボキシル化を触媒する。デヒドロゲナーゼ複合体と異なり、これらの酵素は、鉄-硫黄集団を含み、異なる共同因子を利用し、NAD(P)Hの代わりに電子受容体としてフェレドキシン又はフラボジキシンを使用する。この系統のたいていの酵素は、基質(POR)としてピルベートに特異的であるが、いくつかの2-ケト酸:フェレドキシンオキシドレダクターゼは、アルファ-ケトグルタレート及び2-オキソブタノエートを含む基質として広範囲の2-ケト酸を受容することが証明された(Fukuda及びWakagi Biochim.Biophys.Acta 1597:74-80(2002);Zhangら、J.Biochem. 120:587-599(1996))。1つの当該酵素は、遺伝子S T2300によってコードされたアルファ及びベータサブユニットを含む好熱酸性古菌スルホロブス・トコダイ7のOFORである(Fukuda及びWakagi Biochim.Biophys.Acta 1597:74-80(2002);Zhangら、J.Biochem. 120:587-599(1996))。大腸菌におけるこのタンパク質を効率的に発現させるためにプラスミド系発現システムが開発されており(Fukuda他、Eur. J. Biochem. 268:5639-5646(2001))、基質特異性に関与する残基が確認された(Fukuda及びWakagi Biochim. Biophys. Acta 1597:74-80(2002))。最近、アエロピルム・ペルニクス(*Aeropyrum pernix*)str.K1の2つのOFORも大腸菌にクローン化され、特徴づけられ、広範囲の2-オキソ酸と反応することが判明した(Nishizawaら、FEBS Lett. 579:2319-2322(2005))。

これらのOFOR候補の遺伝子配列が入手可能であるが、それらは、今日までGenBank識別子が割り当てられていない。類似の酵素がすべての古細菌、いくつかの嫌気性細菌及びミトコンドリアのない真核生物に存在する生命情報科学的証拠が存在する(Fukuda及びWakagi Biochim. Biophys. Acta 1597:74-80(2005))。このクラスの酵素は、還元フェレドキシンを使用して、フェレドキシンNADレダクターゼによりNADHを生成することができるため、エネルギーの観点からも興味深い(Petidemangeら、Biochem. Biophys. Acta 421:334-337(1976))。また、酵素のほとんどが嫌気性条件下で作用するように設計されるため、嫌気性条件下での作用のために必要な酵素操作が、2-ケト酸デヒドロゲナーゼ複合体系統における酵素と比べて少なく済む。

【表 2 9】

10

ST2300

NP_378302.1

スルホロブス トコダイ7

【0 2 6 8】

(1.2.1.d-オキシドレダクターゼ(リン酸化/脱リン酸化))

このクラスにおける例示的な酵素は、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートをD-グリセレート1,3-ビスホスフェートに変換するグリセルアルデヒド3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ(例えば、大腸菌gapA(Branlant及びBranlant Eur. J. Biochem. 150:61-66(1985))、L-アスパルテート-4-セミアルデヒドをL-4-アスパルチル-ホスフェートに変換するアスパルテート-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(例えば、大腸菌asd(Biellmannら、Eur. J. Biochem. 104:53-58(1980))、N-アセチル-L-グルタメート-5-セミアルデヒドをN-アセチル-L-グルタミル-5-ホスフェートに変換するN-アセチル-ガンマ-グルタミル-ホスフェートレダクターゼ(例えば、大腸菌argC(Parsotら、Gene 68:275-283(1988))、及びL-グルタメート-5-セミアルデヒドをL-グルタミル-5-ホスフェートに変換するグルタメート-5-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(例えば、大腸菌proA(Smithら、J. Bacteriol. 157:545-551(1984))を含む。

20

【表 3 0】

<i>gapA</i>	P0A9B2.2	エシェリキア コリ
<i>asd</i>	NP_417891.1	エシェリキア コリ
<i>argC</i>	NP_418393.1	エシェリキア コリ
<i>proA</i>	NP_414778.1	エシェリキア コリ

30

【0 2 6 9】

(1.3.1.a-CH-CH供与体に作用するオキシドレダクターゼ)

例示的なエノイル-CoAレダクターゼは、クロトニル-CoAのブチリル-CoAへの還元を自然に触媒するC.アセトブチリクムのbcdの遺伝子生成物である(Atsumiら、Metab Eng(2007); Boyntonら、Journal of Bacteriology 178:3015-3024(1996))。電子転移フラボタンパク質をコードするC.アセトブチリクムetfAB遺伝子の発現と並行してbcdを発現させることによって酵素の活性を高めることができる。エノイル-CoAレダクターゼ工程のさらなる候補はE.グラシリス(*gracilis*)のミトコンドリアエノイル-CoAレダクターゼである(Hoffmeisterら、Journal of Biological Chemistry 280:4329-4338(2005))。そのミトコンドリア標的リーダー配列の除去に続いてこの配列から誘導された構築物を大腸菌にクローン化することで活性酵素を得た(Hoffmeisterら、前出、(2005))。このアプローチは、真核生物遺伝子、特に、原核生物体において、特定の細胞内区画に遺伝子生成物を導くことができるリーダー配列を有する遺伝子を発現させる技術分野の当業者に周知である。原核生物トレポネマ・デデンチコラ(*Treponema denticola*)のこの遺伝子の近相同体TDE0597は、大腸菌においてクローン化及び発現された第3のエノイル-CoAレダクターゼを表す(Tucci及びMartin FEBS Letters 581:1561-1566(2007))。

40

【表 3 1】

<i>bcd</i>	NP_349317.1	クロストリジウム アセトブチリウム
<i>etfA</i>	NP_349315.1	クロストリジウム アセトブチリウム
<i>etfB</i>	NP_349316.1	クロストリジウム アセトブチリウム
TER	Q5EU90.1	ユーグレナ グラシリス
TDE0597	NP_971211.1	トレポネマ デンチコラ

【0 2 7 0】

例示的な2-エノエートレダクターゼ(EC1.3.1.31)酵素は、多種多様な α , β -不飽和カルボン酸及びアルデヒドのNADH依存性還元を触媒することが知られる(Rohdichら、J. Biol. Chem. 276:5779-5787(2001))。2-エノエートレダクターゼは、*C. チロブチリウム*及び*C. テルモアセチウム*(ここではモオレラ・テルモアセチウム(*Moorella thermoacetica*))と呼ぶ(Rohdichら、前出、(2001))を含むいくつかの種のクロストリジア(*Giesel*及び*Simon Arch Microbiol.* 135(1):p.51-57(2001))における*enr*によってコードされる。最近公表された*C. クルイベリ*のゲノム配列において、エノエートレダクターゼに対する9つのコード化配列が報告され、そのうちの1つが特徴づけられた(Seedorfら、Proc Natl Acad Sci U. S. A. 105(6):2128-33(2008))。*C. チロブチリウム*及び*C. テルモアセチウム*の両方の*enr*遺伝子がクローン化及び配列され、互いに59%の同一性を示す。前者の遺伝子は、*C. クルイベリ*における特徴づけられた遺伝子に対して約75%の類似性を示すことも判明した(*Giesel*及び*Simon Arch Microbiol.* 135(1):51-57(1983))。これらの配列に基づいて、*enr*は、大腸菌におけるジエノイルCoAレダクターゼ(*fadH*)に極めて類似していることが報告された(163 Rohdichら、前出(2001))。*C. テルモアセチウム**enr*遺伝子は、また、大腸菌において酵素活性型で発現された(163 Rohdichら、前出(2001))。

【表 3 2】

<i>fadH</i>	NP_417552.1	エシェリキア コリ
<i>enr</i>	ACA54153.1	クロストリジウム ボツリヌスA3株
<i>enr</i>	CAA71086.1	クロストリジウム チロブチリウム
<i>enr</i>	CAA76083.1	クロストリジウム クルイベリ
<i>enr</i>	YP_430895.1	ムーレラ テルモアセチカ

【0 2 7 1】

(1.4.1.a-アミノ酸に作用するオキシドレダクターゼ)

アミノ酸に作用するほとんどのオキシドレダクターゼは、NAD⁺あるいはNADP⁺を受容体とするアルファ-アミノ酸の酸化性脱アミノ化を触媒する。アミノ酸に作用する例示的なオキシドレダクターゼは、*gdhA*によってコードされるグルタメートデヒドロゲナーゼ(脱アミノ化)、*ldh*によってコードされるロイシンデヒドロゲナーゼ(脱アミノ化)、及び*nadX*によってコード化されるアスパルテートデヒドロゲナーゼ(脱アミノ化)を含む。エシェリキア・コリの*gdhA*遺伝子生成物(Korberら、J. Mol. Biol. 234:1270-1273(1993);McPherson及びWootton Nucleic. Acids Res. 11:5257-5266(1983))、テルモトガ・マリチマの*gdh*(Kortら、Extremophiles 1:52-60(1997);Lebbinkら、J. Mol. Biol. 280:287-296(1998)) ;Lebbinkら、J. Mol. Biol. 289:357-369(1999))、及びハロバクテリウム・サリナルムの*gdhAl*(Ingoldsbyら、Gene 349:237-244(2005))は、グルタメートと2-オキシグルタレート及びアンモニアとの可逆的相互変換を触媒し、それぞれNADP(H)、NAD(H)又はその両方に有利に働く。バシルス・セレウスの*ldh*遺伝子は、ロイシン、イソロイシン、バリン及び2-アミノブタノエートを含む広範な基質を有するLeuDHタンパク質をコードする(Ansorge及びKula Biotechnol Bioeng. 68:557-562(2000);Stoyanら、J. Biotechnol 54:77-80(1997))。アスパルテートデヒドロゲナーゼに対してコードするテルモトガ・マリチマ(*Thermotoga maritima*)の*nadX*遺伝子は、NADの生合成に参与する(Yangら、J. Biol. Chem. 278:8804-8808 (2003))。

【表 3 3】

<i>gdhA</i>	P00370	エシェリキア コリ
<i>gdh</i>	P96110.4	テルモトガ マリチマ
<i>gdhA1</i>	NP_279651.1	ハロバクテリウム サリナルム
<i>ldh</i>	P0A393	バシルス セレウス
<i>nadX</i>	NP_229443.1	テルモトガ マリチマ

【0 2 7 2】

lysDH遺伝子によってコードされるリジン6-デヒドロゲナーゼ(脱アミノ化)は、L-リジンのε-アミノ基の酸化性脱アミノ化を触媒して2-アミノアジペート-6-セミアルデヒドを形成し、次にそれが非酵素的に環化して、Δ1-ピペリジン-6-カルボキシレートを形成する(Misono及びNagasaki J.Bacteriol. 150:398-401(1982))。ゲオバシルス・ステアロテルモフィルスのlysDH遺伝子は、NAD依存性リジン6-デヒドロゲナーゼをコードする(Heydariら、Appl Environ.Microbiol 70:937-942(2004))。加えて、アエロピルム・ペルニクスK1のlysDH遺伝子は、ゲノムプロジェクトから相同性を介して特定される。

【表 3 4】

<i>lysDH</i>	AB052732	ゲオバシルス ステアロテルモフィルス
<i>lysDH</i>	NP_147035.1	アエロピルム ペルニクスK1
<i>ldh</i>	P0A393	バシルス セレウス

【0 2 7 3】

(2.3.1.a-アシルトランスフェラーゼ(ホスフェート基の転移))

例示的なホスフェート転移アシルトランスフェラーゼは、ptaによってコードされるホスホトランスアセチラーゼ及びptbによってコードされるホスホトランスブチリラーゼを含む。大腸菌のpta遺伝子は、アセチル-CoAをアセチル-ホスフェートに、又はその逆に変換することができる酵素をコードする(Suzuki, T. Biochim. Biophys. Acta 191:559-569(1969))。この酵素は、そのプロセスでプロピオネートを形成するアセチル-CoAの代わりにプロピオニル-CoAを利用することもできる(Hesslingerら、Mol.Microbiol 27:477-492(1998))。同様に、C.アセトブチリクムのptb遺伝子は、ブチリル-CoAをブチリル-ホスフェートに変換することができる酵素をコードする(Walterら、Gene 134(1):p. 107-11 (1993);Huangら、J Mol Microbiol Biotechnol 2(1):p.33-38(2000))。さらなるptb遺伝子をブチレート生成細菌L2-50(Louisら、J.Bacteriol.186:2099-2106(2004))及びバシルス・メガテリウム(Vazquezら、Curr.Microbiol 42:345-349(2001))に見いだすことができる。

【表 3 5】

<i>pta</i>	NP_416800.1	エシェリキア コリ
<i>ptb</i>	NP_349676	クロストリジウム アセトブチリクム
<i>ptb</i>	AAR19757.1	酪酸産生菌L2-50
<i>ptb</i>	CAC07932.1	バシルス メガテリウム

(2.6.1.a-アミノトランスフェラーゼ)

アスパルテートアミノトランスフェラーゼは、アミノ基をアスパルテートからアルファ-ケトグルタレートに転移して、グルタメート及びオキサロアセテートを形成する。この変換は、例えば、エシェリキア・コリのaspC(Yagiら、FEBS Lett. 100:81-84(1979);Yagiら、Methods Enzymol. 113:83-89(1985))、サッカロマイセス・セレビシアエのAAT2(Yagiら、J Biochem.92:35-43 (1982))及びアラビドプシス・タリアナのASP5(48, 108, 225 48 . de laら、Plant J 46:414-425(2006);Kwok及びHanson J Exp.Bot. 55:595-604(2004);Wilkie及びWarren Protein Expr.Purif. 12:381-389(1998))の遺伝子生成物によって触媒される。バリンアミノトランスフェラーゼは、バリン及びピルベートの2-ケトイソバレレ

ート及びアラニンへの変換を触媒する。大腸菌遺伝子 *avtA* は、1つの当該酵素をコードする (Whalen 及び Berg J. Bacteriol. 150:739-746(1982))。この遺伝子生成物は、また、 α -ケトブチレートのアミノ化を触媒して α -アミノブチレートを生成するが、この反応におけるアミン供与体は特定されていない (Whalen 及び Berg J. Bacteriol. 158:571-574(1984))。大腸菌 *serC* の遺伝子生成物は、2つの反応、ホスホセリンアミノトランスフェラーゼ及びホスホヒドロキシトレオニンアミノトランスフェラーゼを触媒し (Lam 及び Winkler J. Bacteriol. 172:6518-6528(1990))、非リン酸化基質に対する活性を検出できなかった (Drewke ら、FEBS. Lett. 390:179-182(1996))。

【表 3 6】

<i>aspC</i>	NP_415448.1	エシェリキア コリ
<i>AAT2</i>	P23542.3	サッカロミセス セレビシアエ
<i>ASP5</i>	P46248.2	アラビドプシス タリアナ
<i>avtA</i>	YP_026231.1	エシェリキア コリ
<i>serC</i>	NP_415427.1	エシェリキア コリ

10

【0 2 7 4】

Cargill は、マロニル-セミアルデヒドを介してベータ-アラニンから 3-HP を生成するためのベータ-アラニン/アルファ-ケトグルタレートアミノトランスフェラーゼを開発した (PCT/US2007/076252 (Jessen ら))。サッカロマイセス・クルイベリにおける SkPYD4 の遺伝子生成物は、また、ベータ-アラニンをアミノ基供与体として優先的に使用することが証明された (Andersen ら、FEBS. J. 274:1804-1817 (2007))。SkUGA1 は、サッカロマイセス・セレビシアエ GABA アミノトランスフェラーゼ、UGA1 の相同体をコードする (Ramos ら、Eur. J. Biochem. 149:401-404(1985)) のに対して、SkPYK4 は、 β -アラニン及び GABA アミノ交換反応に関与する酵素をコードする (Andersen ら、FEBS. J. 274:1804-1817(2007))。3-アミノ-2-メチルプロピオネートトランスアミナーゼは、メチルマロネートセミアルデヒドから 3-アミノ-2-メチルプロピオネートへの変換を触媒する。該酵素は、ラッタス・ノルベギクス及びサス・スクロファにおいて特徴づけられ、Abat によってコードされる (Kakimoto ら、Biochim. Biophys. Acta 156:374-380(1968); Tamaki ら、Methods Enzymol. 324:376-389(2000))。3-アミノ-2-メチルプロピオネートトランスアミナーゼに対して高度な配列相同性を有する他の生物体における酵素候補は、C. エレガンスの *Gta-1* 及びバシルス・スプチルス (*Bacillus subtilus*) の *gabT* を含む。さらに、遺伝子 *gabT* によってコードされる大腸菌の原生 GABA アミノトランスフェラーゼの 1 つは、広い基質特異性を有することが証明された (Liu ら、Biochemistry 43:10896-10905(2004); Schulz ら、Appl Environ Microbiol 56:1-6(1990))。puuE の遺伝子生成物は、大腸菌における他の 4-アミノブチレートトランスアミナーゼを触媒する (Kurihara ら、J. Biol. Chem. 280:4602-4608(2005))。

20

30

【表 3 7】

<i>SkyPYD4</i>	ABF58893.1	サッカロミセス クルイベリ
<i>SkUGA1</i>	ABF58894.1	サッカロミセス クルイベリ
<i>UGA1</i>	NP_011533.1	サッカロミセス セレビシアエ
<i>Abat</i>	P50554.3	ラツス ノルベギクス
<i>Abat</i>	P80147.2	サス スクロファ
<i>Gta-1</i>	Q21217.1	カエノルハブジチス エレガンス
<i>gabT</i>	P94427.1	バシルス スプチルス
<i>gabT</i>	P22256.1	エシェリキア コリ K12
<i>puuE</i>	NP_415818.1	エシェリキア コリ K12

40

【0 2 7 5】

阻害薬に結合しない大腸菌 4-アミノブチレートトランスアミナーゼ及び阻害薬に結合した大腸菌 4-アミノブチレートトランスアミナーゼの X 線結晶構造が報告された (Liu ら、Biochemistry 43:10896-10905(2004))。基質結合及び基質特異性が研究及び示唆された。活性部位残基の役割が、部位指向性変異及び X 線結晶構造解析によって研究された (Liu ら、B

50

iochemistry 44:2982-2992(2005))。構造情報に基づいて、新規の酵素活性を有する大腸菌4-アミノブチレートトランスフェラーゼを操作する試みがなされた。これらの研究は、BDO経路のためのトランスアミナーゼ活性を発展させる基礎を提供する。

【0276】

(2.7.2.a-ホスホトランスフェラーゼ、カルボキシル基受容体)

例示的なキナーゼは、ackAによってコードされる大腸菌アセテートキナーゼ(Skarstedt及びSilverstein J. Biol. Chem. 251:6775-6783(1976))、buk1及びbuk2によってコードされるC.アセトブチリウムブチレートキナーゼ(Walterら、Gene 134(1):107-111(1993)(Huangら、J Mol Microbiol Biotechnol 2(1):33-38(2000))、及びproBによってコードされる大腸菌ガンマ-グルタミルキナーゼ(Smithら、J.Bacteriol. 157:545-551(1984))を含む。これらの酵素は、それぞれアセテート、ブチレート及びグルタメートをリン酸化する。大腸菌のackA遺伝子生成物は、プロピオネートをもリン酸化する(Hesslingerら、Mol. Microbiol 27:477-492(1998))。

【表38】

<i>ackA</i>	NP_416799.1	エシェリキア コリ
<i>buk1</i>	NP_349675	クロストリジウム アセトブチリウム
<i>buk2</i>	Q97II1	クロストリジウム アセトブチリウム
<i>proB</i>	NP_414777.1	エシェリキア コリ

【0277】

(2.8.3.a-補酵素Aトランスフェラーゼ)

CoA-トランスフェラーゼ系統において、アセテート-CoAトランスフェラーゼ(EC2.8.3.8)としても知られる大腸菌酵素アシル-CoA:アセテート-CoAトランスフェラーゼは、イソブチレート(Matthies及びSchink Appl Environ Microbiol 58:1435-1439(1992))、バレレート(Vanderwinkelら、Biochem. Biophys. Res Commun. 33:902-908(1968)及びブタノエート(Vanderwinkel、前出(1968))を含む様々な分枝状及び直鎖状アシル-CoA基質からCoA部分をアセテートに転移することが証明された。この酵素は、大腸菌種K12におけるatoA(アルファサブユニット)及びatoD(ベータサブユニット)(Korolevら、Acta Crystallogr. D Biol Crystallogr. 58:2116-2121(2002); Vanderwinkel、前出(1968))、並びにコリネバクテリウム・グルタミクムにおけるactA及びcg0592(Duncanら、Appl Environ Microbiol 68:5186-5190(2002))によってコードされる。配列相同性によって見いだされるさらなる遺伝子は、エシェリキア・コリUT189のatoD及びatoAを含む。

【表39】

<i>atoA</i>	P76459.1	エシェリキア コリK12
<i>atoD</i>	P76458.1	エシェリキア コリK12
<i>actA</i>	YP_226809.1	コリネバクテリウム グルタミクムATCC 13032
<i>cg0592</i>	YP_224801.1	コリネバクテリウム グルタミクムATCC 13032
<i>atoA</i>	ABE07971.1	エシェリキア コリUT189
<i>atoD</i>	ABE07970.1	エシェリキア コリUT189

【0278】

類似の変換が、それぞれスクシニル-CoA、4-ヒドロキシブチリル-CoA及びブチリル-CoAアセチルトランスフェラーゼ活性を示すことが証明されたクロストリジウム・クルイベリcat1、cat2及びcat3の遺伝子生成物によって触媒される(Seedorfら、Proc Natl Acad Sci U.S.A. 105(6):2128-2133(2008); Sohling及びGottschalk J Bacteriol 178(3):871-880(1996))。

10

20

30

40

【表 4 0】

<i>cat1</i>	P38946.1	クロストリジウム クルイペリ
<i>cat2</i>	P38942.2	クロストリジウム クルイペリ
<i>cat3</i>	EDK35586.1	クロストリジウム クルイペリ

【0 2 7 9】

嫌気性細菌アシダミノコッカス・フェルメンタンス(*Acidaminococcus fermentans*)のグルタコネート-CoA-トランスフェラーゼ(EC2.8.3.12)酵素は、二酸グルタコニル-CoA及び3-ブテノイル-CoAと反応する(Mack及びBuckel FEBS Lett. 405:209-212(1997))。この酵素をコードする遺伝子は、*gctA*及び*gctB*である。この酵素は、活性が低いが検出可能であり、他のCoA誘導体は、グルタリル-CoA、2-ヒドロキシグルタリル-CoA、アジピル-CoA及びアクリル-CoAを含む(Buckelら、Eur. J. Biochem. 118:315-321(1981))。該酵素は、大腸菌においてクローン化及び発現された(Macら、Eur. J. Biochem. 226:41-51(1994))。

10

【表 4 1】

<i>gctA</i>	CAA57199.1	アシダミノコッカス フェルメンタンス
<i>gctB</i>	CAA57200.1	アシダミノコッカス フェルメンタンス

【0 2 8 0】

(3.1.2.a-チオールエステルヒドロラーゼ(CoA特異的))

20

CoAヒドロラーゼ系統において、酵素3-ヒドロキシイソブチリル-CoAヒドロラーゼは、3-HIBCoAに対して特異的であり、バリン分解中に所望の変換を効率的に触媒することが示された(Shimomuraら、J Biol Chem 269:14248-14253(1994))。この酵素をコードする遺伝子は、ラッタス・ノルベギクス(Shimomuraら、前出(1994);Shimomuraら、Methods Enzymol 324:229-240(2000))及びホモサピエンス(Shimomuraら、前出、2000)の*hibch*を含む。配列相同性による候補遺伝子は、サッカロマイセス・セレビシアエの*hibch*及びバシルス・セレウスのBC_2292を含む。

【表 4 2】

<i>hibch</i>	Q5XIE6.2	ラツス ノルベギクス
<i>hibch</i>	Q6NVY1.2	ホモ サピエンス
<i>hibch</i>	P28817.2	サッカロマイセス セレビシアエ
BC_2292	Q81DR3	バシルス セレウス

30

【0 2 8 1】

アジピル-CoAのアジペートへの変換をアシル-CoAヒドロラーゼ又は同等にチオエステラーゼによって実施することができる。最上の大腸菌遺伝子候補は、アジピル-CoAに対する活性を有するジカルボン酸アセチルトランスフェラーゼであるヒト*acot8*(Westinら、J Biol Chem 280(46):38125-38132(2005))に対して高い類似性を示す*tesB*(Naggertら、J. Biol Chem. 266(17):11044-11050(1991))である。この活性は、ラット肝臓において特徴づけられた(Deana、Biochem. Int. 26(4):p.767-773(1992))。

40

【表 4 3】

<i>tesB</i>	NP_414986	エシェリキア コリ
<i>acot8</i>	CAA15502	ホモ サピエンス
<i>acot8</i>	NP_570112	ラツス ノルベギクス

【0 2 8 2】

他の潜在的大腸菌チオールエステルヒドロラーゼは、*tesA*(Bonner及びBloch、J Biol Chem. 247(10):3123-3133(1972))、*ybgC*(Kuznetsovaら、FEMS Microbiol Rev. 29(2):263-279(2005);Zhuangら、FEBS Lett. 516(1-3):161-163(2002))、*paaI*(Songら、J Biol Chem

50

. 281(16):11028-11038(2006))及びybdB(Leducら、J Bacteriol. 189(19):7112-7126(2007))を含む。

【表 4 4】

<i>tesA</i>	NP_415027	エシェリキア コリ
<i>ybgC</i>	NP_415264	エシェリキア コリ
<i>paal</i>	NP_415914	エシェリキア コリ
<i>ybdB</i>	NP_415129	エシェリキア コリ

【0 2 8 3】

いくつかの真核性アセチル-CoAヒドロラーゼ(EC3.1.2.1)は、広い基質特異性を有する。ラッタス・ノルベギクス脳の酵素(Robinsonら、Biochem.Biophys. Res.Commun. 71:959-965 (1976))は、ブチリル-CoA、ヘキサノイル-CoA及びマロニル-CoAと反応することができる。

【表 4 5】

<i>acot12</i>	NP_570103.1	ラツス ノルベギクス
---------------	-------------	------------

【0 2 8 4】

(4.1.1.a-カルボキシ-リアーゼ)

例示的なカルボキシ-リアーゼは、2-アセトラクテートをアセトインに変換するシトレート異化及び分枝鎖アミノ酸生合成に關与するアセトラクテートデカルボキシラーゼである。ラクトコッカス・ラクチスにおいて、酵素は、遺伝子aldBによってコードされる6つのサブユニットで構成され、バリン、ロイシン及びイソロイシンによって活性化される(Goupilら、Appl.Environ.Microbiol. 62:2636-2640 (1996);Goupil-Feuilleratら、J.Bacteriol. 182:5399-5408(2000))。この酵素は、大腸菌において過剰発現され、特徴づけられた(Phalipら、FEBS Lett. 351:95-99(1994))。他の生物体において、該酵素は、ストレプトコッカス・テルモフィルスのaldC(Monnetら、Lett.Appl.Microbiol. 36:399-405(2003))、バシルス・ブレビスのaldB(Diderichsenら、J.Bacteriol. 172:4315-4321(1990);Najmudinら、Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr. 59:1073-1075(2003))及びエンテロバクター・アエロゲネスのbudA(Diderichsenら、J.Bacteriol. 172:4315-4321(1990))によってコードされる二量体である。バシルス・ブレビスの酵素は、バシルス・スブチリスにおいてクローン化及び過剰発現され、結晶学的に特徴づけられた(Najmudinら、Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr. 59:1073-1075(2003))。また、ロイコノストク・ラクチスの酵素は、精製され、特徴づけられたが、遺伝子は単離されていない(O'Sullivanら、FEMS Microbiol.Lett. 194:245-249(2001))。

【表 4 6】

<i>aldB</i>	NP_267384.1	ラクトコッカス ラクチス
<i>aldC</i>	Q8L208	ストレプトコッカス テルモフィルス
<i>aldB</i>	P23616.1	バシルス ブレビス
<i>budA</i>	P05361.1	エンテロバクター アエロゲネス

【0 2 8 5】

アコニテートデカルボキシラーゼは、カンジダの菌株及び糸状菌アスペルギルス・テレウスにおけるイタコネート生合成の最終工程を触媒する(Bonnarmeら、J Bacteriol. 177:3573-3578 (1995);Willke及びVorlop Appl Microbiol Biotechnol 56:289-295(2001))。イタコネートは、バイオ技術的に興味深い化合物であるが、アコニテートデカルボキシラーゼ遺伝子又はタンパク質配列は、今日まで報告されていない。

【0 2 8 6】

4-オキサロクロネートデカルボキシラーゼは、多くの生物体から単離され、特徴づけら

れた。この酵素をコードする遺伝子は、シュードモナス種(菌株600)のdmpH及びdmpE (Shinglerら、J Bacteriol. 174:711-724(1992))、シュードモナス・プチダのxylIII及びxylIII I((Kato及びAsano Arch.Microbiol 168:457-463(1997);Lian及びWhitman J.Am.Chem.Soc. 116:10403-10411 (1994);Stanleyら、Biochemistry 39:3514(2000))並びにラルストニア・ユートロファ JMP134のReut_B5691及びReut_B5692 (Hughesら、J Bacteriol. 158:79-83 (1984))を含む。シュードモナス種(菌株600)の酵素をコードする遺伝子は、大腸菌においてクローン化及び発現された(Shinglerら、J Bacteriol. 174:711-724(1992))。

【表 4 7】

<i>dmpH</i>	CAA43228.1	シュードモナス種CF600
<i>dmpE</i>	CAA43225.1	シュードモナス種CF600
<i>xylIII</i>	YP_709328.1	シュードモナス プチダ
<i>xylIII</i>	YP_709353.1	シュードモナス プチダ
<i>Reut_B5691</i>	YP_299880.1	ラルストニア ユートロファJMP134
<i>Reut_B5692</i>	YP_299881.1	ラルストニア ユートロファJMP134

10

【 0 2 8 7 】

シナメート(フェニルアクリレート)及び置換シナメート誘導体の対応するスチレン誘導体への変換を触媒するさらなるクラスのデカルボキシラーゼが特徴づけられた。これらの酵素は、様々な生物体に広く存在し、大腸菌においてクローン化及び発現されたこれらの酵素をコードする特定の遺伝子は、サッカロマイセス・セレビスエのpadI(Clausenら、Gene 142:107-112(1994))、ラクトバシルス・プランタルムのpdc(Barthelmebsら、Appl Environ Microbiol 67:1063-1069(2001);Qiら、Metab Eng 9:268-276(2007);Rodriguezら、J .Agric.Food Chem. 56:3068-3072(2008))、クレブシエラ・オキシトカのpofk(Hashidokoら、Biosci.Biotech.Biochem. 58:217-218(1994);Uchiyamaら、Biosci.Biotechnol.Biochem. 72:116-123 (2008))、ペジコッカス・ペントサセウス(Barthelmebsら、Appl Environ Microbiol 67:1063-1069(2001))、並びにバシルス・スプチリス及びバシルス・プミルスのpadC(Lingenら、Protein Eng 15:585-593 (2002))である。シュードモナス・フルオレセンスのフェルラ酸デカルボキシラーゼも精製され、特徴づけられた(Huangら、J.Bacteriol. 176:5912-5918(1994))。重要なこととして、このクラスの酵素は、安定しており、外因性又は内的結合共同因子を必要としないため、これらの酵素は、生体内変換に理想的に適用することが証明された(Sariaslani、Annu.Rev.Microbiol. 61:51-69(2007))。

20

30

【表 4 8】

<i>padI</i>	AB368798	サッカロマイセス セレビスエ
<i>pdc</i>	U63827	ラクトバシルス プランタルム
<i>pofK (pad)</i>	AB330293	クレブシエラ オキシトカ
<i>padC</i>	AF017117	バシルス スプチリス
<i>pad</i>	AJ276891	ペジコッカス ペントサセウス
<i>pad</i>	AJ278683	バシルス プミルス

【 0 2 8 8 】

さらなるデカルボキシラーゼ酵素は、アルファ-ケトグルタレートからコハク酸セミアルデヒドを形成することができる。これらは、その対応する遺伝子配列がまだ確認されていないユーグレナ・グラシリス(Shigeokaら、Biochem.J.282(Pt 2):319-323(1992);Shigeoka及びNakano Arch.Biochem.Biophys.288:22-28(1991); Shigeoka及びNakano Biochem.J. 292 (Pt 2):463-467(1993))、及び結核菌(Tianら、Proc Natl Acad Sci U.S.A. 102:10670-10675(2005))のアルファ-ケトグルタレートデカルボキシラーゼ酵素を含む。加えて、グルタメートデカルボキシラーゼ酵素は、グルタメートを大腸菌gadA及びgadB遺伝子の生成物などの4-アミノブチレートに変換することができる(De Biaseら、Protein.Expr.Purif. 8:430-438(1993))。

40

【表 4 9】

<i>kgd</i>	O50463.4	ミコバクテリウム ツベルクローシス
<i>gadA</i>	NP_417974	エシェリキア コリ
<i>gadB</i>	NP_416010	エシェリキア コリ

【0 2 8 9】

(ケト酸デカルボキシラーゼ)

ケト酸デカルボキシラーゼとも呼ばれるピルベートデカルボキシラーゼ(PDC、EC4.1.1.1)は、ピルベートのアセトアルデヒドへの脱カルボキシル化を触媒する、アルコール発酵における主要酵素である。この酵素は、2-ケトブチレート、2-ケトバレレート、3-ヒドロキシピルベート及び2-フェニルピルベートを含む、脂肪族2-ケト酸に対する広い基質範囲を有する(Bergら、Science 318:1782-1786(2007))。pdcによってコードされるジモモナス・モビルス(PDCは、異なる基質に対する親和性を変化させた指向的操作研究の対象になってきた(Siebertら、Protein Eng Des Sel 18:345-357 (2005))。サッカロマイセス・セレビシアエ(PDCも広範に研究され、変化した活性に対して操作され、大腸菌において機能的に発現された((Killenberg-Jabsら、Eur.J.Biochem. 268:1698-1704(2001);Li及びJordan Biochemistry 38:10004-10012(1999); ter Schureら、Appl.Environ.Microbiol. 64:1303-1307(1998))。この酵素の結晶構造が入手可能である(Killenberg-Jabs Eur.J.Biochem. 268:1698-1704(2001))。他の十分に特徴づけられたPDC候補は、アセトバクター・パステウリアンス(Chandraら、Arch.Microbiol. 176:443-451(2001))及びクルイベロマイセス・ラクチス(Kriegerら、Eur.J.Biochem. 269:3256-3263(2002))の酵素を含む。

【表 5 0】

遺伝子	GenBank ID	生物
<i>pdc</i>	P06672.1	ジモモナス モビルス
<i>pdc1</i>	P06169	サッカロマイセス セレビシアエ
<i>pdc</i>	Q8L388	アセトバクター パステウリアンス
<i>pdc1</i>	Q12629	クルイベロマイセス ラクチス

【0 2 9 0】

PDCのように、ベンゾイルホルメートデカルボキシラーゼ(EC 4.1.1.7)は、広い基質範囲を有し、酵素工学研究のターゲットになってきた。シュードモナス・プチダの酵素は、広範に研究され、この酵素の結晶構造が入手可能である(Hassonら、Biochemistry 37:9918-9930(1998);Polovnikovaら、Biochemistry 42:1820-1830(2003))。シュードモナス・プチダ酵素の活性部位における2つの残基の部位指向性変異は、天然及び非天然基質の親和性を変化させた(Siebert Protein Eng Des Sel 18:345-357(2005))。この酵素の特性が、指向的操作によってさらに改良された(Lingenら、Protein Eng 15:585-593(2002));Lingen Chembiochem 4:721-726(2003))。mdlCによってコードされるシュードモナス・アエルギノサの酵素も実験的に特徴づけられた(Barrowmanら、FEMS Microbiology Letters 34:57-60(1986))。シュードモナス・ツツェリ、シュードモナス・フルオレセンス及び他の生物体のさらなる遺伝子を配列相同性によって推定するか、又はシュードモナス・プチダにおいて開発された成長選択システムを使用して特定することができる(Henningら、Appl.Environ.Microbiol. 72:7510-7517(2006))。

【表 5 1】

<i>mdlC</i>	P20906.2	シュードモナス プチダ
<i>mdlC</i>	Q9HUR2.1	シュードモナス アエルギノサ
<i>dpgB</i>	ABN80423.1	シュードモナス スツトゼリ
<i>ilvB-1</i>	YP_260581.1	シュードモナス フルオレセンス

【0 2 9 1】

(4.2.1.a-ヒドロ-リアーゼ)

ユーバクテリウム・バルケリの2-(ヒドロキシメチル)グルタレートデヒドラターゼは、例示的なヒドロ-リアーゼである。この酵素は、ニコチネート異化の観点で研究され、hmdによってコードされる(Alhapelら、Proc Natl Acad Sci U S A 103:12341-12346(2006))。高度な配列相同性を有する類似の酵素が、バクテロイデス・カピロサス、アナエロトルンクス・コリホミニス及びナタラナエロビウス・テルモフィルスに見いだされる。

【表 5 2】

<i>hmd</i>	ABC88407.1	ユーバクテリウム バルケリ
<i>BACCAP_02294</i>	ZP_02036683.1	バクテロイデスカピロサス ATCC 29799
<i>ANACOL_02527</i>	ZP_02443222.1	アナエロトルンカス コリホミニス DSM 17241
<i>NtherDRAFT_2368</i>	ZP_02852366.1	ナトラナエロビウス テルモフィルス JW/NM-WN-LF

10

【 0 2 9 2 】

第2の例示的なヒドロ-リアーゼは、マレーのフマレートへの脱水を触媒する酵素であるフマレートヒドラターゼである。この酵素についての豊富な構造情報が入手可能であり、研究者は、該酵素を成功裡に操作して、活性、阻害及び局在性を変化させた(Weaver, T. Acta Crystallogr. D Biol Crystallogr. 61:1395-1401(2005))。さらなるフマレートヒドラターゼは、エシェリキア・コリ(Estevezら、Protein Sci. 11:1552-1557(2002); Hong及びLee Biotechnol. Bioprocess Eng. 9:252-255(2004); Rose及びWeaver Proc Natl Acad Sci U S A 101:3393-3397(2004))、カンピロバクター・ジェジュニ(Smithら、Int. J. Biochem. Cell Biol 31:961-975(1999))及びテルムス・テルモフィルス(Mizobataら、Arch. Biochem. Biophys. 355:49-55(1998))の*fumC*、並びにラッタス・ノルベギクス(Kobayashiら、J. Biochem. 89:1923-1931(1981))の*fumH*によってコードされるものを含む。高度な配列相同性を有する類似の酵素は、アラビドプシス・タリアナの*fum1*及びコリネバクテリウム・グルタミクムの*fumC*を含む。

20

【表 5 3】

<i>fumC</i>	P05042.1	エシェリキア コリ K12
<i>fumC</i>	O69294.1	カンピロバクター ジェジュニ
<i>fumC</i>	P84127	テルムス テルモフィルス
<i>fumH</i>	P14408.1	ラツス ノルベギクス
<i>fum1</i>	P93033.2	アラビドプシス タリアナ
<i>fumC</i>	Q8NRN8.1	コリネバクテリウム グルタミクム

30

【 0 2 9 3 】

2-メチルマレートデヒドラターゼとも呼ばれるシトラマレートヒドロリラーゼは、2-メチルマレーをメサコネートに変換する。2-メチルマレートデヒドロゲナーゼ活性が、グルタメート分解VI経路の観点で、クロストリジウム・テタノモルフム、モルガネラ・モルガニ、シトロバクター・アマロナチクスにおいて検出された(Kato及びAsano Arch. Microbiol 168:457-463(1997))。しかし、この酵素をコードする遺伝子は、今日まで配列されていない。

40

【 0 2 9 4 】

C. アセトブチリクムの*crt*の遺伝子生成物は、3-ヒドロキシブチリル-CoAのクロトニル-CoAへの脱水を触媒する(Atsumiら、Metab Eng.; 29 (2007)); Boyntonら、Journal of Bacteriology 178:3015-3024(1996))。P. プチダのエノイル-CoAヒドラターゼ、*phaA*及び*phaB*は、フェニルアセテート異化を通じて二重結合のヒドロキシル化を実施すると考えられる(Oliveraら、Proc Natl Acad Sci USA 95(11):6419-6424(1998))。P. フルオレセンシスの*paaA*及び*paaB*は、相似変換を触媒する(14 Oliveraら、前出、1998)。最後に、いくつかのエシェリキア・コリ遺伝子は、*maoC*(Park及びLee J. Bacteriol 185(18):5391-5397(2003)), *paaF*(Park及びLee Biotechnol Bioeng. 86(6):681-686(2004a)); Park及びLee Appl. Bioc

50

hem Biotechnol. 113-116:335-346(2004b));Ismailら、Eur J Biochem 270(14):p.3047-3054(2003)及びpaaG(Park及びLee、前出、2004;Park及びLee、前出、2004b;Ismailら、前出、2003)を含むエノイル-CoAヒドラターゼ機能性を示すことが証明された。

【表 5 4】

<i>maoC</i>	NP_415905.1	エシェリキア コリ
<i>paaF</i>	NP_415911.1	エシェリキア コリ
<i>paaG</i>	NP_415912.1	エシェリキア コリ
<i>crt</i>	NP_349318.1	クロストリジウム アセトブチリクム
<i>paaA</i>	NP_745427.1	シュードモナス プチダ
<i>paaB</i>	NP_745426.1	シュードモナス プチダ
<i>phaA</i>	ABF82233.1	シュードモナス フルオレセンス
<i>phaB</i>	ABF82234.1	シュードモナス フルオレセンス

10

【0 2 9 5】

大腸菌遺伝子 *fadA* 及び *fadB* は、ケトアシル-CoAチオラーゼ、3-ヒドロキシアシル-CoAデヒドロゲナーゼ及びエノイル-CoAヒドラターゼ活性を示す多酵素複合体をコードする(Yangら、Biochemistry 30(27):p. 6788-6795(1991);Yangら、J Biol Chem 265(18): p. 10424-10429(1990);Yangら、J Biol Chem 266(24):p. 16255(1991);Nakahigashi及びInokuchi Nucleic Acids Res 18(16):p. 4937 (1990))。*fadI* 及び *fadJ* 遺伝子は、類似の機能をコードし、嫌気性条件でのみ自然に発現される(Campbellら、Mol Microbiol 47(3):p. 793-805(2003))。(ネガチブレギュレータ *fadR* をノックアウトすることによって) *fadB* を活性化し、非原生ケトチオラーゼ(ラルストニア・ユートロファの *phaA*)を同時発現することを含む、大腸菌のポリ[(R)-3-ヒドロキシブチレート]を生成する方法が既に記載されている(Satoら、J Biosci Bioeng 103(1):38-44(2007))。この研究は、β-酸化酵素、特に、3-ヒドロキシアシル-CoAデヒドロゲナーゼ及びエノイル-CoAヒドラターゼ活性の両方をコードする *fadB* の遺伝子生成物が、アセチル-CoA前駆体からより長い鎖分子を生成するための経路の一部として機能できることを明確に実証している。

20

【表 5 5】

<i>fadA</i>	YP_026272.1	エシェリキア コリ
<i>fadB</i>	NP_418288.1	エシェリキア コリ
<i>fadI</i>	NP_416844.1	エシェリキア コリ
<i>fadJ</i>	NP_416843.1	エシェリキア コリ
<i>fadR</i>	NP_415705.1	エシェリキア コリ

30

【0 2 9 6】

(4.3.1.a-アンモニア-リアーゼ)

アスパルテートのフマレートへの脱アミノ化を触媒するアスパルターゼ(EC 4.3.1.1)は、微生物において一般的な酵素であり、広く特徴づけられた(Viola, R. E. Adv.Enzymol. Relat Areas Mol.Biol 74:295-341(2000))。aspAによってコードされる大腸菌アスパルターゼの結晶構造が解明された(Shiら、Biochemistry 36:9136-9144 (1997))。大腸菌酵素は、代替的な基質のアスパルテートフェニルメチルエステル、アスパラギン、ベンジルアスパルテート及びマレートと反応することも証明された(Maら、Ann N.Y.Acad Sci 672: 60-65(1992))。個別の研究において、基質特異性を変化させるために、この酵素に対して指向性進化が採用された(Asanoら、Biomol.Eng 22:95-101(2005))。アスパルターゼ機能性を有する酵素は、ハエモフィルス・インフルエンザエ(Sjostromら、Biochim.Biophys.Acta 1324:182-190(1997))、シュードモナス・フルオレセンス(Takagiら、J.Biochem. 96: 545-552(1984))、バシルス・スプチルス(Sjostromら、Biochim.Biophys.Acta 1324:182-190(1997))及びセラチア・マルセセンス(Takagi及びKisumi J Bacteriol. 161:1-6(1985))においても特徴づけられた。

40

【表 5 6】

<i>aspA</i>	NP_418562	エシェリキア コリ K12 亜種 MG1655
<i>aspA</i>	P44324.1	ハエモフィルス インフルエンザエ
<i>aspA</i>	P07346.1	シュードモナス フルオレセンス
<i>ansB</i>	P26899.1	バシルス スプチルス
<i>aspA</i>	P33109.1	セラチア マルセセンス

【0 2 9 7】

ベータ-メチルアスパルターゼ又は3-メチルアスパルテートアンモニア-リアーゼとしても知られる3-メチルアスパルターゼ(EC 4.3.1.2)は、トレオ-3-メチルアスパラテートのメサコネートへの脱アミン化を触媒する。クロストリジウム・テタノモルフムの3-メチルアスパルターゼがクローン化され、大腸菌に機能的に発現され、結晶化された(Asuncionら、Acta Crystallogr.D Biol Crystallogr. 57:731-733(2001);Asuncionら、J Biol Chem. 277:8306-8311(2002);Bottingら、Biochemistry 27:2953-2955(1988);Godaら、Biochemistry 31:10747-10756 (1992)。シトロバクター・アマロナチクスにおいて、この酵素は、BAA28709によってコードされる(Kato及びAsano Arch.Microbiol 168:457-463(1997))。3-メチルアスパルターゼも大腸菌YG1002から結晶化されたが(Asano及びKato FEMS Microbiol Lett. 118:255-258(1994))、タンパク質配列は、GenBankなどの好適データベースに列挙されていない。配列相同性を使用して、C.テタニのCTC_02563及びエシェリキア・コリ O157:H7のECs0761を含むさらなる候補遺伝子を特定することができる。

【表 5 7】

MAL	AAB24070.1	クロストリジウム テタノモルフム
BAA28709	BAA28709.1	シトロバクター アマロナチクス
CTC_02563	NP_783085.1	クロストリジウム テタニ
ECs0761	BAB34184.1	エシェリキア コリ O157:H7 Sakai 株

【0 2 9 8】

エノイル-CoA生成物を形成するアンモニア-リアーゼ酵素は、ベータ-アラニル-CoAを脱アミン化するベータ-アラニル-CoAアンモニア-リアーゼ(EC 4.3.1.6)、及び3-アミノブチリル-CoAアンモニア-リアーゼ(EC 4.3.1.14)を含む。2つのベータ-アラニル-CoAアンモニア-リアーゼが、クロストリジウム・プロピオニウムにおいて特定され、特徴づけられた(Herrmannら、FEBS J. 272:813-821(2005))。他のベータ-アラニル-CoAアンモニア-リアーゼは、今日まで特定されていないが、遺伝子候補を配列類似性によって特定することができる。1つの当該候補は、ミココッカス・キサントスのMXAN_4385である。

【表 5 8】

<i>ac12</i>	CAG29275.1	クロストリジウム プロピオニウム
<i>ac11</i>	CAG29274.1	クロストリジウム プロピオニウム
<i>MXAN_4385</i>	YP_632558.1	ミココッカス キサントス

【0 2 9 9】

(5.3.3.a-イソメラーゼ)

クロストリジウム・アミノブチリウム及びC.クルイベリの両方の4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼは、4-ヒドロキシブチリル-CoAのクロトニル-CoAへの可逆的変換を触媒し、固有のビニルアセチル-CoA Δ-イソメラーゼ活性を保持する(Scherf及びBuckel Eur. J Biochem. 215:421-429(1993);Scherfら、Arch.Microbiol 161:239-245(1994))。N末端アミノ酸配列を含む両原生酵素が精製され、特徴づけられた(Scherf及びBuckel、前出、1993;Scherfら、前出、1994)。C.アミノブチリウム及びC.クルイベリのabfD遺伝子は、これらのN末端アミノ酸配列と厳密に一致するため、4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ/ビニルアセチル-CoA Δ イソメラーゼをコードしている。加えて、ポルフィロモナ

ス・ギンギバリス ATCC 33277 の *abfD* 遺伝子は、ゲノムプロジェクトから相同性を介して特定される。

【表 5 9】

<i>abfD</i>	YP_001396399.1	クロストリジウム クルイベリ DSM 555
<i>abfD</i>	P55792	クロストリジウム アミノブチリウム
<i>abfD</i>	YP_001928843	ポルフィロモナス ギンギバリス ATCC 33277

【0300】

(5.4.3.a-アミノムターゼ)

リジン2,3-アミノムターゼ (EC 5.4.3.2) は、リジンを (3S)-3,6-ジアミノヘキサノエートに変換して、アミン基を2位から3位にシフトさせる例示的なアミノムターゼである。該酵素は、フソバクテリウム・ヌレアツム (*Fusobacterium nucleatum*) (*kamA*) (Barkerら、J. Bacteriol. 152:201-207 (1982)) 及びクロストリジウム・スブテルミナレ (*kamA*) (Chirpichら、J. Biol. Chem. 245:1778-1789 (1970)) を含む、リジンをアセテート及びブチレートに発酵させる細菌に見いだされる。クロストリジウム・スブテルミナレの酵素が結晶化された (Leporeら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102:13819-13824 (2005))。この機能をコードする酵素は、バシルス・スブチリスの *yodO* によってもコードされる (Chenら、Biochem. J. 348 Pt 3:539-549 (2000))。該酵素は、ピリドキサル5'-ホスフェートを共同因子として利用し、S-アデノシルメトイオニンによる活性化を必要とし、L-リジンのみと反応する立体選択性を有する。該酵素は、代替的な基質と反応することが証明されていない。

【表 6 0】

<i>yodO</i>	O34676.1	バシルス スブチリス
<i>kamA</i>	Q9XBQ8.1	クロストリジウム スブテルミナレ
<i>kamA</i>	Q8RHX4	フソバクテリウムヌレアツム 亜種ヌレアツム

【0301】

第2のアミノムターゼ、即ちベータ-リジン5,6-アミノムターゼ (EC 5.4.3.3) は、(3S)-3,6-ジアミノヘキサノエートを (3S,5S)-3,5-ジアミノヘキサノエートに変換して、末端アミノ基を6位から5位にシフトさせるアセテート及びブチレートへのリジン発酵の次の工程を触媒する。この酵素は、また、リジンの2,5-ジアミノヘキサノエートへの変換を触媒し、リジン5,6-アミノムターゼ (EC 5.4.3.4) とも呼ばれる。該酵素は、クロストリジウム・スティックランジ (*kamD*、*kamE*) において結晶化された (Berkovitchら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101:15870-15875 (2004))。ポルフィロモナス・ギンギバリスの酵素も特徴づけられた (Tangら、Biochemistry 41:8767-8776 (2002))。

【表 6 1】

<i>kamD</i>	AAC79717.1	クロストリジウム スティックランジ
<i>kamE</i>	AAC79718.1	クロストリジウム スティックランジ
<i>kamD</i>	NC_002950.2	ポルフィロモナス ギンギバリス W83
<i>kamE</i>	NC_002950.2	ポルフィロモナス ギンギバリス W83

【0302】

オルニチン4,5-アミノムターゼ (EC 5.4.3.5) は、D-オルニチンを2,4-ジアミノペンタノエートに変換して、末端アミンを隣接炭素にシフトさせる。クロストリジウム・スティックランジの酵素は、*oraE* 及び *oraS* の2つの遺伝子によってコードされ、大腸菌においてクローニング、配列決定及び発現された (Chenら、J. Biol. Chem. 276:44744-44750 (2001))。この酵素は、今日まで他の生物体において特徴づけられていない。

【表 6 2】

<i>oraE</i>	AAK72502	クロストリジウム スティックランジ
<i>oraS</i>	AAK72501	クロストリジウム スティックランジ

【0303】

チロシン2,3-アミノムターゼ(EC 5.4.3.6)は、アミンを2位から3位にシフトさせることによってチロシンを3-アミノ-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロパノエートに可逆的に変換するチロシン生合成に関与する。ストレプトマイセス・グロビスポルスにおいて、該酵素は、チロシン誘導体と反応することも証明された(Christensonら、Biochemistry 42:12708-12718(2003))。配列情報は、入手可能でない。

10

【0304】

ロイシン2,3-アミノムターゼ(EC 5.4.3.7)は、ロイシン分解及び生合成を通じて、L-ロイシンをベータ-ロイシンに変換する。ロイシン2,3-アミノムターゼに対するアッセイは、多くの生物体における活性を検出したが(Poston、J. M. Methods Enzymol. 166:130-135(1988))、該酵素をコードする遺伝子は、今日まで特定されていない。

【0305】

Cargillは、L-アラニン β -アラニンに変換することで、4つの生化学工程でピルベートから3-HPへの経路を生成する新規の2,3-アミノムターゼ酵素を開発した(Liaoら、米国公開第2005-0221466号)。

【0306】

(6.2.1.a-酸-チオールリガーゼ)

例示的な酸-チオールリガーゼは、インビボで可逆的な反応である、1つのATPのコンカミナント消費を伴うスクシネートからのスクシニル-CoAの形成をともに触媒する大腸菌の*sucCD*の遺伝子生成物である(Buckら、Biochemistry 24(22):p.6245-6252(1985))。さらなる例示的なCoA-リガーゼは、配列がまだ特徴づけられていないラットジカルボキシレート-CoAリガーゼ(Vamecqら、Biochem J. 230(3):p. 683-693(1985))、*P. チリソゲヌム*の2つの特徴づけられたフェニルアセテート-CoAリガーゼ(Lamas-Maceirasら、Biochem J 395(1):147-155(2006);Wangら、Biochem Biophys Res Commun、360(2):453-458(2007))、シュールドモナス・プチダのフェニルアセテート-CoAリガーゼ(Martinez-Blancoら、J Biol Chem. 265(12):7084-7090(1990))、及びバシルス・スプチルスの6-カルボキシヘキサノエート-CoAリガーゼ(Bowerら、J Bacteriol 178(14):4122-4130(1996))を含む。

20

30

【表 6 3】

<i>sucC</i>	NP_415256.1	エシェリキア コリ
<i>sucD</i>	AAC73823.1	エシェリキア コリ
<i>phl</i>	CAJ15517.1	ペニシリウム クリソゲヌム
<i>phlB</i>	ABS19624.1	ペニシリウム クリソゲヌム
<i>paaF</i>	AAC24333.2	シュールドモナス プチダ
<i>bioW</i>	NP_390902.2	バシルス スプチリス

【0307】

(実施例V)

(スクシニル-CoAからの例示的なBDO経路)

本実施例では、スクシニル-CoAからの例示的なBDO経路について記載する。

【0308】

スクシニル-CoAからのBDO経路は、本明細書に記載されるとともに、これまでに記載されている(それぞれが参照により本明細書に組み込まれている、2008年3月14日出願された米国出願第12/049,256号及び2008年3月14日出願されたPCT出願第US08/57168号参照)。さらなる経路を図8Aに示す。当該例示的なBDO経路の酵素を、これらの酵素をコードする例示的な遺伝子とともに表15に示す。

【0309】

40

50

手短に述べると、スクシニル-CoAをスクシニル-CoAレダクターゼ(又はスクシネートセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ)(EC 1.2.1.b)によってコハク酸セミアルデヒドに変換することができる。スクシネートセミアルデヒドを、既に記載されているように4-ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼ(EC 1.1.1.a)によって4-ヒドロキシブチレートに変換することができる。代替的に、スクシニル-CoAをスクシニル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)(EC 1.1.1.c)によって4-ヒドロキシブチレートに変換することができる。4-ヒドロキシブチレートを、既に記載されているように4-ヒドロキシブチリル-CoAトランスフェラーゼ(EC 2.8.3.a)によって、又は4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ(EC 3.1.2.a)若しくは4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ(若しくは4-ヒドロキシブチリル-CoAシンテターゼ)(EC 6.2.1.a)によって4-ヒドロキシブチリル-CoAに変換することができる。代替的に、4-ヒドロキシブチレートを、既に記載されているように4-ヒドロキシブチレートキナーゼ(EC 2.7.2.a)によって4-ヒドロキシブチリル-ホスフェートに変換することができる。4-ヒドロキシブチリル-ホスフェートを、既に記載されているようにホスホトランス-4-ヒドロキシブチリラーゼ(EC 2.3.1.a)によって4-ヒドロキシブチリル-CoAに変換することができる。代替的に、4-ヒドロキシブチリル-ホスフェートを、4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ(リン酸化)(EC 1.2.1.d)によって4-ヒドロキシブタナールに変換することができる。4-ヒドロキシブチリル-CoAを4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(又は4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ)(EC 1.2.1.b)によって4-ヒドロキシブタナールに変換することができる。代替的に、4-ヒドロキシブチリル-CoAを4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)(EC 1.1.1.c)によって1,4-ブタンジオールに変換することができる。4-ヒドロキシブタナールを、既に記載されているように1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼ(EC 1.1.1.a)によって1,4-ブタンジオールに変換することができる。

10

20

【表 6 4】

表15. スクシニル-CoAからのBDO経路

図	EC クラス	所望の 基質	所望の生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (利用可能な場合)	生物	公知の基質
8A	1.2.1.b	スクシニル-CoA	コハク酸 セミアルデヒド	スクシニル-CoA レダクターゼ(又は コハク酸セミアルデヒド デヒドロゲナーゼ)	<i>sucD</i>	P38947.1	クロストリジウム クルイベリ	スクシニル-CoA
					<i>sucD</i>	NP_904963.1	ポルフィロモナス ギンギバリス	スクシニル-CoA
					<i>Msed_0709</i>	YP_001190808.1	メタロスプアエラ セデューラ	マロニル-CoA
8A	1.1.1.a	コハク酸 セミアルデヒド	4- ヒドロキシ酪酸	4-ヒドロキシ酪酸 デヒドロゲナーゼ	<i>4hbd</i>	YP_726053.1	ラルストニア ユートロファ <i>HI6</i>	4-ヒドロキシ酪酸
					<i>4hbd</i>	L21902.1	クロストリジウム クルイベリ <i>DSM 555</i>	4-ヒドロキシ酪酸
					<i>4hbd</i>	Q94B07	アラビドプシス タリアナ	4-ヒドロキシ酪酸
8A	1.1.1.c	スクシニル-CoA	4- ヒドロキシ酪酸	スクシニル-CoA レダクターゼ (アルコール生成)	<i>adhE2</i>	AAK09379.1	クロストリジウム アセトブチリウム	ブタノイル-CoA
					<i>mcr</i>	AAS20429.1	クロフアレクスウス アウランチアクス	マロニル-CoA
					<i>FAR</i>	AAD38039.1	シモンドシア キネンシス	長鎖アシル-CoA
8A	2.8.3.a	4- ヒドロキシ酪酸	4-ヒドロキシブチ リル-CoA	4-ヒドロキシブチリル-CoA トランスフェラーゼ	<i>cat1, cat2, cat3</i>	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	クロストリジウム クルイベリ	コハク酸 4-ヒドロキ シ酪酸、酪酸
					<i>gctA, gctB</i>	CAA57199.1,	アシタミノコッカス	グルタル酸

10

20

30

40

図	EC クラス	所望の 基質	所望の生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (利用可能な場合)	生物	公知の基質
						CAA57200.1	フェルメンタンス	
					<i>atoA, atoD</i>	P76459.1, P76458.1	エシェリキア コリ	ブタン酸
8A	3.1.2.a	4- ヒドロキシ酪酸	4- ヒドロキシブチリル -CoA	4-ヒドロキシブチリル- CoAヒドロラーゼ	<i>tesB</i>	NP_414986	エシェリキア コリ	アジビル-CoA
					<i>acot12</i>	NP_570103.1	ラッス ノルベギクス	ブチリル-CoA
					<i>hibch</i>	Q6NVY1.2	ホモ サビエンス	3- ヒドロキシプロパノイ ル-CoA
8A	6.2.1.a	4- ヒドロキシ酪酸	4- ヒドロキシブチリル -CoA	4-ヒドロキシブチリル- CoAリガーゼ(又は4- ヒドロキシブチリル-CoA シンテターゼ)	<i>sucCD</i>	NP_415256.1, AAC73823.1	エシェリキア コリ	コハク酸
					<i>phl</i>	CAJ15517.1	ペニシリウム クリソゲヌム	フェニル酢酸
					<i>bioW</i>	NP_390902.2	バシルススブチリス	6-カルボキシヘキサ ン酸
8A	2.7.2.a	4- ヒドロキシ酪酸	4- ヒドロキシブチリル -リン酸	4-ヒドロキシ酪酸 キナーゼ	<i>ackA</i>	NP_416799.1	エシェリキア コリ	酢酸、プロピオン酸
					<i>buk1</i>	NP_349675	クロストリジウム アセトブチリクム	酪酸
					<i>buk2</i>	Q97III	クロストリジウム アセトブチリクム	酪酸

10

20

30

40

図	EC クラス	所望の 基質	所望の生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (利用可能な場合)	生物	公知の基質
8A	2.3.1.a	4- ヒドロキシブチリ ル-リン酸	4- ヒドロキシブチリ ル-CoA	ホスホトランス-4-ヒドロ キシブチリラーゼ	<i>pib</i>	NP_349676	クロストリジウム アセトブチリクム	ブチリル-リン酸
					<i>pib</i>	AAR19757.1	酪酸-産生バクテリウム L2-50	ブチリル-リン酸
					<i>pib</i>	CAC07932.1	バシルス メガテリウム	ブチリル-リン酸
8A	1.2.1.d	4- ヒドロキシブチリ ル-リン酸	4- ヒドロキシブタナ ール	4-ヒドロキシブタナール デヒドロゲナーゼ (リン酸化)	<i>asd</i>	NP_417891.1	エシェリキア コリ	L-4-アスパルチル- リン酸
					<i>proA</i>	NP_414778.1	エシェリキア コリ	L-グルタミル-5- リン酸
					<i>gapA</i>	POA9B2.2	エシェリキア コリ	グリセルアルデヒド-3- リン酸
8A	1.2.1.b	4- ヒドロキシブチリ ル-CoA	4- ヒドロキシブタナ ール	4-ヒドロキシブチリル- CoAレダクターゼ (又は4-ヒドロキシ ブタナール デヒドロゲナーゼ)	<i>sucD</i>	P38947.1	クロストリジウム クルイペリ	スクシニル-CoA
					<i>sucD</i>	NP_904963.1	ボルフィロモナス ギンギバリス	スクシニル-CoA
					<i>Msed_0709</i>	YP_001190808.1	メタロスファエラ セデュラ	マロニル-CoA
8A	1.1.1.c	4- ヒドロキシブチリ ル-CoA	1,4-ブタンジオー ル	4-ヒドロキシブチリル- CoAレダクターゼ (アルコール形成)	<i>adhE2</i>	AAK09379.1	クロストリジウム アセトブチリクム	ブタノイル-CoA
					<i>mcr</i>	AAS20429.1	クロフレクスウス アウランチアクス	マロニル-CoA

10

20

30

40

図	EC クラス	所望の 基質	所望の生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (利用可能な場合)	生物	公知の基質
					<i>FAR</i>	AAD38039.1	シモンディア キネンシス	長鎖アシル-CoA
8A	1.1.1.a	4- ヒドロキシブタナ ール	1,4-ブタンジオー ール	1,4-ブタンジオール デヒドロゲナーゼ	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	サッカロミセス セレビシアエ	一般
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	エシエリキア コリ	>C3
					<i>4hbd</i>	L21902.1	クロストリジウム クルイペリ DSM 555	コハク酸 セミアルデヒド

10

20

30

40

50

【0310】

(実施例VI)

(アルファ-ケトグルタレートからのさらなる例示的なBDO経路)

本実施例では、アルファ-ケトグルタレートからのBDO経路について記載する。

【0311】

スクシニル-CoAからのBDO経路は、本明細書に記載されるとともに、これまでに記載されている(それぞれが参照により本明細書に組み込まれている、2008年3月14日に出願された米国出願第12/049,256号及び2008年3月14日に出願されたPCT出願第US08/57168号参照)。さらなる経路を図8Bに示す。当該例示的なBDO経路の酵素を、これらの酵素をコードする例示的な遺伝子とともに表16に示す。

【0312】

手短に述べると、アルファ-ケトグルタレートを、既に記載されているようにアルファ-ケトグルタレートデカルボキシラーゼ(EC 4.1.1.a)によってコハク酸セミアルデヒドに変換することができる。代替的に、アルファ-ケトグルタレートをグルタメートデヒドロゲナーゼ(EC 1.4.1.a)によってグルタメートに変換することができる。4-アミノブチレートを4-アミノブチレートオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)(EC 1.4.1.a)又は4-アミノブチレートトランスアミナーゼ(EC 2.6.1.a)によってコハク酸セミアルデヒドに変換することができる。グルタメートをグルタメートデカルボキシラーゼ(EC 4.1.1.a)によって4-アミノブチレートに変換することができる。スクシネートセミアルデヒドを、既に記載されているように4-ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼ(EC 1.1.1.a)によって4-ヒドロキシブチレートに変換することができる。4-ヒドロキシブチレートを、既に記載されているように4-ヒドロキシブチリル-CoAトランスフェラーゼ(EC2.8.3.a)によって、又は4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ(EC 3.1.2.a)若しくは4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ(若しくは4-ヒドロキシブチリル-CoAシンテターゼ)(EC 6.2.1.a)によって4-ヒドロキシブチリル-CoAに変換することができる。4-ヒドロキシブチレートを4-ヒドロキシブチレートキナーゼ(EC 2.7.2.a)によって4-ヒドロキシブチリル-ホスフェートに変換することができる。4-ヒドロキシブチリル-ホスフェートを、既に記載されているようにホスホトランス-4-ヒドロキシブチリラーゼ(EC 2.3.1.a)によって4-ヒドロキシブチリル-CoAに変換することができる。代替的に、4-ヒドロキシブチリル-ホスフェートを4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ(リン酸化)(EC 1.2.1.d)によって4-ヒドロキシブタナールに変換することができる。4-ヒドロキシブチリル-CoAを、既に記載されているように4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(又は4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ)(EC 1.2.1.b)によって4-ヒドロキシブタナールに変換することができる。4-ヒドロキシブチリル-CoAを4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)(EC 1.1.1.c)によって1,4-ブタンジオールに変換することができる。4-ヒドロキシブタナールを、既に記載されているように1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼ(EC 1.1.1.a)によって1,4-ブタンジオールに変換することができる。

10

20

30

【表 6 5】

表16. アルファ-ケトグルタル酸からのBDO経路

図	ECクラス	所望の 基質	所望の 生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (利用可能な場合)	生物	公知の 基質
8B	4.1.1.a	アルファ- ケトグルタル酸	コハク酸 セミアルデヒド	アルファ-ケトグルタル 酸デカルボキシラーゼ	<i>kgd</i>	O50463.4	ミコバクテリウム ツベルクローシス	アルファ- ケトグルタル酸
					<i>gadA</i>	NP_417974	エシェリキア コリ	グルタミン酸
					<i>gadB</i>	NP_416010	エシェリキア コリ	グルタミン酸
8B	1.4.1.a	アルファ- ケトグルタル酸	グルタミン酸	グルタミン酸 デヒドロゲナーゼ	<i>gdhA</i>	P00370	エシェリキア コリ	グルタミン酸
					<i>gdh</i>	P96110.4	テルモトガマリチマ	グルタミン酸
					<i>gdhA1</i>	NP_279651.1	ハロバクテリウム サリナナム	グルタミン酸
8B	1.4.1.a	4-アミノ酪酸	コハク酸 セミアルデヒド	4-アミノ酪酸オキシド レダクターゼ (脱アミノ化)	<i>lysDH</i>	AB052732	ゲオバシルス ステアロテルモフィルス	リジン
					<i>lysDH</i>	NP_147035.1	アエロビルム ペルニクスKI	リジン
					<i>ldh</i>	P0A393	バシルス セレウス	ロイシン、イソロイ シン、バリン、2 -アミノブタン酸
8B	2.6.1.a	4-アミノ酪酸	コハク酸 セミアルデヒド	4-アミノ酪酸 トランスアミナーゼ	<i>gabT</i>	P22256.1	エシェリキア コリ	4- アミノ酪酸
					<i>puuE</i>	NP_415818.1	エシェリキア コリ	4- アミノ酪酸
					<i>UGA1</i>	NP_011533.1	サッカロミセス セレシシアエ	4-

10

20

30

40

図	ECクラス	所望の 基質	所望の 生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (利用可能な場合)	生物	公知の 基質
								アミノ酪酸
8B	4.1.1.a	グルタミン酸	4-アミノ酪酸	グルタミン酸 デカルボキシラーゼ	<i>gadA</i>	NP_417974	エシェリキア コリ	グルタミン酸
					<i>gadB</i>	NP_416010	エシェリキア コリ	グルタミン酸
					<i>kgd</i>	O50463.4	ミコバクテリウム ツベルクロシス	アルファ- ケトグルタル酸
8B	1.1.1.a	コハク酸 セミアルデヒド	4- ヒドロキシ酪酸	4-ヒドロキシ酪酸 デヒドロゲナーゼ	<i>4hbd</i>	YP_726053.1	ラルスストニア ユートロファ H16	4- ヒドロキシ酪酸
					<i>4hbd</i>	L21902.1	クロストリジウム クルイベリ DSM 555	4- ヒドロキシ酪酸
					<i>4hbd</i>	Q94B07	アラビドプシス タリアナ	4- ヒドロキシ酪酸
8B	2.8.3.a	4- ヒドロキシ酪酸	4- ヒドロキシブチリル -CoA	4-ヒドロキシブチリル- CoAトランスフェラーゼ	<i>cat1, cat2, cat3</i>	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	クロストリジウム クルイベリ	コハク酸、4- ヒドロキシ酪酸、 酪酸
					<i>gctA, gctB</i>	CAA57199.1, CAA57200.1	アシダミノコツカス フェルメンタンス	グルタミン酸
					<i>atoA, atoD</i>	P76459.1, P76458.1	エシェリキア コリ	ブタン酸
8B	3.1.2.a	4- ヒドロキシ酪酸	4- ヒドロキシブチリル -CoA	4-ヒドロキシブチリル- CoAヒドロラーゼ	<i>tesB</i>	NP_414986	エシェリキア コリ	アジビル-CoA
					<i>acot12</i>	NP_570103.1	ラッスノルベギクス	ブチリル-CoA

10

20

30

40

図	ECクラス	所望の基質	所望の生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (利用可能な場合)	生物	公知の基質
					<i>hibch</i>	Q6NVY1.2	ホモサピエンス	3- ヒドロキシプロパ ノイル-CoA
8B	6.2.1.a	4- ヒドロキシ酪酸	4- ヒドロキシプロチリル -CoA	4-ヒドロキシプロチリル- CoAリガーゼ(又は4- ヒドロキシプロチリル- CoAシンテターゼ)	<i>sucCD</i>	NP_415256.1, AAC73823.1	エシェリキア コリ	コハク酸
					<i>phl</i>	CAJ15517.1	ペニシリウムクリソゲヌム	フェニル酪酸
					<i>bioW</i>	NP_390902.2	バシルススブチリス	6- カルボキシヘキサ ン酸
8B	2.7.2.a	4- ヒドロキシ酪酸	4- ヒドロキシプロチリ ル-リン酸	4-ヒドロキシ酪酸 キナーゼ	<i>ackA</i>	NP_416799.1	エシェリキア コリ	酪酸、 プロピオン酸
					<i>bukI</i>	NP_349675	クロストリジウム アセトブチリクム	酪酸
					<i>buk2</i>	Q97IH1	クロストリジウム アセトブチリクム	酪酸
8B	2.3.1.a	4- ヒドロキシプロチリ ル-リン酸	4- ヒドロキシプロチリル -CoA	ホスホトランス-4-ヒド ロキシプロチリラーゼ	<i>pib</i>	NP_349676	クロストリジウム アセトブチリクム	ブチリル- リン酸
					<i>pib</i>	AAR19757.1	酪酸-産生 バクテリウム L2-50	ブチリル- リン酸
					<i>pib</i>	CAC07932.1	バルシス メガテリウム	ブチリル- リン酸

10

20

30

40

図	ECクラス	所望の基質	所望の生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (利用可能な場合)	生物	公知の基質
8B	1.2.1.d	4-ヒドロキシブチリルリン酸	4-ヒドロキシブタナール	4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ(リン酸化)	<i>asd</i>	NP_417891.1	エシェリキア コリ	L-4-アスパルチルリン酸
					<i>proA</i>	NP_414778.1	エシェリキア コリ	L-グルタミル-5-リン酸
					<i>gapA</i>	P0A9B2.2	エシェリキア コリ	グリセルアルデヒド-3-リン酸
8B	1.2.1.b	4-ヒドロキシブチリル-CoA	4-ヒドロキシブタナール	4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(又は4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ)	<i>sucD</i>	P38947.1	クロストリジウム クルイペリ	スクシニル-CoA
					<i>sucD</i>	NP_904963.1	ポルフィロモナスギンギバリス	スクシニル-CoA
					<i>Msed_0709</i>	YP_001190808.1	メタロスファエラセデューラ	マロニル-CoA
8B	1.1.1.c	4-ヒドロキシブチリル-CoA	1,4-ブタンジオール	4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)	<i>adhE2</i>	AAK09379.1	クロストリジイウムアセトブチリウム	ブタノイル-CoA
					<i>mcr</i>	AAS20429.1	クロロフレクサスアウラネチアクス	マロニル-CoA
					<i>FAR</i>	AAD38039.1	シモンディスキネネシス	長鎖アシル-CoA
8B	1.1.1.a	4-ヒドロキシブタナール	1,4-ブタンジオール	1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼ	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	サッカロマイセスセレビシアエ	一般
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	エシェリキア コリ	>C3
					<i>4hbd</i>	L21902.1	クロストリジウムクルイペリDSM 555	コハク酸セミアルデヒド

10

20

30

40

【0313】

(実施例VII)

(4-アミノブチレートからのBDO経路)

50

本実施例では、4-アミノブチレートからの例示的なBDO経路について記載する。

【0314】

図9Aは、4-アミノブチレートをBDOに変換する例示的なBDO経路を示す。当該例示的なBDO経路の酵素を、これらの酵素をコードする例示的な遺伝子とともに表17に示す。

【0315】

手短に述べると、4-アミノブチレートを4-アミノブチレートCoAトランスフェラーゼ(EC 2.8.3.a)、4-アミノブチリル-CoAヒドロラーゼ(EC 3.1.2.a)又は4-アミノブチレート-CoAリガーゼ(又は4-アミノブチリル-CoAシンテターゼ)(EC 6.2.1.a)によって4-アミノブチリル-CoAに変換することができる。4-アミノブチリル-CoAを4-アミノブチリル-CoAオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)(EC 1.4.1.a)又は4-アミノブチリル-CoAトランスアミナーゼ(EC 2.6.1.a)によって4-オキソブチリル-CoAに変換することができる。4-オキソブチリル-CoAを4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ(EC 1.1.1.a)によって4-ヒドロキシブチリル-CoAに変換することができる。4-ヒドロキシブチリル-CoAを4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)(EC 1.1.1.c)によって1,4-ブタンジオールに変換することができる。代替的に、4-ヒドロキシブチリル-CoAを4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(又は4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ)(EC 1.2.1.b)によって4-ヒドロキシブタナールに変換することができる。4-ヒドロキシブタナールを1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼ(EC 1.1.1.a)によって1,4-ブタンジオールに変換することができる。

【表 6 6】

表17. 4-アミノ酪酸からのBDO経路

図	ECクラス	所望の基質	所望の生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (利用可能な場合)	生物	公知の基質
9A	2.8.3.a	4-アミノ酪酸	4-アミノプロピル-CoA	4-アミノ酪酸-CoA トランスフェラーゼ	<i>cat1, cat2, cat3</i>	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	クロストリジウム クルイペリ	コハク酸、4- ヒドロキシ酪酸、 酪酸
					<i>gctA, gctB</i>	CAA57199.1, CAA57200.1	アシダミノコッカス フェルメンタス	グルタル酸
					<i>atoA, atoD</i>	P76459.1, P76458.1	エシェリキア コリ	ブタン酸
9A	3.1.2.a	4-アミノ酪酸	4-アミノプロピル-CoA	4-アミノプロピル-CoA ヒドロラーゼ	<i>tesB</i>	NP_414986	エシェリキア コリ	アジピル-CoA
					<i>acot12</i>	NP_570103.1	ラツス ノルベギクス	アチリル-CoA
					<i>hibch</i>	Q6NVY1.2	ホモ サピエンス	3- ヒドロキシプロパノイル ル-CoA
9A	6.2.1.a	4-アミノ酪酸	4-アミノプロピル-CoA	4-アミノ酪酸-CoA リガーゼ(又は4- アミノプロピル-CoA シンテターゼ)	<i>sucCD</i>	NP_415256.1, AAC73823.1	エシェリキア コリ	コハク酸
					<i>phl</i>	CAJ15517.1	ペニシリウム クリソゲヌム	フェニル酢酸
					<i>bioW</i>	NP_390902.2	バシルス スブチリス	6- カルボキシヘキサノ 酸
9A	1.4.1.a	4-アミノプロピル-CoA	4-オキシプロピル-CoA	4-アミノプロピル-CoA オキシドレタクターゼ (脱アミノ化)	<i>lysDH</i>	AB052732	ゲオバシルス ステアロテルモフィルス	リジン

10

20

30

40

図	ECクラス	所望の基質	所望の生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (利用可能な場合)	生物	公知の基質
					<i>lysDH</i>	NP_147035.1	アエロピルムペルニクス <i>K1</i>	リジン
					<i>ldh</i>	P0A393	バシルスセレウス	ロイシン、イソロイシン、バリン、2-アミノブタン酸
9A	2.6.1.a	4-アミノブチリル-CoA	4-オキシブチリル-CoA	4-アミノブチリル-CoAトランスアミナーゼ	<i>gabT</i>	P22256.1	エシェリキア コリ	4-アミノ酪酸
					<i>abat</i>	P50554.3	ラツス ノルベギクス	3-アミノ-2-メチルプロピオン酸
					<i>SkyPYD4</i>	ABF58893.1	サッカロミセス クルイペリ	ベータ-アラニン
9A	1.1.1.a	4-オキシブチリル-CoA	4-ヒドロキシブチリル-CoA	4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	サッカロミセス セレビアエ	一般
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	エシェリキア コリ	>C3
					<i>4hbd</i>	L21902.1	クロストリジウム クルイペリ DSM 555	コハク酸 セミアルデヒド
8	1.1.1.c	4-ヒドロキシブチリル-CoA	1,4-ブタンジオール	4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ (アルコール形成)	<i>adhE2</i>	AAK09379.1	クロストリジウム アセトブチリウム	ブタノイル-CoA
					<i>mcr</i>	AAS20429.1	クロロフレクスウス アウランチアクス	マロニル-CoA
					<i>FAR</i>	AAD38039.1	シモンディシアキネンシス	長鎖アシル-CoA

10

20

30

40

図	ECクラス	所望の 基質	所望の 生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (利用可能な場合)	生物	公知の 基質
8	1.2.1.b	4- ヒドロキシブチリ ル-CoA	4- ヒドロキシブタナ ール	4-ヒドロキシブチリル- CoAレダクターゼ (又は4-ヒドロキシ ブタナール デヒドロゲナーゼ)	<i>sucD</i>	P38947.1	クロストリジウム クルイペリ	スクシニル-CoA
					<i>sucD</i>	NP_904963.1	ポルフィロモナス ギンギバリス	スクシニル-CoA
					<i>Msed_0709</i>	YP_001190808.1	メタロスファエラセデュラ	マロニル-CoA
8	1.1.1.a	4- ヒドロキシブタナ ール	1,4ブタンジオー ル	1,4ブタンジオール デヒドロゲナーゼ	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	サッカロミセス セレビスアエ	一般
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	エシェリキア コリ	>C3
					<i>4hbd</i>	L21902.1	クロストリジウム クルイペリDSM 555	コハク酸 セミアルデヒド

10

20

30

40

【0316】

4-アミノブチレートをもBDOに変換する別の例示的なBDO経路を図9Aに示す。当該例示的な

50

BDO経路の酵素を、これらの酵素をコードする例示的な遺伝子とともに表18に示す。

【0317】

手短に述べると、4-アミノブチレートを4-アミノブチレートCoAトランスフェラーゼ (EC 2.8.3.a)、4-アミノブチリル-CoAヒドロラーゼ (EC 3.1.2.a) 又は4-アミノブチレート-CoAリガーゼ (又は4-アミノブチリル-CoAシンテターゼ) (EC 6.2.1.a) によって4-アミノブチリル-CoAに変換することができる。4-アミノブチリル-CoAを4-アミノブチリル-CoAレダクターゼ (アルコール形成) (EC 1.1.1.c) によって4-アミノブタン-1-オールに変換することができる。代替的に、4-アミノブチリル-CoAを4-アミノブチリル-CoAレダクターゼ (又は4-アミノブタナールデヒドロゲナーゼ) (EC 1.2.1.b) によって4-アミノブタナールに変換し、4-アミノブタナールを4-アミノブタン-1-オールデヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.a) によって4-アミノブタン-1-オールに変換することができる。4-アミノブタン-1-オールを4-アミノブタン-1-オールオキシドレダクターゼ (脱アミノ化) (EC 1.4.1.a) 又は4-アミノブタン-1-オールトランスアミナーゼ (EC 2.6.1.a) によって4-ヒドロキシブタナールに変換することができる。4-ヒドロキシブタナールを1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.a) によって1,4-ブタンジオールに変換することができる。

【表 6 7】

表18. 4-アミノ酪酸からのBDO経路

図	EC クラス	所望の 基質	所望の生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (利用可能な場合)	生物	公知の基質
9A	2.8.3.a	4- アミノ酪酸	4- アミノブチリル- CoA	4-アミノ酢酸CoA トランスフェラーゼ	<i>cat1, cat2, cat3</i>	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	クロストリジウム ケルイペリ	コハク酸, 4-ヒド ロキシ酪酸、 酪酸
					<i>gctA, gctB</i>	CAA57199.1, CAA57200.1		グルタル酸
					<i>atoA, atoD</i>	P76459.1, P76458.1	エシェリキア コリ	ブタン酸
9A	3.1.2.a	4- アミノ酪酸	4- アミノブチリル- CoA	4-アミノブチリル-CoA ヒドロラーゼ	<i>tesB</i>	NP_414986	エシェリキア コリ	アジビル-CoA
					<i>acot12</i>	NP_570103.1	ラツス ノルベギクス	ブチリル-CoA
					<i>hibch</i>	Q6NVY1.2	ホモサピエンス	3- ヒドロキシプロパ ノイル-CoA
9A	6.2.1.a	4- アミノ酪酸	4- アミノブチリル- CoA	4-アミノ酪酸-CoAリガーゼ (又は4-アミノブチリル- CoAシンテターゼ)	<i>sucCD</i>	NP_415256.1, AAC73823.1	エシェリキア コリ	コハク酸
					<i>phl</i>	CAI15517.1	ペニシウム ケリソゲヌム	フェニル酢酸
					<i>bioW</i>	NP_390902.2	バシルス スプシルス	6- カルボキシヘキ サン酸
9A	1.1.1.c	4- アミノブチリル-	4-アミノブタン- 1-オール	4-アミノブチリル-CoA レダクターゼ(アルコール 形成)	<i>adhE2</i>	AAK09379.1	クロストリジウム アセトブチリウム	ブタノイル-CoA

10

20

30

40

図	ECクラス	所望の基質	所望の生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (利用可能な場合)	生物	公知の基質
		CoA						
					<i>mcr</i>	AAS20429.1	クロロフレクスウス アウランチアクス	マロニル-CoA
					<i>FAR</i>	AAD38039.1	シモンドシア キネンシス	長鎖 アシル-CoA
9A	1.2.1.b	4- アミノブチリル- CoA	4-アミノブタナール	4-アミノブチリル-CoA レダクターゼ(又は4- アミノブタナール デヒドロゲナーゼ)	<i>sucD</i>	P38947.1	クロストリジウム クルイペリ	スクシニル-CoA
					<i>sucD</i>	NP_904963.1	ボルフィロモナス ギンギバリス	スクシニル-CoA
					<i>Msed_0709</i>	YP_001190808.1	メタロスファエラ セデュラ	マロニル-CoA
9A	1.1.1.a	4-アミノブタナール	4-アミノブタン-1-オール	4-アミノブタン-1-オール デヒドロゲナーゼ	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	サッカロミセス セレビシアエ	一般
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	エシェリキア コリ	>C3
					<i>4hbd</i>	L21902.1	クロストリジウム クルイペリ DSM 555	コハク酸 セミアルデヒド
9A	1.4.1.a	4-アミノブタン-1-オール	4-ヒドロキシブタナール	4-アミノブタン-1-オール オキシドレダクターゼ (脱アミノ化)	<i>lysDH</i>	AB052732	デオバルシス ステアロ テルモフィルス	リジン
					<i>lysDH</i>	NP_147035.1	アエロピルム ペルニクス KI	リジン

10

20

30

40

図	ECクラス	所望の 基質	所望の 生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (利用可能な場合)	生物	公知の 基質
					<i>ldh</i>	P0A393	バシルスセレウス	ロイシン、 イソロイシン、 バリン、2- アミノブタン酸
9A	2.6.1.a	4-アミノブタン- 1-オール	4- ヒドロキシブタナ ール	4-アミノブタン-1-オール トランスアミナーゼ	<i>gabT</i>	P22256.1	エシエリキア コリ	4- アミノブチラ- ート
					<i>abat</i>	P50554.3	ラツス ノルベギクス	3-アミノ-2- メチルプロピオン 酸
					<i>SkyPYD4</i>	ABF58893.1	サッカロミセス クルイベリ	ベーターアラニン
9A	1.1.1.a	4- ヒドロキシブタナ ール	1,4-ブタンジオー ール	1,4-ブタンジオール デヒドロゲナーゼ	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	サッカロミセス セレピシアエ	一般
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	エシエリキア コリ	>C3
					<i>4hbd</i>	L21902.1	クロストリジウム クルイベリ DSM 555	コハク酸 セミアルデヒド

10

20

30

40

【0318】

図9Bは、4-アミノブチレートとBDOを交換する例示的なBDO経路を示す。当該例示的なBDO経路の酵素を、これらの酵素をコードする例示的な遺伝子とともに表19に示す。

50

【0319】

手短に述べると、4-アミノブチレートを4-アミノブチレートキナーゼ(EC 2.7.2.a)によって[(4-アミノブタノイル)オキシ]ホスホン酸に変換することができる。[(4-アミノブタノイル)オキシ]ホスホン酸を4-アミノブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)(EC 1.2.1.d)によって4-アミノブタナールに変換することができる。4-アミノブタナールを4-アミノブタン-1-オールデヒドロゲナーゼ(EC 1.1.1.a)によって4-アミノブタン-1-オールに変換することができる。4-アミノブタン-1-オールを4-アミノブタン-1-オールオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)(EC 1.4.1.a)又は4-アミノブタン-1-オールトランスアミナーゼ(EC 2.6.1.a)によって4-ヒドロキシブタナールに変換することができる。代替的に、[(4-アミノブタノリル)オキシ]ホスホン酸を[(4-アミノブタノリル)オキシ]ホスホン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)(EC 1.4.1.a)又は[(4-アミノブタノリル)オキシ]ホスホン酸トランスアミナーゼ(EC 2.6.1.a)によって[(4-オキシブタノリル)オキシ]ホスホン酸に変換することができる。[(4-オキシブタノリル)オキシ]ホスホン酸を4-ヒドロキシブチリル-ホスフェートデヒドロゲナーゼ(EC 1.1.1.a)によって4-ヒドロキシブチリル-ホスフェートに変換することができる。4-ヒドロキシブチリル-ホスフェートを4-ヒドロキシブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)(EC 1.2.1.d)によって4-ヒドロキシブタナールに変換することができる。4-ヒドロキシブタナールを1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼ(EC 1.1.1.a)によって1,4-ブタンジオールに変換することができる。

【表 6 8】

表19. 4-アミノ酪酸からのBDO経路

図	ECクラス	所望の 基質	所望の 生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (利用可能な場合)	生物	公知の 基質
9B	2.7.2.a	4- アミノ酪酸	[(4- アミノプロパノイル) オキシ] ホスホン酸	4- アミノ酪酸 キナーゼ	<i>ackA</i>	NP_416799.1	エシエリキア コリ	酢酸、プロピオン酸
					<i>bukI</i>	NP_349675	クロストリジウム アセトブチリクム	酪酸
					<i>proB</i>	NP_414777.1	エシエリキア コリ	グルタミン酸
9B	1.2.1.d	[(4- アミノプロパノイル) オキシ] ホスホン酸	4-アミノプロパノール	4- アミノプロパノール アルデヒド デヒドロゲナーゼ (リン酸化)	<i>asd</i>	NP_417891.1	エシエリキア コリ	L-4-アスパルチルリン酸
					<i>proA</i>	NP_414778.1	エシエリキア コリ	L-グルタミル-5-リン酸
					<i>gapA</i>	P0A9B2.2	エシエリキア コリ	グリセルアルデヒド-3- リン酸
9B	1.1.1.a	4-アミノプロパノール	4-アミノプロパノール	4-アミノプロパノール 1-オール デヒドロゲナーゼ	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	サッカロミセス セラビシアエ	一般
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	エシエリキア コリ	>C3
					<i>4hbd</i>	L21902.1	クロストリジウム クルイペリ DSM 555	コハク酸 セミアルデヒド
9B	1.4.1.a	4-アミノプロパノール	4- ヒドロキシプロパノール	4-アミノプロパノール 1-オール	<i>lysDH</i>	AB052732	ゲオバシルス	リジン

10

20

30

40

図	ECクラス	所望の 基質	所望の 生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (利用可能な場合)	生物	公知の 基質
		L-オール	ール	オキシドレダクタ ーゼ(脱アミノ化)			ステアロテルモフィルス	
					<i>lysDH</i>	NP_147035.1	アエロピルムペルニク スKI	リジン
					<i>ldh</i>	P0A393	バシルスセレウス	ロイシン、イソロイシン、バリン、 2-アミノブタン酸
9B	2.6.1.a	4-アミノブタン- L-オール	4- ヒドロキシブタナ ール	4-アミノブタン- L-オール トランスアミナーゼ	<i>gabT</i>	P22256.1	エシェリキア コリ	4-アミノブチラート
					<i>abat</i>	P50554.3	ラツス ノルベギクス	3-アミノ-2- メチルプロピオン酸
					<i>SkpPYD4</i>	ABF58893.1	サツカロミセス クルイペリ	ベータ-アラニン
9B	1.4.1.a	[(4- アミノブタノイル) オキシ] ホスホン酸	[(4- オキソブタノイ ル)オキシ] ホスホン酸	[(4- オキソブタノイル) オキシ]ホスホン酸 オキシドレダクタ ーゼ(脱アミノ化)	<i>lysDH</i>	AB052732	ゲオバシルス ステア ロテルモフィルス	リジン
					<i>lysDH</i>	NP_147035.1	アエロピルム ペルニク スKI	リジン
					<i>ldh</i>	P0A393	バシルスセレウス	ロイシン、イソロイシン、バリン、 2-アミノブタン酸
9B	2.6.1.a	[(4- アミノブタノイル) オキシ] ホスホン酸	[(4- オキソブタノイ ル)オキシ] ホスホン酸	[(4- アミノブタノイル) オキシ] ホスホン酸	<i>gabT</i>	P22256.1	エシェリキア コリ	4-アミノブチラート

10

20

30

40

図	ECクラス	所望の 基質	所望の 生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (利用可能な場合)	生物	公知の 基質
				トランスアミナーゼ				
					<i>SkjPYD4</i>	ABF58893.1	サッカロミセス クルイペリ	ベータ-アラニン
					<i>serC</i>	NP_415427.1	エシエリキア コリ	ホスホセリン、 ホスホヒドロキシトレオニン
9B	1.1.1.a	[(4- オキシ)ブタノイル] オキシ]ホスホン 酸	4- ヒドロキシブチリ ル-リン酸	4- ヒドロキシブチル- リン酸 デヒドロゲナーゼ	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	サッカロミセス セレビシアエ	一般
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	エシエリキア コリ	>C3
					<i>4hbd</i>	L21902.1	クロストリジウム クルイペリ DSM 555	コハク酸 セミアルデヒド
9B	1.2.1.d	4- ヒドロキシブチリ ル-リン酸	4- ヒドロキシブタナ ール	4- ヒドロキシブチル アルデヒド デヒドロゲナーゼ (リン酸化)	<i>asd</i>	NP_417891.1	エシエリキア コリ	L-4-アスパルチル-リン酸
					<i>proA</i>	NP_414778.1	エシエリキア コリ	L-グルタミル-5-リン酸
					<i>gapA</i>	P0A9B2.2	エシエリキア コリ	グリセルアルデヒド-3- リン酸
9B	1.1.1.a	4- ヒドロキシブタナ ール	4- ヒドロキシブタナ ール	4- ヒドロキシブタナ ール	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	サッカロミセス セレビシアエ	一般
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	エシエリキア コリ	>C3

10

20

30

40

図	ECクラス	所望の 基質	所望の 生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (利用可能な場合)	生物	公知の 基質
					<i>4hbd</i>	L21902.1	クロストリジウム クルイペリDSM 555	コハク酸セミアルデヒド

10

20

30

40

【0320】

図9Cは、アセトアセテートを介する例示的な経路を示す。

【0321】

(実施例VIII)

50

(アルファ-ケトグルタレート の例示的なBDO経路)

本実施例では、アルファ-ケトグルタレートからの例示的なBDO経路について記載する。

【0322】

図10は、アルファ-ケトグルタレートをBDOに変換する例示的なBDO経路を示す。当該例示的なBDO経路の酵素を、これらの酵素をコードする例示的な遺伝子とともに表20に示す。

【0323】

手短に述べると、アルファ-ケトグルタレートをアルファ-ケトグルタレート5-キナーゼ (EC 2.7.2.a)によってアルファ-ケトグルタリル-ホスフェートに変換することができる。アルファ-ケトグルタリル-ホスフェートを2,5-ジオキソペンタン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)(EC 1.2.1.d)によって2,5-ジオキソペンタン酸に変換することができる。2,5-ジオキソペンタン酸を2,5-ジオキソペンタン酸レダクターゼ(EC 1.1.1.a)によって5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸に変換することができる。代替的に、アルファ-ケトグルタレートをアルファ-ケトグルタレートCoAトランスフェラーゼ(EC 2.8.3.a)、アルファ-ケトグルタリル-CoAヒドロラーゼ(EC 3.1.2.a)又はアルファ-ケトグルタリル-CoAリガーゼ(又はアルファ-ケトグルタリル-CoAシンテターゼ)(EC 6.2.1.a)によってアルファ-ケトグルタリル-CoAに変換することができる。アルファ-ケトグルタリル-CoAをアルファ-ケトグルタリル-CoAレダクターゼ(又は2,5-ジオキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ)(EC 1.2.1.b)によって2,5-ジオキソペンタン酸に変換することができる。2,5-ジオキソペンタン酸を5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼによって5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸に変換することができる。代替的に、アルファ-ケトグルタリル-CoAをアルファ-ケトグルタリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)(EC 1.1.1.c)によって5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸に変換することができる。5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸を5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ(EC 4.1.1.a)によって4-ヒドロキシブタナールに変換することができる。4-ヒドロキシブタナールを1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼ(EC 1.1.1.a)によって1,4-ブタンジオールに変換することができる。5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸を5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱カルボキシル化)(EC 1.2.1.c)によって4-ヒドロキシブチリル-CoAに変換することができる。

10

20

【表 6 9】

表20. アルファア-ケトグルタル酸からのBDO経路

図	ECクラス	所望の 基質	所望の 生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (利用可能な場合)	生物	公知の 基質
10	2.7.2.a	アルファア- ケトグルタル酸	アルファア- ケトグルタルリ- リン酸	アルファア- ケトグルタル酸 5-キナーゼ	<i>ackA</i>	NP_416799.1	エシェリキア コリ	酢酸、プロピオン酸
					<i>bukI</i>	NP_349675	クロストリジウム アセトブチリウム	酪酸
					<i>proB</i>	NP_414777.1	エシェリキア コリ	グルタミン酸
10	1.2.1.d	アルファア- ケトグルタル リン酸	2,5- ジオキソペンタン 酸	2,5- ジオキソペンタン 酸セミアルデヒド デヒドロゲナーゼ (リン酸化)	<i>proA</i>	NP_414778.1	エシェリキア コリ	L-グルタミル-5-リン酸
					<i>asd</i>	NP_417891.1	エシェリキア コリ	L-4-アスパルチル-リン酸
					<i>gapA</i>	P0A9B2.2	エシェリキア コリ	グリセルアルデヒド-3-リン酸
10	1.1.1.a	2,5- ジオキソペンタン 酸	5-ヒドロキシ-2- オキソペンタン酸	2,5- ジオキソペンタン 酸レダクターゼ	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	サッカロマイセス セラピシアエ	一般
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	エシェリキア コリ	>C3
					<i>4hbd</i>	L21902.1	クロストリジウム クルイペリ DSM 555	コハク酸 セミアルデヒド
10	2.8.3.a	アルファア- ケトグルタル酸	アルファア- ケトグルタルリ- CoA	アルファア- ケトグルタル酸 CoAトランスフェ ラーゼ	<i>catI, cat2, cat3</i>	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	クロストリジウム クルイペリ	コハク酸、4-ヒドロキシ酪酸、 酪酸

10

20

30

40

図	ECクラス	所望の 基質	所望の 生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (利用可能な場合)	生物	公知の 基質
					<i>gctA, gctB</i>	CAA57199.1, CAA57200.1	アシタミノコッカス フェルメンタンス	グルタル酸
					<i>atoA, atoD</i>	P76459.1, P76458.1	エシエリキア コリ	ブタン酸
10	3.1.2.a	アルファ- ケトグルタル酸	アルファ- ケトグルタルル- CoA	アルファ- ケトグルタルル- CoA ヒドロラーゼ	<i>tesB</i>	NP_414986	エシエリキア コリ	アジビル-CoA
					<i>acoi12</i>	NP_570103.1	ラツス ノルベギクス	ブチル-CoA
					<i>hibch</i>	Q6NVY1.2	ホモ サピエンス	3-ヒドロキシプロパノイル-CoA
10	6.2.1.a	アルファ- ケトグルタル酸	アルファ- ケトグルタルル- CoA	アルファ-ケト グルタルル-CoA リガーゼ(又は アルファ-ケト グルタルル-CoA シンテターゼ)	<i>sucCD</i>	NP_415256.1, AAC73823.1	エシエリキア コリ	コハク酸
					<i>phl</i>	CAI15517.1	ペニシウム クリソゲヌム	フェニル酢酸
					<i>bioW</i>	NP_390902.2	バシルス スブチリス	6-カルボキシヘキサン酸
10	1.2.1.b	アルファ- ケトグルタルル- CoA	2,5- ジオキソペンタン 酸	アルファ-ケト グルタルル-CoA レダクターゼ(又は 2,5-ジオキソ ペンタン酸 デヒドロゲナーゼ)	<i>sucD</i>	P38947.1	クロストリジウム クレイベリ	スクシニル-CoA
					<i>Msed_0709</i>	YP_001190808.	メタロスファエラセデュラ	マロニル-CoA

10

20

30

40

図	ECクラス	所望の 基質	所望の 生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (利用可能な場合)	生物	公知の 基質
						1		
					<i>bphG</i>	BAA03892.1	シュードモナス種	アセトアルデヒド、プロピオン アルデヒド、ブチルアルデヒド、 イソブチルアルデヒド及び ホルムアルデヒド
10	1.1.1.a	2,5- ジオキソペンタン 酸	5-ヒドロキシ-2- オキソペンタン酸	5-ヒドロキシ-2- オキソペンタン酸 デヒドロゲナーゼ	<i>ADH2</i> <i>yqhD</i> <i>4hbd</i>	NP_014032.1 NP_417484.1 L21902.1	サッカロミセス セレビシアエ エシェリキア コリ クロストリジウム クルイペリ DSM 555	一般 >C3 コハク酸セミアルデヒド
10	1.1.1.c	アルファ- ケトグルタル- CoA	5-ヒドロキシ-2- オキソペンタン酸	アルファ-ケト グルタル- <i>CoA</i> レタクターゼ (アルコール形成)	<i>adhE2</i>	AAK09379.1	クロストリジウム アセトブチリクム	ブタノイル- <i>CoA</i>
					<i>mcr</i>	AAS20429.1	クロブレクセス アウランチアクス	マロニル- <i>CoA</i>
					<i>FAR</i>	AAD38039.1	シモンディスキネンシス	長鎖アシル- <i>CoA</i>
10	4.1.1.a	5-ヒドロキシ-2- オキソペンタン酸	4- ヒドロキシブタナ ール	5-ヒドロキシ-2- オキソペンタン酸 デカルボキシラー ゼ	<i>pdC</i>	P06672.1	ジモモナス モデルス	2-オキソペンタン酸
					<i>mdlC</i>	P20906.2	シュードモナスブチダ	2-オキソペンタン酸
					<i>pdC1</i>	P06169	サッカロミセス セレビシアエ	ピルビン酸
10	1.1.1.a	4- ヒドロキシブタナ ール	1,4-ブタンジオー ール	1,4-ブタンジオー ールデヒドロゲナー ゼ	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	サッカロミセス セレビシアエ	一般

10

20

30

40

図	ECクラス	所望の 基質	所望の 生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (利用可能な場合)	生物	公知の 基質
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	エシェリキア コリ	>C3
					<i>4hbd</i>	L21902.1	クロストリジウム クレイペリ DSM 555	コハク酸 セミアルデヒド
10	1.2.1.c	5-ヒドロキシ-2- オキソペンタン酸	4- ヒドロキシブチリ ル-CoA	5-ヒドロキシ-2- オキソペンタン酸 デヒドロゲナーゼ (脱炭酸)	<i>sucA</i> , <i>sucB</i> , <i>lpd</i>	NP_415254.1, NP_415255.1, NP_414658.1	エシェリキア コリ	アルファ-ケトグルタル酸
					<i>bjfmBB</i> , <i>bjfmBAA</i> , <i>bjfmBAB</i> , <i>bjfmBAB</i> , <i>pdhD</i>	NP_390283.1, NP_390285.1, NP_390284.1, P21880.1	バシルス スブチリス	バリン、ロイシン及びイソロイシンの2-ケト酸誘導体
					<i>BckdhA</i> , <i>BckdhB</i> , <i>Dbt</i> , <i>Dld</i>	NP_036914.1, NP_062140.1, NP_445764.1, NP_955417.1	ラツス ノルベギクス	バリン、ロイシン及びイソロイシンの2-ケト酸誘導体

10

20

30

40

(実施例IX)

(グルタメートからの例示的なBDO経路)

本実施例では、グルタレートからの例示的なBDO経路について記載する。

【0325】

図11は、グルタメートをBDOに変換する例示的なBDO経路を示す。当該例示的なBDO経路の酵素を、これらの酵素をコードする例示的な遺伝子とともに表21に示す。

【0326】

手短に述べると、グルタメートをグルタメートCoAトランスフェラーゼ(EC 2.8.3.a)、グルタミル-CoAヒドロラーゼ(EC 3.1.2.a)又はグルタミル-CoAリガーゼ(又はグルタミル-CoAシンテターゼ)(EC 6.2.1.a)によってグルタミル-CoAに変換することができる。代替的に、グルタメートをグルタメート5-キナーゼ(EC 2.7.2.a)によってグルタメート-5-ホスフェートに変換することができる。グルタメート-5-ホスフェートをグルタメート-5-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)(EC 1.2.1.d)によってグルタメート-5-セミアルデヒドに変換することができる。グルタミル-CoAをグルタミル-CoAレダクターゼ(又はグルタメート-5-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ)(EC 1.2.1.b)によってグルタメート-5-セミアルデヒドに変換することができる。グルタメート-5-セミアルデヒドをグルタメート-5-セミアルデヒドレダクターゼ(EC 1.1.1.a)によって2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸に変換することができる。代替的に、グルタミル-CoAをグルタミル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)(EC 1.1.1.c)によって2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸に変換することができる。2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸を2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)(EC 1.4.1.a)又は2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸トランスアミナーゼ(EC 2.6.1.a)によって5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸に変換することができる。5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸を5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ(EC 4.1.1.a)によって4-ヒドロキシブタナールに変換することができる。4-ヒドロキシブタナールを1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼ(EC 1.1.1.a)によって1,4-ブタンジオールに変換することができる。代替的に、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸を5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱カルボキシ化)(EC 1.2.1.c)によって4-ヒドロキシブチリル-CoAに変換することができる。

10

20

【表 7 0】

表21. グルタミン酸からのBDO経路

図	ECクラス	所望の基質	所望の生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (利用可能な場合)	生物	公知の基質
11	2.8.3.a	グルタミン酸	グルタミル-CoA	グルタミルCoA トランスフェラーゼ	<i>cat1, cat2, cat3</i>	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	クロストリジウム クルイペリ	コハク酸、4-ヒドロキシ 酪酸、酪酸
					<i>gctA, gctB</i>	CAA57199.1, CAA57200.1	アシタミノコッカス フェルメンタンス	グルタル酸
					<i>atoA, atoD</i>	P76459.1, P76458.1	エシエリキア コリ	ブタン酸
11	3.1.2.a	グルタミン酸	グルタミル-CoA	グルタミル-CoA ヒドロラーゼ	<i>tesB</i>	NP_414986	エシエリキア コリ	アジピル-CoA
					<i>acot12</i>	NP_570103.1	ラツス ノルベギクス	ブチリル-CoA
					<i>hibch</i>	Q6NVY1.2	ホモ サビエンシ	3-ヒドロキシプロパノイル -CoA
11	6.2.1.a	グルタミン酸	グルタミル-CoA	グルタミル-CoA リガーゼ(又はグルタミ ル-CoAシンテターゼ)	<i>sucCD</i>	NP_415256.1, AAC73823.1	エシエリキア コリ	コハク酸
					<i>phl</i>	CAJ15517.1	ペニシルム クリソゲヌム	フェニル酢酸
					<i>bioW</i>	NP_390902.2	バシルス スブチリス	6-カルボキシヘキサン酸
11	2.7.2.a	グルタミン酸	グルタミルCoA-5- リン酸	グルタミルCoA-5- キナーゼ	<i>ackA</i>	NP_416799.1	エシエリキア コリ	酢酸、プロピオン酸
					<i>buk1</i>	NP_349675	クロストリジウム アセトブチリウム	酪酸
					<i>proB</i>	NP_414777.1	エシエリキア コリ	グルタミン酸

10

20

30

40

図	ECクラス	所望の 基質	所望の 生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (利用可能な場合)	生物	公知の 基質
11	1.2.1.1.d	グルタミン酸-5- リン酸	グルタミン酸-5- セミアルデヒド	グルタミン酸-5- セミアルデヒド デヒドロゲナーゼ (リン酸化)	<i>proA</i>	NP_414778.1	エシエリキア コリ	L-グルタミン-5- リン酸
					<i>asd</i>	NP_417891.1	エシエリキア コリ	L-4-アスパルチル- リン酸
					<i>gapA</i>	P0A9B2.2	エシエリキア コリ	グリセルアルデヒド-3- リン酸
11	1.2.1.1.b	グルタミンル-CoA	グルタミン酸-5- セミアルデヒド	グルタミンル-CoA レダクターゼ(又は グルタミン酸-5- セミアルデヒド デヒドロゲナーゼ)	<i>sucD</i>	P38947.1	クロストリジウム クルイペリ	スクシニル-CoA
					<i>Msed_0709</i>	YP_001190808.1	メタロスファエア セデュラ	マロニル-CoA
					<i>bphG</i>	BAA03892.1	シュエードモナス種	アセトアルデヒド、 プロピオンアルデヒド、 ブチルアルデヒド、 イソブチルアルデヒド 及びホルムアルデヒド
11	1.1.1.1.a	グルタミン酸-5- セミアルデヒド	2-アミノ-5- ヒドロキシペンタ ン酸	グルタミン酸-5- セミアルデヒド レダクターゼ	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	サッカロミセス セレビスシアエ	一般
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	エシエリキア コリ	>C3
					<i>4hbd</i>	L21902.1	クロストリジウム クルイペリ DSM 555	コハク酸 セミアルデヒド
11	1.1.1.1.c	グルタミンル-CoA	2-アミノ-5- ヒドロキシペンタ	グルタミンル-CoA レダクターゼ	<i>adhE2</i>	AAK09379.1	クロストリジウム	ブタノイル-CoA

10

20

30

40

図	ECクラス	所望の 基質	所望の 生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (利用可能な場合)	生物	公知の 基質
			ン酸	(アルコール形成)			アセトブチリウム	
					<i>mcr</i>	AAS20429.1	クロアフレクスウス アウランチアクス	マロニル-CoA
					<i>FAR</i>	AAD38039.1	シモンディア キネンシス	長鎖アシル-CoA
11	1.4.1.a	2-アミノ-5- ヒドロキシペンタ ン酸	5-ヒドロキシ-2- オキシソペンタン酸	2-アミノ-5-ヒドロキシ ペンタン酸オキシド レダクターゼ(脱アミノ化)	<i>gdhA</i>	P00370	エシエリキア コリ	グルタミン酸
					<i>ldh</i>	P0A393	バシルス セレウス	ロイシン、イソロイシン、 バリン、2-アミノブタン酸
					<i>nadX</i>	NP_229443.1	テルモトガ マリチャマ	アスパラギン酸
11	2.6.1.a	2-アミノ-5- ヒドロキシペンタ ン酸	5-ヒドロキシ-2- オキシソペンタン酸	2-アミノ-5-ヒドロキシ ペンタン酸トランス アミナーゼ	<i>aspC</i>	NP_415448.1	エシエリキア コリ	アスパラギン酸
					<i>AAT2</i>	P23542.3	サッカロミセス セレビスシアエ	アスパラギン酸
					<i>avtA</i>	YP_026231.1	エシエリキア コリ	バリン、アルファ- アミノ酪酸
11	4.1.1.a	5-ヒドロキシ-2- オキシソペンタン酸	4- ヒドロキシブタナ- ール	5-ヒドロキシ-2-オキシ ペンタン酸 デカルボキシラーゼ	<i>pdC</i>	P06672.1	ジモモナス モビルス	2-オキシソペンタン酸
					<i>mdtC</i>	P20906.2	シュートモナス プチダ	2-オキシソペンタン酸

10

20

30

40

図	ECクラス	所望の 基質	所望の 生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (利用可能な場合)	生物	公知の 基質
					<i>pdcl</i>	P06169	サッカロミセス セレビシアエ	ビルビン酸
11	1.1.1.a	4- ヒドロキシブタナール	L4-ブタンジオール	L4-ブタンジオール デヒドロゲナーゼ	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	サッカロミセス セレビシアエ	一般
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	エシェリキア コリ	>C3
					<i>4hbd</i>	L21902.1	クロストリジウム クルイペリ DSM 555	コハク酸 セミアルデヒド
11	1.2.1.c	5-ヒドロキシ-2- オキソペンタン酸	4- ヒドロキシブチリ ル-CoA	5-ヒドロキシ-2-オキソ ペンタン酸 デヒドロゲナーゼ (脱炭酸)	<i>sucA, sucB, lpd</i>	NP_415254.1, NP_415255.1, NP_414658.1	エシェリキア コリ	アルファ-ケトグルタル酸
					<i>bfmBB, bfmBAA, bfmBAB, bfmBAB, pdhD</i>	NP_390283.1, NP_390285.1, NP_390284.1, P21880.1	バシルス スブチリス	バリン、ロイシン及び イソロイシンの 2-ケト酸誘導体
					<i>Bckdha, Bckdlb, Dbi, Dld</i>	NP_036914.1, NP_062140.1, NP_445764.1, NP_955417.1	ラッス ノルベギクス	バリン、ロイシン及び イソロイシンの 2-ケト酸誘導体

10

20

30

40

50

【0327】

(実施例X)

(アセトアセチル-CoAからの例示的なBDO経路)

本実施例では、アセトアセチル-CoAからの例示的なBDO経路について記載する。

【0328】

図12は、アセトアセチル-CoAをBDOに変換する例示的なBDO経路を示す。当該例示的なBDO経路の酵素を、これらの酵素をコードする例示的な遺伝子とともに表22に示す。

【0329】

手短に述べると、アセトアセチル-CoAを3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.a) によって3-ヒドロキシブチリル-CoAに変換することができる。3-ヒドロキシブチリル-CoAを3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼ (EC 4.2.1.a) によってクロトニル-CoAに変換することができる。クロトニル-CoAをビニルアセチル-CoA Δ イソメラーゼ (EC 5.3.3.3) によってビニルアセチル-CoAに変換することができる。ビニルアセチル-CoAを4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼ (EC 4.2.1.a) によって4-ヒドロキシブチリル-CoAに変換することができる。4-ヒドロキシブチリル-CoAを4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ (アルコール形成) (EC 1.1.1.c) によって1,4-ブタンジオールに変換することができる。代替的に、4-ヒドロキシブチリル-CoAを4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ (又は4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ) (EC 1.2.1.b) によって4-ヒドロキシブタナールに変換することができる。4-ヒドロキシブタナールを1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.a) によって1,4-ブタンジオールに変換することができる。

【表 7 1】

表22. アセトアセチル-CoAからのBDO経路

図	ECクラス	所望の 基質	所望の 生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (利用可能な場合)	生物	公知の 基質
12	1.1.1.a	アセトアセチル- CoA	3- ヒドロキシブチル -CoA	3-ヒドロキシブチル- CoA デヒドロゲナーゼ	<i>hbd</i>	NP_349314.1	クロストリジウム アセトブチリクム	3-ヒドロキシブチル- CoA
					<i>hbd</i>	AAM14586.1	クロストリジウム バイジェリンキー	3-ヒドロキシブチル- CoA
					<i>Msed_1423</i>	YP_001191505	メタロスファエラ セデュラ	推定される 3- ヒドロキシブチル-CoA
12	4.2.1.a	3- ヒドロキシブチル CoA	クロトノイル-CoA	3-ヒドロキシブチル- CoA デヒドロゲナーゼ	<i>crt</i>	NP_349318.1	クロストリジウム アセトブチリクム	3-ヒドロキシブチル- CoA
					<i>maoC</i>	NP_415905.1	エシェリキア コリ	3-ヒドロキシブチル- CoA
					<i>paaf</i>	NP_415911.1	エシェリキア コリ	3-ヒドロキシブチル- CoA
12	5.3.3.3	クロトノイル-CoA	ピニルアセチル- CoA	ピニルアセチル-CoA Δ-イソメラーゼ	<i>abfD</i>	YP_001396399.1	クロストリジウム クルイベリ DSM 555	4-ヒドロキシブチル- CoA
					<i>abfD</i>	P55792	クロストリジウム アミノブチリクム	4-ヒドロキシブチル- CoA
					<i>abfD</i>	YP_001928843	ホルフィロモナス キンギバリス ATCC 33277	4-ヒドロキシブチル- CoA
12	4.2.1.a	ピニルアセチル- CoA	4- ヒドロキシブチル CoA	4-ヒドロキシブチル- CoA デヒドラターゼ	<i>abfD</i>	YP_001396399.1	クロストリジウム クルイベリ DSM 555	4-ヒドロキシブチル- CoA

10

20

30

40

図	ECクラス	所望の 基質	所望の 生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (利用可能な場合)	生物	公知の 基質
					<i>abfD</i>	P55792	クロストリジウム アミノプロチウム	4ヒドロキシブチル- CoA
					<i>abfD</i>	YP_001928843	ボルフィロモナス ギンギバリス ATCC 33277	4ヒドロキシブチル- CoA
12	1.1.1.c	4- ヒドロキシブチル- CoA	1,4-ブタンジオール	4-ヒドロキシブチル- CoAレダクターゼ (アルコール形成)	<i>adhE2</i>	AAK09379.1	クロストリジウム アセトプロチウム	ブタノイル-CoA
					<i>mcr</i>	AAS20429.1	クロロフレクスウス アウランチアクス	マロニル-CoA
					<i>FAR</i>	AAD38039.1	シモンディア キネンシス	長鎖アシル-CoA
12	1.2.1.b	4- ヒドロキシブチル- CoA	4- ヒドロキシブタナ- ール	4-ヒドロキシブチル- CoAレダクターゼ(又は 4-ヒドロキシブタナ-ール デヒドロゲナーゼ)	<i>sucD</i>	P38947.1	クロストリジウム クルイベリ	スクシニル-CoA
					<i>sucD</i>	NP_904963.1	ボルフィロモナス ギンギバリス	スクシニル-CoA
					<i>Msed_0709</i>	YP_001190808.1	メタロスファエラ セデュラ	マロニル-CoA
12	1.1.1.a	4- ヒドロキシブタナ- ール	1,4-ブタンジオール	1,4-ブタンジオール デヒドロゲナーゼ	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	サッカロミセス セラビシアエ	一般
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	エシェリキア コリ	>C3
					<i>4hbd</i>	L21902.1	クロストリジウム クルイベリ DSM 555	コハク酸 セミアルデヒド

10

20

30

40

50

(ホモセリンからの例示的なBDO経路)

本実施例では、ホモセリンからの例示的なBDO経路について記載する。

【0331】

図13は、ホモセリンをBDOに変換する例示的なBDO経路を示す。当該例示的なBDO経路の酵素を、これらの酵素をコードする例示的な遺伝子とともに表23に示す。

【0332】

手短に述べると、ホモセリンをホモセリンデアミナーゼ(EC 4.3.1.a)によって4-ヒドロキシブタ2-エノエートに変換することができる。代替的に、ホモセリンをホモセリンCoAトランスフェラーゼ(EC 2.8.3.a)、ホモセリン-CoAヒドロラーゼ(EC 3.1.2.a)又はホモセリン-CoAリガーゼ(又はホモセリン-CoAシンテターゼ)(EC 6.2.1.a)によってホモセリン-CoAに変換することができる。ホモセリン-CoAをホモセリン-CoAデアミナーゼ(EC 4.3.1.a)によって4-ヒドロキシブタ2-エノイル-CoAに変換することができる。4-ヒドロキシブタ2-エノエートを4-ヒドロキシブタ2-エノイル-CoAトランスフェラーゼ(EC 2.8.3.a)、4-ヒドロキシブタ2-エノイル-CoAヒドロラーゼ(EC 3.1.2.a)又は4-ヒドロキシブタ2-エノイル-CoAリガーゼ(又は4-ヒドロキシブタ2-エノイル-CoAシンテターゼ)(EC 6.2.1.a)によって4-ヒドロキシブタ2-エノイル-CoAに変換することができる。代替的に、4-ヒドロキシブタ4-エノエートを4-ヒドロキシブタ2-エノエートレダクターゼ(EC 1.3.1.a)によって4-ヒドロキシブチレートに変換することができる。4-ヒドロキシブチレートを4-ヒドロキシブチリル-CoAトランスフェラーゼ(EC 2.8.3.a)、4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ(EC 3.1.2.a)又は4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ(又は4-ヒドロキシブチリル-CoAシンテターゼ)(EC 6.2.1.a)によって4-ヒドロキシブチリル-CoAに変換することができる。4-ヒドロキシブタ2-エノイル-CoAを4-ヒドロキシブタ2-エノイル-CoAレダクターゼ(EC 1.3.1.a)によって4-ヒドロキシブチリル-CoAに変換することができる。4-ヒドロキシブチリル-CoAを4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)(EC 1.1.1.C)によって1,4-ブタンジオールに変換することができる。代替的に、4-ヒドロキシブチリル-CoAを4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(又は4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ)(EC 1.2.1.b)によって4-ヒドロキシブタナールに変換することができる。4-ヒドロキシブタナールを1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼ(EC 1.1.1.a)によって1,4-ブタンジオールに変換することができる。

10

20

【表 7 2】

表23. ホモセリンからのBDO経路

図	ECクラス	所望の基質	所望の生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (利用可能な場合)	生物	公知の基質
13	4.3.1.a	ホモセリン	4-ヒドロキシブタ-2-エン酸	ホモセリン デアミナーゼ	<i>aspA</i>	NP_418562	エシェリキア コリ	アスパラギン酸
					<i>aspA</i>	P44324.1	ハエモフィルス インフルエンザエ	アスパラギン酸
					<i>aspA</i>	P07346	シュードモナス フルオレセンス	アスパラギン酸
13	2.8.3.a	ホモセリン	ホモセリン- CoA	ホモセリンCoA トランスフェラーゼ	<i>cat1, cat2, cat3</i>	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	クロストリジウム クルイペリ	コハク酸、 4-ヒドロキシ酪酸、 酪酸
					<i>gctA, gctB</i>	CAA57199.1, CAA57200.1	アシタミノコッカス フェルメンタンス	グルタル酸
					<i>atoA, atoD</i>	P76459.1, P76458.1	エシェリキア コリ	ブタン酸
13	3.1.2.a	ホモセリン	ホモセリン- CoA	ホモセリン-CoA ヒドロラーゼ	<i>tesB</i>	NP_414986	エシェリキア コリ	アジピル-CoA
					<i>acot12</i>	NP_570103.1	ラツス ノルベギクス	ブチリル-CoA
					<i>hibch</i>	Q6NVY1.2	ホモ サピエンス	3- ヒドロキシプロパノイ ル-CoA
13	6.2.1.a	ホモセリン	ホモセリン- CoA	ホモセリン-CoA リガーゼ(又は ホモセリン-CoA シンテターゼ)	<i>sucCD</i>	NP_415256.1, AAC73823.1	エシェリキア コリ	コハク酸
					<i>phl</i>	CA15517.1	ペニシラム	フェニル酢酸

10

20

30

40

図	ECクラス	所望の 基質	所望の 生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (利用可能な場合)	生物	公知の 基質
							クリソゲナム	
					<i>bioW</i>	NP_390902.2	バシルススブチリス	6- カルボキシヘキサノ 酸
13	4.3.1.a	ホモセリン- CoA	4-ヒドロキシブタ-2- エノイル-CoA	ホモセリン-CoA デアミナーゼ	<i>acI1</i>	CAG29274.1	クロストリジウム プロビオニクム	ベータ-アラニル-CoA
					<i>acI2</i>	CAG29275.1	クロストリジウム プロビオニクム	ベータ-アラニル-CoA
					<i>MXAN_438 5</i>	YP_632558.1	ミキソコッカス キサンタス	ベータ-アラニル-CoA
13	2.8.3.a	4-ヒドロキシブタ- 2-エン酸	4-ヒドロキシブタ-2- エノイル-CoA	4-ヒドロキシブタ-2- エノイル-CoA トランスフェラーゼ	<i>cat1, cat2, cat3</i>	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	クロストリジウム クルイペリ	コハク酸, 4- ヒドロキシ酪酸、 酪酸
					<i>gctA, gctB</i>	CAA57199.1, CAA57200.1	アシタミノコッカス フェルメンタンス	グルタル酸
					<i>atoA, atoD</i>	P76459.1, P76458.1	エシエリキア コリ	ブタン酸
13	3.1.2.a	4-ヒドロキシブタ- 2-エン酸	4-ヒドロキシブタ-2- エノイル-CoA	4-ヒドロキシブタ-2- エノイル-CoA ヒドロラーゼ	<i>tesB</i>	NP_414986	エシエリキア コリ	アジピル-CoA
					<i>acot12</i>	NP_570103.1	ラツス ノルベギクス	ブチリル-CoA
					<i>hibch</i>	Q6NVY1.2	ホモ サビエンス	3- ヒドロキシプロパノイ ル-CoA
13	6.2.1.a	4-ヒドロキシブタ-	4-ヒドロキシブタ-2-	4-ヒドロキシブタ-2- エノイル-CoA)リガーゼ (又は4-ヒドロキシブタ-2-	<i>sucCD</i>	NP_415256.1,	エシエリキア コリ	コハク酸

図	ECクラス	所望の 基質	所望の 生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (利用可能な場合)	生物	公知の 基質
		2-エン酸	エノイル-CoA	エノイル-CoA シンターゼ)		AAC73823.1		
					<i>phl</i>	CAI15517.1	ペニシウム クリソゲナム	フェニル酢酸
					<i>bioW</i>	NP_390902.2	バシルススブチリス	6- カルボキシヘキサン 酸
13	1.3.1.a	4-ヒドロキシブタ- 2-エン酸	4- ヒドロキシ酪酸	4-ヒドロキシブタ-2- エン酸レダクターゼ	<i>enr</i>	CAA71086.1	クロストリジウム プロビオニクム	
					<i>enr</i>	CAA76083.1	クロストリジウム クルイペリ	
					<i>enr</i>	YP_430895.1	ムーレア サーモアセチカ	
13	2.8.3.a	4- ヒドロキシ酪酸	4- ヒドロキシブチリル -CoA	4-ヒドロキシブチリル- CoAトランスフェラーゼ	<i>cat1, cat2, cat3</i>	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	クロストリジウム クルイペリ	コハク酸、4- ヒドロキシ酪酸、 酪酸
					<i>gctA, gctB</i>	CAA57199.1, CAA57200.1	アシタミノコッカス フェルメンタンス	グルタル酸
					<i>atoA, atoD</i>	P76459.1, P76458.1	エシエリキア コリ	ブタン酸
13	3.1.2.a	4- ヒドロキシ酪酸	4- ヒドロキシブチリル -CoA	4-ヒドロキシブチリル- CoAヒドロラーゼ	<i>tesB</i>	NP_414986	エシエリキア コリ	アジビル-CoA
					<i>acot12</i>	NP_570103.1	ラッス ノルベギクス	ブチリル-CoA
					<i>hibch</i>	Q6NVY1.2	ホモ サピエンス	3- ヒドロキシプロパノイ

10

20

30

40

図	ECクラス	所望の 基質	所望の 生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (利用可能な場合)	生物	公知の 基質
								ル-CoA
13	6.2.1.a	4- ヒドロキシ酪酸	4- ヒドロキシブチリル -CoA	4-ヒドロキシブチリル- CoAリガーゼ(又は4- ヒドロキシブチリル-CoA シンターゼ)	<i>sucCD</i>	NP_415256.1, AAC73823.1	エシェリキア コリ	コハク酸
					<i>phl</i>	CAJ15517.1	ベニシウム クリソゲヌム	フェニル酢酸
					<i>bioW</i>	NP_390902.2	バシルス スブチリス	6- カルボキシヘキサノ 酸
13	1.3.1.a	4-ヒドロキシブタ- 2-エノイル-CoA	4- ヒドロキシブチリル -CoA	4-ヒドロキシブタ-2- エノイル-CoAレダクターゼ	<i>bcd, etfA, etfB</i>	NP_349317.1, NP_349315.1, NP_349316.1	クロストリジウム アセトブチリクム	
					<i>TER</i>	Q5EU90.1	ユーグレナ グラシリス	
					<i>TDE0597</i>	NP_971211.1	トレボネマ デンチコラ	
8	1.1.1.c	4- ヒドロキシブチリ ル-CoA	1,4-ブタンジオール	4-ヒドロキシブチリル- CoAレダクターゼ (アルコール形成)	<i>adhE2</i>	AAK09379.1	クロストリジウム アセトブチリクム	ブタノイル-CoA
					<i>mcr</i>	AAS20429.1	クロロフレクスウス アウランチアクス	マロニル-CoA
					<i>FAR</i>	AAD38039.1	シモンディア キネンシス	長鎖アシル- CoA
8	1.2.1.b	4- ヒドロキシブチリ ル-CoA	4- ヒドロキシブタナ- ール	4-ヒドロキシブチリル- CoAレダクターゼ (又は4-ヒドロキシブタナ- ールデヒドロゲナーゼ)	<i>sucD</i>	P38947.1	クロストリジウム クルイペリ	スクシニル-CoA

10

20

30

40

図	ECクラス	所望の 基質	所望の 生成物	酵素名	遺伝子名	GenBank ID (利用可能な場合)	生物	公知の 基質
					<i>sucD</i>	NP_904963.1	ボルフィロモナス ギンギハリス	スクシニル-CoA
					<i>Msed_0709</i>	YP_001190808.1	メタロスファエラ セデューラ	マロニル-CoA
8	1.1.1.1.a	4- ヒドロキシブタナ- ール	1,4-ブタンジオール	1,4-ブタンジオール デヒドロゲナーゼ	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	サッカロミセス セレビシアエ	一般
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	エシェリキア コリ	>C3
					<i>4hbd</i>	L21902.1	クロストリジウム クルイベリ DSM 555	コハク酸 セミアルデヒド

10

20

30

40

50

【0333】

(実施例XII)

(スクシニル-CoAシンテターゼを発現するBDO生成菌株)

本実施例では、スクシニル-CoAシンテターゼを発現するBDO生成菌株におけるBDOの増大された生成について記載する。

【0334】

以上に記載されているように、スクシネートは、スクシニル-CoAへの変換によるBDOの生成のための前駆体であり得る(国際公開第2008/115840号、国際公開第2009/023493号、米国特許公開第2009/0047719号、米国特許公開第2009/0075351号をも参照)。したがって、スクシニル-CoAシンテターゼをコードする大腸菌sucCD遺伝子を過剰発現するように宿主菌株を遺伝子改変した。大腸菌sucCDオペロンのヌクレオチド配列を図14Aに示し、コードされたスクシニル-CoAシンテターゼサブユニットについてのアミノ酸配列を図14B及び図14Cに示す。手短に述べると、大腸菌sucCD遺伝子は大腸菌染色体DNAからのPCRによってクローン化し、標準的な分子生物手法を用いてPA11acO-1プロモーターの背後のマルチコピープラスミドpZS^{*}13、pZA13及びpZE33に導入した(Lutz及びBujard、Nucleic Acids Res. 25:1203-1210(1997))。 10

【0335】

スクシニル-CoAシンテターゼをコードする大腸菌sucCD遺伝子を過剰発現させた。それらの結果は、スクシニル-CoAシンテターゼを発現するsucCDを菌株に導入すると、原生レベルの発現、又はスクシニル-CoA/アセチル-CoAトランスフェラーゼであるcat1の発現と比較して様々な菌株におけるBDO生成が向上することを示した。したがって、スクシニル-CoAシンテターゼをコードする原生大腸菌sucCD遺伝子を過剰発現することによってBDO生成を向上させた。 20

【0336】

(実施例XIII)

(BDO経路酵素をコードする異種遺伝子の発現)

本実施例では、BDOの生成の向上をもたらす様々な非原生経路酵素の発現について記載する。

【0337】

アルファ-ケトグルタレートデカルボキシラーゼ。アルファ-ケトグルタレートデカルボキシラーゼをコードするウシ結核菌sucA遺伝子を宿主菌株に発現させた。ウシ結核菌sucAの過剰発現は、BDO生成を向上させた(国際公開第2008/115840号、国際公開第2009/023493号、米国特許公開第2009/0047719号、米国特許公開第2009/0075351号をも参照)。ウシ結核菌sucAのヌクレオチド及びアミノ酸配列並びにコードされたアルファ-ケトグルタレートデカルボキシラーゼを図15に示す。 30

【0338】

菌株を発現するウシ結核sucAを構築するために、以下に示すプライマーを使用して、アルファ-ケトグルタレートデカルボキシラーゼをコードするsucA遺伝子の断片をウシ結核菌BCGのゲノムDNAから増幅した(ATCC 19015;米国菌培養収集所(American Type Culture Collection)、バージニア州Manassas)。全長遺伝子を4つの増幅DNA断片の連結反応によって集積し、P_{PA11acO-1}プロモーターの背後の発現ベクターpZS^{*}13及びpZE23にクローン化した(Lutz及びBujard、Nucleic Acids Res. 25:1203-1210 (1997))。集積遺伝子のヌクレオチド配列をDNA配列決定によって検証した。 40

【化 2】

断片1についてのプライマー:

5'-ATGTACCGCAAGTTCCGC-3' (配列番号)

5'-CAATTTGCCGATGCCCAG-3' (配列番号)

断片2についてのプライマー:

5'-GCTGACCACTGAAGACTTTG-3' (配列番号)

5'-GATCAGGGCTTCGGTGTAG-3' (配列番号)

断片3についてのプライマー:

5'-TTGGTGCGGGCCAAGCAGGATCTGCTC-3' (配列番号)

5'-TCAGCCGAACGCCTCGTCGAGGATCTCCTG-3' (配列番号)

断片4についてのプライマー:

5'-TGGCCAACATAAGTTCACCATTCGGGCAAAAC-3' (配列番号)

5'-TCTCTTCAACCAGCCATTCGTTTTGCCCG-3' (配列番号)

【0339】

インビトロ及びインビボアッセイの両方を使用して、アルファ-ケトグルタレートデカルボキシラーゼの機能的発現を実証した。SucA酵素活性を既に報告されている方法(Tianら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:10670-10675 (2005))に従って測定した。反応混合物は、50mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)、0.2mMのピロリン酸チアミン、1mMのMgCl₂、0.8mMのフェリシアニド、1mMのアルファ-ケトグルタレート及び細胞粗製溶解物を含んでいた。酵素活性を430nmのフェリシアニドの還元によって監視した。SucA酵素のインビボ機能を、大腸菌全細胞培養を使用して検証した。SucA酵素及び4-ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼ(4Hbd)をコードするプラスミドで形質転換された大腸菌MG1655lacI^qの単一コロニーを、適切な抗生物質を含む5mLのLB培地に接種した。細胞を37℃で終夜好氣的に培養した。この終夜培養物の200uLを、20g/Lのグルコース、緩衝能力を向上させるための100mMの3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸(MOPS)、10 µg/mLのチアミン及び適切な抗生物質が補給された8mLのM9最小培地(6.78g/LのNa₂HPO₄、3.0g/LのKH₂PO₄、0.5g/LのNaCl、1.0g/LのNH₄Cl、1mMのMgSO₄、0.1mMのCaCl₂)に導入した。最初に密閉嫌気性ボトルに5分間にわたって窒素を流し、次いで接種後に23Gニードルで隔壁に穴をあけることによってミクロ好気性条件を確立した。成長時にニードルをボトル内に維持して、少量の空気をボトルに導入させた。培養物が中対数成長期に達すると、0.2mMのイソプロピルβ-D-1-チオガラクトピラノシド(IPTG)を用いてタンパク質発現を誘発した。対照として、4-ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼをコードするプラスミドのみ及び空ベクターのみで形質転換された大腸菌MG1655lacI^q菌株を同じ条件下で培養した(表23参照)。LCMS法を使用して培地における4-ヒドロキシブチレート(4HB)の蓄積を監視した。ミコバクテリウム結核菌アルファ-ケトグルタレートデカルボキシラーゼを発現する大腸菌株のみが、有意な量の4HBを生成した(図16参照)。

10

20

30

40

【表 7 3】

表24. 様々なプラスミド対照を含み、*sucA*及び4-ヒドロキシブチレート
デヒドロゲナーゼをコードする3つの菌株

	宿主	pZE13	pZA33
1	MG1655 lacIq	ベクター	ベクター
2	MG1655 lacIq	ベクター	4hbd
3	MG1655 lacIq	<i>sucA</i>	4hbd

10

【0 3 4 0】

個別の実験により、アルファ-ケトグルタレートデカルボキシラーゼ経路は、還元性TCA回路と無関係に機能することが証明された。大腸菌ECKh-401($\Delta adhE$ $\Delta ldhA$ $\Delta pf1B$ $\Delta lpdA::K.p.lpdA322$ Δmdh $\Delta arcA$)を宿主菌株として使用した(表25参照)。すべての3つの構築物は、4HBデヒドロゲナーゼ(4Hbd)をコードする遺伝子を含んでいた。構築物1は、アルファ-ケトグルタレートデカルボキシラーゼ(*sucA*)をコードする遺伝子をも含んでいた。構築物2は、還元性TCA回路を介する4HBの合成に必要とされるスクシニル-CoAシンテターゼ(*sucCD*)及びCoA依存性スクシネートセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(*sucD*)をコードする遺伝子を含んでいた。構築物3は、構築物1及び2のすべての遺伝子を含む。3つの大腸菌株を、第2の培養がミクロ好気性条件下であったことを除いては上記と同じ条件下で培養した。*SucA*酵素を発現することによって、構築物3は、4HB合成のための還元性TCA回路に依存する構築物2より多くの4HBを生成した(図17参照)。

20

【0 3 4 1】

4HB及びBDOの生成に対するアルファ-ケトグルタレートデカルボキシラーゼの貢献のためのさらなる支援を流動分析実験によって提供した。染色体上に*sucCD-sucD*及び*sucA*の両方を含むECKh-432の培養物を、1-¹³C-グルコース(60%)とU-¹³C-グルコース(40%)の混合物を含むM9最小培地で成長させた。バイオマスを収穫し、タンパク質を単離して、アミノ酸に加水分解し、アミノ酸の標識分布を既に記載されているようにガスクロマトグラフィー-質量分光分析(gas chromatography-mass spectrometry)(GCMS)によって分析した(Fischer及びSauer, Eur. J. Biochem. 270:880-891(2003))。加えて、分泌した4HB及びBDOの標識分布を国際公開第2008115840A2号に記載されているようにGCMSによって分析した。このデータを用いて、確立された方法(Suthersら, Metab. Eng. 9:387-405 (2007))を使用して細胞内流動分布を計算した。それらの結果は、アルファ-ケトグルタレートの56%及び84%がアルファ-ケトグルタレートデカルボキシラーゼを介してBDO経路に誘導されることを示していた。残りは、アルファ-ケトグルタレートデヒドロゲナーゼによって酸化され、次いでそれがスクシニル-CoA経路を介してBDOに入った。

30

【0 3 4 2】

これらの結果は、プラスミドに発現されたウシ結核菌BCGの*sucA*遺伝子を含む4-ヒドロキシブチレート生成菌株を実証している。この遺伝子をコードするプラスミドが存在しない場合は、*sucD*(CoA依存性スクシネートセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ)が発現されなければ4-ヒドロキシブチレート生成はごくわずかである。ウシ結核菌は、その酵素生成物が既に特徴づけられた結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)遺伝子の近相同体である(Tianら、前出、2005)。

40

【0 3 4 3】

スクシネートセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(CoA-依存性)、4-ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼ及び4-ヒドロキシブチリル-CoA/アセチル-CoAトランスフェラーゼ。ポルフィロモナス・ギンギバリスW83からの遺伝子は、1,4-ブタンジオール生成のための経路の有効な構成要素であり得る(国際公開第2008/115840号、国際公開第2009/023493号、米国特許公開第2009/0047719号、米国特許公開第2009/0075351号をも参照)。ポルフィロモナス・ギンギバリスからのCoA依存性スクシネートセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(*su*

50

cD)のヌクレオチド配列を図18Aに示し、コードされたアミノ酸配列を図18Bに示す。ポルフィロモナス・ギンギバリスからの4-ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼ(4hbd)のヌクレオチド配列を図19Aに示し、コードされたアミノ酸配列を図19Bに示す。ポルフィロモナス・ギンギバリスからの4-ヒドロキシブチレートCoAトランスフェラーゼ(cat2)のヌクレオチド配列を図20Aに示し、コードされたアミノ酸配列を図20Bに示す。

【0344】

手短に述べると、スクシネートセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(CoA依存性)及び4-ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼ、並びに場合によってはさらに4-ヒドロキシブチリル-CoA/アセチル-CoAをコードするポルフィロモナス・ギンギバリスW83をP.ギンギバリス染色体DNAからのPCRによってクローン化し、標準的な分子生物手法を使用して、PA11acO-1プロモーターの背後のマルチコピープラスミドpZS*13、pZA13及びpZE33に導入した(Lutz及びBujard、Nucleic Acids Res. 25:1203-1210(1997))。次いで、これらのプラスミドを宿主菌株に導入した。

【0345】

ポルフィロモナス・ギンギバリスW83遺伝子を上記のように生成菌株に導入した。いくつかの菌株は、スクシネートセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(CoA依存性)及び4-ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼのみを含み、4-ヒドロキシブチリル-CoA/アセチル-CoAを含んでいなかった。

【0346】

ブチレートキナーゼ及びホスホトランスブチリラーゼ。ブチレートキナーゼ(BK)及びホスホトランスブチリラーゼ(PTB)酵素を利用して4-ヒドロキシブチリル-CoAを生成することができる(国際公開第2008/115840号、国際公開第2009/023493号、米国特許公開第2009/0047719号、米国特許公開第2009/0075351号をも参照)。特に、クロストリジウム・アセトブチリクム遺伝子buk1及びptbを機能的BDO経路の一部として利用することができる。

【0347】

最初の実験は、大腸菌における原生クロストリジウム・アセトブチリクムPTB(020)及びBK(021)遺伝子のクローン化及び発現を含んでいた。必要であれば、各遺伝子の開始コドン及び停止コドンを、大腸菌におけるより最適な発現のためにそれぞれ「ATG」及び「TAA」に改変した。C.アセトブチリクム遺伝子配列(020N及び021N)並びにそれらの対応する翻訳ペプチド配列を図21及び図22に示す。

【0348】

PTB及びBK遺伝子は、C.アセトブチリクムにオペロンとして存在し、PTB(020)遺伝子が最初に発現される。それらの2つの遺伝子は、下流BK(021)遺伝子の再開リボソーム結合部位を含む配列"atta aagttaagt gaggaatgtt aac"(配列番号)によって連結される。この文脈における2つの遺伝子を実験室における発現のために発現ベクターにおけるlac調節プロモーターに融合した(Lutz及びBujard、Nucleic Acids Res. 25:1203-1210 (1997))。

【0349】

これらのベクター構築物からの2つのタンパク質の発現は、大腸菌にのみ希に存在するC.アセトブチリクム遺伝子におけるコドンの高い発生率により、外因的に発現された他の遺伝子と比較して低いことが判明した。したがって、大腸菌遺伝子配列により高度に発現される代替物には、希コドンを変化させる新たな020及び021遺伝子が予測された。このコドン最適化方法は、既に記載されているアルゴリズムに従うものであった(Sivaramanら、Nucleic Acids Res. 36:e16(2008))。この方法は、特定のコドンが両側で隣接する場合のそれらの存在頻度の文脈におけるコドン置換を予測する。隣接するコドンの文脈におけるそれらの発生率に基づいて、より優勢なコドンで置き換えられる希コドンの数が増加する(A<B<C<D)ようにして020(図23)及び021(図24)の代替的遺伝子配列を決定した。原生020及び021ペプチド配列と比較した実際のペプチド配列の変化は、これらの予測配列に導入されなかった。

【0350】

コドン最適化に起因するBK及びPTBタンパク質の発現の向上を図25Aに示す。原生遺伝子

配列の発現をレーン2に示し、020B-021B及び020C-021Cの発現をそれぞれレーン3及び4に示す。コドン最適化オペロン020B-021B(2021B)及び020C-021C(2021C)におけるより高レベルのタンパク質発現は、また、同等に発現された大腸菌粗抽出物における原生オペロン(2021n)と比較して活性の向上をもたらした(図25B)。

【0351】

コドン最適化オペロンを、C. アセトブチリクムアルデヒドデヒドロゲナーゼとともに、菌株ECKh-432($\Delta adhE$ $\Delta ldhA$ $\Delta pflB$ $\Delta lpdA::K.p.lpdA322$ Δmdh $\Delta arcA$ $gltAR163L$ $fimD::$ 大腸菌sucCD、P. ギンギバリスsucD、P. ギンギバリス4hbd $fimD::$ ウシ結核菌sucA、C. クルイベリ4hbd)におけるプラスミドに発現させて完全なBDO経路を提供した。上記のようにミクロ好気性条件を維持するために23Gのニードルを使用して、20g/Lのグルコースを含むM9最小培地で細胞を培養した。結果として生じたグルコースの最終生成物BDOへの変換を測定した。PTB-BK酵素対の直接的生成物である、4Hb-CoAから誘導される自発的再配列分子であるガンマ-ブチリラクトン(GBL)の蓄積も測定した。図26は、原生2021nオペロンの発現が、4HB及び遊離CoAを4HB-CoAに変換することが可能な代替的酵素機能Cat2(034)に匹敵するBDOレベルをもたらしたことを示している。034のGBLレベルは、2021nより有意に高かった。それは、前者の酵素が、原生遺伝子から発現されたPTB-BKより高い活性を有することを示唆している。しかし、BDO及びGBLのレベルは、コドン最適化変異体2021B及び2021Cが発現された場合は、034又は2021nより高かった。それは、PTB及びBKに対する遺伝子のコドン最適化が大腸菌におけるBDO合成に対するそれらの貢献を有意に高めることを示している。

【0352】

これらの結果は、ブチレートキナーゼ(BK)及びホスホトランスブチリラーゼ(PTB)酵素を採用して、4-ヒドロキシブチレートを4-ヒドロキシブチリル-CoAに変換することができることを実証している。これにより、生成された4-ヒドロキシブチリル-CoA1モル当たり1モルのアセテートを生成することになる4-ヒドロキシブチリル-CoA/アセチル-CoAトランスフェラーゼなどのトランスフェラーゼ酵素が必要でなくなる。クロストリジウム・アセトブチリクムからの酵素は、BDO生成のための多くの操作菌株に存在する。

【0353】

4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ。クロストリジウム・ベイジェリンキーald遺伝子を機能的BDO経路の一部として利用することができる(国際公開第2008/115840号、国際公開第2009/023493号、米国特許公開第2009/0047719号、米国特許公開第2009/0075351号をも参照)。クロストリジウム・ベイジェリンキーaldを利用して、BDO生成菌株におけるエタノール生成を減少させることもできる。また、具体的なコドン最適化ald変異体(GNM0025B)は、BDO生成を向上させることが判明した。

【0354】

原生C. ベイジェリンキーald遺伝子(025n)及び酵素の予測タンパク質配列を図27に示す。クロストリジウム・アセトブチリクムPTB及びBK遺伝子に見られるように、原生C. ベイジェリンキーald遺伝子の発現は、大腸菌において非常に低かった。したがって、この遺伝子に対する4つのコドン最適化変異体を予測した。図28A~28Dは、隣接するコドンの文脈におけるそれらの発生率に基づいて、より優勢なコドンで置き換えられる希コドンの数が増加する($A < B < C < D$)、025に対する代替的な遺伝子配列を示す(25A、 $P=0.05$; 25B、 $P=0.1$; 25C、 $P=0.15$; 25D、 $P=1$)。原生025ペプチド配列と比較した実際のペプチド配列の変化は、これらの予測配列に導入されなかった。コドン最適化は、C. ベイジェリンキーaldの発現を有意に増大させて(図29参照)、BDO経路全体を発現する細胞におけるグルコースのBDOへの有意により高度な変換をもたらした(図30A)。

【0355】

原生及びコドン最適化遺伝子をP. ギンギバリスCat2とともに、宿主菌株ECKh-432($\Delta adhE$ $\Delta ldhA$ $\Delta pflB$ $\Delta lpdA::K.p.lpdA322$ Δmdh $\Delta arcA$ $gltAR163L$ $\Delta ackA$ $fimD::$ 大腸菌sucCD、P. ギンギバリスsucD、P. ギンギバリス4hbd $fimD::$ ウシ結核菌sucA、C. クルイベリ4hbd)においてプラスミドに発現させることで、完全なBDO経路を含めた。上記のよう

に20g/Lグルコースを含むM9最小培地に細胞をマイクロ好氣的に培養した。(コドン最適化変異体遺伝子025Bから発現された)C. ベイジェリンキーAld酵素によるBDO及びエタノールの相対的生成をC. アセトブチリウムAdhE2酵素と比較した(図30B参照)。C. アセトブチリウムAdhE2酵素(002C)は、BDOよりエタノールをほぼ4倍多く生成した。比較すると、C. ベイジェリンキーAld(025B)は(内因性ADH活性に関連して)、等しい量のBDOを生成したが、002Cと比較してこの酵素ではBDOとエタノールの生成比が逆転していた。これは、C. ベイジェリンキーAldが、C. アセトブチリウムAdhE2よりアセチルCoAに対して4HB-CoAに特異的であるため、BDO経路に含めるのに前者が好適な酵素であることを示唆している。

【0356】

クロストリジウム・ベイジェリンキーald遺伝子(Tothら、Appl. Environ. Microbiol. 65:4973-4980(1999))を、4-ヒドロキシブチリル-CoAの4-ヒドロキシブタナールへの変換を触媒するための候補として試験した。4-ヒドロキシブチリル-CoAの4-ヒドロキシブチルアルデヒドへの変換を触媒するそれらの能力について50種を超えるアルデヒドデヒドロゲナーゼをスクリーニングした。この酵素がアセチル-CoAでなく4-ヒドロキシブチリル-CoAを基質として嗜好するため、BDO生成菌株へ組み込むのにC. ベイジェリンキーald遺伝子を選択した。これは、アルデヒドデヒドロゲナーゼ機能を有するたいていの他の酵素(例えば、C. アセトブチリウムからのadhE2(Fontaineら、J. Bacteriol. 184:821-830(2002))が選択的にアセチル-CoAをアセトアルデヒドに変換し、それが次にエタノールに変換されるため重要である。C. ベイジェリンキー遺伝子を利用すると、BDO生成生物体において副産物として生成されるエタノールの量が減少する。また、この遺伝子のコドン最適化型は、大腸菌において極めて十分に発現する(Sivaramanら、Nucleic Acids Res. 36:e16 (2008))。 10 20

【0357】

4-ヒドロキシブタナールレダクターゼ。ゲオバシルス・サーモグルコシダシウス(Geobacillus thermoglucosidasius)(M10EXG)からのadh1の4-ヒドロキシブタナールレダクターゼ活性を利用した。これは、4-ヒドロキシブタナールレダクターゼ活性を内因性レベルより高めることによってBDO生成の向上をもたらした。

【0358】

4-ヒドロキシブタナールのBDOへの還元を触媒するそれらの能力について複数のアルコールデヒドロゲナーゼをスクリーニングした。ブチルアルデヒドに対して高い活性を有するたいていのアルコールデヒドロゲナーゼが、4-ヒドロキシブチルアルデヒドに対してはるかに低い活性を示した。1つの注目すべき例外は、4-ヒドロキシブタナール及びブタナールの両方に対して高い活性を示すゲオバシルス・サーモグルコシダシウスからのadh1遺伝子M10EXG(Jeonら、J. Biotechnol. 135:127-133(2008))(GNM0084)である。 30

【0359】

ゲオバシルス・サーモグルコシダシウスからのadh1遺伝子の原生遺伝子配列及びコードされたタンパク質配列を図31に示す。G. サーモグルコシダシウスadh1遺伝子を大腸菌に発現させた。

【0360】

Adh1酵素(084)は、大腸菌におけるその原生遺伝子から極めて十分に発現した(図32A参照)。ADH酵素アッセイにおいて、大腸菌発現酵素は、ブチルアルデヒド又は4HB-アルデヒドを基質として使用した場合に非常に高度な還元活性を示した(図32B参照)。これらの基質について測定したKm値は、それぞれ1.2mM及び4.0mMであった。これらの活性値は、Adh1酵素が、試験されたすべての候補の4HB-アルデヒドの還元に対する活性が最も高いことを示していた。 40

【0361】

C. ベイジェリンキーaldと結合させたときにBDO生成を向上させるその能力について084酵素を試験した。084遺伝子をC. ベイジェリンキーald変異体025B遺伝子の後に挿入して、両遺伝子の結合発現をもたらす合成オペロンを生成した。同様の構築物が025Bを他のADH候補遺伝子と関連づけ、BDO生成に対して各ADHを025Bとともに含める効果を試験した。使 50

用した宿主菌株は、BDO経路の残りを染色体上に含むECKh-459($\Delta adhE$ $\Delta ldhA$ $\Delta pflB$ $\Delta lpdA::fnr-pflB6-K.p.lpdA322$ Δmdh $\Delta arcA$ $gltAR163L$ $fimD::$ 大腸菌 $sucCD$ 、*P. ギンギ* $sucD$ 、*P. ギンギ* $4hbd$ $fimD::$ ウシ結核菌 $sucA$ 、*C. クルイベリ* $4hbd$ $fimD::$ *C. アセトブチリクム* $buk1$ 、*C. アセトブチリクム* ptb)であった。025Bとともに発現された084ADHは、025Bのみ(図33の左矢印)と比較すると、内因性ADH機能と関連して最も高量のBDO(図33の右矢印)を示した。それは、また、026A-C、クロストリジウム・アセトブチリクムブタノールデヒドロゲナーゼのコード最適化変異体;050、*ザイモナス・モビリス* (*Zymomonas mobilis*) アルコールデヒドロゲナーゼI;052、*シトロバクター・フロインディイ* (*Citrobacter freundii*) 1,3-プロパンジオールデヒドロゲナーゼ;053、*ラクトバチラス・ブレビス* (*Lactobacillus brevis*) 1,3-プロパンジオールデヒドロゲナーゼ;057、*バクテロイデス・フラギリス* (*Bacteroides fragilis*) ラクトアルデヒドレダクターゼ;058、大腸菌 1,3-プロパンジオールデヒドロゲナーゼ;071、*枯草菌* (*Bacillus subtilis*) 168 アルファ-ケトグルタレートセミアルデヒドデヒドロゲナーゼなどで示される025Bと組み合わせられると他のADH酵素より多くのBDOを生成した。「PT5lacO」で標示される構築物は、遺伝子がPT5lacOプロモーターによって誘導される構築物である。すべての他の場合において、PA1lacO-1プロモーターを使用した。これは、084ADHをBDO経路に含めるとBDO生成が増大したことを示している。

【0362】

(実施例XIV)

(ピルベートデヒドロゲナーゼを発現するBDO生成菌株)

本実施例では、BDO生成を向上させるためのピルベートデヒドロゲナーゼ(PDH)の利用について記載する。*クレブシエラ肺炎桿菌* (*Klebsiella pneumoniae*) $lpdA$ の異種発現を使用してBDO生成を向上させた。

【0363】

計算上では、1,4-ブタンジオールの最大理論収率を達成するためにピルベートのアセチルCoAへのNADH生成変換が必要である(国際公開第2008/115840号、国際公開第2009/023493号、米国特許公開第2009/0047719号、米国特許公開第2009/0075351号;国際公開2008/018930号; Kimら、*Appl. Environ. Microbiol.* 73:1766-1771(2007); Kimら、*J. Bacteriol.* 190:3851-3858(2008); Menzelら、*J. Biotechnol.* 56:135-142(1997)をも参照)。PDH活性の欠如は、BDOの最大嫌気性理論収率を、ホスホエノールピルベートカルボキシキナーゼ(PEPCK)活性を達成できない場合に11%低下させ、PEPCK活性を達成できる場合に3%低下させることが示された。しかし、より重要なことは、ADHEr、ASPT、LDH_D、MDH及びPFLiのノックアウトを有する、国際公開2009/023493号及び米国特許公開第2009/0047719号に記載されているOptKnock菌株#439にPDH活性が存在しないと、BDOの最大嫌気性収率が、PEPCK活性が存在しない場合又は存在する場合にそれぞれ54%又は43%低下する。外部電子受容体の存在下で、PDH活性の欠如は、ノックアウト菌株の最大収率を、PEPCK活性が存在しない場合又は存在する場合にそれぞれ10%又は3%低下させる。

【0364】

PDHは、中枢代謝の最も複雑な酵素の1つであり、ジヒドロリポイルトランスアセチラーゼ(E2)コアの外部に結合するピルベートデカルボキシラーゼ(E1)の24個のコピー及びジヒドロリポイルデヒドロゲナーゼ(E3)の12個の分子で構成される。PDHは、高いNADH/NAD、ATP/ADP及びアセチル-CoA/CoA比によって阻害される。酵素は、たいていは $lpdA$ によってコードされるE3のNADH感受性により、必然的に、大腸菌などの生物体における酸素が制限された条件又は嫌気性条件下で非常に低い活性を示す。このため、*クレブシエラ肺炎桿菌*からの $lpdA$ 遺伝子のNADH非感応型をクローン化し、発現させて、NADH/NAD比が大きくなると推定される条件下でPDHの活性を高めた。

【0365】

原生 $lpdA$ の置換。*クレブシエラ肺炎桿菌*のピルベートデヒドロゲナーゼオペロンは、ヌクレオチドレベルで大腸菌の相当オペロンと78から95%の間の同一性がある。*K.肺炎桿菌*は、グリセロールの存在下で嫌氣的に成長する能力を有することが示された(Menzelら、*J. Bi*

otechnol. 56:135-142(1997);Menzelら、Biotechnol. Bioeng. 60:617-626(1998))。大腸菌のオペロンのlpdA遺伝子における2つの突然変異は、嫌氣的に成長するその能力を向上させることも示された(Kimら、Appl. Environ. Microbiol. 73:1766-1771(2007);Kimら、J. Bacteriol. 190:3851-3858(2008))。鋳型としてのゲノムDNA(ATCC700721D)並びにプライマー

【化3】

KP-lpdA-Bam (5'-acacgcggatccaacgtcccg-3')(配列番号)及び KP-lpdA-Nhe (5'-agcggctccgctagccgcttatg-3')(配列番号)

10

を使用して、K.肺桿菌のlpdA遺伝子をPCRによって増幅させた。得られた断片をベクターpCR-BluntII-TOPO(Invitrogen;カリフォルニア州Carlsbad)にクローン化して、プラスミドpCR-KP-lpdAを得た。

【0366】

対抗選択の手段として非複製プラスミド及びバシルス・スプチリスからのsacB遺伝子を使用して染色体遺伝子置換を行った(Gayら、J. Bacteriol. 153:1424-1431(1983))。使用したベクターは、サイズが3.6kbであり、カナマイシン抵抗遺伝子を保持する、oriT及びIS配列が欠失したpRE118(ATCC87693)である。配列を確認し、ベクターをpRE118-V2と命名した(図34参照)。

20

【0367】

LpdA遺伝子に隣接する大腸菌断片を、プライマーの組合せ:

【化4】

EC-aceF-Pst (5'-aagccgttgctgcagctcttgagc-3')(配列番号)+ EC-aceF-Bam2 (5'-atctccggcggtcgatccgctcg-3')(配列番号)及び EC-yacH-Nhe (5'-aaagcggctagccacgccgc-3')(配列番号)+ EC-yacH-Kpn (5'-attacacgaggtacccaacg-3')(配列番号)

を使用して、PCRによって増幅させた。K.肺桿菌のlpdA遺伝子を含むBamHI-XbaI断片をプラスミドpCR-KP-lpdAから単離し、次いでそれぞれPstI+BamHI及びNheI-KpnIで消化される上記大腸菌断片、並びにKpnI及びPstIで消化されるpRE118-V2プラスミドに結合させた。(pRE118-M2.1 lpdA yacと呼ばれる)得られたプラスミドを、His322残基のTry残基への突然変異のためのプライマー

30

【化5】

KP-lpdA-HisTyr-F (5'-atgctggcgtacaaaggtgtcc-3')(配列番号)及び (5'-ggacaccttgtacgccagcat-3')(配列番号)

の組合せ又は残基Glu354のLys残基への突然変異のためのプライマー

【化6】

KP-lpdA-GluLys-F (5'-atgcctacactaaaccagaagtgg-3')(配列番号)及び KP-lpdA-GluLys-R (5'-ccacttctggttagttaggcgat-3')(配列番号)

40

の組合せを使用して部位志向突然変異(SDM)させた。ポリメラーゼPfu Turbo(Stratagene;カリフォルニア州San Diego)を用いてPCRを実施した。断片全体の配列並びに所望の突然変異のみの存在を検証した。得られたプラスミドを形質転換によって大腸菌のエレクトロコンピテント細胞△adhE::Frt-△ldhA::Frtに導入した。染色体における第1の組込み事象を、カナマイシン(25又は50mg/L)を含むLB寒天プレート上で選択した。1つが挿入の領域の外側に位置し、1つがカナマイシン遺伝子

【化 7】

(5'- aggcagttccatagatggc-3')(配列番号)

内に位置する2つのプライマーを使用して、PCRによって適正な挿入を検証した。適正な挿入によるクローンを分解に向けて選択した。それらを純粋な液体LB中で所望の温度にて2回二次培養し、順次的な希釈物をLB-無塩-スクロース10%プレート上に仕込んだ。スクロース含有プレート上で成長したクローンをLB-低塩寒天培地上でのカナマイシン抵抗遺伝子の欠失についてスクリーニングし、lpdA遺伝子置換をPCR及び包含領域の配列決定によって検証した。挿入領域の配列を検証した。それを以下に記載する。突然変異Glu354Lysを有する(4-4-P1と命名された)1つのクローンを選択した。次いで、このクローンに大腸菌△PflB::FrtのP1溶解物を形質導入して、菌株ECKh-138(△adhE △ldhA △pflB △lpdA::K.p.lpdA322)を得た。 10

【0368】

aceF及びlpdA遺伝子を包含するECKh-138領域の配列を図35に示す。K.肺桿菌lpdA遺伝子に下線が引かれ、Glu354Lys突然変異が変化したコドンが網掛けされている。原生大腸菌lpdAと突然変異クレブシエラ肺桿菌lpdAのタンパク質配列比較を図36に示す。

【0369】

BDO生成菌株にK.肺桿菌lpdAを使用する有益性を評価するために、強い誘発性プロモーターからBDO経路全体を発現するプラスミドで宿主菌株AB3及びECKh-138を形質転換した。具体的には、大腸菌sucCD、P.ギンギバリスsucD、P.ギンギバリス4hbdを中コピープラスミドpZA33に発現させ、P.ギンギバリスCat2及びC.アセトブチリクムAdhE2を高コピープラスミドpZE13に発現させた。これらのプラスミドは、文献(Lutz及びH. Bujard, Nucleic Acids Res 25:1203-1210(1997))に記載されており、BDO経路発現のためのそれらの使用は、実施例XIII及び国際公開第2008/115840に記載されている。 20

【0370】

20g/Lのグルコース、緩衝能力を向上させるための100mMの3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸(MOPS)、10 µg/mLのチアミン及び適切な抗生物質が補給されたM9最小培地(6.78g/LのNa₂HPO₄、3.0g/LのKH₂PO₄、0.5g/LのNaCl、1.0g/LのNH₄Cl、1mMのMgSO₄、0.1mMのCaCl₂)にて37℃で細胞を嫌氣的に成長させた。最初に密閉嫌気性ボトルに5分間にわたって窒素を流し、次いで接種後に23Gニードルで隔壁に穴をあけることによってミクロ好気性条件を確立した。成長時にニードルをボトル内に維持して、少量の空気をボトルに導入させた。経路遺伝子を誘発するためにOD600が約0.2に達すると0.25mMのIPTGを添加し、誘発後24時間毎に分析に向けてサンプルを採取した。培養上澄みを、実施例II及び国際公開2008/115840号に記載されているようにBDO、4HB及び他の副産物について分析した。ECKh-138におけるBDO及び4HB生成は、48時間後に、AB3、又は先の試験で使用した他の宿主MG1655 △ldhAにおける生成より有意に高かった(図37)。 30

【0371】

PDHプロモーター置換。Fnr結合部位、pflBプロモーターの1つ及びそのリボソーム結合部位(RBS)を含む転写融合体でpdhR受容体を置き換えることで、嫌気性プロモーターによりaceEF-lpdオペロンを発現させると、嫌氣的にpdh活性が高められることが以前に示されている(Zhouら、Biotechnol. Lett. 30:335-342 (2008))。Fnr結合部位、pflB-p6プロモーター及びRBS結合部位を含む融合体を、PCRを重複するによって構成した。一方がプライマー 40

【化 8】

aceE-上流-RC (5'- tgacatgtaacacctaccttctgtgcctgtgccagtgttgctgtgatatagaag-3')(配列番号)

及び pflBp6-Up-Nde (5'- ataataatacatatgaacatgcgagttacgggcctataagccaggcg-3')(配列番号)

を使用し、他方がプライマー

【化 9】

aceE-EcoRV-EC (5'- agtttttcgatatctgcatcagacaccggcacattgaaacgg-3')

(配列番号)及び aceE-上流(5'- ctggcacaggcacagaaggttaggtgttacatgtcagaacgtttacacaatgacgtggatc-3')(配列番号)

を使用する2つの断片を増幅した。PCRを重複することによってそれら2つの断片を集積し、最終的なDNA断片を制限酵素NdeI及びBamHIで消化させた。続いて、上記のようにpRE118-V2を使用して、この断片を大腸菌オペロンのaceE遺伝子の上流に導入した。置換を菌株ECKh-138及びECKh-422において実施した。aceE遺伝子の5'領域を包含するヌクレオチド配列を検証した。それを図37に示す。図37は、pflB-p6プロモーター及びリボソーム結合部位(ribosome binding site)(RBS)に融合されたaceE遺伝子の5'末端のヌクレオチド配列を示す。イタリック体の5'配列は、pdhオペロンから反対方向に転写されるaroP遺伝子の出発点を示す。イタリック体の3'配列は、aceE遺伝子のお出発点を示す。大文字:pflB。下線:FNR結合部位。太字:pflB-p6プロモーター配列。

【0372】

lpdAプロモーター置換。fnr結合部位、pflB-p6プロモーター及びpflB遺伝子のRBSを含むプロモーター領域を、染色体DNA鋳型並びにプライマー

【化10】

aceF-pflBp6-fwd (5'- agacaaatcggttgccgtttgtaagccaggcgagatatgatctatc-3')(配列番号)

及び lpdA-RBS-B-rev (5'-gagttttgatttcagtactcatcatgtaaacctaccttcttctgtgtgatag-3')(配列番号)

を使用してPCRによって増幅させた。プラスミド2-4aを、プライマー

【化11】

B-RBS-lpdA fwd (5'-

ctatatcacagcaagaaggttaggtgttacatgatgactgaaatcaaaactc-3')(配列番号)及び pflBp6-aceF-rev

(5'- gatatagatcatatctcgcttggttaacaaacggcaaccgatttctct-3')(配列番号)

を使用してPCRによって増幅させた。得られた2つの断片を、BPSクローニングキット(BPS Bioscience;カリフォルニア州San Diego)を使用して集積した。得られた構築物を配列決定し、検証し、上記のpRE118-V2法を使用して菌株ECKh-439に導入した。得られた菌株ECKh-456にaceF-lpdA領域を包含するヌクレオチド配列を図39に示す。

【0373】

その構造が以下に示される宿主菌株ECKh-439($\Delta adhE$ $\Delta ldhA$ $\Delta pflB$ $\Delta lpdA::K.p.lpdA322$ Δmdh $\Delta arcA$ $gltAR163L$ $ackA$ $fimD::$ 大腸菌sucCD、P.ギンギバリスsucD、P.ギンギバリス4hbd $fimD::$ ウシ結核菌sucA、C.クルイベリ4hbd)並びにpdhR及びlpdAプロモーター置換誘導体ECKh-455及びECKh-456をBDO生成について試験した。P.ギンギバリスCat2及びC.ベイジェリンキーAldを含むpZS*13で菌株を形質転換して完全BDO経路を得た。細胞を、上記のように20g/Lグルコースが補給されたM9最小培地で培養した。0.2mMのIPTGによる誘発の48時間後のBDO、4HB及びピルベートの濃度を図40に示した。プロモーター置換菌株は、同質遺伝子型の親よりわずかに多くのBDOを生成する。

【0374】

これらの結果は、ピルベートデヒドロゲナーゼの発現がBDO生成菌株におけるBDOの生成を増大させることを実証した。

【0375】

(実施例XV)

(シトレートシンターゼ及びアコニターゼを発現するBDO生成菌株)

10

20

30

40

50

本実施例では、シトレートシンターゼ及びアコニターゼの活性を向上させてBDOの生成を増大させることについて記載する。gltAへのR163L突然変異は、BDO生成を向上させることが判明した。また、arcAノックアウトを使用してBDO生成を向上させた。

【0376】

計算上では、1,4-ブタンジオールの最大理論収率を達成するためにシトレートシンターゼ(CS)及びアコニターゼ(ACONT)を介する流動が必要であることが確認された(国際公開第2008/115840号、国際公開第2009/023493号、米国特許公開第2009/0047719号、米国特許公開第2009/0075351号をも参照)。CS又はACONT活性の欠如は、嫌気性条件下で最大理論収率を14%低下させる。外部電子受容体の存在下で、最大収率は、PEPCK活性が存在しない場合又は存在する場合に、CS又はACONTを介する流動がなければそれぞれ9%又は6%低下する。ピルベートデヒドロゲナーゼ(PDH)については、ADHEr、ASPT、LDH_D、MDH及びPFLiがノックアウトされるノックアウト菌株バックグラウンドにおいてCS及びACONTの重要性が著しく増幅される(設計#439)(引用により本明細書中に組み込まれている国際公開第2009/023493号及び米国特許公開第2009/0047719号参照)。

【0377】

国際公開第2009/023493号及び米国特許公開第2009/0047719号に記載されている最小Opt Knock菌株設計は、マレートデヒドロゲナーゼをコードするmdh遺伝子ECKh-138以外に1つのさらなる欠失を有していた。この遺伝子の欠失は、還元性TCA回路を介するスクシネートへの流動を防止することを意図する。λ赤色相同性組換え法を使用してmdh欠失を実施した(Datsenko及びWanner、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:6640-6645(2000))。以下のオリゴヌクレオチドを使用して、pKD3から、FRT部位が隣接するクロラムフェニコール抵抗遺伝子(chloramphenicol resistance gene)(CAT)をPCR増幅した。

【化12】

S-mdh-Kan 5' - **TAT TGT GCA TAC AGA TGA ATT TTT ATG CAA ACA GTC AGC**
CCT GAA GAA GGG TGT AGG CTG GAG CTG CTT C - 3' (配列番号)

AS-mdh-Kan 5' - **CAA AAA ACC GGA GTC TGT GCT CCG GTT TTT TAT TAT CCG**
CTA ATC AAT TAC ATA TGA ATA TCC TCC TTA G - 3' (配列番号)

【0378】

下線が引かれた領域は、pKD3プラスミドに対する相同性を示し、太字の配列は、mdh ORFの配列の上流及び下流の配列相同性を指す。精製後、PCR生成物を、pRedET(tet)で形質転換され、製造者の説明書(www.genebridges.com/gb/pdf/K001%20Q%20E%20BAC%20Modification%20Kit-version2.6-2007-screen.pdf)に従って調製されたECKh-138エレクトロコンピテント細胞に電気穿孔した。PCR生成物を、それが図41に示されるようにmdh遺伝子の領域上流でECKh-138ゲノムに組み込むように設計した。

【0379】

組換え体をクロラムフェニコール抵抗性について選択し、ストリークを精製した。mdh遺伝子の欠失及びCATの挿入を診断PCRによって検証した。CAT遺伝子を除去するために、FLPリコンビナーゼを含む感温性プラスミドpCP20(Datsenko及びWanner、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:6640-6645 (2000))を30℃で細胞に形質転換し、アンピシリン抵抗性(AMP)について選択した。形質転換体を非選択的に42℃で終夜成長させて、FLP合成を熱的に誘発し、プラスミドの欠失を引き起こした。次いで、培養物ストリークを精製し、個々のコロニーをすべての抗生物質抵抗性の欠失について試験した。大多数が、FRT隣接抵抗遺伝子及びFLPヘルパープラスミドを同時に欠如していた。「FRT」傷残留物も存在した。得られた菌株をECKh-172と命名した。

【0380】

CS及びACONTは、嫌気性条件下で高度な活性を有さないか、又は高度に発現されない。このため、TCA回路の全体的な調節因子に対してコードするarcA遺伝子を欠失させた。arc

Aは、ミクロ好気性条件を通じて作用して、低酸素量に対して敏感である中枢代謝酵素aceE、pflB及びadhEの活性を可能にする遺伝子生成物の発現を誘発する。ミクロ好氣的に、arcA/arcBの欠失は、ldh、icd、gltA、mdh及びgdh遺伝子の特定の活性を高めることが示された(Salmonら、J. Biol. Chem. 280:15084-15096(2005);Shalel-Levanonら、Biotechnol. Bioeng. 92(2):147-159(2005))。大腸菌MG1655のarcA遺伝子上流及び下流領域を、それぞれプライマー

【化13】

ArcA-up-EcoRI (5'-ataataatagaattcgtttgctacctaattgccaaactaaatcgaaacagg-3')(配列番号)を

ArcA-up-KpnI (5'-tattattatggtaccaatatcatgcagcaaacgggtgcaacattgccg-3')(配列番号)とともに使用し、

10

ArcA-down-EcoRI (5'-tgatctggaagaattcatcggtttaccaccgtcaaaaaaacggcg-3')(配列番号)を

ArcA-down-PstI (5'-ataaaaccctgcagcggaacgaagttttatccattttgttacctg-3')(配列番号)

とともに使用してPCRによって増幅させた。続いて、これらの断片を制限酵素EcoRI及びKpnI(上流断片)並びにEcoRI及びPstI(下流)で消化させた。次いで、それらをPstI及びKpnIで消化されたpRE118-V2プラスミドに結合させて、プラスミドpRE118-△arcAを得た。プラスミドpRE118-△arcAの配列を検証した。pRE118-△arcAを大腸菌株ECKh-172のエレクトロコンピテント細胞(△adhE △ldhA △pflB △lpdA::K.p.lpdA322 △mdh)に導入した。上記のようにLB-無塩-スクロースプレート上で組込み及び分解後、得られた菌株ECKh-401の染色体におけるarcA遺伝子の欠失を配列決定によって検証した。それを図42に示す。

20

【0381】

大腸菌のgltA遺伝子は、シトレートシンターゼに対してコードする。この遺伝子は、NADHによってアロステリック阻害されることが既に示されており、この阻害に参与するアミノ酸が特定された(Pereiraら、J. Biol. Chem. 269(1):412-417 (1994);Stokellら、J. Biol. Chem. 278(37):35435-35443 (2003))。大腸菌MG1655のgltA遺伝子を、プライマー

【化14】

(5'-ggaagagaggctggtaccagaagccacagcagga-3')(配列番号)gltA-PstI (5'-

gtaatcactgcgtaagcggccatgccccggcggttaattc-3')(配列番号)

を使用してPCRによって増幅させた。増幅した断片をKpnI及びPstIで消化した後にpRE118-V2にクローン化した。得られたプラスミドをpRE118-gltAと命名した。次いで、このプラスミドを、プライマー

30

【化15】

R163L-f (5'-attgccgcgttcctcctgctgtcga-3')(配列番号)及びR163L-r (5'-cgacagcaggaggaacgcggcaat-3')(配列番号)

を使用して部位志向突然変異させて、残基Arg163をLys残基に変化させた。断片全体の配列を配列決定によって検証した。λ赤色相同性組換え法の変型(Datsenko及びWanner、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:6640-6645(2000))を使用して、Frt傷を残さずに原生gltA遺伝子をR163L突然変異対立遺伝子で置き換えた。全般的な組換え手順は、上記mdh欠失を作製するのに使用したものと同一である。第1に、λ赤色相同性組換え法を使用してrpsL無発現変異を導入することによって、菌株ECKh-172をストレプトマイシン抵抗性にした。次に、組換えを実施して、この菌株における野生型gltAコード化領域全体を、カナマイシン抵抗遺伝子(kanR)及び大腸菌rpsL遺伝子の野生型コピーで構成されるカセットで置き換えた。rpsL無発現変異を保持する大腸菌株に導入されると、カセットは、細胞をストレプトマイシンに対して抵抗性からストレプトマイシン感受性に変化させる。次いで、適切な相同性末端とともに、gltA遺伝子の突然変異型を含むDNA断片を導入し、得られたコロニー成長をストレプトマイシンの存在下で試験した。これを、kanR/rpsLカセットが突然変異g

40

50

ltA遺伝子で置き換えられた菌株について選択した。突然変異遺伝子の適正な座への挿入をPCR及びDNA配列決定分析によって確認した。得られた菌株は、ECKh-422と命名され、遺伝子型 $\Delta adhE$ $\Delta ldhA$ $\Delta pf1B$ $\Delta lpdA::K.p.lpdA322$ Δmdh $\Delta arcA$ $gl tAR163L$ を有する。菌株ECKh-422の突然変異 $gl tA$ 遺伝子を包含する領域を、図43に示すように配列決定によって検証した。

【0382】

次いで、菌株ECKh-401及び $gl tAR163L$ 、突然変異体ECKh-422の粗製抽出物をシトレートシンターゼ活性について評価した。細胞を4500rpmの遠心(Beckman-Coulter、Allegera X-15R;カリフォルニア州Fullerton)によって10分間にわたって抽出した。ベンゾナーゼ及びライソザイムを含む0.3mLのBugBuster(Novagen/EMD;カリフォルニア州San Diego)試薬にペレットを再懸濁させ、静かに振盪しながら溶解を室温で15分間進行させた。無細胞溶解物を4℃で30分間にわたる14000rpmの遠心(Eppendorf遠心器5402;ドイツHamburg)によって得た。サンプル中の細胞タンパク質を、Bradfordの方法(Bradford, Anal. Biochem. 72:248-254(1976))を使用して測定した。

【0383】

アセチル-CoAとオキサロアセテートとの反応から放出される遊離補酵素A(HS-CoA)の形成を追跡することによってシトレートシンターゼ活性を測定した。HS-CoAの遊離チオール基は、5,5'-ジチオビス-(2-ニトロ安息香酸)(DTNB)と反応して、5-チオ-2-ニトロ安息香酸(TNB)を形成する。次いで、410nm(412nmで最大)の吸光度を測定することによってTNBの濃度を分光光度的に監視する。アッセイ混合物は、100mMのトリス/HCl緩衝液(pH7.5)、20mMのアセチル-CoA、10mMのDTNB及び20mMのオキサロアセテートを含んでいた。NADH阻害の評価のために、0.4mMのNADHをも反応物に添加した。5マイクロリットルの細胞抽出物を添加することによってアッセイを開始し、経時的な吸光度変化を追跡することによって反応率を測定した。具体的な活性の単位は、タンパク質1mg当たり1分間毎に変換される生成物の μmol で定義される。

【0384】

図44は、野生型 $gl tA$ 遺伝子生成物及びR163L突然変異体のシトレートシンターゼ活性を示す。アッセイを0.4mMのNADHの不在下又は存在下で実施した。

【0385】

菌株ECKh-401及びECKh-422を、BDO経路全体を発現するプラスミドで形質転換した。大腸菌 $sucCD$ 、P.ギンギバリス $sucD$ 、P.ギンギバリス $4hbd$ 及びウシ結核菌 $sucA$ を低コピープラスミドpZS*13に発現させ、P.ギンギバリスCat2及びC.アセトブチリクムAdhE2を中コピープラスミドpZE23に発現させた。これらの菌株の培養物を、上記のように20g/Lグルコース及び適切な抗生物質が補給されたM9最小培地にてミクロ好氣的に成長させた。複製培養物から平均した誘発の48時間後の4HB及びBDO濃度を図45に示す。いずれもECKh-422の方がECKh-401より高く、 $gl tA$ 突然変異により向上したシトレートシンターゼ活性が、BDO経路への流動の増大をもたらすことが証明される。

【0386】

このセクションに記載されている宿主菌株改変は、酸化性TCA回路を介して炭素流動を転送することを意図していた。それは、国際公開第2009/023493号及び米国特許公開第2009/0047719号に記載されているOptKnock菌株設計と一致する。流動が実際にこの経路を介して誘導されることを実証するために、(実施例XVIIに記載されているように)上流経路が染色体に組み込まれる型のECKh-422である菌株ECKh-432を使用して ^{13}C 流動分析を実施した。BDO経路を完成するために、P.ギンギバリスCat2及びC.ベイジェリンキーAldをpZS*13から発現させた。4つの並行培養物を、4つの異なる標識比(^{1-13}C 、グルコース分子内の第1の炭素原子のみが ^{13}C で標識されている;均一- ^{13}C 、すべての炭素原子が ^{13}C である)の4g/Lの全グルコースを含むM9最小培地(6.78g/Lの Na_2HPO_4 、3.0g/Lの KH_2PO_4 、0.5g/Lの NaCl 、1.0g/Lの NH_4Cl 、1mMの MgSO_4 、0.1mMの CaCl_2)にて成長させた。

1. 80mol%非標識、20mol%均一- ^{13}C

2. 10mol%非標識、90mol%均一- ^{13}C

3. 90mol% ^{1-13}C 、10mol%均一- ^{13}C
4. 40mol% ^{1-13}C 、60mol%均一- ^{13}C

【0387】

並行非標識培養物を重複して成長させ、そこから高頻度サンプルを採取して、成長率、グルコース取込み率及び生成物形成率を評価した。後対数期において、標識培養物を収穫し、タンパク質を単離し、アミノ酸に加水分解し、既に記載されているようにアミノ酸の標識分布をガスクロマトグラフィー-質量分光分析(gas chromatography-mass spectrometry)(GCMS)によって分析した(Fischer及びSauer、Eur. J. Biochem. 270:880-891(2003))。加えて、標識培養物からの肉汁における分泌4HB及びBDOの標識分布を国際公開第2008115840号に記載されているようにGCMSによって分析した。このデータを集合的に使用して、
10
確立された方法(Suthersら、Metab. Eng. 9:387-405(2007))を使用して細胞内流動分布を計算した。得られた中枢代謝流動及び関連する95%信頼区間を図46に示す。値は、1mmol/時のグルコース取込み率に対して正規化されたモル流量である。その結果は、炭素流動が、シトレート合成を介して酸化方向に誘導されること、及びたいの炭素が、TCA回路を完成させるのではなくBDO経路に入ることを示している。また、この菌株におけるmdh欠損により、マレートとオキサロアセテートとの間に流動が実質的に存在しないことが確認される。

【0388】

BDO生成にOptKnockを使用して設計された菌株(国際公開第2009/023493号及び米国特許公開第2009/0047719号参照)などのノックアウト菌株を使用する利点を、ECKh-422の典型的な発酵プロファイルと、BDOが還元性TCA回路を介してスクシネートから生成される本来の菌株ECKh-138のプロファイルとを比較することによって確認することができる(図47参照)。20g/Lのグルコースが補給されたM9最小培地を使用して、2LバイオスタットB+バイオリアクター(Sartorius; フランスCedex)にて1Lの初期培養容量で発酵を実施した。温度37℃で制御し、2Mの NH_4OH 又は Na_2CO_3 を使用してpH7.0を制御した。細胞を約10のOD600に好氣的に成長させ、その時点で培養物を0.2mMのIPTGで誘発させた。誘導の1時間後に、空気流量をミクロ好気性条件に向けて0.02標準リットル毎分まで減少させた。攪拌速度を700rpmに設定した。濃縮グルコースを供給して、容器内のグルコース濃度を0.5から10g/Lの間に維持した。上記実施例と同様に、BDO経路全体を保持するプラスミドで両菌株を形質転換した。ECKh-138では、アセテート、ピルベート及び4HBが発酵の主流であるのに対して
20
30
ECKh-422ではBDOが主たる生成物である。

【0389】

(実施例XVI)

(BDO菌株発現ホスホエノールピルベートカルボキシキナーゼ)

本実施例では、BDO生成を向上させるためのホスホエノールピルベートカルボキシキナーゼ(PEPCK)の利用について記載する。ヘモフィルス・インフルエンザ(*Haemophilus influenza*)PEPCK遺伝子を異種発現に使用した。

【0390】

計算上では、1,4-ブタンジオールの最大理論収率を達成するためにオキサロアセテートのホスホエノールピルベートへのATP生成変換が必要であることが確認された(国際公開第2008/115840号、国際公開第2009/023493号、米国特許公開第2009/0047719号、米国特許公開第2009/0075351号をも参照)。PEPCK活性の欠如は、BDOの最大理論収率を、嫌気性条件の場合に12%低下させ、硝酸塩又は酸素などの外部電子受容体が存在する場合に3%低下させることが示された。
40

【0391】

大腸菌などの生物体において、PEPCKは、オキサロアセテートからホスホエノールピルベートへのグルコース新生及びATP消費方向に作用する。大腸菌のPEPCKの動力学的制限は、それが、PEPからのオキサロアセテートの形成を効果的に触媒することを防止していると仮定された。ATPを生成しないが、効率的な成長に必要とされるPEPカルボキシラーゼ(PC)は、ホスホエノールピルベートからオキサロアセテートを形成するために大腸菌によ
50

って自然に利用される。したがって、3つの非原生PEPCK酵素(表26)をグルコース最小培地における大腸菌のPPC突然変異菌株の成長を補完するそれらの能力について試験した。

【表 7 4】

表26. ホスホエノールピルベートカルボキシキナーゼ配列の源

PEPCK 源菌株	受入番号、GenBank 参照配列
ヘモフィルス・インフルエンザ	NC_000907.1
アクチノバシルス・スクシノゲネス (<i>Actinobacillus succinogenes</i>)	YP_001343536.1
好二酸化炭素性ルーメン細菌 (<i>Mannheimia succiniciproducens</i>)	YP_089485.1

10

【0392】

成長補完試験は、Keioコレクションから得られた Δppc 突然変異大腸菌 JW3978 における候補遺伝子のプラスミドベースの発現を含んでいた(Babaら、Molecular Systems Biology 2:2006.0008(2006))。遺伝子を発現ベクターpZA23(中コピー)及びpZE13(高コピー)におけるPAI1acO-1プロモーターの後にクローン化した。これらのプラスミドは、既に(Lutz及びBujard、Nucleic Acids Res. 25:1203-1210(1997)に)記載されており、発現BD0経路遺伝子におけるそれらの使用は、既に国際公開第2008115840号に記載されている。

20

【0393】

前培養物を、4g/Lのグルコースを含むM9最小培地にて好氣的に成長させた。すべての前培養物にアスパルテート(2mM)を補給して、PEPCK発現に無関係にTCA回路中間体を生成するための供給源を Δppc 突然変異体に供給した。M9最小培地を、4g/Lのグルコースを含むが、アスパルテートを添加せず、IPTGを0.5mMまで添加した試験条件にも使用した。表27は、成長補完試験の結果を示す。

【表 7 5】

表27. ベクターpZA23又はpZE13から発現された場合のH.インフルエンザ、A.スクシノゲネス及び好二酸化炭素性ルーメン細菌からのPEPCKによる Δppc 突然変異体の補完

PEPCK 源菌株	ベクター	時間(時)	OD ₆₀₀
H.インフルエンザ	pZA23BB	40	0.950
Δppc 対照	pZA23BB	40	0.038
A.スクシノゲネス	pZA23BB	40	0.055
好二酸化炭素性ルーメン細菌	pZA23BB	40	0.214
A.スクシノゲネス	pZE13BB	40	0.041
好二酸化炭素性ルーメン細菌	pZE13BB	40	0.024
Δppc 対照	pZE13BB	40	0.042

40

【0394】

ヘモフィルス・インフルエンザPEPCKは、プラスミドベースのスクリーニングで試験された遺伝子の中でも最も良く Δppc 突然変異体大腸菌における成長を補完することが判明した。次いで、上記pRE118-V2を用いたSacB対抗選択法を使用して、この遺伝子を野生型大腸菌(MG1655)のPPC座に組み込まれた(Gayら、J. Bacteriol. 153:1424-1431(1983))。PEPCKを組み込んで大腸菌原生PPCプロモーターを維持したが、非原生PEPCKターミネーターを利用した。ppcをH.インフルエンザpepckで置き換えた後のこの領域の配列を図48に示す。Pepckコード化領域に下線が引かれている。

50

【0395】

適応進化の技術を適用して、大腸菌突然変異体 ($\Delta ppc::H. inf pepCK$) の成長率を向上させた。4g/Lのグルコース及び50mMの重炭酸ナトリウムを含むM9最小培地を使用して、この菌株を嫌気性環境で培養及び進化させた。高い重炭酸ナトリウム濃度を使用して、オキサロアセテート形成へのPEPCK反応の平衡を導いた。指数成長を維持するために、0.5のOD600が達成される限り培養物を2倍に希釈した。3週間の適応進化にわたる約100世代の後に、嫌気性成長率が約8時間から野生型の成長率、即ち約2時間まで向上した。進化後に、個々のコロニーを単離し、嫌気性ボトルにおける成長を初期突然変異体及び野生型菌株のそれと比較した(図49参照)。4g/Lのグルコース及び50mMの重炭酸ナトリウムを含むm9培地を使用した。

10

【0396】

次いで、上記ppc/pepck遺伝子置換手順を、今回はBDO生成菌株ECKh-432 ($\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pflB \Delta lpdA::K.p.lpdA322 \Delta mdh \Delta arcA gltAR163L \Delta ackA fimD::大腸菌sucCD, P.ギンギバリスsucD, P.ギンギバリス4hbd fimD::ウシ結核菌sucA, C.クルイベリ4hbd$) 及び宿主としてのECKh-439を使用して繰り返した。これらの菌株は、以上に記載されているTCA回路強化物並びに染色体に組み込まれた上流経路を含む。ECKh-439は、アセテートキナーゼをコードする、ackA遺伝子が欠失したECKh-432の誘導体である。上記のsacB対抗選択法を使用してこの欠失を実施した。

【0397】

ECKh-453と呼ばれる、ECKh-439の $\Delta ppc::H. inf pepCK$ 誘導体を発酵で処理した。P.ギンギバリスCat2及びC.バイジェリンキーAldを含むpZS*13によって下流BDO経路を供給した。これを、20g/Lのグルコース及び50mMのNaHCO₃が補給されたM9最小培地を使用して、2L Biostat B+バイオリアクター (Sartorius) にて1Lの初期培養容量で実施した。温度を37°Cに制御し、2MのNH₄OH又はNa₂CO₃を使用してpHを7.0に制御した。細胞を約2のOD600まで好氣的に成長させ、その時点で培養物を0.2mMのIPTGで誘発させた。誘発の1時間後に、空気流量をミクロ好気性条件に向けて0.01標準リットル毎分まで減少させた。攪拌速度を最初に700rpmに設定した。培養密度が高くなるに従って、発酵全体を通じて通気量を徐々に増加させた。濃縮グルコース溶液を供給して、容器内のグルコース濃度を0.5から10g/Lの間に維持した。生成物プロファイルを図50に示す。BDO及びアセテートが約1対1のモル比で生成される観察された表現型は、設計#439(ADHEr、ASPT、LDH_D、MDH、PFLi)について国際公開第2009/023493号で予測されたものと極めて類似している。アスパルテートアンモニア-リアーゼを介する自然の流動が低いため、ASPT反応を標的とする欠失は不要であると思われた。

20

30

【0398】

OptKnock菌株の主たる特徴は、対象となる代謝物の生成が一般的に成長に連結され、さらに生成が指数成長時並びに静止期に生じることである。ECKh-432及びECKh-453の成長連結可能性を、対数期を通じて頻りにサンプリングしながらミクロ好気性ボトルにおける成長によって評価した。4g/Lのグルコース及び10mMのNaHCO₃ (ECKh-432の場合) 又は50mMのNaHCO₃ (ECKh-453の場合) を含むM9培地を使用し、接種から0.2mMのIPTGを含めた。ECKh-432のミクロ好気性成長に対して18Gニードルを使用し、ECKh-453に対して18G及び27Gニードルの両方を試験した。ニードルゲージが高次であるほど通気量が少なくなる。図51に示されるように、ECKh-432は、5g/Lのグルコースが消費されるまでBDOの生成を開始せず、それは静止期の開始に対応する。ECKh-453は、実験全体を通じてBDOをより均一に生成する。加えて、成長連結は、培養物の通気量が減少するにつれて向上する。

40

【0399】

(実施例XVII)

(特定の組込み部位におけるBDO経路コード化遺伝子の組込み)

本実施例では、より効率的な発現及び安定性を実現するための様々なBDO経路遺伝子のfimD座への組込みについて記載する。

【0400】

50

4HBに至る上流BDO経路全体をfimD座において大腸菌染色体に組み込んだ。λ赤色相同性組換え法(Datsenko及びWanner、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:6640-6645 (2000))を使用して上流経路のスクシネート分枝を大腸菌染色体に組み込んだ。受容大腸菌株はECKh-422 (ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L)であった。プロモーター、sucCD遺伝子、sucD遺伝子及び4hbd遺伝子及び終結配列を含むポリシストロンDNA断片をpKD3プラスミドのAflIII部位に挿入した。以下のプライマーを使用して、プラスミドからのクロラムフェニコールマーカールとともにオペロンを増幅した。下線が引かれた配列は、目標挿入部位に対して相同性である。

【化16】

5'-GTTTGCACGCTATAGCTGAGGTTGTTGTCTTCCAGCAACGTACCGTATACAA

TAGGCGTATCACGAGGCCCTTTC-3' (配列番号)

5'-GCTACAGCATGTCACACGATCTCAACGGTCGGATGACCAATCTGGCTGGTAT

GGGAATTAGCCATGGTCC-3' (配列番号)

10

【0401】

DpnI処理及びDNA電気泳動に続いて、精製されたPCR生成物を使用して、プラスミドpKD46を保持する大腸菌株を形質転換した。候補菌株を、クロラムフェニコールを含むプレート上で選択した。候補菌株のゲノムDNAを精製した。挿入配列を増幅し、DNA配列決定によって確認した。クロラムフェニコール抵抗性マーカールをフリパーゼによって染色体から除去した。挿入及びマーカール除去後の領域のヌクレオチド配列を図52に示す。

20

【0402】

上流経路のアルファ-ケトグルタレート分枝を相同性組換えによって染色体に組み込んだ。この改変に使用されるプラスミドは、カナマイシン抵抗遺伝子、レバンスクラゼ(sacB)をコードする遺伝子及びR6K条件複製起点を含む、実施例XIVに示されるベクターpRE118-V2から誘導された。組込みプラスミドは、プロモーター、sucA遺伝子、C.クルイベリ4hbd遺伝子及びターミネーターが、目標挿入部位の隣接領域に対して相同性である2つの1.5-kbDNA断片の間に挿入されるポリシストロン配列をも含んでいた。得られたプラスミドを使用して、大腸菌株を形質転換した。カナマイシンを含むプレート上で挿入候補を選択した。適正な組込み部位をPCRによって検証した。染色体から抗生物質マーカールを分離させるために、スクロースを含む培地上での成長について細胞を選択した。最終菌株をPCR及びDNA配列決定によって検証した。挿入及びマーカール除去後の染色体領域のヌクレオチド配列を図53に示す。

30

【0403】

得られた上流経路組込み菌株ECKh-432を、下流経路遺伝子を保持するプラスミドで形質転換した。構築物は、最小培地にてグルコースからBDOを生成することができる(図54参照)。

【0404】

(実施例XVIII)

(ピルベート副産物の形成を低減するための非ホスホトランスフェラーゼスクロース取込み系の使用)

40

本実施例では、スクロースのBDOへの変換における副産物としてのピルベートを減少させるための非ホスホトランスフェラーゼ(PTS)スクロース取込み系の利用について記載する。

【0405】

ホスホトランスフェラーゼ(PTS)系を介するスクロースの利用のために操作された菌株は、副産物として有意な量のピルベートを生成する。したがって、スクロースの移入にはホスホエノールピルベート(PEP)のピルベートへの変換が伴わないため、非PTSスクロース系を使用して、ピルベートの形成を低減することができる。これは、PEPの蓄積及びPPC又

50

はPEPCKを介するオキサロアセテートへの流動を増大させることになる。

【0406】

非PTSスクロースオペロンのrrnC領域への挿入を実施した。rrnC領域に対して相同性の領域が隣接する非PTSスクロース遺伝子を含むPCR生成物を生成するために、2つのオリゴを使用して、Mach1(商標)(Invitrogen、カリフォルニア州Carlsbad)からcsc遺伝子をPCR増幅した。この菌株は、スクロースを異化することが可能であることが知られる大腸菌株であるW菌株の子孫である(Orencio-Trejoら、Biotechnology Biofuels 1:8(2008))。その配列は、大腸菌W菌株K011(受入番号AY314757)に由来し(Shuklaら、Biotechnol. Lett. 26:689-693(2004))、スクロースペルメアーゼ(cscB)、D-フルクトキナーゼ(cscK)、スクロースヒドロラーゼ(cscA)及びLacI関連スクロース特異的抑制因子(scsR)をコードする遺伝子を含む。cscRの最初の53個のアミノ酸をASプライマーの配置によって効果的に除去した。オリゴの配列は、

【化17】

rrnC 23S del S –CSC 5'-TGT GAG TGA AAG TCA CCT GCC TTA ATA TCT CAA
AAC TCA TCT TCG GGT GAC GAA ATA TGG CGT GAC TCG ATA C-3'(配列番号)

及びrrnC 23S del AS –CSC 5'-TCT GTA TCA GGC TGA AAA TCT TCT CTC ATC CGC
CAA AAC AGC TTC GGC GTT AAG ATG CGC GCT CAA GGA C-3'(配列番号)

であった。下線が引かれた領域は、cscオペロンに対する相同性を示し、太字の配列は、rrnC領域の上流及び下流の配列相同性を指す。PCR生成物全体の配列を図55に示す。

【0407】

精製後、PCR生成物を、pRedET(tet)で形質転換され、製造者の説明書(www.genebridges.com/gb/pdf/K001%20Q%20E%20BAC%20Modification%20Kit-version2.6-2007-screen.pdf)に従って調製されたMG1655エレクトロコンピテント細胞に電気穿孔した。PCR生成物を、それが染色体のrrnC領域へのゲノムに組み込まれるように設計した。それは、図56に示されるように、rrlC(23SrRNA)の上流の191個のヌクレオチド、rrlCrRNA遺伝子のすべて及びrrlCの下流の3個のヌクレオチドを効果的に欠失させ、それをスクロースオペロンで置き換えた。

【0408】

形質転換体を、0.4%スクロースを含むM9最小塩培地上で成長させ、個々のコロニーを、診断PCRによってスクロースオペロンの存在について試験した。rrnC::cscAKB領域全体をP1形質導入(Sambrookらの論文、「分子クローニング:実験マニュアル、第3版(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Ed.)」、Cold Spring Harbor Laboratory, New York(2001))によってBDO宿主菌株ECKh-432に移入して、ECKh-463($\Delta adhE$ $\Delta ldhA$ $\Delta pf1B$ $\Delta lpdA::K.p.lpdA322$ Δmdh $\Delta arcA$ $gltAR163L$ $fimD::$ 大腸菌sucCD、P.ギンギバリスsucD、P.ギンギバリス4hbd $fimD::$ ウシ結核菌sucA、C.クルイベリ4hbd rrnC::cscAKB)を得た。組換え体をスクロース上の成長によって選択し、診断PCRによって検証した。

【0409】

ECKh-463を、P.ギンギバリスCat2及びC.ベイジェリンキーAldを含むpZS^{*}13で形質転換して、完全BDO経路を得た。細胞を、10g/Lのスクロースが補給されたM9最小培地(6.78g/LのNa₂HPO₄、3.0g/LのKH₂PO₄、0.5g/LのNaCl、1.0g/LのNH₄Cl、1mMのMgSO₄、0.1mMのCaCl₂)にて培養した。0.2mMのIPTGは、開始時から培養物に存在していた。23Gニードルを有するボトルを使用して嫌気性条件を維持した。対照として、スクロースの代わりに10g/Lのグルコースを用いたことを除いて、同じプラスミドを含むECKh-432を同じ培地上で培養した。図57は、48時間の成長後の培養OD600に対して正規化された平均生成物濃度を示す。そのデータは、各菌株の6つの複製培養物に対応する。これは、スクロース上のECKh-463からのBDO生成が、スクロース上の親菌株のそれと類似していることを証明する。

【0410】

(実施例XIX)

(BDO生成菌株の概要)

本実施例では、様々なBDO生成菌株について記載する。

【0411】

表28は、以上の実施例XII～XVIIIに開示されている様々なBDO生成菌株の概要を示す。

【表 7 6】

表28. 様々なBDO生成菌株の概要

菌株 #	宿主 菌株 #	宿主染色体	宿主 の内容	プラスミドベース
1		Δ ldhA	<i>E. コリ</i> MG1655 の単一欠失 誘導体	<i>E. コリ</i> sucCD, <i>P. ギンギバリス</i> sucD, <i>P. ギンギバリス</i> 4hbd, <i>P.</i> <i>ギンギバリス</i> Cat2, <i>C.</i> アセトブチリウム AdhE2
2	AB3	Δ adhE Δ ldhA Δ pflB	スクシネート生成菌株; <i>E. コリ</i> MG1655の 誘導体	<i>E. コリ</i> sucCD, <i>P. ギンギバリス</i> sucD, <i>P. ギンギバリス</i> 4hbd, <i>P.</i> <i>ギンギバリス</i> Cat2, <i>C.</i> アセトブチリウム AdhE2
3	ECKh- 138	Δ adhE Δ ldhA Δ pflB Δ lpdA::K.p.lpdA322	ピルベートデヒドロゲ ナーゼ流動を増大 させるための lpdAの向上	<i>E. コリ</i> sucCD, <i>P. ギンギバリス</i> sucD, <i>P. ギンギバリス</i> 4hbd, <i>P.</i> <i>ギンギバリス</i> Cat2, <i>C.</i> アセトブチリウム AdhE2
4	ECKh- 138	Δ adhE Δ ldhA Δ pflB Δ lpdA::K.p.lpdA322		<i>E. コリ</i> sucCD, <i>P. ギンギバリス</i> sucD, <i>P. ギンギバリス</i> 4hbd, <i>C.</i> アセトブチリウム buk1, <i>C.</i> アセトブチリウム ptb, <i>C.</i> アセトブチリウム AdhE2
5	ECKh- 401	Δ adhE Δ ldhA Δ pflB Δ lpdA::K.p.lpdA322 Δ mdh Δ arcA	酸化性TCA回路を 通じた流動を導く ためのmdh及び arcAにおける欠失	<i>E. コリ</i> sucCD, <i>P. ギンギバリス</i> sucD, <i>P. ギンギバリス</i> 4hbd, <i>P.</i> <i>ギンギバリス</i> Cat2, <i>C.</i> アセトブチリウム AdhE2
6	ECKh- 401	Δ adhE Δ ldhA Δ pflB Δ lpdA::K.p.lpdA322 Δ mdh Δ arcA		ウシ結核菌 sucA, <i>E. コリ</i> sucCD, <i>P. ギンギバリス</i> sucD, <i>P.</i> <i>ギンギバリス</i> 4hbd, <i>P. ギンギバリス</i> Cat2, <i>C. アセトブチリウム</i> AdhE2
7	ECKh- 422	Δ adhE Δ ldhA Δ pflB Δ lpdA::K.p.lpdA322 Δ mdh Δ arcA gltAR163L	嫌気性活性を向上 させるためのシト レートシンターゼに おける突然変異	<i>E. コリ</i> sucCD, <i>P. ギンギバリス</i> sucD, <i>P. ギンギバリス</i> 4hbd, <i>P.</i> <i>ギンギバリス</i> Cat2, <i>C.</i> アセトブチリウム AdhE2
8	ECKh- 422	Δ adhE Δ ldhA Δ pflB Δ lpdA::K.p.lpdA322 Δ mdh Δ arcA gltAR163L		ウシ結核菌 sucA, <i>E. コリ</i> sucCD, <i>P. ギンギバリス</i> sucD, <i>P.</i> <i>ギンギバリス</i> 4hbd, <i>P. ギンギバリス</i> Cat2, <i>C. アセトブチリウム</i> AdhE2
9	ECKh- 422	Δ adhE Δ ldhA Δ pflB Δ lpdA::K.p.lpdA322 Δ mdh Δ arcA gltAR163L		ウシ結核菌 sucA, <i>E. コリ</i> sucCD, <i>P. ギンギバリス</i> sucD, <i>P.</i> <i>ギンギバリス</i> 4hbd, <i>P. ギンギバリス</i> Cat2, <i>C. ベイジェリンキーAld</i>
10	ECKh- 426	Δ adhE Δ ldhA Δ pflB Δ lpdA::K.p.lpdA322 Δ mdh Δ arcA gltAR163L fimD:: <i>E. コリ</i> sucCD, <i>P. ギンギバリス</i> sucD, <i>P.</i> <i>ギンギバリス</i> 4hbd	ECKh-422に組み込ま れた上流経路の スクシネート分枝	<i>P. ギンギバリス</i> Cat2, <i>C.</i> ベイジェリンキーAld
11	ECKh- 432	Δ adhE Δ ldhA Δ pflB Δ lpdA::K.p.lpdA322 Δ mdh Δ arcA gltAR163L fimD:: <i>E. コリ</i> sucCD, <i>P. ギンギバリス</i> sucD, <i>P.</i> <i>ギンギバリス</i> 4hbd fimD::ウシ結核菌	ECKh-422に組み込ま れたスクシネート 及びアルファ-ケト グルタレート上流分枝	<i>P. ギンギバリス</i> Cat2, <i>C.</i> ベイジェリンキーAld

10

20

30

40

菌株 #	宿主 菌株 #	宿主染色体	宿主 の内容	プラスミドベース
		sucA, <i>C. クレイベリ</i> 4hbd		
12	ECKh-432	$\Delta adhE \Delta dhA \Delta pf1B$ $\Delta lpdA::K.p.lpdA322 \Delta mdh$ $\Delta arcA \Delta gltAR163L \Delta fimD::E. コリ$ $sucCD, P.ギンギバリス sucD, P.$ $ギンギバリス 4hbd \Delta fimD::ウシ結核菌$ $sucA, C. クレイベリ 4hbd$		<i>C. アセトブチリクム</i> buk1, <i>C.</i> <i>アセトブチリクム</i> ptb, <i>C.</i> <i>ベイジェリンキー</i> Ald
13	ECKh-439	$\Delta adhE \Delta dhA \Delta pf1B$ $\Delta lpdA::K.p.lpdA322 \Delta mdh$ $\Delta arcA \Delta gltAR163L \Delta ackA \Delta fimD::E. コリ$ $sucCD, P.ギンギバリス sucD, P.ギンギバリス$ $4hbd \Delta fimD::ウシ結核菌 sucA, C. クレイベリ 4hbd$	ECKh-432の アセテート キナーゼ欠失	<i>P.ギンギバリス</i> Cat2, <i>C.</i> <i>ベイジェリンキー</i> Ald
14	ECKh-453	$\Delta adhE \Delta dhA \Delta pf1B$ $\Delta lpdA::K.p.lpdA322 \Delta mdh$ $\Delta arcA \Delta gltAR163L \Delta ackA$ $\Delta ppc::H.i.ppcK \Delta fimD::E. コリ$ $sucCD, P.ギンギバリス sucD, P.$ $ギンギバリス 4hbd \Delta fimD::ウシ結核菌$ $sucA, C. クレイベリ 4hbd$	ECKh-432の アセテートキナーゼ 欠失及び PPC/PEPCK置換	<i>P.ギンギバリス</i> Cat2, <i>C.</i> <i>ベイジェリンキー</i> Ald
15	ECKh-456	$\Delta adhE \Delta dhA \Delta pf1B \Delta lpdA::fnr-$ $pf1B6-K.p.lpdA322 \Delta mdh \Delta arcA$ $\Delta gltAR163L \Delta fimD::E. コリ$ $sucCD, P.ギンギバリス sucD, P.$ $ギンギバリス 4hbd \Delta fimD::ウシ結核菌$ $sucA, C. クレイベリ 4hbd$	ECKh-432における 嫌気性プロモーター によるlpdAプロモーターの置換	<i>P.ギンギバリス</i> Cat2, <i>C.</i> <i>ベイジェリンキー</i> Ald
16	ECKh-455	$\Delta adhE \Delta dhA \Delta pf1B \Delta lpdA::$ $K.p.lpdA322 \Delta pdhR::fnr-pf1B6$ $\Delta mdh \Delta arcA \Delta gltAR163L \Delta fimD::E. コリ$ $sucCD, P.ギンギバリス sucD, P.ギンギバリス$ $4hbd \Delta fimD::ウシ結核菌 sucA, C. クレイベリ 4hbd$	ECKh-432における 嫌気性プロモーター によるpdhR及び aceEFプロモーター の置換	<i>P.ギンギバリス</i> Cat2, <i>C.</i> <i>ベイジェリンキー</i> Ald
17	ECKh-459	$\Delta adhE \Delta dhA \Delta pf1B \Delta lpdA::$ $K.p.lpdA322 \Delta mdh \Delta arcA$ $\Delta gltAR163L \Delta fimD::E. コリ$ $sucCD, P.ギンギバリス sucD, P.$ $ギンギバリス 4hbd \Delta fimD::ウシ結核菌$ $sucA, C. クレイベリ 4hbd \Delta fimD::C.$ $アセトブチリクム buk1, C.$ $アセトブチリクム ptb$	BK/PTBの ECKh-432への組み込み	<i>C. ベイジェリンキー</i> Ald
18	ECKh-459	$\Delta adhE \Delta dhA \Delta pf1B \Delta lpdA::$ $K.p.lpdA322 \Delta mdh \Delta arcA$ $\Delta gltAR163L \Delta fimD::E. コリ$ $sucCD, P.ギンギバリス sucD, P.$ $ギンギバリス 4hbd \Delta fimD::ウシ結核菌$ $sucA, C. クレイベリ 4hbd \Delta fimD::C.$ $アセトブチリクム buk1, C.$ $アセトブチリクム ptb$		<i>C. ベイジェリンキー</i> Ald, <i>G.</i> <i>サーモグルコシダシウス adh1</i>
19	ECKh-463	$\Delta adhE \Delta dhA \Delta pf1B$ $\Delta lpdA::K.p.lpdA322 \Delta mdh$ $\Delta arcA \Delta gltAR163L \Delta fimD::E. コリ$ $sucCD, P.ギンギバリス sucD, P.$ $ギンギバリス 4hbd \Delta fimD::ウシ結核菌$ $sucA, C. クレイベリ 4hbd$ $rrnC::cscAKB$	ECKh-432に 挿入された 非PTSスクロース 遺伝子	<i>P.ギンギバリス</i> Cat2, <i>C.</i> <i>ベイジェリンキー</i> Ald
20	ECKh-463	$\Delta adhE \Delta dhA \Delta pf1B$ $\Delta lpdA::K.p.lpdA322 \Delta mdh$		<i>C. アセトブチリクム</i> buk1, <i>C.</i> <i>アセトブチリクム</i> ptb, <i>C.</i>

10

20

30

40

菌株 #	宿主 菌株 #	宿主染色体	宿主 の内容	プラスミドベース
		Δ arcA gltAR163L fimD:: <i>E. コリ</i> sucCD, <i>P. ギンギバリス</i> sucD, <i>P.</i> ギンギバリス4hbd fimD:: ウシ結核菌 sucA, <i>C. クレイベリ</i> 4hbd rrnC::cscAKB		ペイジェリンキーAld

【0412】

10

表28に概要が示された菌株は、以下の通りである。菌株1:内因性ldhAの欠失を有する大腸菌MG1655の単一欠失誘導体;大腸菌sucCD、*P. ギンギバリス* sucD、*P. ギンギバリス* 4hbd、*P. ギンギバリス* Cat2、*C. アセトブチリクム* AdhE2のプラスミド発現。菌株2:宿主菌株AB3、スクシネート生成菌株、内因性adhE ldhA pf1Bの欠失を有する大腸菌MG1655の誘導体;大腸菌sucCD、*P. ギンギバリス* sucD、*P. ギンギバリス* 4hbd、*P. ギンギバリス* Cat2、*C. アセトブチリクム* AdhE2のプラスミド発現。

【0413】

菌株3:宿主菌株ECKh-138、内因性adhE、ldhA、pf1Bの欠失、内因性lpdAの欠失、及びlpdA座にGlu354Lys突然変異を有するクレブシエラ肺桿菌lpdAの染色体挿入;大腸菌sucCD、*P. ギンギバリス* sucD、*P. ギンギバリス* 4hbd、*P. ギンギバリス* Cat2、*C. アセトブチリクム* AdhE2のプラスミド発現;菌株はピルベートデヒドロゲナーゼ流動を増大させるためのlpdAの向上をもたらす。菌株4:宿主ECKh-138、内因性adhE、ldhA、pf1B及びlpdAの欠失、Glu354Lys突然変異を有するクレブシエラ肺桿菌lpdAの染色体挿入;大腸菌sucCD、*P. ギンギバリス* sucD、*P. ギンギバリス* 4hbd、*C. アセトブチリクム* buk1、*C. アセトブチリクム* ptb、*C. アセトブチリクム* AdhE2のプラスミド発現。

20

【0414】

菌株5:宿主菌株ECKh-401、内因性adhE、ldhA、pf1Bの欠失、内因性lpdAの欠失、及びlpdA座にGlu354Lys突然変異を有するクレブシエラ肺桿菌lpdAの染色体挿入、内因性mdh及びarcAの欠失;大腸菌sucCD、*P. ギンギバリス* sucD、*P. ギンギバリス* 4hbd、*P. ギンギバリス* Cat2、*C. アセトブチリクム* AdhE2のプラスミド発現;菌株は、酸化性TCA回路を通じた流動を誘導するためのmdh及びarcAにおける欠失を有する。菌株6:宿主菌株ECKh-401、内因性adhE、ldhA、pf1Bの欠失、内因性lpdAの欠失、及びlpdA座にGlu354Lys突然変異を有するクレブシエラ肺桿菌lpdAの染色体挿入、内因性mdh及びarcAの欠失;ウシ結核菌sucA、大腸菌sucCD、*P. ギンギバリス* sucD、*P. ギンギバリス* 4hbd、*P. ギンギバリス* Cat2、*C. アセトブチリクム* AdhE2のプラスミド発現。

30

【0415】

菌株7:宿主菌株ECKh-422、内因性adhE、ldhA、pf1Bの欠失、内因性lpdAの欠失、及びlpdA座にGlu354Lys突然変異を有するクレブシエラ肺桿菌lpdAの染色体挿入、内因性mdh及びarcAの欠失、gltA Arg163Leu突然変異体によるgltAの染色体置換;大腸菌sucCD、*P. ギンギバリス* sucD、*P. ギンギバリス* 4hbd、*P. ギンギバリス* Cat2、*C. アセトブチリクム* AdhE2のプラスミド発現;菌株は、嫌気性活性を向上させるためのシトレートシンターゼの突然変異を有する。菌株8:菌株ECKh-422、内因性adhE、ldhA、pf1Bの欠失、内因性lpdAの欠失、及びlpdA座にGlu354Lys突然変異を有するクレブシエラ肺桿菌lpdAの染色体挿入、内因性mdh及びarcAの欠失、gltA Arg163Leu突然変異体によるgltAの染色体置換;ウシ結核菌sucA、大腸菌sucCD、*P. ギンギバリス* sucD、*P. ギンギバリス* 4hbd、*P. ギンギバリス* Cat2、*C. アセトブチリクム* AdhE2のプラスミド発現。菌株9:宿主菌株ECKh-422、内因性adhE、ldhA、pf1Bの欠失、内因性lpdAの欠失、及びlpdA座にGlu354Lys突然変異を有するクレブシエラ肺桿菌lpdAの染色体挿入、内因性mdh及びarcAの欠失、gltA Arg163Leu突然変異体によるgltAの染色体置換;ウシ結核菌sucA、大腸菌sucCD、*P. ギンギバリス* sucD、*P. ギンギバリス* 4hbd、*P. ギンギバリス* Cat2、*C. ペイジェリンキー* Aldのプラスミド発現。

40

50

【0416】

菌株10: 宿主菌株ECKh-426、内因性adhE、ldhA、pflBの欠失、内因性lpdAの欠失、及びlpdA座にGlu354Lys突然変異を有するクレブシエラ肺桿菌lpdAの染色体挿入、内因性mdh及びarcAの欠失、gltA Arg163Leu突然変異体によるgltAの染色体置換、fimD座における大腸菌sucCD、P. ギンギバリスSucD、P. ギンギバリス4hbdの染色体挿入; P. ギンギバリスCat2、C. ベイジェリンキーAldのプラスミド発現; 菌株は、fimD座において菌株ECKh-422に組み込まれた上流経路のスクシネート分枝を有する。菌株11: 宿主菌株ECKh-432、内因性adhE、ldhA、pflBの欠失、内因性lpdAの欠失、及びlpdA座にGlu354Lys突然変異を有するクレブシエラ肺桿菌lpdAの染色体挿入、内因性mdh及びarcAの欠失、gltA Arg163Leu突然変異体によるgltAの染色体置換、fimD座における大腸菌sucCD、P. ギンギバリスSucD、P. ギンギバリス4hbdの染色体挿入、fimD座におけるウシ結核菌sucA、C. クルイベリ4hbdの染色体挿入; P. ギンギバリスCat2、C. ベイジェリンキーAldのプラスミド発現; 菌株は、ECKh-422に組み込まれたスクシネート及びアルファ-ケトグルタレート上流経路分枝を有する。菌株12: 宿主菌株ECKh-432、内因性adhE、ldhA、pflBの欠失、内因性lpdAの欠失、及びlpdA座にGlu354Lys突然変異を有するクレブシエラ肺桿菌lpdAの染色体挿入、内因性mdh及びarcAの欠失、gltA Arg163Leu突然変異体によるgltAの染色体置換、fimD座における大腸菌sucCD、P. ギンギバリスSucD、P. ギンギバリス4hbdの染色体挿入、fimD座におけるウシ結核菌sucA、C. クルイベリ4hbdの染色体挿入; C. アセトブチリウムbuk1、C. アセトブチリウムptb、C. ベイジェリンキーAldのプラスミド発現。

10

【0417】

20

菌株13: 宿主菌株ECKh-439、内因性adhE、ldhA、pflBの欠失、内因性lpdAの欠失、及びlpdA座にGlu354Lys突然変異を有するクレブシエラ肺桿菌lpdAの染色体挿入、内因性mdh及びarcAの欠失、gltA Arg163Leu突然変異体によるgltAの染色体置換、内因性ackAの欠失、fimD座における大腸菌sucCD、P. ギンギバリスSucD、P. ギンギバリス4hbdの染色体挿入、fimD座におけるウシ結核菌sucA、C. クルイベリ4hbdの染色体挿入; P. ギンギバリスCat2、C. ベイジェリンキーAldのプラスミド発現; 菌株は、菌株ECKh-432においてアセテートキナーゼ欠失を有する。菌株14: 宿主菌株ECKh-453、内因性adhE、ldhA、pflBの欠失、内因性lpdAの欠失、及びlpdA座にGlu354Lys突然変異を有するクレブシエラ肺桿菌lpdAの染色体挿入、内因性mdh及びarcAの欠失、gltA Arg163Leu突然変異体によるgltAの染色体置換、内因性ackAの欠失、内因性ppcの欠失、及びppc座におけるヘモフィルス・インフルエンザppckの挿入、fimD座における大腸菌sucCD、P. ギンギバリスSucD、P. ギンギバリス4hbdの染色体挿入、fimD座におけるウシ結核菌sucA、C. クルイベリ4hbdの染色体挿入; P. ギンギバリスCat2、C. ベイジェリンキーAldのプラスミド発現; 菌株は、菌株ECKh-432においてアセテートキナーゼ欠失及びPPC/PEPCK置換を有する。

30

【0418】

菌株15: 宿主菌株ECKh-456、内因性adhE、ldhA、pflBの欠失、内因性lpdAの欠失、及びlpdA座にGlu354Lys突然変異を有するクレブシエラ肺桿菌lpdAの染色体挿入、内因性mdh及びarcAの欠失、gltA Arg163Leu突然変異体によるgltAの染色体置換、fimD座における大腸菌sucCD、P. ギンギバリスSucD、P. ギンギバリス4hbdの染色体挿入、fimD座におけるウシ結核菌sucA、C. クルイベリ4hbdの染色体挿入、fnr結合部位、pflB-p6プロモーター及びpflBのRBSによるlpdAプロモーターの置換; P. ギンギバリスCat2、C. ベイジェリンキーAldのプラスミド発現; 菌株は、菌株ECKh-432において嫌気性プロモーターによるlpdAプロモーターの置換を有する。菌株16: 宿主菌株ECKh-455、内因性adhE、ldhA、pflBの欠失、内因性lpdAの欠失、及びlpdA座にGlu354Lys突然変異を有するクレブシエラ肺桿菌lpdAの染色体挿入、内因性mdh及びarcAの欠失、gltA Arg163Leu突然変異体によるgltAの染色体置換、fimD座における大腸菌sucCD、P. ギンギバリスSucD、P. ギンギバリス4hbdの染色体挿入、fimD座におけるウシ結核菌sucA、C. クルイベリ4hbdの染色体挿入、fnr結合部位、pflB-p6プロモーター及びpflBのRBSによるpdhR及びaceEFプロモーターの置換; P. ギンギバリスCat2、C. ベイジェリンキーAldのプラスミド発現; 菌株は、ECKh-432において嫌気性プロモーターによるpdhR及びaceEFプロモーターの置換を有する。

40

50

【0419】

菌株17: 宿主菌株ECKh-459、内因性adhE、ldhA、pflBの欠失、内因性lpdAの欠失、及びlpdA座にGlu354Lys突然変異を有するクレブシエラ肺桿菌lpdAの染色体挿入、内因性mdh及びarcAの欠失、gltA Arg163Leu突然変異体によるgltAの染色体置換、fimD座における大腸菌sucCD、P. ギンギバリスsucD、P. ギンギバリス4hbdの染色体挿入、fimD座におけるウシ結核菌sucA、C. クルイベリ4hbdの染色体挿入、fimD座におけるC. アセトブチリウムbuk1、C. アセトブチリウムptbの染色体挿入; C. ベイジェリンキーAldのプラスミド発現; 菌株はBK/PTBの菌株ECKh-432への組込みを有する。菌株18: 宿主菌株ECKh-459、内因性adhE、ldhA、pflBの欠失、内因性lpdAの欠失、及びlpdA座にGlu354Lys突然変異を有するクレブシエラ肺桿菌lpdAの染色体挿入、内因性mdh及びarcAの欠失、gltA Arg163Leu突然変異体によるgltAの染色体置換、fimD座における大腸菌sucCD、P. ギンギバリスsucD、P. ギンギバリス4hbdの染色体挿入、fimD座におけるウシ結核菌sucA、C. クルイベリ4hbdの染色体挿入、fimD座におけるC. アセトブチリウムbuk1、C. アセトブチリウムptbの染色体挿入; C. ベイジェリンキーAld、ゲオバシルス・サーモグルコシダシウスadh1のプラスミド発現。

10

【0420】

菌株19: 宿主菌株ECKh-463、内因性adhE、ldhA、pflBの欠失、内因性lpdAの欠失、及びlpdA座にGlu354Lys突然変異を有するクレブシエラ肺桿菌lpdAの染色体挿入、内因性mdh及びarcAの欠失、gltA Arg163Leu突然変異体によるgltAの染色体置換、fimD座における大腸菌sucCD、P. ギンギバリスSucD、P. ギンギバリス4hbdの染色体挿入、fimD座におけるウシ結核菌sucA、C. クルイベリ4hbdの染色体挿入、rrnC座における非PTSスクロースオペロン遺伝子スクロースペルメアーゼ(cscB)、D-フルクトキナーゼ(cscK)、スクロースヒドロラーゼ(cscA)及びLacI関連スクロース特異的抑制因子(cscR)の挿入; P. ギンギバリスCat2、C. ベイジェリンキーAldのプラスミド発現; 菌株は、菌株ECKh-432に挿入された非PTSスクロース遺伝子を有する。菌株20: 宿主菌株ECKh-463、内因性adhE、ldhA、pflBの欠失、内因性lpdAの欠失、及びlpdA座にGlu354Lys突然変異を有するクレブシエラ肺桿菌lpdAの染色体挿入、内因性mdh及びarcAの欠失、gltA Arg163Leu突然変異体によるgltAの染色体置換、fimD座における大腸菌sucCD、P. ギンギバリスsucD、P. ギンギバリス4hbdの染色体挿入、fimD座におけるウシ結核菌sucA、C. クルイベリ4hbdの染色体挿入、rrnC座における非PTSスクロースオペロンの挿入; C. アセトブチリウムbuk1、C. アセトブチリウムptb、C. ベイジェリンキーAldのプラスミド発現。

20

30

【0421】

表28に開示されているものを含む、本明細書に開示されているBDO生成菌株に加えて、BDOの生成をさらに増大させ、且つ/又は望ましくない副産物を減少させるさらなる改変を組み込むことができることが理解される。例えば、BDO生成菌株、又は表28の菌株は、さらなるノックアウトを組み込んで、BDOの生成をさらに増大させるか、又は望ましくない副産物を減少させることができる。例示的なノックアウトは、既に記載されている(米国特許公開2009/0047719号参照)。当該ノックアウト菌株としては、

【化 18】

ADHEr,

NADH6; ADHEr, PPCK; ADHEr, SUCD4; ADHEr, ATPS4r; ADHEr, FUM; ADHEr, MDH;
 ADHEr, PFLi, PPCK; ADHEr, PFLi, SUCD4; ADHEr, ACKr, NADH6; ADHEr, NADH6, PFLi;
 ADHEr, ASPT, MDH; ADHEr, NADH6, PPCK; ADHEr, PPCK, THD2; ADHEr, ATPS4r,
 PPCK; ADHEr, MDH, THD2; ADHEr, FUM, PFLi; ADHEr, PPCK, SUCD4; ADHEr, GLCpts,
 PPCK; ADHEr, GLUDy, MDH; ADHEr, GLUDy, PPCK; ADHEr, FUM, PPCK; ADHEr, MDH,
 PPCK; ADHEr, FUM, GLUDy; ADHEr, FUM, HEX1; ADHEr, HEX1, PFLi; ADHEr, HEX1,
 THD2; ADHEr, FRD2, LDH_D, MDH; ADHEr, FRD2, LDH_D, ME2; ADHEr, MDH, PGL,
 THD2; ADHEr, G6PDHy, MDH, THD2; ADHEr, PFLi, PPCK, THD2; ADHEr, ACKr, AKGD,
 ATPS4r; ADHEr, GLCpts, PFLi, PPCK; ADHEr, ACKr, ATPS4r, SUCOAS; ADHEr, GLUDy,
 PFLi, PPCK; ADHEr, ME2, PFLi, SUCD4; ADHEr, GLUDy, PFLi, SUCD4; ADHEr, ATPS4r,
 LDH_D, SUCD4; ADHEr, FUM, HEX1, PFLi; ADHEr, MDH, NADH6, THD2; ADHEr,
 ATPS4r, MDH, NADH6; ADHEr, ATPS4r, FUM, NADH6; ADHEr, ASPT, MDH, NADH6;
 ADHEr, ASPT, MDH, THD2; ADHEr, ATPS4r, GLCpts, SUCD4; ADHEr, ATPS4r, GLUDy,
 MDH; ADHEr, ATPS4r, MDH, PPCK; ADHEr, ATPS4r, FUM, PPCK; ADHEr, ASPT, GLCpts,
 MDH; ADHEr, ASPT, GLUDy, MDH; ADHEr, ME2, SUCD4, THD2; ADHEr, FUM, PPCK,
 THD2; ADHEr, MDH, PPCK, THD2; ADHEr, GLUDy, MDH, THD2; ADHEr, HEX1, PFLi,
 THD2; ADHEr, ATPS4r, G6PDHy, MDH; ADHEr, ATPS4r, MDH, PGL; ADHEr, ACKr,
 FRD2, LDH_D; ADHEr, ACKr, LDH_D, SUCD4; ADHEr, ATPS4r, FUM, GLUDy; ADHEr,
 ATPS4r, FUM, HEX1; ADHEr, ATPS4r, MDH, THD2; ADHEr, ATPS4r, FRD2, LDH_D;
 ADHEr, ATPS4r, MDH, PGDH; ADHEr, GLCpts, PPCK, THD2; ADHEr, GLUDy, PPCK,
 THD2; ADHEr, FUM, HEX1, THD2; ADHEr, ATPS4r, ME2, THD2; ADHEr, FUM, ME2,
 THD2; ADHEr, GLCpts, GLUDy, PPCK; ADHEr, ME2, PGL, THD2; ADHEr, G6PDHy, ME2,
 THD2; ADHEr, ATPS4r, FRD2, LDH_D, ME2; ADHEr, ATPS4r, FRD2, LDH_D, MDH;
 ADHEr, ASPT, LDH_D, MDH, PFLi; ADHEr, ATPS4r, GLCpts, NADH6, PFLi; ADHEr,
 ATPS4r, MDH, NADH6, PGL; ADHEr, ATPS4r, G6PDHy, MDH, NADH6; ADHEr, ACKr,
 FUM, GLUDy, LDH_D; ADHEr, ACKr, GLUDy, LDH_D, SUCD4; ADHEr, ATPS4r, G6PDHy,
 MDH, THD2; ADHEr, ATPS4r, MDH, PGL, THD2; ADHEr, ASPT, G6PDHy, MDH, PYK;
 ADHEr, ASPT, MDH, PGL, PYK; ADHEr, ASPT, LDH_D, MDH, SUCOAS; ADHEr, ASPT,
 FUM, LDH_D, MDH; ADHEr, ASPT, LDH_D, MALS, MDH; ADHEr, ASPT, ICL, LDH_D,
 MDH; ADHEr, FRD2, GLUDy, LDH_D, PPCK; ADHEr, FRD2, LDH_D, PPCK, THD2;
 ADHEr, ACKr, ATPS4r, LDH_D, SUCD4; ADHEr, ACKr, ACS, PPC, PPCK; ADHEr, GLUDy,
 LDH_D, PPC, PPCK; ADHEr, LDH_D, PPC, PPCK, THD2; ADHEr, ASPT, ATPS4r, GLCpts,
 MDH; ADHEr, G6PDHy, MDH, NADH6, THD2; ADHEr, MDH, NADH6, PGL, THD2;
 ADHEr, ATPS4r, G6PDHy, GLCpts, MDH; ADHEr, ATPS4r, GLCpts, MDH, PGL; ADHEr,
 ACKr, LDH_D, MDH, SUCD4.

10

20

30

40

50

が挙げられるが、それらに限定されない。

【 0 4 2 2 】

表29は、大腸菌などの宿主生物体のノックアウトされる対応する遺伝子の反応を示す。
表29における略語に対応する代謝物質を表30に示す。

【 表 7 7 】

表29. *E. コリ*において特定の反応が生じるのを防止するためにノックアウトされる
対応する遺伝子

反応略語	反応化学量論 *	各反応を触媒する 酵素をコードする 遺伝子
ACKr	[c] : ac + atp <==> actp + adp	(b3115又はb2296 又は b1849)
ACS	[c] : ac + atp + coa --> accoa + amp + ppi	b4069
ACt6	ac[p] + h[p] <==> ac[c] + h[c]	非遺伝子関連
ADHEr	[c] : etoh + nad <==> acald + h + nadh [c] : acald + coa + nad <==> accoa + h + nadh	(b0356又はb1478 又は b1241) (b1241又はb0351)
AKGD	[c] : akg + coa + nad --> co2 + nadh + succoa	(b0116 及び b0726 及び b0727)
ASNS2	[c] : asp-L + atp + nh4 --> amp + asn-L + h + ppi	b3744
ASPT	[c] : asp-L --> fum + nh4	b4139
ATPS4r	adp[c] + (4) h[p] + pi[c] <==> atp[c] + (3) h[c] + h2o[c]	((b3736 及び b3737 及び b3738) 及び (b3731 及び b3732 及び b3733 及び b3734 及び b3735)) 又は (b3736 及び b3737 及び b3738) 及び (b3731 及び b3732 及び b3733 及び b3734 及び b3735) 及び b3739))
CBMK2	[c] : atp + co2 + nh4 <==> adp + cbp + (2) h	(b0521又はb0323 又は b2874)
EDA	[c] : 2ddg6p --> g3p + pyr	b1850
ENO	[c] : 2pg <==> h2o + pep	b2779
FBA	[c] : fdp <==> dhap + g3p	(b2097又はb2925 又は b1773)
FBP	[c] : fdp + h2o --> f6p + pi	(b4232又はb3925)
FDH2	for[p] + (2) h[c] + q8[c] --> co2[c] + h[p] + q8h2[c] for[p] + (2) h[c] + mqn8[c] --> co2[c] + h[p] + mql8[c]	((b3892 及び b3893 及び b3894)又は(b1474 及び b1475 及び b1476))
FRD2	[c] : fum + mql8 --> mqn8 + succ [c] : 2dmmql8 + fum --> 2dmmq8 + succ	(b4151 及び b4152 及び b4153 及び b4154)
FTHFD	[c] : 10fthf + h2o --> for + h + thf	b1232
FUM	[c] : fum + h2o <==> mal-L	(b1612又はb4122 又は

10

20

30

40

反応略語	反応化学量論 *	各反応を触媒する 酵素をコードする 遺伝子
		b1611)
G5SD	[c] : glu5p + h + nadph --> glu5sa + nadp + pi	b0243
G6PDHy	[c] : g6p + nadp <==> 6pgl + h + nadph	b1852
GLCpts	glc-D[p] + pep[c] --> g6p[c] + pyr[c]	((b2417 及び b1101 及び b2415 及び b2416)又は(b1817 及び b1818 及び b1819 及び b2415 及び b2416)又は (b2417 及び b1621 及び b2415 及び b2416))
GLU5K	[c] : atp + glu-L --> adp + glu5p	b0242
GLUDy	[c] : glu-L + h2o + nadp <==> akp + h + nadph + nh4	b1761
GLYCL	[c] : gly + nad + thf --> co2 + mlthf + nadh + nh4	(b2904 及び b2903 及び b2905 及び b0116)
HEX1	[c] : atp + glc-D --> adp + g6p + h	b2388
ICL	[c] : icit --> glx + succ	b4015
LDH_D	[c] : lac-D + nad <==> h + nadh + pyr	(b2133又はb1380)
MALS	[c] : accoa + glx + h2o --> coa + h + mal-L	(b4014又はb2976)
MDH	[c] : mal-L + nad <==> h + nadh + oaa	b3236
ME2	[c] : mal-L + nadp --> co2 + nadph + pyr	b2463
MTHFC	[c] : h2o + methf <==> 10fthf + h	b0529
NADH12	[c] : h + mqn8 + nadh --> mql8 + nad [c] : h + nadh + q8 --> nad + q8h2 [c] : 2dmmq8 + h + nadh --> 2dmmql8 + nad	b1109
NADH6	(4) h[c] + nadh[c] + q8[c] --> (3) h[p] + nad[c] + q8h2[c] (4) h[c] + mqn8[c] + nadh[c] --> (3) h[p] + mql8[c] + nad[c] 2dmmq8[c] + (4) h[c] + nadh[c] --> 2dmmql8[c] + (3) h[p] + nad[c]	(b2276 及び b2277 及び b2278 及び b2279 及び b2280 及び b2281 及び b2282 及び b2283 及び b2284 及び b2285 及び b2286 及び b2287 及び b2288)
PFK	[c] : atp + f6p --> adp + fdp + h	(b3916又はb1723)
PFLi	[c] : coa + pyr --> accoa + for	((b0902 及び b0903) 及び b2579)又は(b0902 及び b0903)又は(b0902 及び b3114)又は(b3951 及び b3952))
PGDH	[c] : 6pgc + nadp --> co2 + nadph + ru5p-D	b2029
PGI	[c] : g6p <==> f6p	b4025
PGL	[c] : 6pgl + h2o --> 6pgc + h	b0767
PGM	[c] : 2pg <==> 3pg	(b3612又はb4395又は b0755)
PPC	[c] : co2 + h2o + pep --> h + oaa + pi	b3956
PPCK	[c] : atp + oaa --> adp + co2 + pep	b3403
PRO1z	[c] : fad + pro-L --> 1pyr5c + fadh2 + h	b1014
PYK	[c] : adp + h + pep --> atp + pyr	b1854又はb1676)
PYRt2	h[p] + pyr[p] <==> h[c] + pyr[c]	非遺伝子関連

10

20

30

40

反応略語	反応化学量論 *	各反応を触媒する 酵素をコードする 遺伝子
RPE	[c] : ru5p-D <=> xu5p-D	(b4301又はb3386)
SO4t2	so4[c] <=> so4[p]	(b0241又はb0929又は b1377又はb2215)
SUCD4	[c] : q8 + succ --> fum + q8h2	(b0721 及び b0722 及び b0723 及び b0724)
SUCOAS	[c] : atp + coa + succ <=> adp + pi + succoa	(b0728 及び b0729)
SULabc	atp[c] + h2o[c] + so4[p] --> adp[c] + h[c] + pi[c] + so4[c]	((b2422 及び b2425 及び b2424 及び b2423)又は(b0763 及び b0764 及び b0765)又は (b2422 及び b2424 及び b2423 及び b3917))
TAL	[c] : g3p + s7p <=> e4p + f6p	(b2464又はb0008)
THD2	(2) h[p] + nadh[c] + nadp[c] --> (2) h[c] + nad[c] + nadph[c]	(b1602 及び b1603)
THD5	[c] : nad + nadph --> nadh + nadp	(b3962又は(b1602 及び b1603))
TPI	[c] : dhap <=> g3p	b3919

10

20

【表 7 8】

表30. 表29に使用される略語に対応する代謝物質名

代謝物質 略語	代謝物質名
10fthf	10-ホルミルテトラヒドロホレート
1pyr5c	1-ピロリン-5-カルボキシレート
2ddg6p	2-デヒドロ-3-デオキシ-D-グルコネート6-ホスフェート
2dmmq8	2-デメチルメナキノン8
2dmmql8	2-デメチルメナキノール8
2pg	D-グリセレート2-ホスフェート
3pg	3-ホスホ-D-グリセレート
6pgc	6-ホスホ-D-グルコネート
6pgl	6-ホスホ-D-グルコノ-1,5-ラクトン
ac	アセテート
acald	アセトアルデヒド
accoa	アセチル-CoA
actp	リン酸アセチル
adp	ADP
akg	2-オキソグルタレート
amp	AMP
asn-L	L-アスパラギン
asp-L	L-アスパルテート
atp	ATP
cbp	リン酸カルバモイル
co2	CO ₂
coa	補酵素A
dhap	リン酸ジヒドロキシアセトン
e4p	D-エリトロース4-ホスフェート
etoh	エタノール
f6p	D-フルクトース6-ホスフェート
fad	酸化型フラビンアデニンジヌクレオチド
fadh2	還元型フラビンアデニンジヌクレオチド
fdp	D-フルクトース1,6-ビスホスフェート
for	ホルメート
fum	フマレート
g3p	グリセルアルデヒド3-ホスフェート
g6p	D-グルコース6-ホスフェート
glc-D	D-グルコース
glu5p	L-グルタメート5-ホスフェート
glu5sa	L-グルタメート5-セミアルデヒド
glu-L	L-グルタメート
glx	グリオキシレート
gly	グリシン
h	H ⁺
h2o	H ₂ O
icit	イソシトレート
lac-D	D-ラクテート
mal-L	L-マレート
methf	5,10-メテニルテトラヒドロホレート

10

20

30

40

代謝物質 略語	代謝物質名
mlthf	5,10-メチレンテトラヒドロホレート
mql8	メナキノール8
mqn8	メナキノン8
nad	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド
nadh	還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド
nadp	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドホスフェート
nadph	還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドホスフェート
nh4	アンモニウム
oaa	オキサロアセテート
pep	ホスホエノールピルベート
pi	ホスフェート
ppi	ジホスフェート
pro-L	L-プロリン
pyr	ピルベート
q8	ユビキノン-8
q8h2	ユビキノール-8
ru5p-D	D-リブロース5-ホスフェート
s7p	セドヘプツロース7-ホスフェート
so4	サルフェート
succ	スクシネート
succoa	スクシニル-CoA
thf	5,6,7,8-テトラヒドロホレート
xu5p-D	D-キシロース5-ホスフェート

10

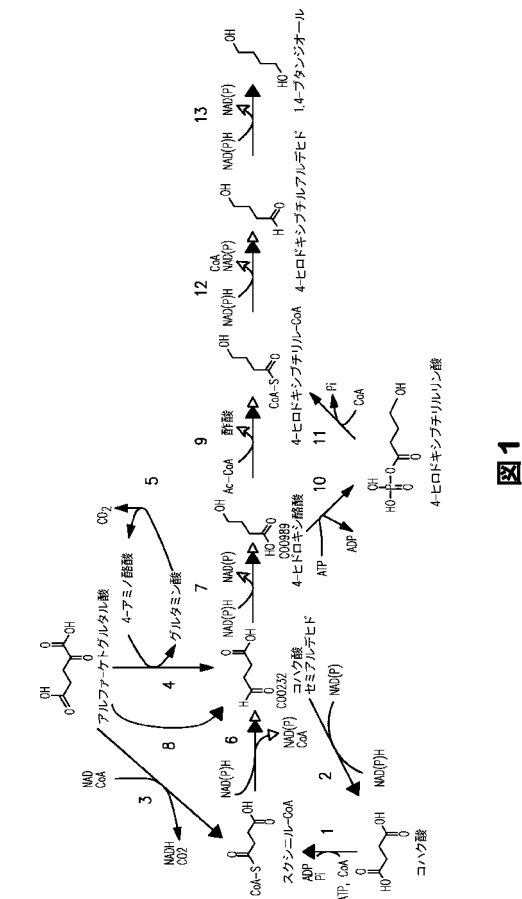
20

【 0 4 2 3 】

本出願全体を通じて、様々な文献を参照した。これらの文献の開示内容は、本発明が関係する技術分野の状況をより十分に説明するために、その全体が本出願において引用により本明細書に組み込まれている。本発明を、以上に示した実施例に関して説明したが、本発明の主旨から逸脱することなく様々な修正を加えることができることが理解されるべきである。

30

【図 1】



【図 2】

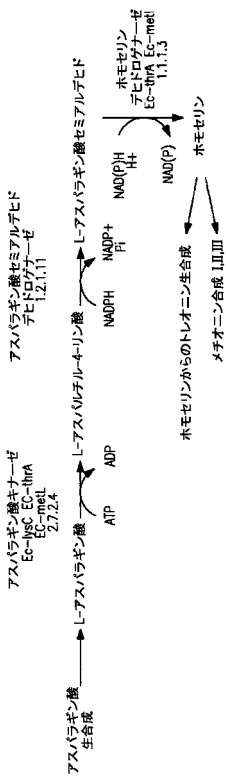


図12

【図 3】

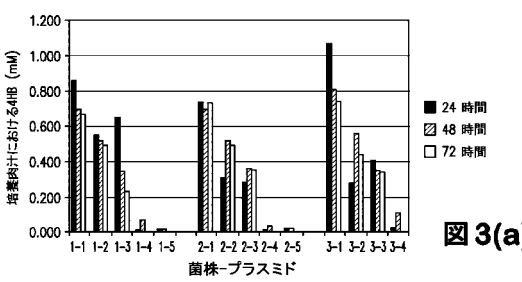


図 3(a)

【図 4】

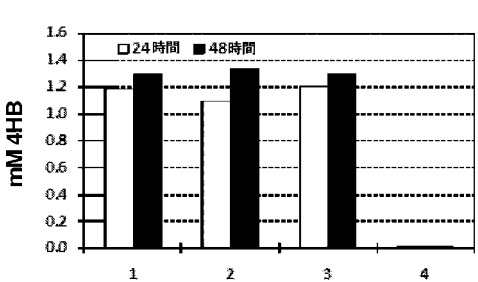


図 4

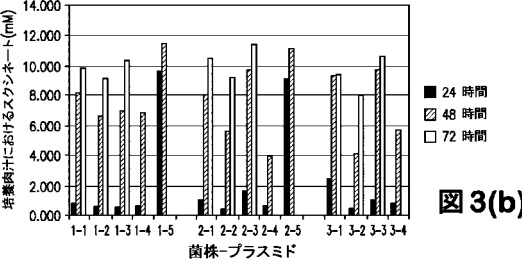


図 3(b)

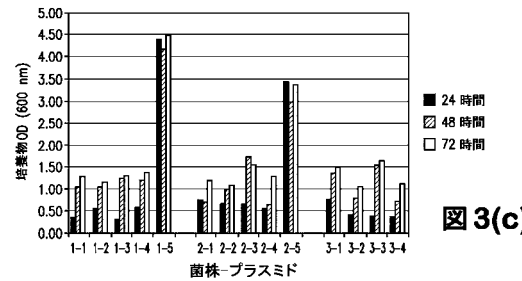


図 3(c)

【図 5】

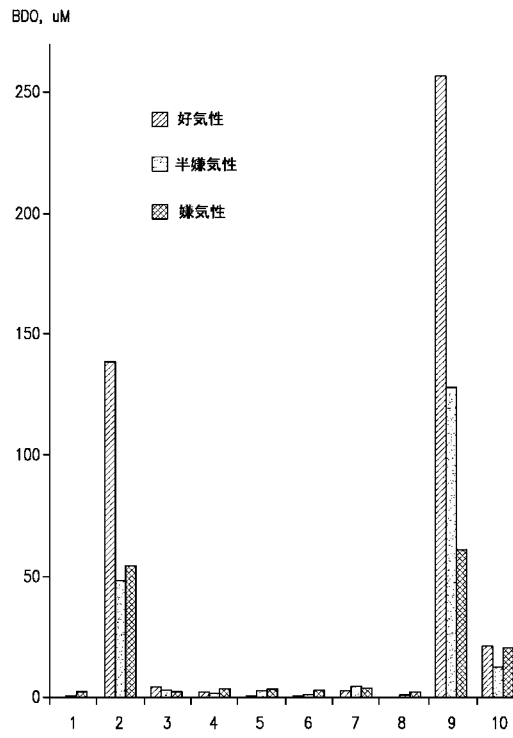


図 5

【図 6】

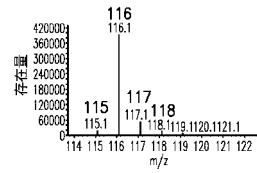


図 6(a)

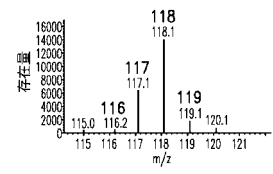


図 6(b)

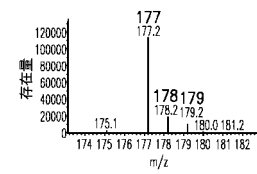


図 6(c)

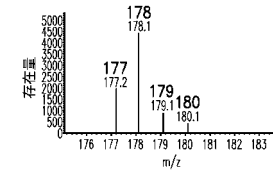


図 6(d)

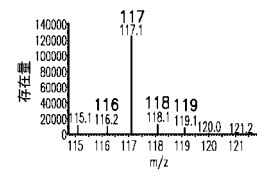


図 6(e)

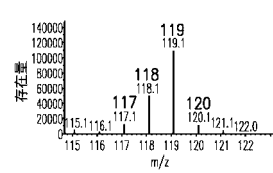


図 6(f)

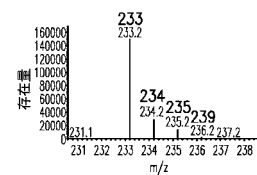


図 6(g)

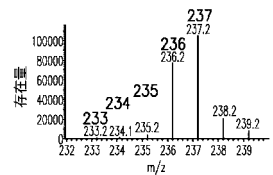


図 6(h)

【図 7】

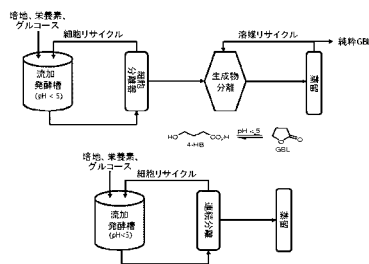


図 7

【図 8】

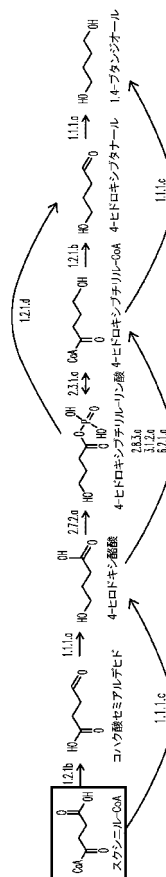


図 8A

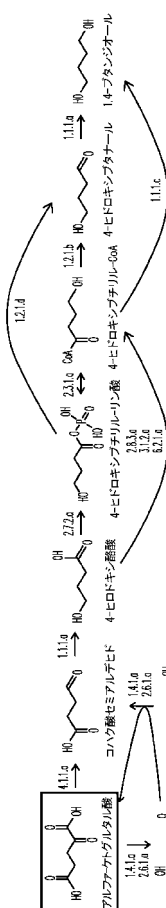


図 8B

【図 12】

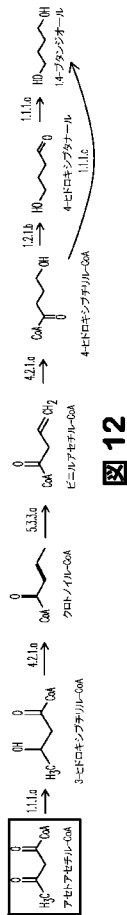


図 12

【図 14】

A.

ATGAACCTACATGAATACAGGCAAAACAACTTTTGGCCGCTATGGCTTACCAGCACCGTGGGTT
ATGCGTGTACTCTCCGCGGAAGCAGAGAAGCGCTTCAAAATACGGTCCGCTCCGCTGGGTTAG
TGAAATGTACAGTTTACGCTGGTGGCCGCGTAAAGCGGCGGTGTGAAGTTGTAAACAGCAAA
GAAGACATCGTCTTTCGCAAAATCGCTGGGCAAGCGCTGTGTAACGTATCAACAGATGCC
AATGGCAACCGGTTAAACAGATTTCTGGTTGAAGCAGCGACCGATATCGCTAAAGAGCTGTATCTCG
GTGGCGTTGTGACCGTAGTTCCGCTGGTGTGCTTTATGGCTCCACCGAAGCGCGGTGGAAAT
CGAAAAAGTGGCGAAGAACTCCGACCTGATCATCAAAAGTTTGGCTGTATCGCTGACGTGGCC
GATGCCGTATCAGGGACCGGAGCTGGCGTTCAAACTGGTCTTGAAGTTAACTGGTTTACGACGTT
CACCAGATCTTCTGAGGCTGGCGACATTTCTGGGAGCGCGACCTGGCGTTGATCGAAATCAAC
CGCTGGTCTACCAACAGCGGATCTGATTTGGCTCGACGGCAAACTGGCGCTGACGGCAAC
GCACTGTTCGCGCAAGCTGATCTGGCGAAATGCGTGACGAGTCCGAGGAAGATCCGCGTGAAGCA
CAGGCTGCACAGTGGGAAGTGAACCTGCTGGCTGACCGGTAACATCGGTTGTATGTTAAACGG
CGAGCTGTGGCGATGGGTACGATGACATCGTTAACTGACGCGCGCGCAACCGGCTAACTCTCT
GACGTTGGCGCGCGCAACAAAGACGTTGAACCGAAGCGTTCAAAATCATCTCTCTGACGAC
AAAGTGAAGCGGTTCTGTTAACTATCTGGCGGATGCTGTTGTTGCGACGATGCTGCTGACGGA
TCATCGCGCGGAGCAAGTGGGTGTTAACTGACGCGGCTGCTGTTGACGTTGTTGAAGTAAACAG
CGCAACTCGCGCGCAAGAACTGGCTGACGAGCGCTGAATATTATTGACGCAAAAGGCTGACGCG
ATGCACTGACGAGGTTGTTGCGGAGTGGAGGGGAAATATGTTCCATTTAATGATAAACAC
AAGGTTATCTGCGACGGGTTTACCGGTAGCGAGCGGCTTCCACTCAGAACAGGCTATGATACG
GCACTAAATGTTGTCGCGGCTAAACCGAGTGAAGCGCGCACCCACCTCGCGCTGCGGCTGT
TCAACACCGTGGTGAAGCGGTTGCTGCACTGGCGTACCGCTTCTGTTATCTAGCTACGACGAC
GTTCTGCGAAAGACTCATTCTGGAAGCCATGACGACGAGCATCAAACTGATTATCACTACCTGAA
GGCATCCGACGCTGATATGCTGACGCTGAAGTGAAGCTGATGAAGCAGCGGTTGTTATGATC
GGCCCGAAGTCCGAGCGGTTATCACTCCGCGTGAATGCAAAATCGGTATCCAGCTGGTGCACATTC
ACAAACCGGTAAGTGGGTATGTTTCCGCTGCGGTACACTGACCTATGAAGCGGTTAAACAGAC
CAGCGATTACGTTTCCGCTAGCTGACCTGTGCTGGTATGTCGCGGTGACCGGATCCGCGGCTCTA
CTTATCGACATCTCGAAATGTTGCAAAAGATTCGCGACCGGAGCGGATCGTGAATCGTGAAG
TCGCGGCTAGCGCTGAAGAAAGAGCTGCTGATCAACAGAGCAGCTTACCAAGCGGTTGTTG
GTTACATCGCTGCTGACGCGCGCAAGGCAACGATGTCGCGCACCGCGGCTCCATCATTTCCG
GTGGGAAAGGAGCTGCGATGAGAAATTCGCTGCTGGAAGCGCGAGCGGTGAACACGCTTGC
AGCTGGCGGATATCGTGAAGCACTGAAACTGTTTCTGAATAA

B.

MNLHEYQAKLFARYGLPAPVGYACTIPREAEASKIGAPWVVKQVHAGRGKAGGVKVVNSKE
DIRAFENWLKRLVTVYQDANGQPVNQLVEAATDIAKELVLAUVDRSSRRVVFMASTEGGVEIKV
AETPHLUHKVADLPTRMPYQGRFLKLGLEKLVQCFKIFMGLATIFLERDLALINPLVITKQDL
ICLDKLGADGNALFRQPLDNRMQSQEDPREAQAQWELNYVALDGNIGCMVNGAGLAMSTMD
IVKLHGGEPANFLDVGGGAKERVITAEKILSDDKVKVVLNIFGGIVRCDIADGIGAVAEVGNVNV
VRLGNNALGAKKLADSLNIAAKGLTDAAGQVVAAGVGK

C.

MSILIDKNTKVICQGTGSQTFHSEQAIYAGTKMVGVPKGGGTHLGLPVNTRVAAATGATAS
VTVVPAPCFKDSLEAIDAGKLIITTEGPTLDMLTVKVKLEFAGVRMIPNCPVITPGECKIQPQSHHK
PGKGVISRSGLTLYEAVKQTTDYSGPGQCTGVGGDDIPGSGNFIDILEMFEKDPQTEAIVMGEIGSGAE
EAAAIIKEHVTKPVVGYIAGVTAPKGRKMGHAGAIAGGCGTADGKFAALEAAGVKTVRSLADIGEALTK
VLK

図 14

【図 13】

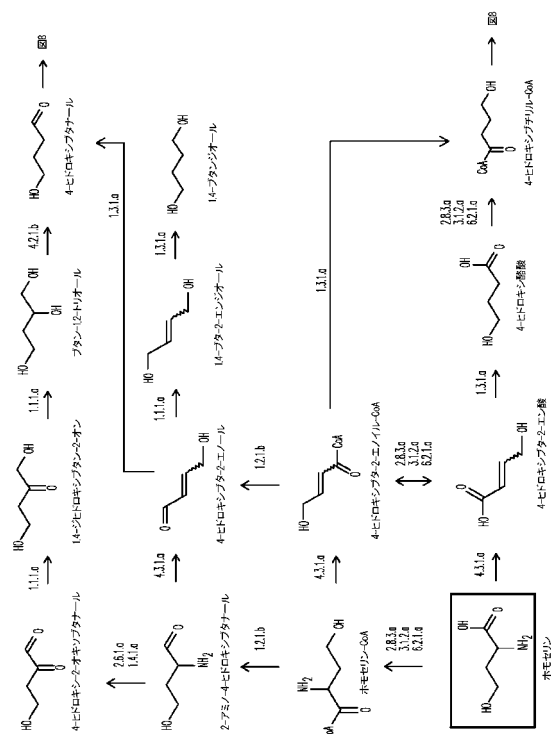


図 13

【図 15 - 1】

A.

ATGGCAACATAAGTTCACCATTCGGGCAAAACGAATGSGTGGTTGAAGAGATGTACCGCAAGTTC
CGGACGACCCCTCTCGGTCGATCCAGCTGGCAGAGTTCCTGGTTGACTACAGCCCGGCAACCCA
CTCCCAACCAAGCTGCCAACAACCCGCGGTACTCTGACCATCTGGTCCGAGCGGCGCTGCGGCG
CGCCCGGAGCAACCCCGCAAGCGGCGGACCCGCGCGCGGCAACGCGGCTGGTCCGCGCAT
GGCGCGCAAACTGCGCTTCCCGCGCGGCAAGGTAAGGAGTACGAGTGTGCGCGCGCGCGCG
CGCGCGCGCGTCTCAAGAACATGTCGCGCTGTTGAGAGTGCGCGCGGCGGACGACGCTCCGCGG
GTCGCGCGCAAGCTACTGATCGACACCGGATGATCATCAACACAGTGTGAAGCGGACCGCGCG
GGCAAGATCTGTTACGCACTTCTGGGCTACCGCTGGTGTGAGCGGTAAGAAATTTCCGAAAC
ATGAACCGGCACTACACGAACTGACGCGAAGCGGCGGCTGACGCGCGGCGGCGGCGGCGGCG
GGCTGTGGCGATCGACTGCAAGCAAGGAGCGGAGCGGCTTCCCTGGTGGTGGCGGCGGCGGCG
GTCGAGAGCATGCGATTCGCGGCTGCTGACGCGCTACGAAGACATGCTACGCGGCGGCGGCGG
CGGCAAGTGAACCTGAAAGATTTGCGGCGGCTGACGATTTGCTGCTGACCAATCCGCGCAACATCG
ACCGTGCATTGCTGCGCGGCTGATGCGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCG
TACCGCGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCG
ACTTTGACCTCCACCTACGACCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
TCACGAGTTGCTGCTGCGGAGTCTGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCG
GCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCG
GATCGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCG
TGCTTCCGAGTACCGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCG
GTGTTCAAGGTCGACGCGGCTTGGCGGCTGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
CGGATGCTGCTGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
TGCTGCAACACGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
AGCAAGCTCAACCGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCG
TTCCTGCTGGAAGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
CAGCGGCTCGACGAGGTGCTGCTGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
GTCGCGAAGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
GACATTGAGTGTGCTGCTGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
TGTGTCGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
CTCGGTTGGTGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
GCTGAACCTGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
ATCGGCTTCAACCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
TCGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
GGCACAACGAGGSGTACGACCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
GCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
GAGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
CAAGCAGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
GAGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
GATCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
CATCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
CATCTGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG

図 15

【図 15 - 2】

CCGCACGGGACGAGGGGACGGACCCGACCACTCTGCGCCGATCGAACCTCTTGCAGTTG
TGGCGGAAGGTTTCGATGACCATCGCGATGCCGTCGACTCCGTCGAACCTCTTGCAGTTG
GGCATGCGCTGGACGGCATCAACCGCCGCTGCTGTTTACGCCCAAGTCGATGTTGGCTCACA
GGCCCGCTCAGCGAAATCAAGGACTTCCAGAGATCAAGTTCCGCTCAGTCTGGAGGAACCCAC
CTATGAGGACGGCATCGGAGACCGCAACAGGTCAAGGTCGCTGACAGTGGCAAGCTGTA
TTACGAGCTGGCCCGCCGACGGGCAAGGACACCGCAATGACCTCGCGATCGTGCGGCTTGAACA
GCTCGCCCGCTGCGCCAGGCGTCTGACTGCTGCTGAAACGCTGACCGCTACGAGAACGTCAGGAGTT
CTTCTGGTCCAGAGGAACCGGCAACAGGCTGCTGCGCCGATTCGGGCTCGAACTACCCGA
GCTGCTGCTGCAAGTTGCGCGGATCAAGCAATCTCGCGCCGGGCGATGTCAGCCCGCTGCTC
AGGCTGCTCGAAGGTGCACGCGCTCGAACAGCAGGAGATCTCGACGAGGCTTCCGCTAA

B.

MANISSPFGQNEWLVEEMYRKFRDDPSSVDPSWHEFLVDYSPESTSQPAAEPTRVTSPLVAERAAAA
PQAPPKPADTAAAGNGVVAALAAKTAVPPPAEGDEVAVLRGAAAAVKNMSASLEVPTATSVRAVPA
KLIDNRIVINQLKTRGGKISFTLLGYALVQAVKKFPMNMNRHYTEVDGKTAVTAPHTNLGLAIDLQ
GKDGKRLVAVGIRKCTMRFAQFVTAIEDIVRRARDGLTTEDFAGVTISLTNPGTIGTVHVSPLRMPG
QGAIIGVAMEYPAEFQGAEEERIAELGKILITLSTYDRHIIQGAESGDFLRIHELISLDFWDEVFREL
SIPYLPVRWSTNDPDSIVDKNARVMNLIAAYRNRGHLMADTDLRLDKARFRSHPDLEVLTHGLWLWL
DRVFKVDGFAGAQYKLRDVLGLLRDAYCRHIGVEYAHILDPEQKEWLEQRVETKHVKPTVAQKYLSK
LNAAEAFETTLQTKYVQKRFSLGAEVIPMMDDAIDQCAEHGLDEVIGMPHGRNLNVLNIVGKPY
SQIFTEFEGNLNPSQAHGSGDVKYHLGATGLYLQMFQNDIQVSLTANPSHLEAVDPVLEGLVRAKQDL
LDHGSIDSDGQRAFVSPLMLHGDAAFAGQGVAAETLNLNLPGYRVGGTHIIVNNQJGFTTAPESRS
SEYCTDVAKMIGAFIFHVNGDDPEACYVVARLAVDFRQRFKDVVDMLCYRRRHNEGDDPSMTNP
YMYDVVDTKRARKSYTEAUJRGDISMKEAEDALRDYQQLERFVNEVRELEKHGVQPSVESVSDOMI
PAGLATAVDKSLARIGDAFLALPNGFTAHPRVQPVLEKRRMAYEGKIDWAFGELLALGSLVAEGLKVR
LSGGDSRRGTQSRHSVLIDRHTGEFTPLQLLATNSDGSPTGGKFLVYDPSLSEYAAVGFYGVYVGNPD
AVVLWEAQFGDFVNGAQSIDEFISGEAKWGQLSNVLLPHPHGEGQGPDPHTSARIERFLQLWAGGS
MTIAMPSPTSPNYHLRRLHLDGIQRLVFTPKSLMRHKAASVEIKDFTEIKFRVLEEPTYEDGIGDRNK
VSRLLTSGKLYELAAARKAKDNRRNDLAVIRLEQLAPRRRLRETLDRYENNVKEFFVWQEEPANQGAWP
RFGLEPELLDKLAGIKRISRRAMSAPSSSGVHVAEQQILDEAFG

図15 (続き)

【図 16】

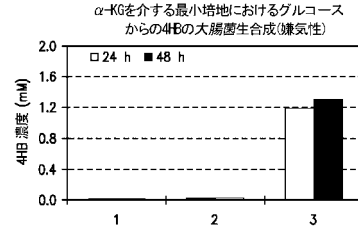


図 16

【図 17】

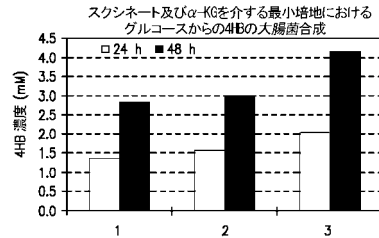


図 17

【図 18】

A.

ATGGAATCAAGAAATGGTGAGCCTTGACGCAAGGCTCAGAAGGAGTATCAAGCTACCCATAAC
CAAGAAGCAGTTGACAAACATTTCCGAGCTGCGACAAAAGTTATTTATGAAAATGCAAGCTATTCTGG
CTCGGAAGCAGTAGACGAACCGCATGGGCGTTTACGAACACAAAGTGGCCAAAGTAACAGGC
AAATCCAAGGCTGTTTGTACAACTCCCAATATAAAATCGATTGGTATCTCAATATAGACAGGC
GTACCGGTATGATCGAGATTGCAAGGCTATCGGAGTTGTAGGAGCCGTAAACGCCGACGACCAAC
CGATCGTTACTCGGATGAGCAATATCATCTTTGCTTAAAGACTGCAATGCGCATCATTATTGCCCCC
ACCCGAGATCCAAAATGCTCTGCAACAGCAGTTCGTCTGATCAAGAAAGCTATCGCTCGTTCGA
CGTACCGGAAGGTATGTTTCAGATCATCGAAGAACCCAGCATCGAAGAGACGAGGAACATCAGG
CGCCGCTAGACGTAGTACTGCTACGGGTGGTATGGGCACTGTGAACCTCTCATATTCTTCAGGAA
AGCCTTCTTTCGGTGTGGAGCCGTAACCTTCAGGTGATCGTGGATAGCAACATCAATTCGAAGC
TGCTCGAGAAAAATCATCCCGTCTGCTTCTCGACACCGGTATCATCTGCTCAGGCGAACAGAGC
ATCATCTAACAGAGGCTGACAAAGGAAGCAGTTTTCACAGCATTCGCAACCAAGCTGATATTTCT
GTGACGAAAGCGAAGGAGATCGGCTCTGTCGAGCTATCTTCGAAAATGGAGCCATCGCGAAAGAT
GTAGTAGTACAGAGCTTGCTCATTGCAAGAAAGCAACATCAATATCCCGAGGAGTACCGGTA
TTCTCGTTGTTGAAGCTCGCGGCTAGGAGCAGAAGACGTTATCTGTAAGGAAAGATGTGTCCG
TAATGTGCGCCTCAGCTACAAGCACTTGAAGAGGTTAGAAATCGCAGTCAAGCAACCTCGCCAA
CGAAGGTAAAGGCCACACTGTCTATCCACTCAAACAATCAGGCAACATCATCTCTCGAGGATCA
GAGTGAAGGTTATCTGATCTGATGTAATGCTCGGAGTCCACTACAGCAGCGGCTCACATCCAAA
ACGGTCTTGGCGTAACCAATACGCTCGGATCGGATCATGGGTAATAACTCTATCTCCGGAACATT
CACTTACAAGCACTCTCAACATTTACGCACTGCGACCGTGAATTCAAGCATTCACATCCCCGATG
ACAAAGAAATCTGGGAACCTAA

B.

MEIKEMVSLARKAQKEYQATHNQEAVDNCRAAKVIYENAILAREAVDETGMGVYEHKAVKNQGS
KGVWYNLHNKKSIGLIDERTGMIEAKP/GVVAVTPTNPVTPMSNIFALKTNIAIIAPHPRSKCS
AHAVRLKEAIPFNVPEGMVQIIEPSIEKTQELMGAVDVVATGGMGMVKSAYSSGKPSFGVGAGN
VQVIVDSNIDFEAAEKIITGRAFDNGICSGEQSIYNADKEAVFTAHRHGAIFYCDFAEGDRARAIF
NGAIADVVGQSVAFIAKANINIPETRLVVEARGVGAEDVICKEKMPVMCALSYKHFEEGVEIARNT
LANEGNGHTCAIHSNNQAHILAGSELTVSRIVNPASATTAGGHI/QNGLAVNTLGGGSWGNNSIENF
TYKHLNLSRIAPLNSSIH/PDDKEIWEI

図 18

【図 19】

A.

ATGCAACTTTTCAAACCTCAAGAGTGTAACACATCACTTGACACTTTTGCGAGAAITTTGCCAAGGAATT
CTGCTTTGGAGAACGCGACTTGGTAATTACCAACGAGTTTCATCTATGAACCGTATATGAAGGCATGC
CAGCTCCCCGCCATTTTGTATGAGGAGAAATATGGGCAAGGCGAGCCTTCTGACGAAATGATGA
ATAACACTTTGGCAGACATCCGTAATATCCAGTTCCAGCCCGTAATCGGTATCGGAGAGTACGCT
TATTGACATCTCTAAAGCTTTTCGTCTGAAAGGATTAATGATGATCATCGATGCAATCGACGCCAAAA
TACCTTTATCAAGAGAAAGAACTGATCATTGTGCCACACATGCGGAACGGTAGCGAGGTGA
CGAACAATTTCTATCGGAGAAATCAAAAGCCGTACACCAAAATGGGATTTGCTGACGATGCCATTTG
TGACAGACCATGCCATCATCATCTGAACTTCTGAAGAGCTTGCCTTTCCACTTCTACGCATCGAGT
CAATCGATGCTTATCATGCGCATCGAGTCATACGTATCTCTTAAAGCCAGTCCATATTTCTGCTCTGT
TCAGTGAGGCGGCTTGGGACATATCTGGAAGTATTCAGAAAAATCGCCGAACACGCGCTGAAT
ACCGCTTCGAAAAGCTGGGAGAAATGATCATGGCCAGCAACTATCCGGTATAGCCTTCGGAATG
CAGGAGTAGGAGCCCTCCAGCAGTATCTACCGCTTGGGAGGCAACTATCACGTGCGCATGGAG
AAGCAAACTATCAGTTCTCACAGAGGTATTCAGAGTATACCAAAAGAAAGAAATCTTTCGGCTATAT
AGTCGAACCTCAACTGGAAGCTCTCAAGATCTGAAGTCCAGCCGCAAGTATATCCGAAGCTG
GATGAACCTCTCGGATGCTTCTTACCAAGAAACCTTTCAGCAATACGGCATGAAGGACGAAGAG
GTAAGAGGCTTTGCGGAATCAGTGCTTAAGACACAGCAAGATTTCTCGCCCAACAACATCGTAGAG
CTTACTGTAGATGAGATCGAAGGTATCTACAGAAGACTCTACTAA

B.

MLQLKLSVTHHFDTFAEFAKEFLGERDLVITNEFIYEPYMKACQLPCHFVMQEKYQGGEPSDEMNN
NLADIRNIQFDRVIGIGGTVIDISKLFVLKGLNDVDAFDRKLIPLKEKELIVPTTCTGSGEVTNISIAEKSR
HTKMGALDDAIVADHAIIPPELLKSLPFHFCASDAIDALIHAIESVSPKASPSYRLFSEAAW/DILEVFVKIAE
HGPEYRFELKLEMIMASNYAGIAGFAGNAGVAVHALSYPLGGNYHVPHEANYQFFTEVKVYQKNPF
GYIVELNWLKSKILNCQPEYVYPLDELLGCLLTKPLIHEYGMKDEVRGFAESVLTKQRLANNVVELT
VDEIEGIRRLY

図 19

【図 20】

A.

ATGAAAACGCTATTAGCGGAATATGCCTCCGAATTGTTTCGCGCCGAAGAAGCCGTAACACATATCA
 AAAATGGAGAACGGGTAGCTTTGTACATGCTGCGGAGTTCCTCAGAGTTGTGTTGATGCACCTGGT
 ACAACAGCGCCGACCTTTTCAGAAATGTGCAAAATTTATCAGTCTTTGCTCGGCGAAGGAAATAT
 ATGGCACCTGAAATGGCCCTCAGTTCGACACATCAACCAATTTGTAGGTGGTAATTCCTGTAAGC
 AGTTGAGGAAAATAGAGCCGCTCATCTCCGTATTCITTTATGAAGTGCATCAATGATTCGCAAA
 GACATCCTTCACATAGATGTGCCATCGTTTCAGCTTCAATGCTGATGAGAATGGTACTGTAGTTT
 TGGAGTATCTTGCATATTAGCAAAACCGCAGCAGAAAGCGCTCATTTAGTTATAGGGGAAATCAA
 CCGTCAAATGCCATATGACATGCGGCACAACCTGATTCACATATCGAAGTTGGATTACATCGTGATG
 GCAGACTACCTTATCTATTCTCTTGCAAAAGCCAAAATCGGAGAAGTAGAAGAAGCTATCGGGCGTA
 ATTGTGCGGAGCTTATTGAAGATGGTGCCACACTCCAATCGGTATCGGCGCGATTCTGTATCGAGC
 CCTGTATTCTCAAGGACAAAAGATCTGGGGATCCATACCGAGAGTGTCTCCGATGGTGTGTGTC
 GAATTAGTTGCGAGTGGAGTAATTACAGGAAAGAAAAGACACTTACCCCGGAAAGATGCTGCGCA
 ACCTTCTTAATGGGAAGCGAAGCATATATCTTATCATGCACAAAAATCCCGATGATGAACTTTATCC
 GGTAGATTACGTCAATGATCCGCGAGTAACTCGTCAAAATGATAATATGGTCAGCATCAATAGCTGT
 ATCGAAATCGATCTTATGGGCAAGTCGTGCGCAAGTATAGGAAGCAAGCAATTCAGCGGAACC
 GCGGCTCAAGTAGATTATGTTCTGTGGAGCAGCATGTTCTAAAAACGGCAAAAGCATCATGGCAATT
 CCTCAACAGCCAAAACGGTACTGCATCTCGAATGTACCTATAATTGCGAGGGAGCTGCTGTAA
 CAACCTCCGCAACGAAGTCGATTACGTTGTAAACCGAATACGGTATAGCACAACTCAAGGAAAGA
 ATGTGCGCGAGCGAGCAGAAGCTCTTATTGCCATAGCCACCAGCGATTTCAGAGAGGAACATAACGA
 AACATCTCCGCAACGTTTTCGGATAA

B.

MKDVLAEYASRIVSAEFVAKHKNKGERVALSHAAGVPOQSDVALVQQADLFQNVFIYHMLCLGEGKYM
 APEMAPHFRHITNFVGGNSRKAVERNADHPIVFFVPSMIRKDLIHDAIVQLSMPDENGYCSFGVS
 CDYKPAEASAHVLVIGENRQMPYVHGDNLIHISKLDYIVMADYPIYSLAKPKIGVEFAIGRNCAELIEDG
 ATILQIGIGAPDAALLFLKDKDLGIHTEMFSDDGVVELVRSVITGKKKTLHPGKMVATFLMGSEDVYHFI
 DKNPDELVYPDYVNDPRVIAQNDNMVINSICIEDLMGQVVSCEIGSKQFSGTGGQVDYVRGAAMWS
 NGKSIAMIPSTAKNGTASRIVPIAEGAAVTTLRNEVDVYVTEYGIQKXLSRQAEALIAHPDFREEL
 TKHLRKRFG

図 20

【図 21】

A.

ATGATTAAAGAGTTTTAAAGAAATTAATCATGAAGGTAAGAGCAAGAAATGAAAAAGTTGCG
 TGTTCCTGTAAGCAAGACGAGCGAGTCTTGAAGCAGTACAGAGTGTGAAGAAATGGTA
 TTGCAGATGCTATTCTTGTGTGAGACCATGACGAAATCGTCTCAATCGCGCTTAAATAGGA
 ATGGATGTAATGATTTTGAATAGTAACCGAGCCTAACGTTAAGAAAGCTGCTTTAAAGGC
 AGTAGAGCTGTATCACTGGAAGAGCTGATATGGTAATGAAGGGAATGTAAATACAGCAA
 CTTTCITAAAGATCTGTAATTAACCAAGAGAGTTGGACTAGAACAGGAAAAATATGCTCAC
 GTTGCAGTATTGAAACAGAGAAATTTGATAGACTATTATTTTAAGCAGATGTGCTTTCAA
 TACTTATCCTGAATTAAGGAAAAAATTTGATATAGTAACCAATTCAGTTAAGGTTGCACATG
 CAATAGAAATTAAGAAAGGTTGCTCAATTTGTGCGAGTTGAGGTTATAAACCTTAA
 ATGCGCTCAAGACTTGTGCGAGCAATGCTTTCAAAAATGAGCGACAGAGGCAAAATTAAGGG
 TTGTGAGTTTACCGGACCTTTAGCACTTTGATATAGCTTTATCAGAGAAGCGACACATCA
 AGGGAGTAAACAGGAGAGTTGCTGGAAAAAGCTGATATCTTCTTAATGCAAAAGCATAGAAACA
 GGAATGTAATGTATAGACTTTAACAATAACCACTGATTCAAAAATGGAGGAATCTTAGT
 TGGAACTCTGCAACAGCTGTITTAACCTCAAGAGCTACAGCCATGAACAAAAATGAAC
 CTATAGCACTTGCAGCTTAGTTGCGAGCAATAATAA

B.

MIKSPKEIIMKPKSKEMKKVAVAVAQDEPVLAVRADKNGTADAILVGDHDEIVSIALKIG
 MDVHDFEIVNEPNVKKAAALKAVALVSTGKADHVMKGLVNTATFLRSVLNKEVGLRTGKTMSH
 VAVFEIEXFDRLLFLDVAFNTPPELKEKIDIVNNSVKVAHAIIGIENPKVAPICAVEVINPK
 NPSILDAAMLKMSDRGQIRGCVVUGPLALDIALSEEAHNRGVTGEGVAGKADIFLKNPIET
 GVMYKCTLTITDSKNGGTLVGTSPVVLTSRADSHETKRSIALASVAGIK

図 21

【図 22】

A.

ATGTATAGATTACTAATAATCAATCCTGGCTCGACCTCAACTAAAATTTGTTATTTAIGACGA
 TGAAGAAAGAGATATTTGAGAAGCTTTAAGACATCTCAGCTGAAGAGATAGAAAAATATAACA
 CTATATTTGATCAATTTCAATTCAGAAAGATGTAATTTAGATGCGTTAAAGAGAGCAAAAC
 ATGAGGATAGCTTTCTAAATCGTGTAGTTGGAAGAGCGGACTTTAAAGCCATAGTAAG
 TGGAACTTATGCGAGTAANTCAAAATTCGTTGAAGACTTAAAGTAGAGAGTTCAAGTGTGCG
 ATGCGTCAATCTTGGTGGAAATATTTGCAATGAAATAGCAAAAGAAATTAATGTTCCAGCA
 TACATAGTTGATCCAGTTGTTGTGGATGAGCTTGAATGAAGTTCAAGAAATATCAGGAATGGC
 TGACATTCGAAGAAAAAGTATATCCATGCAATTAATCAAAAGCAGTTGCTAGAGATATG
 CAAGGAAGTTGGAAGAAATACGAAGATCTTAATTTAATCGTAGTCCACATGGGTGGAGGT
 ACTTCAGTAGGTACTATCAAGATGGTAGAGTATAGAACTTAATATACACTTGAATGGAGA
 AGGTCCATTTCCACGAGAAAGGTGGTGGAGTTCCAAATAGGAGATCTTGAAGATTGTGCT
 TCAGCAACAAATATCTATGAGAGTANTGAAGAAGTAAAGCGCAAGGCGGACTTGTGTT
 AGTTGCTAAATATCTATGCGATTTAAGCGCTGTAGTTGATTAAGCTTTCAAGGAGATAAGAA
 ATGTGCACCTTATATATGAAGCTTTCAGCTTCCAGGTAGCAAAAGAGATAGGAAAAATGTCAA
 CCGTTTCAAAAGGAAATGTAGATGCATAATCTCAACAGCGGAAATTCGTACACACCGCAT
 GTATGTAATGCCATAGAGGATAGTAAAATTCATAGCACCTGTAGTTAGATATGGTGGAGA
 AGATGAACCTCTTGCACTTGCAGAGAGGTGACTAGASTTTAAGAGGAGAGAGAAAAAGCTA
 AGGAATACAAATAA

B.

MYRLLIINPGSTIKIGLYDDEKEIFKTLRHSZETIEKYNTFDQFQRKNVLDALKEAN
 IEVSSILNAVVRGGLLPFVSGTYAVNQKVLLEDLKVGVQGHASNLGGIINEIAKEINVPA
 YIVDFVVDDELDEVSRISGNADIPKRSIFHALAKAVARRYAKEVGRKYEDNLNIVVHMGGS
 TSVGTHKCRVIEVNNLTGCEPSPERSGVPDGLVRLCFSNKYTYEVMKINIKGKGVV
 SYLNTIDFKAIVVDKALBGGDKCALIYEAIFQVAKELSKCSTVLKGNVDAILLTGGIAINEH
 VCNRIEDRVKFIAPVVRVGGDELLALAEGLRVLRGEEKAKSYK

図 22

【図 23 - 1】

A.

ATGATTAAAGAGTTTTAAAGAAATTAATCATGAAGGTAAGAGCAAGAAATGAAAAAGTTGCG
 TGTTCCTGTAAGCAAGACGAGCGAGTCTTGAAGCAGTACGCGATGCTAAGAAAAATGGTA
 TTGCAGATGCTATTCTTGTGTGCGACCATGACGAAATCGTCTCAATCGCGCTTAAATAGGC
 ATGGATGTAATGATTTTGAATAGTAACCGAGCCTAACGTTAAGAAAGCTGCTTTAAAGGC
 AGTAGAGCTGTATCACTGGAAGAGCTGATATGGTAATGAAGGGAATGTAAATACAGCAA
 CTTTCITAAAGATCTGTAATTAACCAAGAGAGTTGGACTAGAACAGGAAAAATATGCTCAC
 GTTGCAGATTTGAAACAGAGAAATTTGATAGCTGTATTTTAAGCAGATGTGCTTTCAA
 TACTTATCCTGAATTAAGGAAAAAATTTGATATCGTGAACCAATTCAGTTAAGGTTGCACATG
 CAATAGGATTTGAAATTCGAAGGTTGCTCAATTTGTGCGAGTTGAGGTTATAAACCTTAA
 ATGCGCTCAAGACTTGAAGCGCAATGCTTTCAAAAATGAGCGACAGAGGCAAAATTAAGGG
 TTGTGAGTTGACGGACCGTTAGCACTTTGATATCGCTTTATCAGAGAAGCGACACATCA
 AGGGGCTAAGCAGGAGAGTTGCTGGAAAAAGCTGATATCTTCTTAATGCAAAAGCATGAAGCA
 GGAATGTAATGTATAGACTTTAACAATAACCACTGATAGCAAAAATGGCGGAATCTTAGT
 TGGAACTCTGCAACAGCTGTITTAACCTCAAGAGCTACAGCCATGAACAAAAATGAAC
 CTATTGCACCTTGCAGCTTAGTTGCGAGCAATAATAA

B.

ATGATTAAAGAGTTTTAAAGAAATTAATCATGAAGGTAAGAGCAAGAAATGAAAAAGTTGCG
 TGTTCCTGTAAGCAAGACGAGCGAGTCTTGAAGCAGTACGCGATGCTAAGAAAAATGGTA
 TTGCCAGTGTATTCTTGTGTGCGACCATGACGAAATCGTCTCAATCGCGCTTAAATAGGC
 ATGGATGTAATGATTTTGAATAGTAACCGAGCCTAACGTTAAGAAAGCTGCTTTAAAGGC
 AGTAGAGCTGTATCACTGGAAGAGCTGATATGGTAATGAAGGGAATGTAAATACAGCAA
 CTTTCITAAAGATCTGTAATTAACCAAGAGAGTTGGCTACGACAGAGGCAAAATTAAGGG
 TTGTGAGTTGACGGACCGTTAGCACTTTGATATCGCTTTATCAGAGAAGCGACACATCA
 AGGGGCTAAGCAGGAGAGTTGCTGGAAAAAGCTGATATCTTCTTAATGCAAAAGCATGAAGCA
 GGAATGTAATGTATAGACTTTAACAATAACCACTGATAGCAAAAATGGCGGAATCTTAGT
 TGGAACTCTGCAACAGCTGTITTAACCTCAAGAGCTACAGCCATGAACAAAAATGAAC
 CTATTGCACCTTGCAGCTTAGTTGCGAGCAATAATAA

図 23

【図 23 - 2】

C.

ATGATTAAAGAGTTTAAATGAATTAATCATGAAGGTAAAGACAAAAGAAATGAAAAAGTTGG
TGTGCTGTGTCACAAAGACGACCGGTATGCGAAGCGGTACGAGTGAAGAAATGGTA
TTGCCGATGCTATCTGGTTGCGGCGATGAGAAATGCTCTATGCGCGTGAATTTGGC
ATGAGTGTAAATGATTTTGAATTTGTAACGAGCTTAACGTTAAGAAAGCTGCGCTGAGAGC
GGTAGAGTGTGTTCCACCGGAAAGGTGATGTTGTTAAGGAGCTGTTGAATACCGCAA
CTTTCTTACGCGAGCTACTGACAAAGAACTTGGTCTGCTACCGGAAAAACCATGAGTCAC
GTTGCGGTATTTGAAACTGAGAAATTTGATGCTGCTGTTCTGACCGATGTTGCTTTCAA
TACTTATCTCGAATTAAGAAAGAAATTTGATATGTTAACAATAGCGTTAAGGTTGCGCAT
CCATTGTTATGAAATCCAAAGTTTGGTCCAATTTGTCAGTTGAGGTATTAACCCGAAA
ATGCCATCAACCTTGGTGGCGAATGCTTACGAAATGAGTGACCGCGGCAAAATTAAGG
TTGTGCTGTTGACCGCGCGCTGGCATCGGATATCGGTTAAGCGAAGAGCGGCACATCTA
AAGCGGTAAACCGCGGAGTTGCTGGAAGAACTGATATCTTCTGATGCGCAACATTGAAACA
GGCAATGTAATGTATAAAGGTTAAGCTATAACACTGATAGCAAAAAATGGCGCATCTGGT
TGAACCTCTGCACAGTTGTTTAACTCTACGCGCTGACGCCATGAAACAAAATGAACA
GCATTGCACTGGCAGCGTGGTTGACGGCAATAAATAA

D.

ATGATTAAAGTTTAAACGAATTAATCATGAAGGTAAAGCAAAAGAGATGAAAAAGTTGGC
GGTTGCGGTTGCGAGGATGAACCGGTGCGGAGCGGTGCGCGATGCCAAAAAAGCGTTA
TTGCCGATGCCATCTGTTGGCGGATCACCAGTAATTTGCTCTATTGCGCTGAAAAATTTGGC
ATGAGTGTAAACGATTTTGAATTTGTAAGAACCGAAGCTGAAAAAGCGGCGCTGAAGC
GGTTGAAGTGGTTTCCACCGTTAAGCGGATATGCTGATGAAGGCGCTGGTAATACCGCAA
CTTCTCTGCGCAGCGTGTGATTAAGAAATGAGTGTGCTGATCGGTTAAGCATGAGTCAT
GTTCGCGGTGTTTGAACCGAATAATGACCGCTGCTGTTCTGACCGCATGTTGCGTTTAA
TACCTATCGCGAAGTGAAGAAATTAATGATATGTTAATGAAGCTGCAAAAGTTGGCGCAT
CCATTGTTATGAAAAACCGAAGTGGCGCGGATTTGCGCGGTTGAAGTGAATTAACCGGAAA
ATGCCGCTCAACCGTGGATGCCCGCATCTCAGCAAAATGAGCGATCGCGCTCAATCAAGG
CTGTGTGTTGATGGCGCGCTGGCGTGGATATCGCGCTTACGCAAGAGCGGCGCATCAT
AAGCGGTGACCGCGGAGTTGGCGGTAAGCGCATATTTCTGATGCGCAATTTGAACCC
GCCAACGTCATGTAAGCGCTGACCTTACCGCGCAGCAAAACCGCGCATTTGCTGT
GGTACACGCGCGCGTGGTCTGACCTGGCGCGCAGCGCATGAAGCAAAATGAACA
GCATTGCGCTGGCGCGCTGGTGGCGGTAATAAATAA

図23 (続き)

【図 24 - 2】

C.

ATGTATCCTCTGCTGATATCAATCTGGCTCGACCTCAACTAAAAATGCTATTATGACGATGA
AAAAGAGATATTTGAAGAAACGTTACGTCATAGCGCTGAAGAGATTGAAAAATATAACACTATTT
TTGATCAATTTCACTTCGCGCAAAATGATTTCTGATCGGCTGAAAGAGCAAAACATTGAAGTC
AGTTTCGCTGAATCGGTGATTTGGTTCGCGCGGCTCTGCTGAAGCCAAATTTGTCAGCGGCATCTATGC
GGTAAATCAAAAAATGCTGGAAGACCTGAAAGTGGCGCTTCAGGCGCAGCATGCCAGCAATCTTG
GTGGCATATTTGCCAATGAAATCGCCAAAGAAATCAATGTTCCGCGCATACATGTTGATCCGGTT
GTTGTGGATGAGCTGGATGAAGTTAGCCGTATCAGCGGAATGGCTGACATTCACAGTAAAGTAT
TTTCCATGCACTGAATCAAAAGCGGTTGCGCGCTGCTATGCAAAAGAAATTTGGTAAAAATACG
AAGATCTTAATCTGATCGTGGTGCATATCGGTGCGGCTACTAGCGTCCGTACTCATAAAGATGGT
CGCGTGAATGAAGTTAATAACACTTGTATGGCGAAGTCCATTTCTCACCAGAACGTAGCGGTGG
CGTTCCAAATTTGGCGATCTGGTACGTTTGTGCTTCAGCAACAAATATACCTATGAAGAAATGATGA
AAAAGATAAACCGCAAGCGCGCGCTTTAGTTACCTGAATACTATCGATTTTAAAGCGGTAGTT
GATAAAGCGCTGGAAGCGCATAAAGAAATGTGCACTGATTTATGAAGCGTTCACTTCCAGGTGGC
AAAAGAGATTTGTAATGTTCAACCGTTCTGAAGGCAATGTTGATGCCATTTACTCGACCGCGG
GCATTGCTTCAACGAGCATGTTTGTATGCCATTGAAGGATCGCGTAAATTTCACTGCACTGTG
GTTGTTATGTTGCGGAGATGAACCTGCTGGCATGCGGAGAGGTGGTCTGCGCGTTTACGCGG
CGAAGAAAAAGCGAAGAAATACAAATAA

D.

ATGTATCCTCTGCTGATATCAACCCGGGCGACCTCAACCAAAATTTGGTATTACGACGATGA
AAAAGAGATTTTGAAGAAACGTTGCTGACAGCGCAGAAGAGATTGAAAAATATAACACTATTT
TCGATCAGTTCCAGTTCCGCAAAACGTTGATTTCTGATCGGCTGAAAGAGCAAAACATTGAAGTC
TCTGCTGAATCGGTGATTTGGTTCGCGCGGCTCTGCTGAACCGATTTGTCAGCGGCATCTATGC
GGTTAATCAGAAATGCTGGAAGATCTGAAAGTGGCGGTGAGGCGGCGATGCCAGCAATCTGC
GCGGCATTTATCGCAATGAAATCGCAAGAGATCAACGTCGCGGCTTATATGCTGATCCGCTG
GTGGTTGATGAACGATGAAGTACGCGCTATCAGCGCATGCGCGGATTTTCCGCTAAAAAGCAT
TTTCCATGCGCTGAATCAGAAAGCGGTTGCGGCTGCTATGCCAAGAGTGGGTAAGAAATATG
AAGATCTCAATCTGATTTGGTGCATATGGCGCGCGGACAGCGTCCGTTACGCTAAAGATGGT
CGCGTGAATGAAGTGAATAACAGCTGGATGGCGAAGGCGGTTCTCGCGGAACTGACGCGCG
CGTGGCATTTGGCGATCTGGTGGCTGTTGCTGATTCAGCAATAATACACTACGAAAGAGTGAATGA
AAAAATCAACCGCAAGCGCGGCTGGTGGTATCTGATCTGAATACCATCGATTTTAAAGCGGTGGTT
GATAAAGCGCTGGAAGCGCATAAAAATGCGCGCTGATTTATGAAGCGTTTACCTTCAGGTGGC
GAAAGAGATTGTAATGTTCAACCGTCTGAAAGGCAACGTTGATGCCATTTATCTGACCGGCG
GCATTGCTTATGAACGACATGTTTGTATGCCATTGAAGGATCGCGTAAATTTCACTGCACTGTG
GTGCGTTACCGCGCGGAGATGAATGCTGGCGCTGCGGAGAGCGGCTGCGCGGTTGTCGCGG
CGAAGAAAAAGCGAAGAGTACAAATAA

図 24 (続き)

【図 24 - 1】

A.

ATGTATCCTTTACTGATTATCAATCTGGCTCGACCTCAACTAAAAATTTGGTATTTATGACGATGA
AAAAGAGATATTTGAAGAGACCTTACGTCATTCAGCTGAAGAGATTGAAAAATATAACACTATAT
TTGATCAATTTCACTTCAGTTCCGCAAGAAATGTTGATTTCTGATCGGTTAAAGCAAACTAGTAAGTGAAGTATGC
AGTAAATCAAAAAATGCTTGAAGACCTTAAAGTAGGCGGTTCAAGGTGAGCATGCGTCAAACTCTTG
GTGGAAATTTATGCAAAATGAAATAGCAAAAGAAATTAATGTTCCAGCATACATCGTTGATCCAGTAT
GTTGGATGAGCTTTGATGAAGTTTCACTGATATCAGGAATGCGTGCATTTCCAGCTAAAGTAT
ATTCATGCTAATTAATCAAAAGCAGTGTGCTAGCGGATGCAAAAGAGTTGGAAAAAATACG
AAGATCTTAATTAATCGTGGTCCCATCGGTGGCGGTTCTTCAGTAGGTACTCATAAAGATGTT
AGAGTAAATGAAGTTAATAATACACTTGGATGGAGAGGTCATTTCTCACCAGAAAGAGTGGTGG
CGTTCCAAATAGGCGATCTTGTACGTTTGTGCTTCAGCAACAAATATACCTATGAAGAGTAAATGA
AAAAAGATAAACCGCAAGGCGCGGTTGTTAGTTACTTAAATACATCGATTTTAAAGCTGTAGTT
GATAAAGCTCTTGAAGGCGATGAAGAAATGTCACCTTATATGAAGCTTTCACATTTCCAGGTAGC
AAAAGAGATGGAAGAAATGTTCAACCGTTTAAAGGGAATGTAGATGCAATATCTTAACCGCGG
GAATGCTGTACAAAGAGATGATGTAATGCTATGCAATAGAGATAGAGTAAATTTCACTGCACTGTG
GTCTGTTATGGTGAAGATGAATCTTCTGCACTTCAGAGAGTGGAGCTGCGGCTTTTACGCGG
AGAAGAAAAAGCTAAGGAATACAAATAA

B.

ATGTATCCTTTACTGATTATCAATCTGGCTCGACCTCAACTAAAAATTTGGTATTTATGACGATGA
AAAAGAGATATTTGAAGAGACCTTACGTCATTCAGCTGAAGAGATTGAAAAATATAACACTATAT
TTGATCAATTTCACTTCGCGCAAGAAATGTTGATTTCTGATCGGTTAAAGCAAACTAGTAAGTGAAGTATGC
AGTCTTTAAATGCTGTAGTTTGGACGCGCGGCTGTTAAAGCAAAATTTGTCAGTGGAGCTTATGC
AGTAAATCAAAAAATGCTTGAAGACCTTAAAGTGGCGGTTCAAGGTGAGCATGCGCAATCTTG
GTGGCATATTTGCCAATGAAATCGCAAAAGAAATCAATGTTCCAGCATACATCGTTGATCCGCTG
GTTGTGGATGAGCTTTGATGAAGTTAGCGGCTAAGCGGAATGGCTGACATTTCCAGTAAAGTAT
ATTCATGCTAATTAATCAAAAGCAGTGTGCTGCTGCTATGCAAAAGAGTTGGTAAAAAATACG
AAGATCTTAATTAATCGTGGTCCCATCGGTGGCGGTTACTTCAGTAGGTACTCATAAAGATGTT
CGCGTGAATGAAGTTAATAATACACTTGGATGGCGAAGTCCATTTCTCACCAGAACGTTAGTGGTGG
CGTTCCAAATGCGCATCTGTAAGCTTTGTTGCTTCAGCAACAAATATACCTATGAAGAGTATGATGA
AAAAGATAAACCGCAAGGCGCGGCTGTTAGTTACTTAAATACATCGATTTTAAAGCTGTAGTT
GATAAAGCTCTTGAAGGCGATGAAGAAATGTTCAACCGTTTAAAGGGAATGTAGATGCAATATCTTAACCGCGG
GAATGCTGTACAAAGAGATGATGTAATGCTATGCAATAGAGATAGAGTAAATTTCACTGCACTGTG
GTCTGTTATGGTGAAGATGAATCTTCTGCACTTCAGAGAGTGGAGCTGCGGCTTTTACGCGG
CGAAGAAAAAGCGAAGAAATACAAATAA

図 24

【図 25】

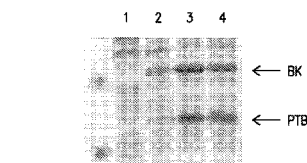


図 25A

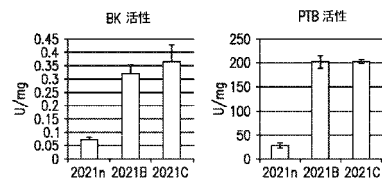


図 25B

【図 26】

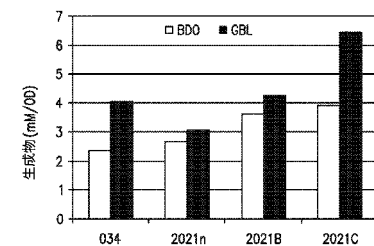


図 26

【図 27】

A.

ATGAATAAAGACACACTAATACCTACACATAAAGATTAAAGATAAAACAAATGGTGAACAT
TAAATTTAAAGAACTACAAAGGATTAATCTTCTGAGTTTCGGAGTATTCGAAATGTTGAAATGCTA
TAAGCAGCGCTGTACACGCAACAAAGATATTACCTCTCAATATACAAAGAGCAACGTGAAATA
ATCATAACTGAGATAAAGAGCGCATTAACAAATAAAGAGGCTCTGGCTACAAATGATTCTGGA
AGAAACACATATGGGAAGATATGAGGATAAAATATTAAACATGAATTTGGTAGCTAAATATATCTC
CTGGTACAGAAATTTAACTACTACTGCTTGGTCAGGTGATAATGCTCTACAGTTGTAGAAATG
TCTCATATGGTGTATAGTGCAATACCTCTTCTCAAGATCCAACTGAACTGTAAATGTGTA
TAGCTAGGCACTGATAGCTGCTGCAAAATGCTGTAGTATTAAACGACACCCATGCGCTAAATAAT
GTGTTGCCCTTTGCTGTTGAAATGATTAATAGGCAATATTCTCATGTGGCGGTCTGAAATCTA
GTAAACAATATAAAAAATCCAACTATGGAGTCTCTAGATGCAATATTAAAGCATCTTCAATAAA
ACTCTTTTGGCGGAATGGGGGTCCAGGAATGTTAAAAACCTCTTAAATCTGTTAAGAAAGCTA
TAGGTGCTGGTCTGGGAAATCCACAGTATTATTGTAGATGATACTGCTGATATAGAAAGGCTGGT
AGGAGCATCATTAAGAGGCTGTTCTTTGATAATATTTACCTGTGATGCAAGAAAGGATATT
TGTCTTTGCAAAATGTTGCAAGATTTTAAATCTCAACATCTTAAATAAATTAATCTGTAAATTA
ATGAAGATCAAGTATCAAAATTAATAGATTACGATTTACAAATAAATAATGAACCTCAAGAAATC
TTTATAAACAAAAATGGGTAGGAAAGATGCAAAATATTCTTATAGATGAAATAGATGTTGAGTC
TCCTTCAAAATGTTAAATGCATAATCTGCGAAGTAAATGCAAAATCATCCATTTGTTATGACAGAAC
TCATGATGCCAATATTGCCAATTTGAAGATTAAAGATATAGATGAAGCTATTAAATATGCAAG
ATAGCAGAACAAAAATAGAAACATAGTGGCTATATTCTTAAATAATAGACAACTCAAAATAG
ATTGAAAGAGAAATAGATCTACTATTTTGTAAAGAGTCTAAATCTTTTGTGCTGTTGTTGTT
ATGAAGCAGAAAGTTTACAACTTTTCACTATTGCTGGATCTACTGCTGAGGAAATAACCTCTGCA
AGGAATTTTACAAACAAAGAGATGTGACTTGCCGCTAA

B.

MNKDLTLPITTKDLKVKITNGENINLKNYKDNSSCFQVFNENVENA.ISSAVHAQKILSLHYTKEQREK
IITSRKJALQNKVILATMILETHMRYEDKILKHELVAKYTPGTEDLTPFWSGDNGLTVVEM
SPFGVIGAITPSTNPTETVICNSIQMLAAGNAVFNHFCARCKVAFVAVENIKAIISCQGFENL
VTTHKNTFMSLDLIIKIGITLILCLOSPQNVITLLNSGKAIIGAGANPNVINDOTADIKAG
RSIIIEGCSFENNLPCIAEKVEYFVFENVADLLISNHLKUNAVIINBDYSKLIDLVLQKHETQEV
FINKKMWGDKAKLPLEIDIVGSPNVKCIICBVNANHPVMTLEHMPILPIVRVKIDIEAKIKYAK
IAEQNRKHSAYIYSKNIIDNLNRFREIETDITFVKNKASFAGVGYEABGGTPTTITAGSTGEGITSA
RNFTRRQRCLVAG

図 27

【図 28 - 1】

A.

ATGAATAAAGACACACTAATACCTACAACTAAAGATTTAAAGATAAAACAAATGGTGAACAT
TAAATTTAAAGAACTACAAAGGATTAATCTTCTGAGTTTCGGGCTATTCGAAATGTTGAAATGCTA
TAAGCAGCGCTGTACACGCAACAAAGATATTATCCCTCTCAATATACAAAGAGCAACGTGAAATA
ATCATAACTGAGATAAAGAGCGCATTAACAAATAAAGAGGCTGCTGGCTACAAATGATTCTGGA
AGAAACACATATGGGACGCTTATGAGGATAAAATATTAAACATGAATTTGGTAGCTAAATATATCTC
CTGGTACAGAAATTTAACTACTACTGCTGCTGGAGCGGTGATAATGCTCTGACAGTTGTAGAAATG
TCTCCATATGGTGTATTGGTGCAATAACTCTTCTACGAATCCAACTGAACTGTAAATATGTAA
TAGCATAGGCAATGTTGCTGCTGGAATGCTGTAGTATTAAACGACACCCATGCGCTAAATAAT
GTGTTGCCCTTTGCTGTTGAAATGATTAATAGGCAATTAATTTCTCATGTGGCGGTCTGAAATCTG
GTAAACAATATAAAAAATCCAACTAGGAGTCTCTGGATGCAATATTAAAGCATCTCTTCAATAAA
ACTCTTTTGGCGGAATGGGGGTCCAGGAATGGTAAACCTGTTAAATTTCTGTTAAGAAAGCTA
TAGGTGCTGCTGCTGGAATCCACAGTATTATGCTGATGATATGCTGATATAGAAAGGCTGGT
CCTAGCATCATTGAAGGCTGTTCTTTTGATAATAATTTACCTTGTATTGCGAAGAAAGAGTATT
TGTTTTTGAGAAATGTTGCAGATGATTAAATATTAACATGCTAAAAATAATGCTGTAAATATAA
ATGAAGATCAAGTATCAAAATTTAATCGATTAGTATTACAAAAATAATTAAGAACTCAAGAAATAC
TTTATAAACAAAAATGGGTAGGAAAGATGCAAAATATTCTCGATGAATAGATGTTGAGTC
TCCTTCAAAATGTTAAATGCATAATCTGCGAAGTAAATGCAAACTCATCCATTTGTTATGACAGAAC
TCATGATGCCAATATTGCCAATTTGACGCGTTAAAGATATTCGATGAAGCTATTAAATATGCAAG
ATAGCAGAACAAAAATAGAAACATAGTGGCTATATTATTTCTCAAAAAATATGCAACACTGAAATCG
CTTTGAACGTGAAATAGATCTACTATTTTGTAAAGAGTCTCAAAATCTTTTGTGCTGTTGTTGTT
ATGAAGCAGAAAGTTTACAACTTTTCACTATTGCTGGATCTACTGCTGAGGAAATAACCTCTGCA
CGTAATTTTACACGCCAAGCTGCTGCTGTACTTGCCGCTAA

B.

ATGAATAAAGACACACTGATCCCTACAACTAAAGATTTAAAGATAAAACAAATGGTGAACAT
TAAATTTAAAGAACTACAAAGGATTAATCTTCTGAGTTTCGGGCTATTCGAAATGTTGAAATGCTA
TCAGCAGCGCTGTACACGCAACAAAGATATTATCCCTCTCAATATACAAAGAGCAACGTGAAATA
ATCATAACTGAGATAAAGAGCGCATTAACAAATAAAGAGGCTGCTGGCTACAAATGATTCTGGA
AGAAACACATATGGGACGCTTATGAGGATAAAATATTAAACATGAATTTGGTAGCTAAATATATCTC
CTGGTACAGAAATTTAACTACTACTGCTGCTGGAGCGGTGATAATGGTCTGACAGTTGTAGAAATG
TCTCCATATGGTGTATTGGTGCAATAACTCTTCTACCAATCCAACTGAACTGTAAATATGTAA
TAGCATAGGCAATGTTGCTGCTGGAATGCTGTAGTATTAAACGACACCCATGCGCTAAATAAT
GTGTTGCCCTTTGCTGTTGAAATGATTAATAGGCAATTAATTTCTCATGTGGCGGTCCGGAATCTG
GTAAACAATATAAAAAATCCAACTAGGAGTCTCTGGATGCAATATTAAAGCATCTCTTCAATAAA
ACTCTTTTGGCGGAATGGGGGTCCAGGAATGGTAAACCTGTTAAATTTCTGTTAAGAAAGCTA
TAGGTGCTGCTGCTGGAATCCACAGTATTATGCTGATGATATGCTGATATAGAAAGGCTGGT
CCTAGCATCATTGAAGGCTGTTCTTTTGATAATAATTTACCTTGTATTGCGAAGAAAGAGTATT
TGTTTTTGAGAAATGTTGCAGATGATTAAATATTAACATGCTGAAATAATAGCTGTAAATATAA
ATGAAGATCAAGTATCAAAATTTAATCGATTAGTATTACAAAAATAATTAAGAACTCAAGAAATAC
TTTATAAACAAAAATGGGTAGGATAAGATGCAAAATATTCTCGATGAATAGATGTTGAGTC
TCCTTCAAAATGTTAAATGCATAATCTGCGAAGTGAATGCCAATATC

図 28

【図 28 - 2】

ATTTGTTATGACAGAACTGATGATGCCAATATTGGCAATTTGGCGGTTAAAGATATCGATGAG
CTATTAAATATGCAAAAGTTGACAGAAACAAATAGAAACATAGTGCTATATTATTATAGCAAAAT
ATCCAGCAACCTGATCGCTTTGACGCGTGAATTCGATCTACTATTTTGTGTAAGAGATGCTAAATC
TTTTGCTGGTGGTGGTATGAAGCAGAGGATTACCACTTTTCACTATTGCTGGATCTACTGGTG
AGGCGATAACCTCTGACGTAATTTTACCGCGCAACCTCGCTGTGACTGCGCGGCTAA

C.

ATGAATAAAGACACGCTGATCCCGACCACTAAAGATCTGAAAGTAAAAACCAATGGTGAACAT
TAACTGGAAGAACTACAAAGATTAAGCAATGTTTCGGCGTATTGCAAAATGTTGAAATGCTA
TCAGCAGCGCGGTACACGCAACAAAGATCTCTGCTGCAATTAACAAAGAGCAACGTGAAATA
ATCATCACTGATGATCCGTAAGCGCGCATTAACAAATAAAGAGGCTGCTGGCAACAAATGATTCTGGA
AGAAACACATATGGGACGTTATGAGGATAAAATACTCAAAACATGAAGTGGTGGCAAAATATACGC
CTGGTACTGAAGATTAAACCAACCACTGCTGGAGCGGTGATAATGGTCTGACAGCTTTGTTGAAATG
TCGGCTATGGTGTATTATTGGTCAATTAACGCTTCAACCAATCCAACTGAAACGCTTAATTGTTAA
TAGCATTTGGCATGATTGCTGCTGGAATGCGGTAGTATTAAACGCTCAACCTGCTGCTGCAAAAT
GTGTTGCCCTTTGCTGTTGAAATGATCAATAAAGCGATTATTAGCTGTGGCGGTCCGGAATCTG
GTAACCACTATATAAAAAATCCAAACCAATGGAGTCTGCTGATGCTGATTAATGAGCATCTTCAATCAA
ACTGCTGTGCGGCACCTGCGGCTCCAGGAATGGTGAACCACTGCTGAATAGCGGTAAAGAAAGCGA
TTGGTGTGCTGGTGGTGGAAATCCACAGTATTGCTGATGATGCTGATATTGAAAAAGCGGGT
CGTAGCATCATTGAAGGCTGTTCTTTTGATAATAATTTACCTGATTGCGAAGAAAGAGTATT
TGTTTTTGAGAAATGTTGCGGATGATCTGATCTCTAACAATGCTGAAATAATGCGGTGATTATCA
ATGAAGATCAGGTTAGCAAACTGATCGATCTGGTATTACAAAAATAATGAACTCAAGAAATAC
TTTATCAACAAAAATGGTAGGTAAGATGCAAACTGTTCTCGATGAAATCGATGTTGAGTC
GCCCTTCAAAATGTTAAATGCATTATCTGCGAAGTGAATGCAATATCCATTTGTGATGACCGAAC
TGATGATGCCAATTTTGGCGATTGTTGCGCTTAAAGATATGATGAAGCGATTAATATGCAAAAG
ATGCGAAGCAAAATCTGAACATGAGTCTCATATTATAGCAAAATATGCAACCACTGATGCT
CTTTGACGCTGAAATCGATACCACTATTTTTGTGAAGATGCTAAATCTTTTCTGCTGGTGTG
ATGAAGCAGAGGTTTACCACTTTCACTATTGCTGGAAGCAACCGGTGAAGGCATTACCTCTGCA
CGTAATTTTACCGCGCAACGCTGCTGTGATCTGCGCGGCTAA

D.

ATGAATAAAGATACGCTGATCCCGACCAACAAAGATCTGAAAGTGAACCAACCGCGCAAAAT
CAACCTGAAAACTATAAAGATAACAGCAGTTGCTTTGGCGTGTGTTGAAACGTTGAAAAACGCCA
TCTCCAGCGCGGTGCAATGCGCAAAATTTCTCTGCTGATTACACAAAGAGCAGCGTGAAAAA
ATTATCAACCGAAATCCGTAAGCGCGGCTGCAAAACAAAGAGTGTGGCAACCAATGATCCTGGA
AGAAACGCTATGCGGCGTTATGAAGATAAAATTTCTGAAACATGAACCTGTTGGCGAAATACACGC
CGGCGACTGAAGATCTGACCAACCAACCGCTGGAGCGGCGATAACCGCTGACCGGTGGTGAGATG
TCGCTTATGGCGGTGATTGGCGCGATTACGCGCTCAACCAACCGCACCGGAAACGGTGATTGTTAA
CAGCATTTGCGATGATGTTGCGCGGTAATGCGGTTGTTTAAACGCTATCCCTGCGCGAAAAAT
GTGTTGCCCTTTGCGGTGAGATGATGACAAAGCAATATCAGCTGGCGCGCGCGGAAATCTG
GTGACCACTCAAAATCCCAACCAATGCAAGATCTGATGCAAACTCTTCAACATCTCTTCACTCA
ACTGCTGTGCGGCACCGCGCGCGCGGCTGTTGAAACGCTGCTGAACAGCGGTAAAAAGCGA
TTGGCGCGCGCGCGGTAAACCGCGGTGATTGCTGATGACACCGCGGATATT

図 28 (続き)

【図 28 - 3】

GAAAAAGCGGGCGGTAGCATTTATTGAAGGCTGTTCTTTTGATAACAACTGCCCTGCATTGCGCA
AAAAAGAGTGTGTTGCTTTTGAAACGTTGCGCGATGATCTGATACGCAATATGCTGAAAAACAAAG
CGGTGATTATCAATGAAGATCAGGTAGCAACATGATCGATTCTGGTGTGCAAAAAACAAAGAA
ACGAGGAAATATTATTATCAACAAAAATGGTGTGAAAGATGCAAACTGCTGATGAAAT
CGATGTTGAAATCGCCGCTCAACCTGAAATGTTATTATCTGCAAGTGAACCGCAACCATCCGTTTG
TGAATGACCGAATGATGATGCGGATCTGCGGATGTTGCGCGTGAAGATATCGATGAAGCGGATT
AAATATGCGCAAAATGCGGCAACAAACCGTAAACCGACCGGCTATTATTATGACGCAAAATATCGA
TAACCTGAAACCGCTTGAACGTTGAATCTGATACACCTTTTGTGCAAAATATGCGCAAAATGTTTG
CGCGCTGTTATGAAGCGGAAAGGTTTACCACTTTACCACTTCCGCTGACACCGCGGCGGAGGC
ATTACACGCGCGCTAATTTTACCGCGCGCGGTGCTGCTGCTGCGCGGCTAA

図 28 (続き)

【図 29】



図 29

【 図 3 0 】

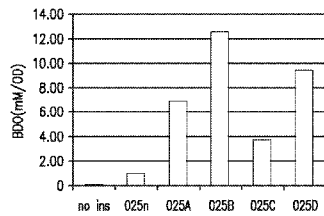


图 30A

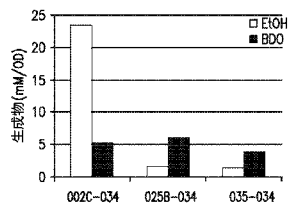


图 30B

【 図 3 1 】

A.

ATGAAGCTCCGTAATAGGACCAATTTAAAGCAATTAATAAAGAGCTTGAAGAGCCATCT
TATTTCATATGCGAAGATTAAGTCCGCATTAAGACCTCGGGTGTTCAGCATACGACGTTCGAC
CCGCTCTAGCGGATAGGCGCATAAACCAAACTCTCTTTAAATCCCTCGGCATACGGATCCGGA
ATTGTGAAGAAGTTCGCTCGGSGGGTAACCATTAAAGAGGGAGACCGCGTGGGATTCCTGT
GTATTATTCTCGCTGCTGAGCATTCGCAATATTGTTAAGCGGACAGAGCAATATTGTGACACT
ACAAACAAACCGCGTCTCGGCATCGCGGGTGTTCAGCAATATTTCGAGCATTCGCGCAGCATAT
GTTGATGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
TACTTTAAAGCTCTTAAAGTACAGATACAAAGCCGGAGATAGGGTAGCATATTCGACCAT
CGGGCTCTGACATGTTGCGCTCGCATGATGCGCAAGAGCATGGGGTGTTCAGTGTTCGACATGGAT
ATCCGGCATCGCAAACTCGAATCTCGAAGAGAGTCTGGGGCCGATCTGTTGTGAAATCTCGCAAA
AAGAAATCGCGCCAAATTTATGAAGAGAGAGTCCGCGAGTACACGCGGGTGTTCGACACTG
TATCTAAACATTCGTTTCAATTCGCGTACAATCTATATCGAGAGGGCGGACCGTGGTCTTTCG
GGAATACCGCGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
TATGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
TAAATACCATTTGAAGATGCGCATCTTGAAAGAAATTAACAGATATTTCGACGATCTGTAAAG
GGAGAAATTAACGACGGGCTGTTTAAAGCTTGAAGAAATTAATTAATTA

B.

MKAADVVEQFKEPLKIKVEKPSISYGEVLVIRKACGVCHTDLHAAGDWPVKPLPLIPGHGSGV
 IVVEVPGHVLTKVQDVRGIPWLYASQKCEYCLSSQGEALCEHQNGAVSVQDGVAEYCRAPAD
 VVEVPGHVSFEAAAPVIFCAGVTTAKYKLVGTGKGEWAIVYIGGLGHVAVQYAKMGLHVAVD
 IGDEKLELAKELGADLVNPAKENAAQFMKEKVGSGVAAVVTVASKPAQFSAYNSIRRGTCVLV
 GLPPEMPPIPIFDTVLNGIKIGSVIGTRKDLQEALQFAABGKVKTIIEVQPLEKINEVFDRLM
 GEINRGVVLTLNNN

图 31

【図 3 2】

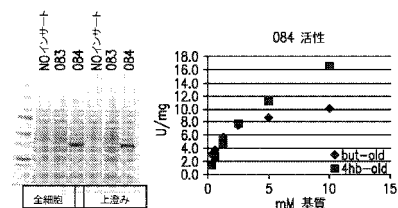


图 32A

图 32B

【 3 3 】

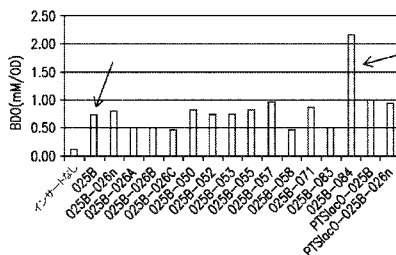


图 33

【图 3 4】

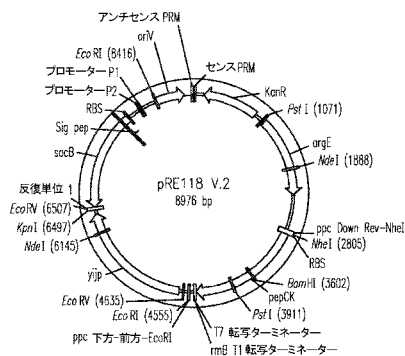


图 34

【図 3 5 - 1】

 Δ

ATGCTTATCGAAATCAAAGTACCGGACATCGGGCTGATGAAGTTGAATCACCGAGATCTTGTC
 AAAGTGGCGGCAAAAGTTGAAGCGGAACGATCGCTGATACCCGTAGGAAGCGCAAAAGCTCTATG
 GAAGTTGGCTCTCCGCGGGGGTATCTGTAAAGAACCAAGCTCTGTTGGCGATGAACCAACCG
 ACCGGCCGACATGTTATGTTTCCGCGCGACGCGTCAGACGAGCGCTGCACTGCTGACCGAG
 AAGAAGAAAGAAAGCAAGCATCCGTCAGCAGCAGCAGCGCTCGCGCGCAAAAGAGTTAACGTT
 CCGGATATCGGCGACGACGAATGTGAAGTGAACGAAATCTGTGTAAGTTTGGCGATAAAGTTGA
 GCTGAACATGCTACCAAGTAGAAGGCCAACAGCTCTTGTAAGTTTCCGCTGCTTGTCTG
 GCACGCTGAAAAGAGATCAAAGTGAACGTGGTGAACAAAGTTGTCACCGCTCGCTGATATGGTCT
 TCGAAGCTCGGGTGAAGCGGGCGGCGCATCTCGCGCGCTAACACGAAGCAAGCATCGGCGACGG
 GCGCTTCACGACGCGTGGCTGCGCTGAAGAAAGTAATCTTCGATATCGGCTGCGGAGCAAGTTGAA
 GTACGTGAAGTAGTGTGAAGTTGGCGCAAAAGTTGCGCTGAACGACTCACTGATCCAGCTAGAA
 GCGGCAAAAGCTCTATGGAAGTTCTCGGCGCGCTTGCAGGCGTCGTAAGGAAAGCTAAGAACTAAC
 TTGGCGATAAAGTGAATAATGGCTGCTGTATTATGCTTCAGAATTGAAGCGGACGCGCTGGG
 CGACGCTCTGCGAAAGCGAAGGAGCGGACGCGGCGACCGGCAAGAAAGCTGAAGCCCGGACGAG
 AGCAACCGCTGCGAAAGCGGCGCAAACTGATTAATTGCTGAALAACGCTTAATGCTTACGCGAC
 CTGCTGATCGCGCTCTGGCAGCGAGTTTGGTGTAACTTCGAAAGTGAAGGCGACCTGACCTACG
 TAAAGTCGTATCTCGCGCGAGCATCTGACGCTACGTGAAGAAAGTATCAACGCTGCGAAGC
 AGCTCGCGGACGAGCTCGGCTGGTATCCCTGGCATCTGCTCCGTCGGCCAGAGTGGACCTACGACA
 GTTTTGTAAGTCAAGTAAGTGAAGTACGGCTCGGCGCAATCGAAGATCTGCTGGCAACTGACGGC
 TAACTGGTAATGATCGAGTGTATTACTATCGCAAAAGTATGATACCAAGTGTGGAAGCGCTC
 GTAAACAGCAAGCAAGCAAGCGCAAGAGTAAGCTGGATGTAAGATACCCCGGTTGTCTTC
 ATATGAAGCGCTTGTCGACATCTTCAGCAAGCTGCTTCGATTAAGTTGCTGCTCGGAAGCG
 GTACGCTGTGACCTGGAAGAAATACATCAATCGTGTGGCGGTGATGCCAAGCAAGCTGTCTG
 TTGTTCCGATATCAAGACGCTCAACAAAGAAAGCATCATCGACTCTGTCGAGCTGATGACATCT
 TTGTAAGAAAGCGCTGACGTAAGCTACTGCTGCGGGCGAAATCGACGGCGGTTGCTTCAACTCT
 CAGCATCGCGCGCTGGTACTACCACCTCGCGCGCATTTGTGAACGCGCGAAGTGGTACTCTC
 GCGCTTCCAGCTCGCGAGTGAGCGCGGTGTGAAGTGTGAAGAGTTCTGTCGCGCTGTGATGCTG
 CGAATTTCTCTCTCTCGACCAACCGGTCGATGACGCGTGTGATGTCGGGCTTTTCAATCAACATT
 AACACAAAGCTGTGTCGATATCGCGCTCTGGTGATGAAGTAAAGAGCGCGGCCCAACCGCGCGCT
 TTTTCTGGAATCTCAAGATATGTAGGATTATAGCAAGTGAAGCAAAATCGTGTCCGTTTGTGT
 TTAATAATTGTGAACATTTGTAAATATCCAGCGAGTGAAGCAAGCGCGGTGAGTGTGGAGTTAT
 TCTCACATCCCTATGGATTTCTGGTGCAAGCAAGTGAAGCAAGCGCGTGAAGTCCCGAGGACTTAC
 TAAGTAAGTACTGGGTGAGGGGCTGACGAATACGCGCTCGGCGCTGAAGACGACGGGTATG
 ACCCGCGGATATGGAATATAGAGCTATAGTAGTACTGAATCACTGAATACCGAGTCTGTGATCT
 GGGGCGACCGCGGACGCTTACCGCTGCTCTCGAGCTGGCGATTTAGGCTGTGAAGAACGTAATCG
 TAGAAGCTTACAAAGCACTTGGCGGTGTTTGTCTGAAGCTGGGTTGTATCCCTCTAAAGCGCTGCT
 GAAAGTGGCGAAAAGTTTCAAGAAAGCGAAAGCCTGGGCGAAGCAAGCACTGTTTTCGGCGAAC
 CAAACATGCATTTGCAAGATCTCGACATCTGGAAGAAAGCACTCATCACTAGCTGACGCGTGGTCT
 GCTGGTGATCGGCAAGAGCTGTAAAGTGAAGGCTGTAAAGCTGGGTAAATATACCGGCGATA
 CACCTCTGCGGTGAGGCGAAAGCGCAAAACGCGCAAGCTGATCAACTCTGCAACAGGCATCATCGGCG
 GGGTCTGCTCGCATAGCTGCGTTTCTTCGCGATGAAGATCCGCGCGCTATGGAGCTACCGACG
 CGGCTGGAACTGAATITCGGCAAGAACGCTGTGTTGATGGCGCGGGTATCATCGGTTGTGAAG
 ATGGGCTGATATACCATCGCTGGTGTTCAGAGATTCAGCTGTGGGTGGAATTTGTCACCAAGCTTAC
 CGGCTGCCGCAAGAGCGGTGTGAAGTTCTTCCAAACGATCATCGCAAGAAATTAACCTGATG
 CTGGAAGCAAAAGTGAAGCTGGTTGAAGCGAAAGAAAGCGATTTACGTTTTCCTGATGAAGTGA
 AAAGCACGCGCGGACGAGCGAGCTTACGACGACGCTGTGTGCTGATCGGCGCGTACCAAGTAA

【図 35 - 2】

AAAACTCGATGCAAGTAAAGCTGGCGTGAAGTTGACGATCGCGCTTCATCCGCGTTGACAAA
 CAAATGCGCAACGTCGCCACATCTTTGCTATCGCGATATGTCGGTCAGCCGATGCTGGCGC
 ACAAGGTGTCATCAAGGCCAGTTCGCCGAGAAGTTATCTCCGCTCGAAGCACTATTCGATCC
 GAAAGTATCCCATCCATCCCTACACTAAACGAGAAGTGGCATGGCTGCTGACCGAGAAAGA
 AGCGAAAGAGAAAGCATCAGCTACGAAACCGCACTTCCTCGGGCTGCTTCGCGCGTCTGCT
 CGCTCTGACTGGCAGATGGTATGACCAAACTGATCTCGACAAGAGACCCACCGTGTATCGGC
 CGCGCGATTGTCGGCACCAACGGCGCGAGCTGCTGGGTGAGATCGCGCTGGCTATCGAGATCGG
 CTGTGACGCTGAAGACATCGCCCTGACCATCCAGCTCACCCTGACTCTGCACGAGTCCGTTGGCTG
 GCGCGGGAAGTGTTCGAAGGCGCATCAGCGACCTGCCAAACGCCAAGCGAAGAAAAGTAACT
 TTTTCTTCAGGAAAAAGCATAAGCGGCTCCGGAGCGCGCTTTTATGCTGATGTTTGAACATA
 TGTCACTGTTTATAAACCGCTACACCTCATACATACTTTAAGGCGGAATTCGCAGATATCCATCACA
 CTGGCGCGGCTCGAGCATGATAGCACATCCGGCAATTAAGGCGGCTAACCCACCGCGCTT
 TTTTACGCTGCAATTTACCTTCCAGTCTTCTGCTCCAGCTTACAGAGAGCGTTCCGATACCTGTA
 CCGTGTCTGCTTATTCAGCTGACAGTATGTTACTGCTGTTAGACGTTGTGGCGCGCTCTCTGAA
 CTTTCTCCGAAAAACCTGACGTTGTTCAAGTGATGCCGATTGAACACGCTGGCGGCGGCTTATCAG
 TTGCTGTTGATTGATGCGCGCTGCTGACTTTTCTCT

【図 36】

		セクション1									
EC-IpdA	(1)	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90
KP-IpdA 突然変異	(1)	MMSTEIKTQVVVLGAGPAGYSAAFRCADLGLTIVIVERNTLGGVCLNVGCT									
		セクション2									
EC-IpdA	(53)	53	60	70	80	90	100	110	120	130	140
KP-IpdA 突然変異	(53)	PSKALLHVAKVIEEAKALAEHGVFGPEKPTDIDKIRTWKEKVINQITGGLAG									
		セクション3									
EC-IpdA	(105)	105	110	120	130	140	150	160	170	180	190
KP-IpdA 突然変異	(105)	MAKGRKVKVNLGKFTGANTLEVEGENKTVINFDNATIAAGSRPIQLPFI									
		セクション4									
EC-IpdA	(157)	157	170	180	190	200	210	220	230	240	250
KP-IpdA 突然変異	(157)	PHEDPRVWDSTDALELKSVPRVLMVGGGIGLEMGTVYHALGSEIDVVEMF									
		セクション5									
EC-IpdA	(209)	209	220	230	240	250	260	270	280	290	300
KP-IpdA 突然変異	(209)	DQVIPAADKDIKRVFTKRISKKNLMLEKVTAVEAKEDGIYVMEGKKAPA									
		セクション6									
EC-IpdA	(261)	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350
KP-IpdA 突然変異	(261)	EPQRYDAVLVAIGRVPNGKNLDAGKAGVEVDDRGFIRVDKQLRTNVPHIFAI									
		セクション7									
EC-IpdA	(313)	313	320	330	340	350	360	370	380	390	400
KP-IpdA 突然変異	(313)	GDIVGQPLAHKGVHEGHVAAEVJSLKHYFDEKVPISYATYKPEVAVWGLT									
		セクション8									
EC-IpdA	(365)	365	370	380	390	400	410	420	430	440	450
KP-IpdA 突然変異	(365)	EKEAKEKGISYETATFPWAASGRATASDCADGMTKLIFDKETHRVVGGAI									
		セクション9									
EC-IpdA	(417)	417	430	440	450	460	470	480	490	500	510
KP-IpdA 突然変異	(417)	TNGGELLGEIGLAIRMGCDAEDIALTIHAHPTLHESVGLAAEFVFGSITDLP									
		セクション10									
EC-IpdA	(469)	469	476	483	490	497	504	511	518	525	532
KP-IpdA 突然変異	(469)	NPAKAKK-									

図 36

図 35(続き)

【図 37】

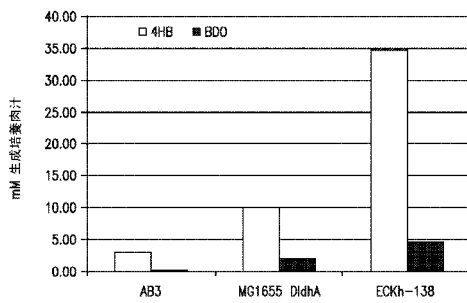


図 37

【図 38】

ataataacatatgaccatgcagattacggcctataagccaggcgagatatgactatataattctcatcataatgctttgta
 gtatctctgctgcgacttaataaagagagattgtagtgaagctgacaacctttgatctttactctgctgaatggcgaagtg
 ccgaagagcgagggtgtatataaagcaagaaacatccgttaagactttctatctggcgattaccggaggtgtttcatctcaatgcattc
 accatggcagaggcacaGAAGGTAGGTGTTACatgfcagaagctttacacaaatgagtgatctattat

図 38

【図 39 - 1】

AAGAGGTAAGAATAATGGCTATCGAAATCAAAGTACCGGACATCGGGCTGATGAAGTTGAAAT
 CACGAGATCTCGTCAAAGTGGCGCAAAAGTTGAAGCGGAACAGTCGCTGATCACCCTAGAAGG
 CGACAAGCTCTATGGAAGTTCCGCTCCGACGGCGGTTATCGTTAAAGAGATCAAAGTCTCTGTT
 GGGCATAAAACCCAGACCGGCGCATGATTATGATTTTCGATTCCCGGACGGTGCAGCAGACGCT
 GCACCTGCTCAGGCAAGAGAAGAAAGAACGAGCTCCGGCAGCAGCACCAGCGCTGCGCGGCG
 AAAAGACGTTAACGTTCCGATATCGGACGACGAAAGTTGAAGTACCGAAATCTGGTGAAGT
 TGGCGATAAGTTGAAGTGAACGATCGCTGATCAGCTAGAAAGCGCAAGGCTCTATGGAAGT
 TCCGCTCCGTTTGTGCGACCGTGAAGAGATCAAAGTGAAGTGGTGAAGTGTCTACCGCG
 CGTGATGATGTTCTTCAAGTCCGGGTGAAGCAGCGCGCGACGCTCCGCGCGTAAACAGGA
 AGCAGCTCCGGCAGCGGCGCTGACAGCGGCTGGCTGAAGAAAGTTAACGTTCCGGATATCGG
 CGTGACGAAGTTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGGCGCAAAAGTTGGCGCTGAACAGT
 CACTGATCACCCTAGAAGCGCAAAAGCTCTATGGAAGTTCCGGCGGCTTTCAGCGCTGCTGA
 AGGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGT
 AAGCGCAGCGCTGCGGCGCTGCGGAGCTCTCGGAAACAGGAAGCGGCGCGCGCGGAGCAAAA
 GCTGAAGCGCGGCGCAGCAGCAGCTGCGGAAAGCGGAAGCAAACTGAATTCGCTGAAGCAAG
 CGCTTATGTTACCGGACTCCGCTGATCCGCGCTGCGCAGCGAGTTGGTGTAACTTGGCGAA
 GTGAAGGCGACTGCGGTAAGGCTGATCTCGCGCGAAGAGCTTCAAGCTTACGTAAGAAAGCT
 ATCAACGTCGAAAGCAGCTCCGCGCAGCGCTGCGGCTGATCCCTGGCATGCTGCGGCGGCG
 AAGGTGGACTCAGCAAGTTTGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGT
 GGTGCGAACTGAGCGTAACTGGGTAATGATCCGCTGTTACTCACTTCGACAAAACGATATCA
 CCGAGTTGAAGCGTTCGTAACAGCAGAAACGAAGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
 ATCAACCGGTTGTCTTCAATGAAGCGGTTGCTGAGCTCTTGAAGCAGATGCTGCTTCAATAG
 TTCGCTGTCGGAAGCAGGTCAGCGTCTGACCTGAAGAAATACATCAACATCGGTGCGCGGGA
 TACCCGCAACGGTCTGTTTCCGCTATCAAGACGCTCAACAGAAAGGCATCATCGAGCTGCT
 CGCGAGCTGATGACTATTTCAAGAAAGCGGCTGACGCTAAGCTGACTGCGGCGGCGGCGGCGG
 CGGTTGCTTCACTTCCAGCATCGCGGCGGCTGGTACTACCCACTTCCGCGGCTGTTGAACCGG
 CGGGAAGTGGCTATCTCGCGGTTCCAAGTCCGCGGATGAGCGCGGCTGGAATGTTGAAGGTT
 GTGCGCGCTGATGCTGCGGCTTCTCTCTCTCTCGACACCGGCTGATCGAGCGTGTGCTGCTG
 CCGGTTTCACTATCATTAACAACAGCTGCTGACATTCGCGCTTGGTATGTAAGTAAAGAG
 CGGCGGCAACGCGCGCTTTTCTGTTAATCTCATGAATGATTAGGTTATTAGCGAATAGACAA
 ATCGGTTGCGGTTTGAAGCGGCGGAGATATGATCTATATCAATTTCTCATCTAATGCTTTGTTA
 GTATCTGCTCGCGGCTTAATAAGAGAGAGTATGCTTCTATATCACAGCAAGGCTAGGTGTTA
 CATGATGAGTACTGAATAACAACTCAGGCTGCTGCTGCTGCTGCGGCGGCGGCGGCGGCTTCTG
 AGCTTCCGTTGCGGCTTATGCTGGAAGCGCTCATGCTGAGAAAGTTACAGCCCTCGGTGGT
 GTTGTCTGAAGCTGGTGTATCCCTTAAAGCGCTGCTGACGCTGGCAAGGTTATCGAAGAG
 CGAAGCGCTGCGGCGAAGCGGCTGTTTTCGCGCAACCGAACTGACATTGACAAGATCCGCA
 CTGGAAGAAAGAGTCACTACGCTGACGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
 TGAAGTGTGTTAAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
 GCAAAACCGTATCACTTCAACAGCGCTATCATCGGCGGCTTCCGCTCGGATTACGCTGCTGCT
 TATCCGCTGATGAAGATCCGCGTATGGGACTCACCGGCGCTGGAATCTGAACTCTGACCGAA
 ACGCATGCTGGTATGCGCGGCGGCTATCATCGCTGGAATGGTACCGTATCATGCTGCTGCTGCTG
 TCGAGATTGACGCTGGTGAAGTTCGACCGGTTTCCGCGGCTGCGGCAAAAGCGCTGCTGCTG
 AGTCTTCAACAGCATCAGCAAGAAATTAACCTGATGCTGGAAGCAAGGCTGCTGCTGCTGCTG
 GCGAAAGAGCGGTTTACGTTTCCATGGAAGGTAAGAAAGCAACCGCGGCAAGCGGCGGCTG
 CGACGAGTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
 CGTGAAGTTCGAGTATGCGGCTTCTCGGCTTACGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG

【図 4 3】

AAGCCACAGCAGGATGCCACTGCAACAAGGTGATCACACCGGAAACGGATGGAGAATGGAGC
CTATGCCGTGATGGGGAACGGGATGGTCTGTAGTTCAGATTAAACAGGCTCTTTGTTTTCACATT
CTATCATGAATAAGCCACATGCTGTTCTTATTAATTCCTGGGACTACGGGCACAGAGGTTAACT
TTCTGTTACTGGAGACGTCGGGATTCCTCTCCGCTGCTTGGGGTGCAGACAGGCTCTCTTCT
ATAACTGCGCGTCATGCAAAACACTGCTCCAGATGCGAAACGACAGCTTACAAAGCTGGTGGCT
GGGATTGACGGTGTTCGGGAGACCTGGCGGAGTATAGGCTGTTCAAAAATCATTACAATTA
CCTACATATAGTTTGGGTTTATCTCTGAACAGTGATCAGGTCACGATAACAACATTATTAAT
TTTTAATCATTAATTTGACAATCATTCAACAAAGTTGTTACAAACATTACCAGGAAAGCATATAAT
GCGTAAAGATTGAAGTCGGTATTTCACCTAAGATTAACTTATGTAAACAGTGTGGAAGTATTGACC
AATTCATTGGGACAGTATTAGTGGTAGACAAGTTAATAATTGGATTGCTAAGTACTTGATTCCG
CATTTATTCGTCATCAATGATCTTACCTGCAAGCGCCAGAGCTGTCACCCAGGTTTCCCTCT
TTCAAGAGCGGCGGCAAAATAAAACGGGTAAGCCAGGTTGATGTGCGAAGCAAAATTA
GTTCCGCGAGCTTACGAATAAGCGCTGAAGGAGACCTTAATGGCTGATACAAAAGCAAACT
ACCTCAACGGGATACAGCTGTTGAACGATGCTGCTGAAGGCAACGCTGGTCAAGATTGTTAT
GATATCCGACTCTCGGTTCAAAGGTTGTTTCACTTTGACCCAGGCTTCACTTCAACCGCATCTG
CGAATCTAAATTAATCTTTATGATGGTGAAGGTTATTTGCTGACCGCGGTTTCCGATCGATC
AGCTGGCGACCGATTCTAACTACTGGAAGTTTGTACATCTGCTGAATGGTGAAGCAACCGATCA
GGAACAGTATGACGAATTAACACTACGCTGACCCGTCATACCATGATCCAGCAGAGATTACCCGT
CTGTTCCATGCTTTCCGTCGCGACTGCATCAATGGCAGTCATGTGTGGTATTACCGCGCGCTGG
CGGCGTTCTATCAGACTCGCTGGATTTAAACATCTCTGACCCGTGAAATGCCGCTTCTCTCTG
CTGTGCAAAATGCCACATGGCGCGATGTTTACAAGTATTCATTGTCAGCCATTGTTTACCC
CGCAGCATCTCTCTACGCGGTAACCTTCTGAATATGATGTTCTCCAGCGCTGCAAGCGTATG
AAGTTAATCCGATTCTGGAACGTGTATGACCGTATTCTGATCTGACGCTGACCATGAACAGAA
GCGCTTACTCCACCGTGGTACCGCTGCTCTCGGTGCGAACCCTTGTCTGTATCGCAGCA
GGATTGCTTCACTGGGACCTGCGCAGCGCGTCTAACGAAGCGCGCTGAATAATGCTGGAA
GAAATCAGCTCCGTTAAACATCTCGGAATTTGTCGTCGTCGAAAGCAAAAATGATTCTTCCG
CTGATGGGCTTCCGTCACCGCTTACAAAAATACGACCGCGCGCCAGCTGAATGCGTGAACCC
TGCCATGAAGTGTGAAGAGCTGGGACGAAGGATGACCTGCTGGAAGTGGCTATGAGCTGGA
AAACATCGCTGCAACGACCGTATTATGGAAGAAAGTACCGGAACGCTGATTCTACTCT
GATATCATCTGAAGCGATGGGTTATCGCTTCAAGTTCACCGTCACTTTCGAATGGCAGCTAC
CGTTGGCTGATGCCACTGAGCGAAATGACAGTGAACGATGAAGATTGCCGCTCCGCTCA
GCTGTATACAGGATATGAAAAACGCACTTAAAGCGATATCAAGCGTATATGTTGATTGCTAAG
TTGTAATATTTAAACCGCGCTCATATGGCGGTTGATTATATATGCTTAAACCAAAAAATTTG
AAAAATAAAAATCAATTAACGACCTATATAGATTAAAAAGAAATAGAACAGCTCAATATATCAG
AACCAATCTTCAATTAATAAACTTCAATGATGCTGATTTAAACCTATGAAATGACGCTATCT
ATACCCCTATATTTTATTCATCATCAACAATCATGATACCAATATTTAGTTTTCATTATTA
AACTAAACATATTTTAAAGCAAACTAAAACTAGCAATATCAATACGATATTCTGGCTAGCTAT
ACCTTATCTATATCTTAAAGGACTGTTATGTTTAAAGGCAAAAAACATTGGCGCACTGCC
CTATCTCTGCTTCACTGCACTGTTATGCTGCTGATGAAGGTTCTGGCGAAATCACTTTAAGG
GGAGGTTATTGAAGCACTTGTGAATTCATCCAGAAGATTAATGATAAAACATAGATCTGGACAA
GTACGACAAACCAATAAAGCGGAGCATATAGCAATAAAGTGGCGTGCAGATCTGCTGATCA
ACGTGATCTGCTGCTTCTGCAACGCTAGCGGAATGCGGTATCCAAAGTTGGCGTAACTTCGA
TAGCAGGCTAAGCAACTGGTCTACGCTTGTGAGCAACACCAAGTGCAGGCGAAGCAACTGG
GGTGGTGTACGACTGATGGCAAAAAATGACGGTAAACATCGTATTAGGTTGACCGCGCAGATCT
TGACCTGGATGAAGCTCATGACAGACAGCGTGAACCTTTTCCGCTGGAT

図 43

【図 4 4】

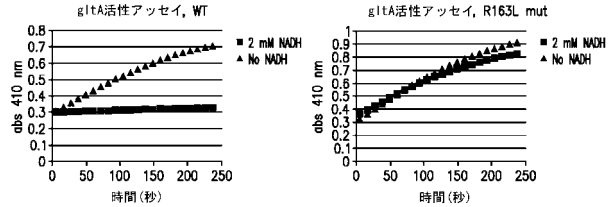


図 44A

図 44B

【図 4 5】

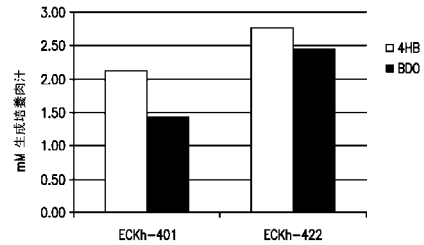


図 45

【図 4 6】

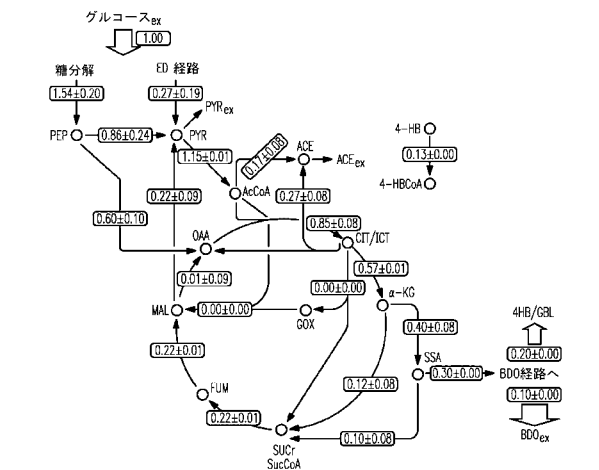


図 46

【図 4 8 - 1】

CGCGATGTGCGACGTACGAAACTGAAAAACCGCTCTACATTCTGCGGACGTCTGATGAAGAAAC
AGTATGGCCGAGCGCGTATTGTCGCAAACTACCGCTTGGCCCGGATTGCGCATCATTTGGG
AACCAGGCTCACTAACCCGGTACGCGACATAAAGGTCAATCTCTAACGCCATCGGTATTCAGG
CCAGTCGGGCACTCCAGCATGACGACGCGGAGTTAACGCTATCGAACTAATGACGACGCCAT
CGGCGATATTTGCAATTGCGCGATAAAGTGAAGAAAGTATACACGAAAGGTTTACGTCGCA
TACCTACGCTCAACCTCGGCGATATTACGCGTGGCGACGCTCTAACGATATTTGCGCTGCTGA
GTTGCATATGGATATTCGTCGCGTCTGGCATGACACTCAATGAATTTGTTGCTCAACGATG
CATTTGGCTCGGTGAGCGAAGCTGCGCGGCTGCTGACGCTGACGAGCTGATCCGCGCATCC
CTGGCTATGAATGCCACCGAATCATCACTGTTGAAGTGGTGAAGAAATGCTCGGAGCAAAA
CGGAAGTGGTGAACACTGACCGAAGCGCGCTTATTAACAGTTATGCGCGACGCTGTTGGG
GCTGCTCAATTAATCAGGCTCATCAACCTGATGAATCTGGAAGCAAGGTTATCAAGCGCAAC
GCGAAGTGAACCCAGGTAATCACTATTTGCTGGCATTAAGAGTGAAGCGGATAAGCGCTC
GGCGCATCCGCGCGCTGTTGCCAACTCCAGTGGCGCAATATGTCGATGCGATCTTCCGATC
TTATCGCACTACAGTGAACGATGCGCAACGCTAGGCGGATAAGGCGCTCGCGCGCATCC
GGCACTGTTGCCAACTCCAGTGGCGCAATATGTCGATGCGATCTTCCGATCTTATCCGACCG
ACAGTGACTCAACGATGCGCAACTGAGGCGGATAAGGCGCTCGCGCGCATCGCGCACTGTTG
CCAACTCCAGTGGCGCAATATGTCGATGCGGATGCTGCGCATCTTATCCGACCTACACTTTG
GTACTTGGGCGGATTTTAACTTCCATAAGTTACGCTTATTAAGCGCTCGTGAATTAATGAC
GTAATTCCTGCTATTTATGCTGTTGCTGAAGCGATTGCGCATGTTGACGCTACCGCTTTTACG
GCTTTATAAAGACGCGAAGCAAGCGGACATTTGCGGCCATCTGAGCAAGGAGGAGAAG
TGCATATGACGACTTAAATAAAGTGGTAAAGAACTGGAAGCTCTTGGTATTTATGACGTAAGA
AGTTGTTACAATCCAGCTACGAGCAATTTGCGAAGAAAGTAAACAGGTTTGAAGGCTTT
GAAAAAGTACTTTAATCAGACTGGTGCAGTGAATAGACAGGATCTTACAGCTGCTTCTC
CAAAAGATAAATATATCGTGTAGATGAAAAACCAAGATAGTCTTGGTGACATCTGAAGC
AAAAACGACAAACGCAATGAACCAAGCTACATGCAAGGTTTAAAGAGCTTGTAAACCAACCA
GCTTCTCTGTAACGCTTATTGTTAGTTGATGTTTCTGTTGTCGAGCGAAGCAACGCTATTGCA
GTACGATTGCTCACTGAAGTACGCTGGCAAGCAATTTGTAATAAATATGTTTATCGCCCACTGA
AGAACCACTCAAAATTTTGAACGAGATTGCTTGAATGAATGTTCTAAAGTAAACCAATCAAACT
GGAAAGAACAGGTTTAAATCAGAAATCTGTTGCTTCACTTGAACGATTCAATCAATC
GGTGTACTTGGTACGCGGTGAATGAAAAAGGTTTCTCAATCATGAACACTTCTTACCAC
TTAAGAGTGTGGTGAATGCACTGCTCAGCTACGCTGTTGAAGTGGCGATAGCAATCTTCTT
CGCTTATCTGCGACAGTAAACAACTTTTCAACGCTGCAACGCTGAATTAATCGGTGACGAT
GAACGCGCTGGGATGATGGGTTCTTAACTTGAAGTGGTGTCTGCGAAGCAATCACC
TTTGAAGAAAAATGAACAGATATTACCGCGCTATCCCTGCGACGATTATTGAAGAACTGGT
TGTTGTCGAGATGTTCTGTTGATTCGATGTTTCAAAACAGAAATACTCCGCTGTTTAC
CAATTTATCATGATAACATTGTAACCACTTCTGTCGAGCTACGCAACTAAGTGTATTC
TTAATGACAGATTTGGGCTTATACCAGGATCTCAATTTGAACAGCAAGCAACTAACTA
CTCTTATCTGTTTACAGCAAAATGAGGAGTACTGGAAGCTGTTATCTGAACCACTCAACT
TTCAGCATGTTTCGTTGCTGCTTCTTAACTTCAACCACTCAATATGAGCAAGTGTATGTA
CGTATGCAAGCAGTGGTCTGAGCTTACTTGAATTAATGTTGGAATGGCAGGCAAGCT
ATCTCAATCAAGATCTGCGGATATGATGCAATCTAGATGGCTCAATGAAAAAGCTGAAA
TGGCGCAATACCAATCTTAACTAGGCAATCTTAAAGGATACAGGCTGATGATCTGCAATCTT
GATCTGCGATACTACGAGATAAAGCAAGTGGCAATGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCT
TTGCGAAAACTTGTAAATATGCAACTAACGAAGGAGGCAAGCTTAACTGAGCTGCTGTA
AGCTTAACTGAAAGCTTCTGAGGCTATCAATAAAGCAAGGCTCAGTGAAGAGCTGGCC
TTTCTTTATCTGTTGTTGCTGTTGAGGCTCTCTGAT

図 48

【図 4 7】

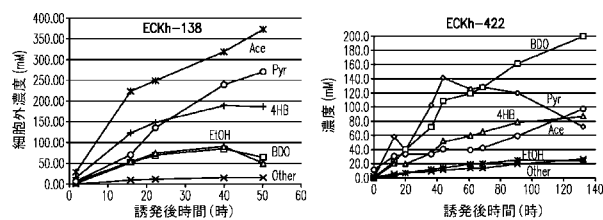


図 47A

図 47B

【図 5 2 - 2】

CGGCTGCTTTCGACAAAGGATATCTGTCTGAGGCGAACAGAGCATCATCTACAAAGGCTGAC
AAGGAAGCAGTTTTCACAGCATTCGCAACACGCGTGCATATTTCTGTACGAAGCCGAAAGAGAT
CGGGCTCGTACGCTATCTTCAAAATGAGCCATCGCAAAAGATAGTAGAGTGTGAGGCTGCGC
TTTATTCGCAAGAAAGCAACATCAATATCCCGAGGGTACCGTATTTCTGTTGAGCTCGCG
GGCTAGGAGCAGAAGCGTATCTGTAAAGAAAGATGTGCCGTAAATGTGCGCCCTCAGCTACA
GCACTTCGAAGAAGGTGTAGAAATCGCAGTACGAGGCTCGCCCAACGAAGTAAACGGCCACACT
GTGCTATCACTCAACAAATCAGGCACATCATCTCTCGAGGATCAGAGCTGACGGTATCTGTAT
CGTAGTGAATGCTCGAGTGCACACTACAGCGCGCTCATCTCAAACGCTTTCGCCGTAACCAAT
ACGCTCGGATCGGATCATGGGTAAATCACTCTATCTCCGAGAACTTCACTTCAAGCACTCTCTCA
ACATTTACGCAATCGCACCCTTGAATTCAGCACTTCACTCCCGATGACAAAGAAATCTGGGAAT
CTAATCTAGCAAGAGGAGAGTGCACATGCAACTTTTCAAACTCAAGAGTGAACACATCACTTTGA
CACTTTTGCAGAAATTTGCCAAGGAATCTGTCTTGGAGAACGCGACTTGGTAATACCAAGAGTTC
ATCTATGAACGSTATATGAAGCATGCGAGCTCCCTGCCATTTTGTATGACAGGAAATATGGG
AAGGCGAGCCTTCTGACGAAATGATGAATAACATCTTGGCAGACATCCGTAATCCAGTTGACCG
CGTAATCGGTATCGGAGGAGGTACGGTATGACATCTCTAACTTTTGGTCTGAAGGATTAAT
GATGACTCTGATGATTGACCGCAAAATACCTTTATCAAAGAGAAAGAACTGATCATTTGTGCCA
CAACATCGCGAAGCGGTAGCGAGGTGACGAACATTTCTATCGCAGAAATCAAAGCGGTACACCA
AAATGGGATTGGCTGACGATGCAATTTGTGAGACCATGCCATCATCACTGAACTTCTGAAGAG
CTTGGCTTCCACTTCTACGCTACGAGTGAATCGATGCTTCTATCATGCCATCGATCATACGATATC
TCTAAAGCGACTCAATTTCTGCTGTCTGTCAGTGAGCGCGCTTGGGACATTAATCTGGAATGATTCA
AGAAATCGCGCAACAGCGCCCTGAATACGCTTCTGAAAGCTGGGAGAAATGATCATGGCCAGCA
ACTATGCGCGTATAGCTTCCGAAATGCAAGGATGAGGAGCGCTCAGCACTATCTCTACCGTGGG
AGGCAACTATCAGCTGCGCATGGAGAAGCAACTATCAGTTCTTACAGAGGTATTCAAAGTATAC
CAAAAGAAAGATCTTTCGGCTATATAGTGAACATCACTGGAAGCTCTCCAAGATACGAACTGCC
AGCCCGAATACGTATATCGAAGCTGGATGAATCTCTGGATGCCCTTCTACCAAGAACTTTGCAC
GAATACGGCATGAAGGACGAAGAGGTAGAGGCTTTCGGGAATCAGTGCTTAAGACACAGCAAG
ATTGCTGCCAACCACTACGTAGAGCTTATGTAGTAGATCGAAGGTATCTACAGAAAGACTTCTAC
TAATCTAGAAAGCTTCTAGAGGCACTCAATAAAACGAAAGGCTCAGTCAAGAGACTGGGCTTTT
GTTTATCTGTTGTTTGGTGCAAGCTCTCTGAGTAGGACAAATCCGCGCTAGACCTAGGCG
GTTGCGCTGCGACAGCTTGAAGCAATGTGTAGCTGAGCTGCTTGAAGTTCCTATACCTTTTA
GAGAATAGGAATCTCGAATAGGAACAAGGAGGATTTATATGAGCACTGGCTAATTCCTCAT

図52 (続き)

【図 5 3 - 1】

TCGAGAAATTTATCAAAAGAGTGTGACTTGTGAGCGGATAACAATGATCTTAGATTCAATTGTG
AGCGGATAACAATTTACACAGAATTCATTAAGCTAGCAAGAGGAGAAAGTGCACATGGCAACAT
AAGTTCAACATTCGGGCAAAAGCAATGCTGTGTGAAGAGATGATCCGCAAGTTCGGCGACGACCC
CTCTCTGGTGCATCCGAGTGGCACGAGTTCTTGGTGTACTACAGCCCGCAACCTTCCCAACCA
GTTGCCGAACCAACCGGGTTACTCGCCACTGCTTGGCCAGCGGCGCTGCTGGCGGCCCGCAG
GCACCCCCAAGCCGCGGACACCGCGCGCGCGGCAACGCGCTGGTTCGCGCATGCGCGCCAA
AACTGGCTTCCCCGCCAGCGGAAGGTGACGAGGTAGCGGTGCTGGCGGCGCGCGCGCGCG
TCGTCAGAAACATGCTCGGCTGTTGGAGTGTGCCAGCGCGACCGCTCGCGGCGTCCGCGCA
AGCTACTGATCGACAACCGGATGCTCATCAACACCGATTGAAGCGGACCCGCGCGCAAGATCT
CGTTCAGCATTTGCTGGGCTACGCCCTGTCAGGCGGTGAAGAAATTCGCGAATGACACCGG
ACTACACGAAGTCGACGCGAAGCCACCGCGGTACCGCGCGCACCAATCTCGGCTGGCGA
TCGACTCTCAAGGCAAGGACGGGAGCGTTCCCTGTTGGTGGCGGCTCAAGCGGTTCGAGAC
ATGCGATTGCGCGAGTTCTGTCACGGCTACGAAGACATCTGACCGCGCGCGCGGCAAGCTG
ACCACTGAAGACTTTGCCGCGTGTGACGATTTGCTGACCAATCCCGGAACCATCGGCAACGCTGAT
GCTGCGCGGCTGATGCCGCGGCGGCGCATATCGCTGCGTGGCGCATGAATACCCGCG
GAGTTTCAAGCGCGCGGAGGAGGATCGCCAGCTGGGATCGGCAAAATGATCACTTTGACG
TTCACCTACGACACCGCATCATCAGGGCGCGGATCGGGCATCTGTCGCGCACACGACGACT
TGCTGCTCTGGATGGCTCTCGGGAGAGTCTTCCGCGAATCGAGCATCCATATCTGCGGCTGG
CTGAGCAGCGCAACACCGGCTGCTGCTGAGCAAGAAAGCTGCTGCTGCAATGATGTCGCGG
CTACCGCAACCGCGGCTATCTGATGGCGATACCGACCGCTGCGGTTGACAAAGCTCGGTTCCG
AGTCAACCGGACTCGAAGTGTGACCGCGGCTGAGCTGGGATCTGATGGGTGTTCAAG
GTGCAAGGCTTTCGCGTGGCGATGACAAGAACTGCGGAGTGTGCGTCTGCTGCGGATGCC
TACTGCGGCGACATCGGCTGGAGTACGCCATATCTCGACCCCGCAACAAAGGAGTGGCTCGAA
CAACGGGTGCGAGACCAAGCAGTCAAAACCATCTGCGCCCAAGAAATATCTCTCAGCAAGCTC
AAGCGCGCGAGGCTTTGAACGCTTCTACAGACCAAGTACGTCGGCGCAAGCGGTTCTCGCTG
GAAGGCGCGAAGCGTATCCGATGATGAGGCGGATCGGCGATCGACCGTGGCTGAGCAGCGCT
CGAGAGGTGGTATCGGGATCGCGACCGCGGCGGCTCAAGCTGCTGGCAACATCTGTCGCGA
AGCGTACTCGCAGATCTTCCGAGTTGAGGGAATCGGCGATCGGCGGATGATCGGCTCG
GTGACGTCAAGTACCACCTGGCGCGACCGGCTTACTTGCAGATGTTGCGGACACGACATTC
AGGTGCTGCTGACCGCAACCGCTGCTGATCTGAGGCGCTGCAAGCGTCTGAGGAGTGGTGCG
GGGCGAAGCAGGATCTGCTGACCAAGGAATCGACAGCGCGGCAACGCGGCTTCTCGTG
GTGCGCTGATGTTGATGGCGATGCGCGCTTCCGCGTCAAGGTGCTGCGCGACGCTGAAC
CTGGCGAATCTGCGGCGTACCGCTGCGCGCGCACATCATCTGTCACCAACAGATCGGCT
TCACACCGCGCGGAGTATTCCAGTCCAGTCTGACGAGTCTGACCGCATCGCAAGATGATCGGG
CAGCGATTTTACGTCAACGCGGACGACCGCGGAGCGTGTCTGGTGGCGGCTTGGCGGTGG
ACTTCGACAAACGTTTCAAGAGGAGTGTGATCTGATGACATGCTGCTACCGCGCGCGGCA
ACGAGGTTGACGACCGCTGATGACCAACCTCATATGACGCTGCTGACACCAAGCGCGGCG
CCGCGAAAGCTACACGAAACCGCTGATCGGAGTGGCGCATCTGATGAAGGAGGCGGAGGAC
GGCTGCGGATACAGGCGGAGTGAACGCGGTTCACCAAGTTCGCGAGCTGGAAGGCA
CGGTGTGACACCGAGTGGTGGAGTCGAGACGATATCCCGCGCGGCTGGCACTGCGG
TGACCAAGTCTGCTGCTGGCGGATCGGCGATGCTTCTGCTTGGCAAGGCTTACCGCGCA
CCCGGAGTTCACACCGGTGCTGAGAGGCGCGGAGATGGCTTATGAAGGCAAGATGACTGGG
CCTTTGGCGAGTGTGCGGCTGGGCTGCTGGTGGCGGAGGAGTGGTGGCTTGTGGGCG
AGGACAGCGCGCGGCGCTTCTCCAGCGCGCTTGGTCTTCTGACGCGCGACATGCGCGAGG
AGTTCAACCACTGCGAGTGTGGCGACCACTCGACGCGAGCGCGCGGCAAGTTCCTGG
TCTACGACTGCCACTGTGAGTACGCGCGCTGGCTTGAAGTACGCTCACTGTGGGCAATCG
GGACCGCGTGTGCTGCGGAGGCGGACTTGGCGACTTCTGACAGCGCGCACGATGATCTGCA

図53

【図 5 3 - 2】

CGAGTTCATCAGCTCGGTTGAGGCAAGTGGGCGCAATTTGCCAAGCTGCTGCTGTTACGCGAC
GGGCGAGGCGGCGAGGACCGACCACTTCTGCCGGATCGAACGCTTCTGCAAGTGTGGGCG
GAAGGTTGATGACCATCGCATGCGGCTGCACTCGTGAACACTTCCACCTGCTACGCGGCGATG
CCCTGGACGGCATCAACGCCGCTGATGCTGTTACGCGCAAGTGCATGTTGCTCACAAGCGCG
GCTGAGCGAAATCAAGGACTTACCGAGATCAAGTTCGCTCAGTGTGGAGGAACCGCACTATGA
GGACGGCATCGGAGACCGCAACAGGTGACGCGGATCTGCTGACCAAGTGGCAAGCTGATTAACGA
GCTGGCGCGCGCAAGGCGCAAGCAACCGCAATGACCTCGCATGCTGCGGCTTGAACAGCTCGC
CCGCTGCCAGGCGTGCAGTGCCTGAAAGCTGGAACGCTACGAGAAGCTCAAGGAGTTCCTG
GGTCAAGAGGAACCGCGCAACAGGCTGCGTGGCGCGGATTCGGGCTCGAATACCGGAGCTGCT
GCTGACAAGTTGGCGGGATCAAGGCTGCGCGCGGCGATGTCAGCGCGGCTGCTGAGGCTC
GTCGAAGGTGACGCGCTGCAACAGCAGGAGATCTCGACGAGGCGTTCGGCTAATCAGCAAGA
GGAGAAGTGCACATGAAGTTATTAATTTGCACTGATGTTTATAAATTTGATCTGCAAGGAGT
TTATGAATACCTTAAGTTGAAAAAGGTGACTTTATCTACTAATGAATTTTATATAAACCCTTCC
TTGAGAAATCAATGATGCTGAGATGCTGTTATTCAGGAGAAATATGAACTCGGTGAACCTTCTGA
TGAATGATAAACAATATAATTAAGGATATTGGAGATAAACAATATAAGAATATTTGCTGAGGG
GGAGGATCTGAATGATATAGCAAAATCCTCAGTCTAAGTACTGATGATTCATTTGATTTGTT
TGAGGAAAAAGTACCTTGTGAAAAAACAAGAAATTAATATAGTTCCACTACATGTGGAACAGGT
TCAGAAGTTACAAATGATCAGTTGCAAGATTAAGAGAGAAGACATCTAAAAAGGAATGCTTCA
GACGAATATATGCAACTATGCACTGATGTAACGAAATTTAAGAGGACTTCCATATAAGTTTT
TGTAACGAGTCCGTAGTGCCTTATACATGCAACAGAAGCTTATGATCTCCTCAATGCAATCCT
ATACTGATGTTTGTAGTAAAGCTATGGAGTTAATTTAATGGATACATGCAATGGTAGAGAA
AGGAAATGATTACAGAGTTGAATTAATGAGGATTTGTTATAGGCGACATTAATGCAAGTATAGCT
TTTGGAAATGCAAGGAGTGGAGCGGTTACGCACTCTCATATCCAATAGCGGAAATATCATGTGC
CTCATGGAGAGCAATATCTGTTTTACAGAAATTTAAAACTTATATAGAAAAATCCAAAT
GGCAAGATTAAGATGAATAAATATAGCAGGCTAATAAATGATGAAGTGAAGCTTAT
GACAGTTTATCACACTTTTATGATAAATTTGTCAGAAAAACCATTAAGAGAAATGGAATGAAG
AGGAGAAATTTGAACCTTTGCTGATTCAGTAATAGAGGACGACGAGAGCTGTTGGTAACAAAT
ATGAACCTTTTCAAGAGAGACATAGTAACACATATAAAAAAGTTATATTAATCTAGAAAGCTTCT
AGAGGATCAATAAAGCAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGCGCTTTCGTTTTATCTGTTGTTGTC
GGTGAACGCTCTGCTGAGTAGGACAAATCCGCGCGCTAGACCTA

図53 (続き)

【図 5 4】

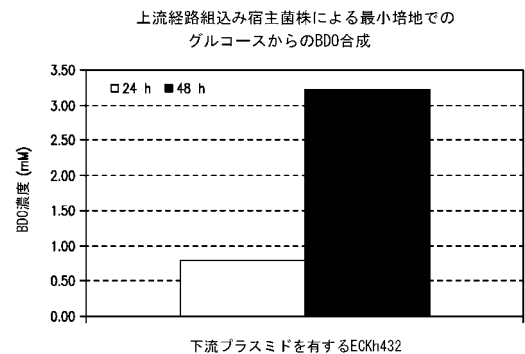


図 54

【図 55 - 1】

		cs0R w/5' del
		SENSE PRIM
1	TCCTATACG CTCGAATAC TCTCTCAT CCGCAACCA GCTTCGGGT TAGAGTGGC GTCACAGAC GTAGGCTTC GACTCTGTC GTCGGGTC	cs0R w/5' del
		AGCATATC GACTTTAG AAGAGATAG GGGTTTGT CAGAGCGCA ATTCTAGCG CGAGTTCTG CTTTGGCAG CTAGAGGCG CAGACAGCG
101	AGGACGGC TACGCTCT TCTCTCTG ATATCTCT TACCTTAG CAGACGTCA GCGATTCG CTGAATAG TTTTATACA ATATCTCT	cs0R w/5' del
		TCTCTGCG ATGTGAGCA AAGAGACAC TACAGAGC ATGTGATCT GTTTCGGGT CTTCTAGTC GACTTATCA AAAATATAG TATAAAGG
201	TGAGATAC GTTCGCGC GCGACGTCA GCTCTGCG CAGCTCGG ATGGCATAT CTACTATCA ATGGGCTTC GACATATAC GTCTCTGAG	cs0R w/5' del
		ACTCTATG GAGGGGTC GGGTATCT CAGAGAGC GTGACATCT TACCTATCA GATATGCT TACCTGCGC CTATATAG GTAGGACTC
301	TCTCTATG GTGAATAT TGTATAGC AGCTGTGC CAGATATCT AGGTTATCT AGTATATC CTATATAT CACTGCGCA TATATATCA	cs0R w/5' del
		AGGACATC CACTTTAT ACAAACGC TTGACATC GTCTATGG TCGCATGG TCAATATG GACTATAC GTACGGGT ATACTATCT
401	CAGAGATT GTTCGGTC GGTATATC AGGCTATC CTCTGTCA CTGAATAT CTCTGCGC AGGTTATC TCGAGGAT TTGAGATC	cs0R w/5' del
		GTCTGAAA TGGGCTGC CGATAGAG TTGCGATC GAGAGGAT GACTTTAC GAGAGGTC TCGATACA GCGTCTCA ACTCTGTC
501	CTGGCTGT AGTAGATG ATTGATCA GCGAGGAA TTGATGCG CAGAGATCA TACATATC AGCTCTCG GAGTTTAT GATCTGAC	cs0R w/5' del
		GAGCGACT GAGCTCTC TACAGCAT GACTTTGT AAGATATC GTTCTCAT ACTATGAT TGGATAGC GTTCAAGCA GTTAGATG
601	TTCAAGCG GCAACGCA TTTTATCT CTATATGT GTAGATCG CAGAGCTT GTGCTTAT AGCTTTAT GCGAGGCG GTAGATCT	cs0R w/5' del
		AGCTTTGT TGTATGCT AAGATACA GATTCGAC CACTCTAT GCTCGGAA CAGATATG TCGAGGCA GCTCTTCC GATCTTGG
701	CAGAGATT GCGATATG GGTATATG ATGTGTGC CTCTGGAT CTCTTTAC GAGCTTAC CAGATATG CTCTGCGC AGTATATG	cs0R w/5' del
		GGTCTACA GCGCATAC CGAATAT TACAGATC GAGCGGTA GAGAGGAT GCGAGATC GTTATATG GAGGATCT TGTATATC
801	GCGAGATT GGTATATG TATATAGC TGTATAGC GAGAGGTA GCGAGATC TTGCGTGC TGTATATG GTTCTGCGC AGTATATG	cs0R
		AGCTTTCA TGTATATG AATATATC AGCTTTCT CTCTTCACT GCGCTAGG AAGGGGTC AATAGGCA CAGATATG
901	GCGAGATT GGTATATG TATATAGC TGTATAGC GAGAGGTA GCGAGATC TTGCGTGC TGTATATG GTTCTGCGC AGTATATG	cs0R
		TGTATATG GGTATATG TATATAGC TGTATAGC GAGAGGTA GCGAGATC TTGCGTGC TGTATATG GTTCTGCGC AGTATATG
1001	ATGAGCTT TCGCTTGT TATATAGC TGTATAGC GAGATAT TACAGATC TGTATAGC GTTCAAGC GCGAGGCG AATATATG	cs0R
		GTGATATG AAGGGGTC AATATATG AATATATG GTATATGT ATTTATAG ATTCGCTG CAGCTATG GCGCTTCC TATATATC

図 55

【図 55 - 2】

1101	TAGCGCTCA ATCTCTGT TGGATATC GCGAGGTA CAGTGTCT AGTATATG TCAATATG GCGAGCTC AGTGTGAT TATATCTG	cs0A
		ATGGGAT TATAGATC AACTATAG GCGTCTTT GTTACAGG TATATATG AGTATATG CCGATATG TCGAGCTG AATATAGC
1201	AGGTATGC ATCATATC TTGAGTCC AGTATATC AGCTTCACT GTCTGATC TTCTCTAG AAGATATG TGTATATG TCGAGGTA	cs0A
		TATAGATC TATAGATC AATGTATG TCGATATG TATAGATC GCGAGGTA AAGATATG TGTATATG AATATATG AATATATG
1301	GAGATATG TGTATATC GTAGATCT AGCTTCTG AAGAGATC GTATATAT GGTATATC TGTATATG CCGAGGTA CAGTATAT	cs0A
		CTGTATCT AGAGATGC GATGTATG TGTAGATC TCGAGGTA GCGAGGTA AATATATG TGTATATG AATATATG AATATATG
1401	CTGCGATC CTATATCT TGTATATC GCGATATC AGATATAT CCGAGGTA AATATATC GAGCTTCT CTATATAG CTCTATAT	cs0A
		GAGCTATG GAGTATAT AATCTCTAT TGTATATG TGTATATG GTCTATAT TGTATATG CTATATAG GAGTATAT GAGTATAT
1501	CTATATAT AGTATATG TGTATATC TGTATATC AATATATC GGTATATC CAGTATAT AATATATG TGTATATG TGTATATG	cs0A
		GATATATG TGTATATG AATATATG TGTATATG TGTATATG TGTATATG TGTATATG TGTATATG TGTATATG
1601	ATTTATAT CTATATCT AGTATATC TGTATATG GAGATATC GATATATG AATATATG CCGAGGTA CAGTATAT	cs0A
		TATATAT GATATATC GGTATATG AATATATC TGTATATG TGTATATG TGTATATG TGTATATG TGTATATG TGTATATG
1701	CTTCTATG GATATATC GCGATATC GATATATG TGTATATG TGTATATG GATATATC CCGAGGTA CAGTATAT	cs0A
		GATATAT GATATATC GATATATC GATATATG TGTATATG TGTATATG TGTATATG TGTATATG TGTATATG TGTATATG
1801	TGTATATG TGTATATC GATATATC GATATATG TGTATATG TGTATATG GATATATC CCGAGGTA CAGTATAT	cs0A
		AGTATAT GATATATC GATATATC GATATATG TGTATATG TGTATATG TGTATATG TGTATATG TGTATATG TGTATATG
1901	CTATATAT AATATATC GATATATC GATATATC TGTATATG TGTATATG AATATATC CCGAGGTA CAGTATAT	cs0A
		GATATAT GATATATC GATATATC GATATATG TGTATATG TGTATATG TGTATATG TGTATATG TGTATATG TGTATATG
2001	GATATATG GATATATC GATATATC GATATATG TGTATATG TGTATATG GATATATC CCGAGGTA CAGTATAT	cs0A
		AGTATAT GATATATC GATATATC GATATATG TGTATATG TGTATATG TGTATATG TGTATATG TGTATATG TGTATATG

図 55 (続き)

【図 55 - 3】

2101	GATATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC	cs0A
		GATATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC
2201	TGTATATG GATATATC GATATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC	cs0A
		GATATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC
2301	ATTTATAT AATATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC	cs0A
		GATATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC
2401	AGTATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC	cs0A
		GATATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC
2501	AGTATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC	cs0A
		GATATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC
2601	AGTATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC	cs0A
		GATATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC
2701	GATATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC	cs0A
		GATATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC
2801	TGTATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC	cs0A
		GATATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC
2901	AGTATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC	cs0A
		GATATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC
3001	TGTATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC	cs0A
		GATATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC
3101	AGTATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC	cs0A
		GATATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC
3201	GATATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC	cs0A
		GATATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC
3301	GATATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC	cs0A
		GATATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC

図 55 (続き)

【図 55 - 4】

3401	GATATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC	cs0B
		GATATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC
3501	GATATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC	cs0B
		GATATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC
3601	TGTATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC	cs0B
		GATATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC
3701	GATATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC	cs0B
		GATATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC
3801	AGTATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC	cs0B
		GATATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC
3901	GATATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC	cs0B
		GATATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC
4001	TGTATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC	cs0B
		GATATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC
4101	TGTATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC	cs0B
		GATATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC
4201	TGTATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC	cs0B
		GATATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC
4301	GATATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC	cs0B
		GATATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC
4401	TGTATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC	cs0B
		GATATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC
4501	AGTATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC	cs0B
		GATATATG TGTATATC TGTATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC GATATATC

図 55 (続き)

【図 55 - 5】

4601 TTGCTGCG ATGTGCTG TTTCAGCC GAGCGAGA GTTTGACC AGGAGGTA CAGGAGGT TTCTGCGA TTGAGTAT TGTTGCTG
 AGCGAGCC TACGCGAG AAGTTGCG CTGACCTT GAGGAGTG TGCTTCAT GTTCTGTA AAGAGGCT AAAGGAGG
 ccs6

4701 ATGTGCTAT TTGCAATT CTCTGACT AAAAGCGG AGGAGTAT TACGAGAG CTGTACCT CAGCATAT GAGTAACT TTCTGCGT
 TACAGGTA AGGAGTAA GAGGAGTA TTCTGCGG TGCTTATA ATACCTTG GAGATGAA GTGTATAT CTGCACTG AAAAGCGCA
 GTTCTGTA GTCTATAT CTGACCGG AAAAGTAA TACGAGAG CTGACCTG CAGTATAG CTGATGAA AGGCTGAT GAGTCTCG
 CAGGAGTAT CAGATATG GAGTTGCG TTCTATAT ATCACTTAC GATCGGAG GATTAATAG GATTAATAT TGCGAGTAA GAGGAGCG
 TACGCTAT CAGATATG TCGATGCG GTTCTGTA TTCTGCGG ATCTGCTA TTCTGCGG TTCTGCGG ATCTGCTG TCGATATG
 ATCTGCTG GTTATAGA ATCTGCGG CAGGAGTAT AGGCTGCT TACGAGAG AGGCTGCG AGGCTGCG TCGATATG AGGCTGCT
 TCGAGGAG GTTATAGA ATCTGCGG CAGGAGTAT AGGCTGCT TACGAGAG AGGCTGCG AGGCTGCG TCGATATG AGGCTGCT
 AGGCTGCT GATCGGAG GTTCTGTA ATCTGCGG ATCTGCGG ATCTGCGG ATCTGCGG ATCTGCGG ATCTGCGG ATCTGCGG
 ATCTGCTG GATCGGAG GTTCTGTA ATCTGCGG ATCTGCGG ATCTGCGG ATCTGCGG ATCTGCGG ATCTGCGG ATCTGCGG

アンチセンス_PRR

図55 (続き)

【図 56】

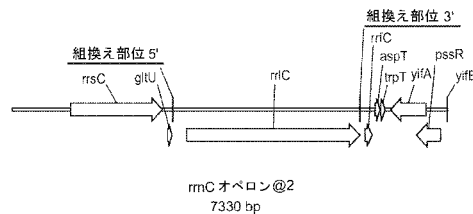


図 56

【図 57】

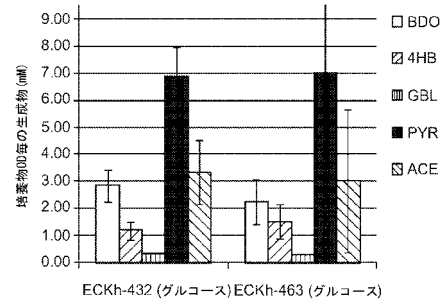


図 57

【配列表】

2020005647000001.app

【手続補正書】

【提出日】 令和1年9月24日 (2019.9.24)

【手続補正1】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0008

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【0008】

【図1】 4-ヒドロキシブチレート (4-HB) 及び1,4-ブタンジオール生成への生化学経路を示す概略図である。最初の5つの工程は、大腸菌に対して内因性であり、残りは、非相同的に発現され得る。生合成反応を触媒する酵素は、(1)スクシニル-CoAシンテターゼ;(2)CoA非依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ;(3) α -ケトグルタレートデヒドロゲナーゼ;(4)グルタメート:スクシネートセミアルデヒドトランスアミナーゼ;(5)グルタメートデカルボキシラーゼ;(6)CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ;(7)4-ヒドロキシブタノエートデヒドロゲナーゼ;(8) α -ケトグルタレートデカルボキシラーゼ;(9)4-ヒドロキシブチリルCoA:アセチル-CoAトランスフェラーゼ;(10)ブチレートキナーゼ;(11)ホスホトランスブチリラーゼ(phosphotransbutyrylase);(12)アルデヒドデヒドロゲナーゼ;(13)アルコールデヒドロゲナーゼである。

【図2】 大腸菌におけるホモセリン生合成を示す概略図である。

【図3】 4-HB経路遺伝子の様々な組合せを発現するプラスミドを含む大腸菌株を使用するグルコース最小培地での4-HBの生成を示す図である。(a)液体培地における4-HB濃度;(b)液体培地におけるスクシネート濃度;(c)600nmで測定された培養OD。棒の集合体は、24時間、48時間、及び(測定した場合の)72時間の時点を表す。x軸上の符号は、使用した菌株/

プラスミド組合せを示す。第1の指数は、宿主菌株：1、MG1655 $lacI^Q$;2、MG1655 $\Delta gabD lacI^Q$;3、MG1655 $\Delta gabD \Delta aldA lacI^Q$ を指す。第2の指数は、使用したプラスミド組合せ：1、pZE 13-0004-0035及びpZA33-0036;2、pZE13-0004-0035及びpZA33-0010n;3、pZE 13-0004-0008及びpZA33-0036;4、pZE13-0004-0008及びpZA33-0010n;5、対照ベクターpZE13及びpZA33を指す。

【図4】結核菌から α -ケトグルタレートデカルボキシラーゼを発現する大腸菌におけるグルコースからの4-HBの生成を示す図である。菌株1～3は、pZE13-0032及びpZA33-0036を含む。菌株4は、空ベクターpZE13及びpZA33のみを発現する。宿主菌株は、1及び4、MG1655 $lacI^Q$;2、MG1655 $\Delta gabD lacI^Q$;3、MG1655 $\Delta gabD \Delta aldA lacI^Q$ である。棒は、24及び48時間における濃度を指す。

【図5】組換え大腸菌株における10mM 4-HBからのBDOの生成を示す図である。番号付けしたP.ギンギバリス(*gingivalis*)からcat2を発現するpZA33-0024を含むMG1655 $lacI^Q$ 、並びにpZE13上に発現される以下の遺伝子:1、なし(対照);2、0002;3、0003;4、0003n;5、0011;6、0013;7、0023;8、0025;9、0008n;10、0035を用いた実験に対応する。遺伝子番号は、表6に規定されている。各位置について、棒は、それぞれ好気性、ミクロ好気性及び嫌気性条件を指す。ミクロ好気性条件は、培養チューブを排気せずに密閉することによって生成された。

【図6】4g/L非標識グルコース(a、c、e及びg)均一標識 ^{13}C -グルコース(b、d、f及びh)が補給されたM9最小培地で成長したMG1655 $lacI^Q$ pZE13-0004-0035-0002pZA33-0034-0036によって生成された4-HB及びBDOの質量スペクトルを示す図である。(a)及び(b)、2個の炭素原子を含む誘導体化BDOの質量116特異的断片;(c)及び(d)、1個の炭素原子を含む誘導体化BDOの質量177特異的断片;(e)及び(f)、2個の炭素原子を含む誘導体化4-HBの質量117特異的断片;(g)及び(h)、4個の炭素原子を含む誘導体化4-HBの質量233特異的断片。

【図7】 γ -ブチロラク톤の生成のためのバイオプロセスの概略流れ図である。パネル(a)は、パッチ式分離を用いた流加発酵を示し、パネル(b)は、連続分離を用いた流加発酵を示す。

【図8】図8A及び図8Bは、例示的な1,4-ブタンジオール(BDO)経路を示す図である。図8Aは、スクシニル-CoAからBDO経路を示す図である。図8Bは、アルファケトグルタレートからのBDO経路を示す図である。

【図9A】例示的なBDO経路を示す図である。図9Aは、4-アミノブチレートからの経路を示す図である。

【図9B-C】例示的なBDO経路を示す図である。図9Bは、4-アミノブチレートからの経路を示す図である。図9Cは、アセトアクトニル-CoAから4-アミノブチレートへの経路を示す図である。

【図10】アルファ-ケトグルタレートからの例示的なBDO経路を示す図である。

【図11】グルタメートからの例示的なBDO経路を示す図である。

【図12】アセトアセチル-CoAからの例示的なBDO経路を示す図である。

【図13】ホモセリンからの例示的なBDO経路を示す図である。

【図14】大腸菌スクシニル-CoAシンテターゼのヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す図である。図14Aは、大腸菌sucCDオペロンのヌクレオチド配列(配列番号45)を示す図である。図14B(配列番号46)及び図14C(配列番号47)は、sucCDオペロンによってコードされるスクシニル-CoAシンテターゼサブユニットのアミノ酸配列を示す図である。

【図15】ウシ結核菌(*Mycobacterium bovis*)アルファ-ケトグルタレートデカルボキシラーゼのヌクレオチド及びアミノ酸配列を示す図である。図15Aは、ウシ型結核菌sucA遺伝子のヌクレオチド配列(配列番号48)を示す図である。図15B(配列番号49)は、ウシ型結核菌アルファ-ケトグルタレートデカルボキシラーゼのアミノ酸配列を示す図である。

【図16】嫌気性(ミクロ好気性)条件下でのアルファ-ケトグルタレートを介する最小培地中でのグルコースからの4-ヒドロキシブチレートの大腸菌における生合成を示す図である。宿主菌株はECKh-401である。実験は、プラスミドpZA33上に存在する上流経路遺伝子に基づいて以下のように標識される。1)4hbd-sucA;2)sucCD-sucD-4hbd;3)sucCD-sucD-4hb

d-sucA。

【図 1 7】スクシネート及びアルファ-ケトグルタレートを紹介する最小培地でのグルコースからの4-ヒドロキシブチレートの大腸菌における生合成を示す図である。宿主菌株は野生型MG1655である。実験は、プラスミドpZE13及びpZA33上に存在する遺伝子に基づいて以下のように標識する。1)エンブティ調節ベクター;2)エンブティpZE13、pZA33-4hbd;3)pZE13-sucA、pZA33-4hbd。

【図 1 8】図18Aは、ポルフィロモナス・ギンギバリス(*Porphyromonas gingivalis*)からのCoA依存性スクシネートセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(sucD)のヌクレオチド配列(配列番号50)を示す図であり、図18Bは、コードされたアミノ酸配列(配列番号51)を示す図である。

【図 1 9】図19Aは、ポルフィロモナス・ギンギバリスからの4-ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼ(4hbd)のヌクレオチド配列(配列番号52)を示す図であり、図19Bは、コードされたアミノ酸配列(配列番号53)を示す図である。

【図 2 0】図20Aは、ポルフィロモナス・ギンギバリスからの4-ヒドロキシブチレートCoAトランスフェラーゼ(cat2)のヌクレオチド配列(配列番号54)を示す図であり、図20Bは、コードされたアミノ酸配列(配列番号55)を示す図である。

【図 2 1】図21Aは、クロストリジウム・アセトブチリウム(*Clostridium acetobutylicum*)からのホスホトランスブチリラーゼ(ptb)のヌクレオチド配列(配列番号56)を示す図であり、図21Bは、コードされたアミノ酸配列(配列番号57)を示す図である。

【図 2 2】図22Aは、クロストリジウム・アセトブチリウムからのブチレートキナーゼ(bukl)のヌクレオチド配列(配列番号58)を示す図であり、図22Bは、コードされたアミノ酸配列(配列番号59)を示す図である。

【図 2 3】C.アセトブチリウム原生配列と比べてより優勢な大腸菌コドンのための変更コドンを含むC.アセトブチリウム020(ホスホトランスブチリラーゼ)についての代替的ヌクレオチド配列を示す図である。図23A~23D(それぞれ020A~020D、配列番号60~63)は、より優勢なコドンで置き換えられた希大腸菌コドンが増加する(A<B<C<D)配列を含む。

【図 2 4】C.アセトブチリウム原生配列と比べてより優勢な大腸菌コドンのための変更コドンを含むC.アセトブチリウム021(ブチレートキナーゼ)についての代替的ヌクレオチド配列を示す図である。図24A~24D(それぞれ021A~021B、配列番号64~67)は、より優勢なコドンで置き換えられた希大腸菌コドンが増加する(A<B<C<D)配列を含む。

【図 2 5】大腸菌における発現のために最適化されたコドンによるブチレートキナーゼ(butyrate kinase)(BK)及びホスホトランスブチリラーゼ(PTB)の発現の向上を示す図である。図25Aは、タンパク質に対してクーマシーブルーで染色された硫酸ドデシルナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を示す図である(レーン1、インサートを有さない対照ベクター;レーン2、大腸菌におけるクロストリジウム・アセトブチリウム原生配列の発現;レーン3、020B-021Bコドン最適化PTB-BKの発現;レーン4、020C-021Cコドン最適化PTB-BKの発現)。BK及びPTBの位置が示されている。図25Bは、コドン最適化020B-021B(2021B)及び020C-021C(2021C)と比較した原生C.アセトブチリウム配列(2021n)のBK及びPTB活性を示す図である。

【図 2 6】BDO精製酵素:Cat2(034);2021n;2021B;2021Cを発現する様々な菌株におけるBDO及びガンマ-ブチラクトン(gamma-butyrolactone)(GBL)の生成を示す図である。

【図 2 7】図27Aは、原生クロストリジウム・ベイジェリンキー(*Clostridium biejerinckii*)ald遺伝子(025n)のヌクレオチド配列(配列番号68)を示す図であり、図27Bは、コードされたアミノ酸配列(配列番号69)を示す図である。

【図 2 8】図28A~図28Dは、より優勢なコドンで置き換えられた希コドン数が増加する(A<B<C<D)クロストリジウム・ベイジェリンキーald遺伝子の代替的な遺伝子配列(それぞれ025A-025D、配列番号70~73)を示す図である。

【図 2 9】原生C.ベイジェリンキーald遺伝子及びコドン最適化変異体;無インサート(インサートを有さない対照)、025n、025A、025B、025C、025Dの発現を示す図である。

【図 3 0】様々な菌株におけるBDO又はBDO及びエタノール産生を示す図である。図30は、

原生C. ベイジェリンキーald遺伝子(025n)又は大腸菌における発現のために最適化されたコドンを含む変異体(025A~025D)を含む菌株におけるBDO生成を示す図である。図30Bは、コドン最適化変異体025Bと比較した、C. アセトブチリクムAdhE2酵素(002C)を発現する菌株におけるエタノール及びBDOの生成を示す図である。第3の集合は、P. ギンギバリス(P. gingivalis)sucD(035)の発現を示す図である。すべての場合において、P. ギンギバリスCat2(034)も発現される。

【図31】図31Aは、ゲオバシルス・サーモグルコシダシウス(Geobacillus thermoglucosidasius)からのadh1遺伝子のヌクレオチド配列(配列番号74)を示す図であり、図31Bは、コードされたアミノ酸配列(配列番号75)を示す図である。

【図32】図32Aは、大腸菌におけるゲオバシルス・サーモグルコシダシウスadh1遺伝子の発現を示す図である。全細胞溶解物又は上澄みをSDS-PAGEによって分析し、インサートを有さないプラスミド、083(ジオトリカム・カピタタム(Geotrichum capitatum)N-ベンジル-3-ピロリジノルデヒドロゲナーゼ)インサート及び084(ゲオバシルス・サーモグルコシダシウスadh1)インサートを有するプラスミドに対してクーマシーブルーで染色した。図32Bは、ブチルアルデヒド(菱形)又は4-ヒドロキシブチルアルデヒド(正方形)を基質とする084の活性を示す図である。

【図33】様々な菌株:インサートを有さないプラスミドにおけるBDOの生成を示す図である。025B、025B-026n; 025B-026A; 025B-026B; 025B-026C; 025B-050; 025B-052; 025B-053; 025B-055; 025B-057; 025B-058; 025B-071; 025B-083; 025B-084; PTSlac0-025B; PTSlac0-025B-026n。

【図34】ベクターpRE119-V2についてのプラスミドマップを示す図である。

【図35】aceF及びlpdA遺伝子を包含するECKh-138領域の配列を示す図である。K. ニューモニエ(K. pneumonia)lpdA遺伝子に下線が引かれ、Glu354Lys突然変異体に変化したコドンが網掛けされている。

【図36】原生大腸菌lpdAと突然変異K. ニューモニエlpdAとのタンパク質配列比較を示す図である。

【図37】菌株AB3、MG1655 ΔldhA及びECKh-138における4-ヒドロキシブチレート(左棒)及びBDO(右棒)の生成を示す図である。すべての菌株が、大腸菌sucCD、P. ギンギバリスsucD、P. ギンギバリス4hbdを中コピープラスミドpZA33上に発現し、P. ギンギバリスCat2、C. アセトブチリクムAdhE2を高コピープラスミドpZE13上に発現させた。

【図38】pflB-p6プロモーター及びリボソーム結合部位(RBS)に融合したaceE遺伝子の5'末端のヌクレオチド配列を示す図である。イタリック体の5'配列は、pdhオペロンから反対方向に転写されるaroP遺伝子の出発点を示す。イタリック体の3'配列は、aceE遺伝子のお発点を示す。大文字:pflB RBS。下線:FNR結合部位。太字:pflB-p6プロモーター配列。

【図39】菌株ECKh-456におけるaceF-lpdA領域におけるヌクレオチド配列(配列番号80)を示す図である。

【図40】菌株ECKh-439、ECKh-455及びECKh-456の各々についての4-ヒドロキシブチレート、BDO及びピルベート(それぞれ左棒から右棒)の生成を示す図である。

【図41A】mdh遺伝子の欠失に対する組換え部位の概略を示す図である。

【図41B】プラスミドpKD3からのmdh遺伝子のFRT部位及び相同性領域が隣接するクロラムフェニコール抵抗性遺伝子(CAT)の増幅のPCR生成物の配列を示す図である。

【図42】菌株ECKh-401におけるarcA欠失領域の配列を示す図である。

【図43】菌株ECKh-422の突然変異gltA遺伝子を包含する領域の配列を示す図である。

【図44】野生型glutA遺伝子生成物及びR163I突然変異体のシトレートシンターゼ活性を示す図である。アッセイを0.4mMのNADHの不在下(菱形)又は存在下(正方形)で実施した。

【図45】いずれも完全BDO経路に対する遺伝子をプラスミドに発現する菌株ECKh-401及びECKh-422における4-ヒドロキシブチレート(左棒)及びBDO(右棒)の生成を示す図である。

【図46】中心代謝流動及び代謝標識実験からの関連する95%信頼区間を示す図である。

値は、1mmol/時のグルコース取込み率に対して正規化されたモル流量である。それらの結果は、炭素流動がシトレートシンターゼを通じて酸化方向に導かれること、及びほとんどの炭素がTCA回路を完了するのでなく、BDO経路に入ることを示している。

【図 4 7】いずれもBDO経路全体をプラスミドに発現する菌株DCKh-138及びECKh-422についての細胞外生成物の形成を示す図である。測定された生成物は、アセテート(Ace)、ピルベート(Pyr)、4-ヒドロキシブチレート(4HB)、1,4-ブタンジオール(BDO)、エタノール、及びガンマ-ブチロラクトン(GBL)、スクシネート及びラクテートを含む他の生成物であった。

【図 4 8】(H. インフルエンザ(H. influenza)ホスホエノールピルベートカルボキシキナーゼ(pepek)でPEPカルボキシラーゼ(ppc)を置き換えた後の領域の配列を示す図である。pepekコード化領域に下線が引かれている。

【図 4 9】50mMのNaHCO₃を含む最小培地で成長させた進化pepCK菌株の成長を示す図である。

【図 5 0】P. ギンギバリスCat2及びC. ベイジェリンキーAldをプラスミドpZS*13に発現する菌株ECKh-453における生成物の形成を示す図である。測定された生成物は、1,4-ブタンジオール(BDO)、ピルベート、4-ヒドロキシブチレート(4HB)、アセテート、γ-ブチロラクトン(GBL)及びエタノールであった。

【図 5 1】2つの菌株ECKh-453及びECKh-432のBDO生成を示す図である。いずれもP. ギンギバリスCat2及びC. ベイジェリンキーAld発現するプラスミドpZS*13を含む。示されるように27又は18ゲージのニードルで穿刺された容器を用いて培養物をミクロ好気性条件下で成長させた。

【図 5 2】プロモーター、sucCD遺伝子、sucD遺伝子、4hbd遺伝子及び終止配列を含むポリシストロンDNA断片の挿入の領域における菌株ECKh-426のゲノムDNAのヌクレオチド配列を示す図である。

【図 5 3】プロモーター、sucA遺伝子、C. クルイベリ(C. kluyveri)4hbd遺伝子及び終止配列を含むポリシストロン配列の挿入の領域における菌株ECKh-432の染色体領域のヌクレオチド配列を示す図である。

【図 5 4】染色体に組み込まれている上流BDO経路コード化遺伝子を有し、下流BDO経路遺伝子を保持するプラスミドを含むECKh-432菌株の最小培地におけるグルコースからのBDO合成を示す図である。

【図 5 5】rrnC領域に対して相同性の領域が隣接する非ホスホトランスフェラーゼ(非PTS)スクロース利用遺伝子を含むPCR生成物を示す図である。

【図 5 6】rrnCオペロンにおける組込み部位の概略図を示す図である。

【図 5 7】グルコース上で成長された菌株ECKh-432及びスクロース上で成長された菌株ECKh-463の成長の48時間後に培養物OD600に対して正規化された平均生成物濃度を示す図である。いずれもP. ギンギバリスCat2及びC. ベイジェリンキーAldを発現するプラスミドpZS*13を含む。データは、各菌株の6つの複製培養物に対する。測定された生成物は、1,4-ブタンジオール(BDO)、4-ヒドロキシブチレート(4HB)、γ-ブチロラクトン(GBL)、ピルベート(PYR)及びアセテート(ACE)(それぞれ左棒から右棒)であった。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 2 1 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 2 1 1】

BDO経路のための発現ベクターの構築.ベクター骨格及びいくつかの菌株をDr. Rolf Lutz of Expressys(www.expressys.de/)から得た。ベクター及び菌株は、Dr. Rolf Lutz及びProf. Hermann Bujard(Lutz, R.及びH. Bujard, Nucleic Acids Res 25:1203-1210(1997))によって開発されたpZ発現システムに基づく。得られたベクターは、pZE13luc、pZA33luc、pZS*13luc及びpZE22lucであり、スタッファー断片としてルシフェラーゼ遺伝子を含んで

いた。ルシフェラーゼスタッファー断片を、適切な酵素部位によって側面が固められたlacZ-アルファ断片で置き換えるために、ルシフェラーゼスタッファー断片を、最初にEcoRI及びXbaIによる消化によって各ベクターから除去した。lacZ-アルファ断片は、以下のプライマーpUC19からPCR増幅された。

【化 1】

lacZ α -RI

5'GACGAATTTCGCTAGCAAGAGGAGAAGTCGACATGTCCAATTCAGTGGCCGTCGT
TTTAC3' (配列番号1)

lacZ α 3'BB

5'-GACCCTAGGAAGCTTTCTAGAGTCGACCTATGCGGCATCAGAGCAGA-3' (配列番号2)

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 3 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 3 3 8】

菌株を発現するウシ結核sucAを構築するために、以下に示すプライマーを使用して、アルファ-ケトグルタレートデカルボキシラーゼをコードするsucA遺伝子の断片をウシ結核菌BCGのゲノムDNAから増幅した(ATCC 19015; 米国菌培養収集所(American Type Culture Collection)、バージニア州Manassas)。全長遺伝子を4つの増幅DNA断片の連結反応によって集積し、P_{AllacO-1}プロモーターの背後の発現ベクターpZS*13及びpZE23にクローン化した(Lutz及びBujard、Nucleic Acids Res. 25:1203-1210 (1997))。集積遺伝子のヌクレオチド配列をDNA配列決定によって検証した。

【化 2】

断片1についてのプライマー:

5'-ATGTACCGCAAGTTCCGC-3' (配列番号 3)

5'-CAATTTGCCGATGCCCAG-3' (配列番号 4)

断片2についてのプライマー:

5'-GCTGACCACTGAAGACTTTG-3' (配列番号 5)

5'-GATCAGGGCTTCGGTGTAG-3' (配列番号 6)

断片3についてのプライマー:

5'-TTGGTGCGGGCCAAGCAGGATCTGCTC-3' (配列番号 7)

5'-TCAGCCGAACGCCTCGTCGAGGATCTCCTG-3' (配列番号 8)

断片4についてのプライマー:

5'-TGGCCAACATAAGTTCACCATTCGGGCAAAAC-3' (配列番号 9)

5'-TCTCTTCAACCAGCCATTCGTTTTGCCCCG-3' (配列番号 10)

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】 0 3 4 8

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 3 4 8 】

PTB及びBK遺伝子は、C. アセトブチリクムにオペロンとして存在し、PTB(020)遺伝子が最初に発現される。それらの2つの遺伝子は、下流BK(021)遺伝子の再開リボソーム結合部位を含む配列“atta aagttaagtg gaggaatggtt aac”(配列番号11)によって連結される。この文脈における2つの遺伝子を大腸菌における発現のために発現ベクターにおけるlac調節プロモーターに融合した(Lutz及びBujard、Nucleic Acids Res. 25:1203-1210 (1997))。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 3 6 5

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 3 6 5 】

原生lpdAの置換。クレブシエラ肺桿菌のピルベートデヒドロゲナーゼオペロンは、ヌクレオチドレベルで大腸菌の相当オペロンと78から95%の間の同一性がある。K. 肺桿菌は、グリセロールの存在下で嫌氣的に成長する能力を有することが示された(Menzelら、J. Biotechnol. 56:135-142(1997);Menzelら、Biotechnol. Bioeng. 60:617-626(1998))。大腸菌のオペロンのlpdA遺伝子における2つの突然変異は、嫌氣的に成長するその能力を向上させることも示された(Kimら、Appl. Environ. Microbiol. 73:1766-1771(2007);Kimら、J. Bacteriol. 190:3851-3858(2008))。鋳型としてのゲノムDNA(ATCC700721D)並びにプライマー

【化 3】

KP-lpdA-Bam (5'-acacgcggatccaacgtcccg-3')(配列番号12)及び KP-lpdA-Nhe (5'-agcggctccgctagccgcttatg-3')(配列番号13)

を使用して、K. 肺桿菌のlpdA遺伝子をPCRによって増幅させた。得られた断片をベクターpCR-BluntII-TOPO(Invitrogen;カリフォルニア州Carlsbad)にクローン化して、プラスミドpCR-KP-lpdAを得た。

【手続補正 6】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 3 6 7

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 3 6 7 】

LpdA遺伝子に隣接する大腸菌断片を、プライマーの組合せ:

【化 4】

EC-aceF-Pst (5'-aagccgttgctgcagctcttgagc-3')(配列番号 14) + EC-aceF-Bam2 (5'-atctccggcggtcgatccgctcg-3')(配列番号15) 及び EC-yacH-Nhe (5'-aaagcggctagccacgccgc-3')(配列番号16) + EC-yacH-Kpn (5'-attacacgaggtacccaacg-3')(配列番号17)

を使用して、PCRによって増幅させた。K. 肺桿菌のlpdA遺伝子を含むBamHI-XbaI断片をプラスミドpCR-KP-lpdAから単離し、次いでそれぞれPstI+BamHI及びNheI-KpnIで消化される上記大腸菌断片、並びにKpnI及びPstIで消化されるpRE118-V2プラスミドに結合させた。(pRE118-M2.1 lpdA yacと呼ばれる)得られたプラスミドを、His322残基のTry残基への突然変異のためのプライマー

【化 5】

KP-lpdA-HisTyr-F (5'- atcgtggcgtacaaaggtgtcc-3')(配列番号18) 及び (5'-
ggacacctttgtacgccagcat-3')(配列番号19)

の組合せ又は残基Glu354のLys残基への突然変異のためのプライマー

【化 6】

KP-lpdA-GluLys-F (5'-atcgctacactaaaccagaagtgg-3')(配列番号 20) 及び KP-lpdA-
GluLys-R (5'-ccacttctggttagttaggcgat-3')(配列番号 21)

の組合せを使用して部位志向突然変異(SDM)させた。ポリメラーゼPfu Turbo(Stratagene; カリフォルニア州San Diego)を用いてPCRを実施した。断片全体の配列並びに所望の突然変異のみの存在を検証した。得られたプラスミドを形質転換によって大腸菌のエレクトロコンピテント細胞 $\Delta adhE::Frt-\Delta ldhA::Frt$ に導入した。染色体における第1の組込み事象を、カナマイシン(25又は50mg/L)を含むLB寒天プレート上で選択した。1つが挿入の領域の外側に位置し、1つがカナマイシン遺伝子

【化 7】

(5'- aggcagttccataggatggc-3')(配列番号22)

内に位置する2つのプライマーを使用して、PCRによって適正な挿入を検証した。適正な挿入によるクローンを分解に向けて選択した。それらを純粋な液体LB中で所望の温度にて2回二次培養し、順次的な希釈物をLB-無塩-スクロース10%プレート上に仕込んだ。スクロース含有プレート上で成長したクローンをLB-低塩寒天培地上でのカナマイシン抵抗遺伝子の欠失についてスクリーニングし、lpdA遺伝子置換をPCR及び包含領域の配列決定によって検証した。挿入領域の配列を検証した。それを以下に記載する。突然変異Glu354Lysを有する(4-4-P1と命名された)1つのクローンを選択した。次いで、このクローンに大腸菌 $\Delta PflB::Frt$ のP1溶解物を形質導入して、菌株ECKh-138($\Delta adhE \quad \Delta ldhA \quad \Delta pflB \quad \Delta lpdA::K.p.lpdA322$)を得た。

【手続補正 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 7 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 3 7 1】

PDHプロモーター置換。Fnr結合部位、pflBプロモーターの1つ及びそのリボソーム結合部位(RBS)を含む転写融合体でpdhR受容体を置き換えることで、嫌気性プロモーターによりaceEF-lpdオペロンを発現させると、嫌氣的にpdh活性が高められることが以前に示されている(Zhouら、Biotechnol. Lett. 30:335-342 (2008))。Fnr結合部位、pflB-p6プロモーター及びRBS結合部位を含む融合体を、PCRを重複するによって構成した。一方がプライマー

【化 8】

aceE-上流-RC (5'- tgacatgtaacacctaccttctgtgcctgtgccagtggttgctgtgatatagaag-3') (配列番号23)

及び pflBp6-Up-Nde (5'- ataataatacatatgaacatgcgagttacgggcctataagccaggcg-3') (配列番号24)

を使用し、他方がプライマー

【化 9】

aceE-EcoRV-EC (5'- agtttttcgatatctgcatcagacaccggcacattgaaacgg-3')

(配列番号25) 及び aceE-上流 (5'- ctggcacaggcacagaaggttaggtgttacatgtcagaacgtttacacaatgacgtggatc-3')(配列番号26)

を使用する2つの断片を増幅した。PCRを重複することによってそれら2つの断片を集積し、最終的なDNA断片を制限酵素NdeI及びBamHIで消化させた。続いて、上記のようにpRE118-V2を使用して、この断片を大腸菌オペロンのaceE遺伝子の上流に導入した。置換を菌株ECKh-138及びECKh-422において実施した。aceE遺伝子の5'領域を包含するヌクレオチド配列を検証した。それを図37に示す。図37は、pflB-p6プロモーター及びリボソーム結合部位(ribosome binding site)(RBS)に融合されたaceE遺伝子の5'末端のヌクレオチド配列を示す。イタリック体の5'配列は、pdhオペロンから反対方向に転写されるaroP遺伝子の出発点を示す。イタリック体の3'配列は、aceE遺伝子のお発点を示す。大文字:pflB。下線:FNR結合部位。太字:pflB-p6プロモーター配列。

【手続補正 8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 7 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 3 7 2】

lpdAプロモーター置換。fnr結合部位、pflB-p6プロモーター及びpflB遺伝子のRBSを含むプロモーター領域を、染色体DNA鋳型並びにプライマー

【化 1 0】

aceF-pflBp6-fwd (5'- agacaaatcggttgccgtttgttaagccaggcgagatatgatctatc-3')(配列番号27)

及び lpdA-RBS-B-rev (5'-gagttttgatttcagtactcatcatgaacaccttcttctgtgtgatag-3')(配列番号28)

を使用してPCRによって増幅させた。プラスミド2-4aを、プライマー

【化 1 1】

B-RBS-lpdA fwd (5'-

ctatatcacagcaagaaggttaggtgttacatgatgagtactgaaatcaaaactc-3')(配列番号29) 及び pflBp6-aceF-rev (5'- gatatagatcatatctcgcttgcttaacaacggcaaccgattgtct-3')(配列番号30)

を使用してPCRによって増幅させた。得られた2つの断片を、BPSクローニングキット(BPS Bioscience;カリフォルニア州San Diego)を使用して集積した。得られた構築物を配列決定し、検証し、上記のpRE118-V2法を使用して菌株ECKh-439に導入した。得られた菌株ECKh-456にaceF-lpdA領域を包含するヌクレオチド配列を図39に示す。

【手続補正 9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 7 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 3 7 7】

国際公開第2009/023493号及び米国特許公開第2009/0047719号に記載されている最小Opt Knock菌株設計は、マレートデヒドロゲナーゼをコードするmdh遺伝子ECKh-138以外に1つのさらなる欠失を有していた。この遺伝子の欠失は、還元性TCA回路を介するスクシネートへの流動を防止することを意図する。λ赤色相同性組換え法を使用してmdh欠失を実施

した(Datsenko及びWanner、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:6640-6645(2000))。以下のオリゴヌクレオチドを使用して、pKD3から、FRT部位が隣接するクロラムフェニコール抵抗遺伝子(chloramphenicol resistance gene)(CAT)をPCR増幅した。

【化 1 2】

S-mdh-Kan 5' - TAT TGT GCA TAC AGA TGA ATT TTT ATG CAA ACA GTC AGC
CCT GAA GAA GGG TGT AGG CTG GAG CTG CTT C - 3' (配列番号 31)

AS-mdh-Kan 5' - CAA AAA ACC GGA GTC TGT GCT CCG GTT TTT TAT TAT CCG
CTA ATC AAT TAC ATA TGA ATA TCC TCC TTA G - 3' (配列番号 32)

【手続補正 1 0】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 8 0

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 3 8 0】

CS及びACONTは、嫌気性条件下で高度な活性を有さないか、又は高度に発現されない。このため、TCA回路の全体的な調節因子に対してコードするarcA遺伝子を欠失させた。arcAは、ミクロ好気性条件を通じて作用して、低酸素量に対して敏感である中枢代謝酵素aceE、pf1B及びadhEの活性を可能にする遺伝子生成物の発現を誘発する。ミクロ好氣的に、arcA/arcBの欠失は、ldh、icd、gltA、mdh及びgdh遺伝子の特定の活性を高めることが示された(Salmonら、J. Biol. Chem. 280:15084-15096(2005);Shalel-Levanonら、Biotechnol. Bioeng. 92(2):147-159(2005))。大腸菌MG1655のarcA遺伝子上流及び下流領域を、それぞれプライマー

【化 1 3】

ArcA-up-EcoRI (5'- ataataatagaattcggttgctacctaattgccaaactaaatcgaaacagg -3') (配列番号33) を

ArcA-up-KpnI (5'-tattattatggtaccaatatcatgcagcaaacgggtgcaacattgccg -3') (配列番号34) とともに使用し、

ArcA-down-EcoRI (5'-tgatctggaagaattcatcggtttaccaccgtcaaaaaaacggcg -3') (配列番号35) を

ArcA-down-PstI (5'-ataaaaccctgcagcggaaacgaagttttatccattttggttacctg -3') (配列番号36)

とともに使用してPCRによって増幅させた。続いて、これらの断片を制限酵素EcoRI及びKpnI(上流断片)並びにEcoRI及びPstI(下流)で消化させた。次いで、それらをPstI及びKpnIで消化されたpRE118-V2プラスミドに結合させて、プラスミドpRE118-△arcAを得た。プラスミドpRE118-△arcAの配列を検証した。pRE118-△arcAを大腸菌株ECKh-172のエレクトロコンピテント細胞(△adhE △ldhA △pf1B △lpdA::K.p.lpdA322 △mdh)に導入した。上記のようにLB-無塩-スクロースプレート上で組み込み及び分解後、得られた菌株ECKh-401の染色体におけるarcA遺伝子の欠失を配列決定によって検証した。それを図42に示す。

【手続補正 1 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 8 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 3 8 1】

大腸菌のgltA遺伝子は、シトレートシンターゼに対してコードする。この遺伝子は、NADHによってアロステリック阻害されることが既に示されており、この阻害に関与するアミノ酸が特定された(Pereiraら、J. Biol. Chem. 269(1):412-417 (1994);Stokellら、J. Biol. Chem. 278(37):35435-35443 (2003))。大腸菌MG1655のgltA遺伝子を、プライマー

【化 1 4】

(5'- ggaagagaggctggtacccagaagccacagcagga-3') (配列番号37) *gltA*-PstI (5'-
gtaatcactgcgtaagcgccatgccccggcggttaattc -3') (配列番号38)

を使用してPCRによって増幅させた。増幅した断片をKpnI及びPstIで消化した後にpRE118-V2にクローン化した。得られたプラスミドをpRE118-*gltA*と命名した。次いで、このプラスミドを、プライマー

【化 1 5】

R163L-f (5'- attgccgcttctctctgctgtcga-3') (配列番号39) 及び
R163L-r (5'-cgacagcaggaggaacgcggcaat -3') (配列番号40)

を使用して部位志向突然変異させて、残基Arg163をLys残基に変化させた。断片全体の配列を配列決定によって検証した。λ赤色相同性組換え法の変型(Datsenko及びWanner、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:6640-6645(2000))を使用して、Frt傷を残さずに原生*gltA*遺伝子をR163L突然変異対立遺伝子で置き換えた。全般的な組換え手順は、上記*mdh*欠失を複製するのに使用したものと同一である。第1に、λ赤色相同性組換え法を使用して*rpsL*無発現変異を導入することによって、菌株ECKh-172をストレプトマイシン抵抗性にした。次に、組換えを実施して、この菌株における野生型*gltA*コード化領域全体を、カナマイシン抵抗遺伝子(*kanR*)及び大腸菌*rpsL*遺伝子の野生型コピーで構成されるカセットで置き換えた。*rpsL*無発現変異を保持する大腸菌株に導入されると、カセットは、細胞をストレプトマイシンに対して抵抗性からストレプトマイシン感受性に変化させる。次いで、適切な相同性末端とともに、*gltA*遺伝子の突然変異型を含むDNA断片を導入し、得られたコロニー成長をストレプトマイシンの存在下で試験した。これを、*kanR*/*rpsL*カセットが突然変異*gltA*遺伝子で置き換えられた菌株について選択した。突然変異遺伝子の適正な座への挿入をPCR及びDNA配列決定分析によって確認した。得られた菌株は、ECKh-422と命名され、遺伝子型Δ*adhE* Δ*ldhA* Δ*pflB* Δ*lpdA*:K.p.*lpdA*322 Δ*mdh* Δ*arcA* *gltA*R163Lを有する。菌株ECKh-422の突然変異*gltA*遺伝子を包含する領域を、図43に示すように配列決定によって検証した。

【手続補正 1 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 4 0 0

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 4 0 0】

4HBに至る上流BDO経路全体を*fimD*座において大腸菌染色体に組み込んだ。λ赤色相同性組換え法(Datsenko及びWanner、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:6640-6645 (2000))を使用して上流経路のスクシネート分枝を大腸菌染色体に組み込んだ。受容大腸菌株はECKh-422 (Δ*adhE* Δ*ldhA* Δ*pflB* Δ*lpdA*:K.p.*lpdA*322 Δ*mdh* Δ*arcA* *gltA*R163L)であった。プロモーター、*sucCD*遺伝子、*sucD*遺伝子及び*4hbd*遺伝子及び終結配列を含むポリシストロンDNA断片をpKD3プラスミドのAflIII部位に挿入した。以下のプライマーを使用して、プラスミドからのクロラムフェニコールマーカータンとオペロンを増幅した。下線が引かれた配列は、目標挿入部位に対して相同性である。

【化 1 6】

5'-GTTTGCACGCTATAGCTGAGGTTGTGTCTTCCAGCAACGTACCGTATACAA
 TAGGCGTATCACGAGGCCCTTTC-3' (配列番号41)

5'-GCTACAGCATGTCACACGATCTCAACGGTCGGATGACCAATCTGGCTGGTAT
 GGGAATTAGCCATGGTCC-3' (配列番号42)

【手続補正 1 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 4 0 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 4 0 6】

非PTSスクロースオペロンのrrnC領域への挿入を実施した。rrnC領域に対して相同性の領域が隣接する非PTSスクロース遺伝子を含むPCR生成物を生成するために、2つのオリゴを使用して、Mach1(商標)(Invitrogen、カリフォルニア州Carlsbad)からcsc遺伝子をPCR増幅した。この菌株は、スクロースを異化することが可能であることが知られる大腸菌株であるW菌株の子孫である(Orencio-Trejoら、Biotechnology Biofuels 1:8(2008))。その配列は、大腸菌W菌株K011(受入番号AY314757)に由来し(Shuklaら、Biotechnol. Lett. 26:689-693(2004))、スクロースペルメアラーゼ(cscB)、D-フルクトキナーゼ(cscK)、スクロースヒドロラーゼ(cscA)及びLacI関連スクロース特異的抑制因子(scsR)をコードする遺伝子を含む。cscRの最初の53個のアミノ酸をASプライマーの配置によって効果的に除去した。オリゴの配列は、

【化 1 7】

rrnC 23S del S -CSC 5'-**TGT GAG TGA AAG TCA CCT GCC TTA ATA TCT CAA**
AAC TCA TCT TCG GGT GAC GAA ATA TGG CGT GAC TCG ATA C-3' (配列番号43)

及び rrnC 23S del AS -CSC 5'-**TCT GTA TCA GGC TGA AAA TCT TCT CTC ATC CGC**
CAA AAC AGC TTC GGC GTT AAG ATG CGC GCT CAA GGA C-3' (配列番号44)

であった。下線が引かれた領域は、cscオペロンに対する相同性を示し、太字の配列は、rrnC領域の上流及び下流の配列相同性を指す。PCR生成物全体の配列を図55に示す。

【手続補正 1 4】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 1 4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 1 4】

A.

ATGAACTTACATGAATATCAGGCAAAACAACCTTTTTGCCCGCTATGGCTTACCAGCACCGGTGGGTT
 ATGCCTGTACTACTCCGCGCGAAGCAGAAGAAGCCGCTTCAAAAATCGGTGCCGGTCCGTGGGTAG
 TGAAATGTCAGGTTACGCTGGTGGCCGCGGTAAAGCGGGCGGTGTGAAAGTTGTAAACAGCAAA
 GAAGACATCCGTGCTTTTGAGAAAACCTGGCTGGGCAAGCGTCTGGTAACGTATCAAACAGATGCC
 AATGGCCAACCGGTTAACCAGATTCTGGTTGAAGCAGCGACCGATATCGCTAAAGAGCTGTATCTCG
 GTGCCGTTGTTGACCGTAGTTCCCGTCGTGTGGTCTTTATGGCCTCCACCGAAGGCGGCGTGGAAT
 CGAAAAAGTGGCGGAAGAACTCCGCACCTGATCCATAAAGTTGCGCTTGATCCGCTGACTGGCCC
 GATGCCGTATCAGGGACGCGAGCTGGCGTTCAAACCTGGGTCTGGAAGGTAACTGGTTCAGCAGTT
 CACCAAAATCTTCATGGGCTGGCGACCATTTCTGGAGCGCGACCTGGCGTTGATCGAAATCAAC
 CCGCTGGTCATCACCAACAGGGCGATCTGATTTGCCTCGACGGCAAACTGGGCGCTGACGGCAAC
 GCACTGTTCCGCCAGCCTGATCTGCGCGAAATGCGTGACCACTCGCAGGAAGATCCGCGTGAAGCA
 CAGGCTGCACAGTGGGAACTGAACTACGTTGCGCTGGACGGTAACATCGGTTGTATGGTTAACGGC
 GCAGGCTCTGGCGATGGGTACGATGGACATCGTTAACTGCACGGCGGCGAACCAGGCTAATCTCTT
 GACGTTGGCGGCGGCGCAACCAAAGAACGTGTAACCGAAGCGTTCAAAATCATCTCTCTGACGAC
 AAAGTGAAAAGCCGTTCTGGTTAACATCTTCGCGCGGTATCGTTCGTTGCGACCTGATCGCTGACGGTA
 TCATCGGCGCGGTAGCAGAAGTGGGTGTTAACGTACCGGTCGTGGTACGTCTGGAAGGTAAACAACG
 CCGAAGTCCGCGCGAAGAACTGGCTGACAGCGGCCTGAATATTATTGCAGCAAAAGGTCTGACGG
 ATGCAGCTCAGCAGGTTGTTGCCGAGTGAGGGGAAATAATGTCCATTTTAATCGATAAAAAACACC
 AAGGTTATCTGCCAGGGCTTTACCGGTAGCCAGGGGACTTTCCACTCAGAACAGGCCATTGCATACG
 GCACTAAAATGGTTGGCGGCGTAACCCAGGTAAAGGCGGCACCAACCTCGGCGCTGCCGGTGT
 TCAACACCGTGCGTGAAGCCGTTGCTGCCACTGGCGCTACCGCTTCTGTTATCTACGTACCAGCACC
 GTTCTGCAAAGACTCCATTCTGGAAGCCATCGACGCAGGCATCAAACCTGATTATCACCATCACTGAA
 GGCATCCCGACGCTGGATATGCTGACCGTGAAAGTGAAGCTGGATGAAGCAGGCGTTCGTATGATC
 GGCCCGAAGTGGCCAGGCGTTATCACTCCGGGTGAATGCAAAATCGGTATCCAGCCTGGTCACATTC
 ACAACCGGGTAAAGTGGGTATCGTTTCCCGTTCGGGTACACTGACCTATGAAGCAGGTTAAACAGAC
 CACGGATTACGTTTTCGGTCAGTCGACCTGTGTCGGTATCGGCGGTGACCCGATCCCGGGCTCTAAC
 TTTATCGACATTCTCGAAATGTTTCAAAAAGATCCGAGACCGAAGCGATCGTGATGATCGGTGAGA
 TCGGCGGTAGCGCTGAAGAAGAAGCAGCTGCGTACATCAAAGAGCACGTTACCAAGCCAGTTGTGG
 GTTACATCGCTGGTGTGACTGCGCCGAAAGGCAACGTATGGGCCACGCGGGTGCCATCATTGCCG
 GTGGGAAAGGGACTGCGGATGAGAAATTCGCTGCTCTGGAAGCCGCGAGGCGTGAAAACCGTTCGC
 AGCCTGGCGGATATCGGTGAAGCACTGAAAACCTGTTCTGAAATAA (配列番号45)

B.

MNLHEYQAKQLFARYGLPAPVGYACTTPREAEEAASKIGAGPWVVKQVHAGGRGKAGGVKVVNSKE
 DIRAFAENWLGRKRLVYQTDANGQPVNQILVEAATDIAKELYLGAVVDRSSRRVFMASTEGGVEIEKV
 AEETPHLIHKVALDPLTGPMYQGRELAFKLGLEGKLVQQFTKIFMGLATIFLERDLALIEINPLVITKQGD
 ICLDGKLGADGNALFRQPDIREMRDQSQEDPREAQAAQWELNYVALDGNIGCMVNGAGLAMGTMD
 IVKLHGGEPANFLDVGGGATKERVTEAFKIISDDKVKAVLVNIFGGIVRCDLIADGIIGAVAEGVNVV
 VRLEGNNALGAKKLADSGLNIIAAKGLTDAAQVVAAVEGK (配列番号46)

C.

MSILIDKNTKVICQGFSGQGFHSEQAIAYGTMVGGVTPGKGGTTHLGLPVFNTVREAVAATGATAS
 VIYVPAPFCKDSILEAIDAGIKLIITITEGIPTLDMLTVKVLDEAGVRMIGPNCPGVITPGECKIGIQPGHIHK
 PGKVGIVSRSGTLTYEAVKQTTDYGFGQSTCVGIGGDPPIGNSFIDILEMFEKDPQTEAIVMIGEIGGSAEE
 EAAAYIKEHVTKPVVGYIAGVTAPKGKRMGHAGAIAGGKGTADKFAALEAAGVKTVRSLADIGEALKT
 VLK (配列番号47)

図 14

【手続補正 1 5】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 1 5 - 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 15 - 2】

CCGCACGGGACGAGGGGACGGGACCCGACCACACTTCTGCCCGGATCGAACGCTTCTTGCAAGTTG
 TGGGCGGAAGGTTTCGATGACCATCGCGATGCCGTGCACTCCGTGCACTACTTCCACCTGCTACGCC
 GGCATGCCCTGGACGGCATCCAACGCCCCTGATCGTGTTACGCCCCAAGTCGATGTTGCGTCACAA
 GGCCGCCCTCAGCGAAATCAAGGACTTCACCGAGATCAAGTTCCGCTCAGTGCTGGAGGAACCCAC
 CTATGAGGACGGCATCGGAGACCGCAACAAGGTCAGCCGGATCCTGCTGACCAGTGGCAAGCTGTA
 TTACGAGCTGGCCGCCCGCAAGGCCAAGGACAACCGCAATGACCTCGCGATCGTGCGGCTTGAACA
 GCTCGCCCCGCTGCCAGGCGTCGACTGCGTGAAACGCTGGACCGCTACGAGAACGTCAAGGAGTT
 CTTCTGGGTCCAAGAGGAACCGGCCAACCAGGGTGGTGGCCGCGATTGGGGCTCGAACTACCCGA
 GCTGCTGCCTGACAAGTTGGCCGGGATCAAGCGAATCTCGCGCCGGGCGATGTCAGCCCCGTCGTC
 AGGCTCGTCGAAGGTGCACGCCGTGCAACAGCAGGAGATCCTCGACGAGGCGTTCGGCTAA
 (配列番号48)

B.

MANISSPFGQNEWLVEEMYRKFRDDPSSVDPSWHEFLVDYSPEPTSQPAAEPTRVTSPLVAERAAAAA
 PQAPPKPADTAAAGNGVVAALAAKTAVPPPAEGDEVAVLRGAAAAVVKNMSASLEVPTATSVRAVPA
 KLLIDNRIVINNQLKRTRGGKISFTHLLGYALVQAVKKFPNMNRHYTEVDGKPTAVTPAHTNLGLAIDLQ
 GKDGKRSLVAVIGKRCETMRFAQFVTAYEDIVRRARDGKLTTEDFAGVTISLTNPGTIGTVHVSVPRLMPG
 QGAIIGVGAMEYPAEFQGAEEERIAELGIGKLITLTSTYDHRHIIQGAESGDFLRTIHELLSDGFWDEVFREL
 SIPYLPVRWSTDNPDSIVDKNARVMNLIAAYRNRGHLMAADTDPLRLDKARFRSHPDLEVLTHGLTLWDL
 DRVFKVDGFAGAQYKKLRDVLGLLRDAYCRHIGVEYAHILDPEQKEWLEQVRVETKHVKPTVAQQKYILSK
 LNAAEAFETFLQTKYVGQKRFSLEGAESVIPMMDAAIDQCAEHGLDEVVIGMPHRGRNLNLANIVGKPY
 SQIFTEFEGNLNPSQAHGSGDVKYHLGATGLYLQMFQDNDIQVSLTANPSHLEAVDPVLEGLVRAKQDL
 LDHGSIDSDGQRAFSVVPLMLHGDAAFAGQGVVAETLNLANLPGYRVGGTIHIVNNQIGFTTAPESRS
 SEYCTDVAKMIGAPIFHVNGDDPEACVWVARLAVDFRQRFKKDVVIDMLCYRRRGHNEGDDPSMTNP
 YMYDVVDTKRGARKSYTEALIGRGDISMKEAEDALRDYQGQLERVFNEVRELEKHGVQPSVESDQMI
 PAGLATAVDKSLLARIGDAFLALPNGFTAHPRVQPVLEKRRE MAYEGKIDWAFGELLALGSLVAEGKLVR
 LSGQDSRRGTFSQRHSLIDRHTGEEFTPLQLLATNSDGSPTGGKFLVYDSPLSEYAAVGFYGYTVGNPD
 AVVLWEAQFGDFVNGAQSIIDEFISSEGAKWGQLSNVVLPHGHEGQGPDHTSARIERFLQLWAEGS
 MTIAMPSTPSNYFHLLRRHALDGIQRPLIVFTPMSMLRHKA AVSEIKDFTEIKFRSVLEEPTYEDGIGDRNK
 VSRILLTSGKLYYELAARKAKDNRNDLAIVRLEQLAPLPRRLRETLDRENVKEFFWVQEEPANQGAWP
 RFGLELPELLPKLAGIKRISRRAMSAPSSGSSKVHAVEQQEILDEAFG (配列番号49)

図15 (続き)

【手続補正 16】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 18

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 18】

A.

ATGGAAATCAAAGAAATGGTGAGCCTTGACGCAAGGCTCAGAAGGAGTATCAAGCTACCCATAAC
 CAAGAAGCAGTTGACAACATTTGCCGAGCTGCAGCAAAAGTTATTTATGAAAATGCAGCTATTCTGG
 CTCGCGAAGCAGTAGACGAAACCGGCATGGGCGTTTACGAACACAAAGTGGCCAAGAATCAAGGC
 AAATCCAAAGGTGTTTGGTACAACCTCCACAATAAAAAATCGATTGGTATCCTCAATATAGACGAGC
 GTACCGGTATGATCGAGATTGCAAAGCCTATCGGAGTTGTAGGAGCCGTAACGCCGACGACCAACC
 CGATCGTTACTCCGATGAGCAATATCATCTTTGCTCTTAAGACCTGCAATGCCATCATTATTGCCCCC
 ACCCCAGATCCAAAAAATGCTCTGCACACGCAGTTCTGCTGATCAAAGAAGCTATCGCTCCGTTCAA
 CGTACCGGAAGGTATGGTTCAGATCATCGAAGAACCCAGCATCGAGAAGACGCAGGAACATCATGG
 GCGCCGTAGACGTAGTAGTTGCTACGGGTGGTATGGGCATGGTGAAGTCTGCATATTCTTCAGGAA
 AGCCTTCTTCGGTGTGGAGCCGGTAACGTTGAGGTGATCGTGGATAGCAACATCGATTCGAAGC
 TGCTGCAGAAAAAATCATCACCGGTCGTGCTTTGACAACGGTATCATCTGCTCAGGCGAACAGAGC
 ATCATCTACAACGAGGCTGACAAGGAAGCAGTTTTCACAGCATTCCGCAACCACGGTGCATATTTCT
 GTGACGAAGCCGAAGGAGATCGGGCTCGTGAGCTATCTTCGAAAATGGAGCCATCGCGAAAGAT
 GTAGTAGGTCAGAGCGTTGCCTTCATTGCCAAGAAAGCAAACATCAATATCCCCGAGGGTACCCGTA
 TTCTCGTTGTTGAAGCTCGCGGCTAGGAGCAGAAGACGTTATCTGTAAGGAAAAGATGTGTCCCG
 TAATGTGCGCCCTCAGCTACAAGCACTTCGAAGAAGGTGTAGAAATCGCACGTACGAACCTCGCCAA
 CGAAGGTAACGCCACACCTGTGCTATCCAACCAATCAGGCACACATCATCCTCGCAGGATCA
 GAGCTGACGGTATCTCGTATCGTAGTGAATGCTCCGAGTGCCACTACAGCAGGCGGTACATCCAAA
 ACGGTCTTGCCGTAACCAATACGCTCGGATGCGGATCATGGGGTAATAACTCTATCTCCGAGAACTT
 CACTTACAAGCACCTCCTCAACATTTACGCATCGCACCGTTGAATTCAAGCATTACATCCCCGATG
 ACAAAGAAATCTGGGAACCTCTAA (配列番号50)

B.

MEIKEMVSLARKAQKEYQATHNQEAVDNICRAAAKVIYENAAAILAREAVDETGMGVYEHKVAKNQGKS
 KGVWYNLHNKKSIGILNIDERTGMIEIAKPIGVVGAVTPTTNPIVTPMSNIIFALKTCNAIIAPHPRSKKCS
 AHAVRLIKEAIAPFNVPEGMVQIIEEPSIEKTQELMGAVDVVATGGMGMMVKSAYSSGKPSFGVGAGN
 VQVIVDSNIDFEAAAEKIITGRAFDNGIICSGEQSIYNEADKEAVFTAFRNHGAYFCDEAEGDRARAAIFE
 NGAIKDVVGQSVAFIAKKANINIPEGTRILVVEARGVGAEDVICKEKMCPVMCALSYKHFEEGVEIARTN
 LANEGNGHTCAIHSNNQAHIIAGSELTVSRIVVNAPSATTAGGHIQNLAVTNTLGCOSWGNNSISENF
 TYKHLLNISRIAPLNSSIHIPDDKEIWEL (配列番号51)

図 18

【手続補正 17】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 19

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 19】

A.

ATGCAACTTTTCAAACCTCAAGAGTGTAACACATCACTTTGACACTTTTGCAGAATTTGCCAAGGAATT
 CTGTCTTGGAGAACGCGACTTGGTAATTACCAACGAGTTCATCTATGAACCGTATATGAAGGCATGC
 CAGCTCCCCTGCCATTTTGTATGCAGGAGAAATATGGGCAAGGCGAGCCTTCTGACGAAATGATGA
 ATAACATCTTGGCAGACATCCGTAATATCCAGTTCGACCGCGTAATCGGTATCGGAGGAGGTACGGT
 TATTGACATCTCTAAACTTTTCGTTCTGAAAGGATTAAATGATGTACTCGATGCATTGACCGCAAAA
 TACCTCTTATCAAAGAGAAAGAACTGATCATTGTGCCACAAACATGCGGAACGGGTAGCGAGGTGA
 CGAACATTTCTATCGCAGAAATCAAAAGCCGTACACCAAAATGGGATTGGCTGACGATGCCATTGT
 TGCAGACCATGCCATCATCATACCTGAACCTTCTGAAGAGCTTGCCTTTCCACTTCTACGCATGCAGTG
 CAATCGATGCTCTTATCCATGCCATCGAGTCATACGTATCTCTAAAGCCAGTCCATATTCTCGTCTGT
 TCAGTGAGGCGGCTTGGGACATTATCCTGGAAGTATTCAAGAAAATCGCCGAACACGGCCCTGAAT
 ACCGCTTCGAAAAGCTGGGAGAAATGATCATGGCCAGCAACTATGCCGGTATAGCCTTCGGAAATG
 CAGGAGTAGGAGCCGTCCACGCACTATCCTACCCGTTGGGAGGCAACTATCACGTGCCGCATGGAG
 AAGCAAACTATCAGTTCTTACAGAGGTATTCAAAGTATACCAAAAGAAGAATCCTTTCGGCTATAT
 AGTCGAACTCAACTGGAAGCTCTCCAAGATACTGAACTGCCAGCCCGAATACGTATATCCGAAGCTG
 GATGAACTTCTCGGATGCCTTCTTACCAAGAAACCTTTGCACGAATACGGCATGAAGGACGAAGAG
 GTAAGAGGCTTTGCGGAATCAGTGCTTAAGACACAGCAAAGATTGCTCGCCAACAACTACGTAGAG
 CTTACTGTAGATGAGATCGAAGGTATCTACAGAAGACTCTACTAA (配列番号52)

B.

MLFLKLSVTHHFDTFAEFAKEFCLGERDLVITNEFIYEPYMKACQLPCHFVMQEKYQGGEPSDEMNM
 NILADIRNIQFDRVIGGGTVIDISKLFVLKGLNDVLDADFDRKIPLIKEKELIIVPTTCGTGSEVTNISIAEIKSR
 HTKMGLADDAIVADHAIIPPELLKSLPFHFYACSAIDALIHAIESYVSPKASPYSLFSEAAWDIILEVFKIAE
 HGPEYRFELGEMIMASNYAGIAFGNAGVGAVHALSYPLGGNYHVPHEANYQFFTEVFKVYQKKNPF
 GYIVELNWKLSKILNCQPEYVYPKLDELLGCLLTKKPLHEYGMKDEEVRGFAESVLKTQQRLLANNYVELT
 VDEIEGIYRRLY (配列番号53)

図 19

【手続補正 18】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 20

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 20】

A.

ATGAAAGACGTATTAGCGGAATATGCCTCCCGAATTGTTTCGGCCGAAGAAGCCGTAAAACATATCA
 AAAATGGAGAACGGGTAGCTTTGTCACATGCTGCCGGAGTTCCTCAGAGTTGTGTTGATGCACTGGT
 ACAACAGGCCGACCTTTTCCAGAATGTCGAAATTTATCACATGCTTGTCTCGGCGAAGGAAAATAT
 ATGGCACCTGAAATGGCCCCTCACTCCGACACATAACCAATTTGTAGGTGGTAATTCTCGTAAAGC
 AGTTGAGGAAAATAGAGCCGACTTCATTCCGGTATTCTTTATGAAGTGCCATCAATGATTGCAAAA
 GACATCCTTCACATAGATGTCGCCATCGTTCAGCTTCAATGCCTGATGAGAATGGTTACTGTAGTTT
 TGGAGTATCTTGCGATTATAGCAAACCGGCAGCAGAAAGCGCTCATTTAGTTATAGGGGAAATCAA
 CCGTCAAATGCCATATGTACATGGCGACAATTGATTACATATCGAAGTTGGATTACATCGTGATG
 GCAGACTACCCTATCTATTCTCTTGCAAAGCCCAAATCGGAGAAGTAGAAGAAGCTATCGGGCGTA
 ATTGTGCCGAGCTTATTGAAGATGGTGCCACACTCCAACCTCGGTATCGGCGCGATTCTGATGCAGC
 CCTGTTATTCCTCAAGGACAAAAAAGATCTGGGGATCCATACCGAGATGTTCTCCGATGGTGTGTC
 GAATTAGTTCGCAGTGGAGTAATTACAGGAAAGAAAAAGACACTTCACCCCGGAAAGATGGTCGCA
 ACCTTCTTAATGGGAAGCGAAGACGTATATCATTTATCGACAAAAATCCCGATGTAGAATTTATCC
 GGTAGATTACGTCAATGATCCGCGAGTAATCGCTCAAAATGATAATATGGTCAGCATCAATAGCTGT
 ATCGAAATCGATCTTATGGGACAAGTCGTGTCGAATGTATAGGAAGCAAGCAATTCAGCGGAACC
 GGCGGTCAAGTAGATTATGTTCTGTTGGAGCAGCATGGTCTAAAAACGGCAAAAGCATCATGGCAATT
 CCCTCAACAGCCAAAAACGGTACTGCATCTCGAATTGTACCTATAATTGCAGAGGGAGCTGCTGTAA
 CAACCCTCCGCAACGAAGTCGATTACGTTGTAACCGAATACGGTATAGCACAACTCAAAGGAAAGA
 GTTTGCGCCAGCGAGCAGAAGCTCTTATTGCCATAGCCCACCCGGATTTAGAGAGGAACTAACGA
 AACATCTCCGCAAACGTTTCGGATAA (配列番号54)

B.

MKDVLAEYASRIVSAEEAVKHIKNGERVALSHAAGVPQSCVDALVQQADLFQNVIEYHMLCLGEGKYM
 APEMAPHFRHITNFVGGNSRKAVEENRADFIPVFFYEVPSMIRKDILHIDVAIVQLSMPDENGYSFGVS
 CDYSKPAAESAHLVIGEINRQMPYVHGDNLHISKLDYIVMADYPIYSLAKPKIGEVEEAIGRNCAELIEDG
 ATLQLGIGAIPDAALLFLKDKDLGIHTEMFSDGVVELVRSGVITGKKKTLHPGKMMVATFLMGSEDVYHFI
 DKNPDVELYPVDYVNDPRVIAQNDNMVSINSCIEIDLMGQVVSECIGSKQFSGTGGQVDYVRGAAWSK
 NGKSIMAIPTAKNGTASRIVPIAEGAAVTTLRNEVDYVVTEYGIAQLKGKSLRQRAEALIAHPDFREEL
 TKHLRKRFG (配列番号55)

図 20

【手続補正 19】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 21

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 2 1】

A.

ATGATTAAGAGTTTTAATGAAATTATCATGAAGGTAAAGAGCAAAGAAATGAAAAAAGTTGC
 TGTGCTGTAGCACAAGACGAGCCAGTACTTGAAGCAGTAAGAGATGCTAAGAAAAATGGTA
 TTGCAGATGCTATTCTTGTGGAGACCATGACGAAATCGTGTCAATCGCGCTTAAAAATAGGA
 ATGGATGTAAATGATTTTGAAATAGTAAACGAGCCTAACGTTAAGAAAGCTGCTTTAAAGGC
 AGTAGAGCTTGTATCAACTGGAAAAAGCTGATATGGTAATGAAGGGACTTGTAATACAGCAA
 CTTTCTTAAGATCTGTATTAACAAGAAAGTTGGACTTAGAACAGGAAAAACTATGTCTCAC
 GTTGCAGTATTTGAACTGAGAAATTTGATAGACTATTATTTTAAACAGATGTTGCTTTCAA
 TACTTATCCTGAATTAAAGGAAAAAATTGATATAGTAAACAATTCAGTTAAGGTTGCACATG
 CAATAGGAATTGAAAATCCAAAGGTTGCTCCAATTTGTGCAGTTGAGGTTATAAACCTAAA
 ATGCCATCAACACTTGATGCAGCAATGCTTTCAAAAATGAGTGACAGAGGACAAATTAAGG
 TTGTGTAGTTGACGGACCTTTAGCACTTGATATAGCTTTATCAGAAGAAGCAGCACATCATA
 AGGGAGTAACAGGAGAAGTTGCTGGAAAAGCTGATATCTTCTTAATGCCAAACATAGAAACA
 GGAAATGTAATGTATAAGACTTTAACATATACAACCTGATTCAAAAAATGGAGGAATCTTAGT
 TGGAACTTCTGCACCAGTTGTTTTAACTTCAAGAGCTGACAGCCATGAAACAAAAATGAACT
 CTATAGCACTTGCAGCTTTAGTTGCAGGCAATAAATAA (配列番号56)

B.

MIKSFNEIIMKVKSKEMKKVAVAVAQDEPVLEAVRDAKKNGIADAILVGDHDEIVSIALKIG
 MDVNDFEIVNEPNVKKAAALKAVELVSTGKADMVMKGLVNTATFLRSVLNKEVGLRTGKTMSH
 VAVFETEFDRLLFLTDVAFNTYPELKEKIDIVNNSVKVAHAIGIENPKVAPICAVEVINPK
 MPSTLDAAMLSKMSDRGQIKGCVVDGPLALDIALSEEAHHKGVTEVAGKADIFLMPNIET
 GNVMYKTLTYTTDSKNGGILVGTSAVVLTSRADSHETKMNSIALAALVAGNK (配列番号57)

図 21

【手続補正 2 0】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 2 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 2 2】

A.

ATGTATAGATTACTAATAATCAATCCTGGCTCGACCTCAACTAAAATTGGTATTTATGACGA
 TGAAGAAAGAGATATTTGAGAAGACTTTAAGACATTCAGCTGAAGAGATAGAAAAATATAACA
 CTATATTTGATCAATTTCAATTCAGAAAGAATGTAATTTTAGATGCGTTAAAAGAAGCAAAC
 ATAGAAGTAAGTTCTTTAAATGCTGTAGTTGGAAGAGGCGGACTCTTAAAGCCAATAGTAAG
 TGGAACCTTATGCAGTAAATCAAAAAATGCTTGAAGACCTTAAAGTAGGAGTTCAAGGTCAGC
 ATGCGTCAAATCTTGGTGGAATTATTGCAAATGAAATAGCAAAAAGAAATAAATGTTCCAGCA
 TACATAGTTGATCCAGTTGTTGTGGATGAGCTTGATGAAGTTTCAAGAATATCAGGAATGGC
 TGACATTCCAAGAAAAAGTATATTCCATGCATTAAATCAAAAAGCAGTTGCTAGAAGATATG
 CAAAAGAAGTTGGAAAAAAATACGAAGATCTTAATTTAATCGTAGTCCACATGGGTGGAGGT
 ACTTCAGTAGGTACTCATAAAGATGGTAGAGTAATAGAAGTTAATAATACACTTGATGGAGA
 AGGTCCATTCTCACCAGAAAGAAGTGGTGGAGTTCCAATAGGAGATCTTGTAAGATTGTGCT
 TCAGCAACAAATATACTTATGAAGAAGTAATGAAAAAGATAAACGGCAAAGGCGGAGTTGTT
 AGTTACTTAAATACTATCGATTTTAAAGGCTGTAGTTGATAAAGCTCTTGAAGGAGATAAGAA
 ATGTGCACTTATATATGAAGCTTTCACATTCCAGGTAGCAAAAAGAGATAGGAAAATGTTCAA
 CCGTTTTAAAGGAAATGTAGATGCAATAATCTTAACAGGCGGAATTGCGTACAACGAGCAT
 GTATGTAATGCCATAGAGGATAGAGTAAAATTCATAGCACCTGTAGTTAGATATGGTGGAGA
 AGATGAACCTTCTTGCACTTGCAGAAGGTGGACTTAGAGTTTTAAGAGGAGAAGAAAAAGCTA
 AGGAATACAAATAA (配列番号58)

B.

MYRLLIINPGSTSTKIGIYDDEKEIFEKTLRHSAAEIEKYNTIFDQFQFRKNVILDALKEAN
 IEVSSSLNAVVGRRGGLLKPIVSGTYAVNQKMLEDLKVGVOGQHASN LGGIIANEIAKEINVPA
 YIVDPVVVDELDEVSRISGMADIPRKSIFHALNQKAVARRYAKEVGKKYEDLNLIVVHMGGG
 TSVGTHKDGRVIEVNNTLDGEGPFSPESSGGVPIGDLVRLCFSNKYTYEEVMKKINGKGGVV
 SYLNTIDFKAVVDKALEGDKKCALIYEAFTFQVAKEIGKCSTVLKGNVDAIILTGGIAYNEH
 VCNAIEDRVKFIAPVVRYGGEDELLALAEGGLRVLRGEEKAKKEYK (配列番号59)

図 22

【手続補正 2 1】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 2 3 - 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 2 3 - 1】

A.

ATGATTAAGAGTTTTAATGAAATTATCATGAAGGTAAAGAGCAAAGAAATGAAAAAGTTGC
 TGTGCTGTAGCACAAAGACGAGCCAGTACTTGAAGCAGTACGCGATGCTAAGAAAAATGGTA
 TTGCAGATGCTATTCTTGTGGCGACCATGACGAAATCGTGTCAATCGCGCTTAAAAATAGGC
 ATGGATGTAAATGATTTTGAATAGTAAACGAGCCTAACGTTAAGAAAGCTGCTTTAAAGGC
 AGTAGAGCTGGTATCAACTGGAAAAGCTGATATGGTAATGAAGGGACTTGTAATACAGCAA
 CTTTCTTACGCTCTGTATTAAACAAAGAAGTTGGACTGAGAACAGGAAAACTATGTCTCAC
 GTTGCAGTATTTGAACTGAGAAATTTGATCGTCTGTTATTTTAAACAGATGTTGCTTTCAA
 TACTTATCCTGAATTAAGGAAAAAATTGATATCGTAAACAATTCAGTTAAGGTTGCACATG
 CAATAGGTATTGAAAATCCAAAGGTTGCTCCAATTTGTGCAGTTGAGGTTATAAACCCCTAAA
 ATGCCATCAACACTTGATGCAGCAATGCTTTCAAAAATGAGTGACAGAGGACAAATTAAGG
 TTGTGTAGTTGACGGACCGTTAGCACTTGATATCGCTTTATCAGAAGAAGCAGCACATCATA
 AGGGCGTAACAGGAGAAGTTGCTGGAAAAGCTGATATCTTCTTAATGCCAAACATTGAAACA
 GGAAATGTAATGTATAAGACTTTAACATATACAACCTGATAGCAAAAATGGCGGAATCTTAGT
 TGGAACCTCTGCACCAGTTGTTTTAACTTCACGCGCTGACAGCCATGAAACAAAAATGAACT
 CTATTGCACTTGCAGCTTTAGTTGCAGGCAATAAATAA (配列番号60)

B.

ATGATTAAGAGTTTTAATGAAATTATCATGAAGGTAAAGAGCAAAGAAATGAAAAAGTTGC
 TGTGCTGTAGCACAAAGACGAGCCAGTACTTGAAGCAGTACGCGATGCTAAGAAAAATGGTA
 TTGCCGATGCTATTCTGGTTGGCGACCATGACGAAATCGTGTCTATCGCGCTGAAAAATAGGC
 ATGGATGTAAATGATTTTGAATTTGTTAACGAGCCTAACGTTAAGAAAGCTGCGTTAAAGGC
 AGTAGAGCTGGTATCAACTGGAAAAGCTGATATGGTAATGAAGGGACTGGTAAATACCGCAA
 CTTTCTTACGCTCTGTATTAAACAAAGAAGTTGGTCTGCGTACAGGAAAAACCATGTCTCAC
 GTTGCAGTATTTGAACTGAGAAATTTGATCGTCTGTTATTTTAAACAGATGTTGCTTTCAA
 TACTTATCCTGAATTAAGGAAAAAATTGATATCGTTAACAATAGCGTTAAGGTTGCACATG
 CCATTGGTATTGAAAATCCAAAGGTTGCTCCAATTTGTGCAGTTGAGGTTATTAACCCGAAA
 ATGCCATCAACACTTGATGCAGCAATGCTTTCAAAAATGAGTGACCGCGGACAAATTAAGG
 TTGTGTAGTTGACGGACCGCTGGCACTTGATATCGCTTTATCAGAAGAAGCAGCACATCATA
 AAGGCGTAACAGGAGAAGTTGCTGGAAAAGCTGATATCTTCTTAATGCCAAACATTGAAACA
 GGAAATGTAATGTATAAGACGTTAACCTATAACCACTGATAGCAAAAATGGCGGCATCCTGGT
 TGGAACCTCTGCACCAGTTGTTTTAACTTCACGCGCTGACAGCCATGAAACAAAAATGAACT
 CTATTGCACTGGCAGCGCTGGTTGCAGGCAATAAATAA (配列番号61)

図 23

【手続補正 2 2】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 2 3 - 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 2 3 - 2】

C.

ATGATTAAAGAGTTTTAATGAAATTATCATGAAGGTAAAGAGCAAAGAAATGAAAAAGTTGC
TGTTGCTGTTGCACAAGACGAGCCGGTACTGGAAGCGGTACGCGATGCTAAGAAAAATGGTA
TTGCCGATGCTATTCTGGTTGGCGACCATGACGAAATCGTCTCTATCGCGCTGAAAAATGGC
ATGGAIGTTAATGATTTTGAATTTGTTAACGAGCCTAACGTTAAGAAAGCTGCGCTGAAGGC
GGTAGAGCTGGTTTCCACCGGAAAAGCTGATATGGTAATGAAAGGGCTGGTGAATACCGCAA
CTTTCTTACGCAGCGTACTGAACAAAGAAGTTGGTCTGCGTACCGGAAAAACCATGAGTCAC
GTTGCGGTATTTGAAACTGAGAAATTTGAICGTCTGCTGTTTCTGACCGATGTTGCTTTCAA
TACTTATCCTGAATTAAGAAAAAATTGATATCGTTAACAATAGCGTTAAGGTTGCGCATG
CCATTGGTATTGAAATCCAAAGGTTGCTCCAATTTGTGCAGTTGAGGTTATTAACCCGAAA
ATGCCATCAACACTTGATGCCGCAATGCTTAGCAAAATGAGTGACCGCGGACAAATTAAAGG
TTGTGTGGTTGACGGCCCGCTGGCACTGGATATCGCGTTAAGCGAAGAAGCGGCACATCATA
AAGGCGTAACCGGCGAAGTTGCTGGAAAAGCTGATATCTTCCTGATGCCAAACATTGAAACA
GGCAATGTAATGTATAAAACGTTAACCTATAACCACTGATAGCAAAAATGGCGGCATCCTGGT
TGGAACCTTCTGCACCAAGTTGTTTTAACCTACGCGCTGACAGCCATGAAACCAAAATGAACA
GCATTGCACTGGCAGCGCTGGTTGCAGGCAATAAATAA (配列番号62)

D.

ATGATTAAAAGTTTTAACGAAATTATCATGAAAGTGAAAAGCAAAGAGATGAAAAAGTGGC
GGTTGCGGTTGCGCAGGATGAACCGGTGCTGGAAGCGGTGCGCGATGCCAAAAAAACGGTA
TTGCCGATGCCATTCTGGTGGGCGATCACGATGAAATTGTCTCTATTGCGCTGAAAAATGGC
ATGGAIGTTAACGATTTTGAATTTGTTAATGAACCGAACGTGAAAAAGCGGCGCTGAAAGC
GGTTGAACTGGTTTCCACCGGIAAAGCCGATATGGTGATGAAAGGGCTGGTGAATACCGCAA
CCTTCCTGCGCAGCGTGCTGAATAAAGAAGTGGGTCTGCGTACCGGTAAAACCATGAGTCAT
GTTGCGGTGTTTTGAAACCGAAAAATTTGACCGTCTGCTGTTTCTGACCGATGTTGCGTTTTAA
TACCTATCCGGAAGTGAAGAGAAAAATTGATATCGTTAATAACAGCGTGAAAGTGGCGCATG
CCATTGGTATTGAAAACCCGAAAGTGGCGCCGATTTGCGCGGTTGAAGTGATTAACCCGAAA
ATGCCGTCAACGCTGGATGCCGCGATGCTCAGCAAAATGAGCGATCGCGGTCAAATCAAAGG
CTGTGTGGTTGATGGCCCGCTGGCGCTGGATATCGCGCTTAGCGAAGAAGCGGCGCATCATA
AAGGCGTGACCGGCGAAGTGGCCGGTAAAGCCGATATTTTCCTGATGCCGAATATTGAAACC
GGCAACGTGATGTATAAAACGCTGACCTATAACACCGACAGCAAAAACGGCGGCATTCTGGT
GGGTACCAGCGCGCCGGTGGTGCTGACCTCGCGCGCCGACAGCCATGAAACCAAAATGAACA
GCATTGCGCTGGCGGCGCTGGTGGCCGGTAATAAATAA (配列番号63)

図23 (続き)

【手続補正 2 3】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 2 4 - 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 2 4 - 1】

A.

ATGTATCGTTTACTGATTATCAATCCTGGCTCGACCTCAACTAAAAATTGGTATTTATGACGATGA
 AAAAGAGATATTTGAGAAGACTTTACGTCATTTCAGCTGAAGAGATAGAAAAATATAACACTATAT
 TTGATCAATTTTCAGTTTCAGAAAGAATGTAATTCCTCGATGCGTTAAAAGAAGCAAACATTGAAGTA
 AGTTCTTTAAATGCTGTAGTTGGACGCGGCGGACTGTTAAAGCCAATAGTAAGTGGAACCTTATGC
 AGTAAATCAAAAAATGCTTGAAGACCTTAAAGTAGGCGTTCAAGGTCAGCATGCGTCAAATCTTG
 GTGGAATTATTGCAAATGAAATAGCAAAAGAAATAAATGTTCCAGCATAACATCGTTGATCCAGTT
 GTTGTGGATGAGCTTGATGAAGTTTCACGTATATCAGGAATGGCTGACATTCCACGTAAAAAGTAT
 ATTCCATGCATTAAATCAAAAAGCAGTTGCTAGACGCTATGCAAAAGAAGTTGGAAAAAATACG
 AAGATCTTAATTTAATCGTGGTCCACATGGGTGGCGGTACTTCAGTAGGTACTCATAAAGATGGT
 AGAGTAATTGAAGTTAATAATACACTTGATGGAGAAGGTCCATTCTCACCAGAAAGAAGTGGTGG
 CGTTCCAATAGGCGATCTTGTACGTTTGTGCTTCAGCAACAAATATACTTATGAAGAAGTAATGA
 AAAAGATAAACCGCAAAGGCGGCGTTGTTAGTTACTTAAATACTATCGATTTTAAGGCTGTAGTT
 GATAAAGCTCTTGAAGGCGATAAGAAATGTGCACTTATATATGAAGCTTTTCACATTCCAGGTAGC
 AAAAGAGATAGGAAAATGTTCAACCGTTTTAAAGGAAATGTAGATGCAATAATCTTAACAGGCG
 GAATTGCGTACAACGAGCATGTATGTAATGCCATAGAGGATAGAGTAAATTCATTGCACCTGTA
 GTTCGTTATGGTGGAGAAGATGAACTTCTTGCACTTGCAAGAAGGTGGACTGCGCGTTTTACGCGG
 AGAAGAAAAAGCTAAGGAATACAAATAA (配列番号64)

B.

ATGTATCGTTTACTGATTATCAATCCTGGCTCGACCTCAACTAAAAATTGGTATTTATGACGATGA
 AAAAGAGATATTTGAGAAGACGTTACGTCATTTCAGCTGAAGAGATTGAAAAATATAACACTATAT
 TTGATCAATTTTCAGTTCCGCAAGAATGTGATTCTCGATGCGTTAAAAGAAGCAAACATTGAAGTC
 AGTTCTTTAAATGCTGTAGTTGGACGCGGCGGACTGTTAAAGCCAATTGTCAGTGGAACCTTATGC
 AGTAAATCAAAAAATGCTTGAAGACCTTAAAGTGGGCGTTCAAGGTCAGCATGCCAGCAATCTTG
 GTGGCATTATTGCCAATGAAATCGCAAAAGAAATCAATGTTCCAGCATAACATCGTTGATCCGGTT
 GTTGTGGATGAGCTTGATGAAGTTAGCCGTATAAGCGGAATGGCTGACATTCCACGTAAAAAGTAT
 ATTCCATGCATTAAATCAAAAAGCAGTTGCTCGTCGCTATGCAAAAGAAGTTGGTAAAAAATACG
 AAGATCTTAATTTAATCGTGGTCCACATGGGTGGCGGTACTTCAGTAGGTACTCATAAAGATGGT
 CGCGTGATTGAAGTTAATAATACACTTGATGGCGAAGGTCCATTCTCACCAGAACGTAGTGGTGG
 CGTTCCAATTGGCGATCTGGTACGTTTGTGCTTCAGCAACAAATATACTTATGAAGAAGTGATGA
 AAAAGATAAACCGCAAAGGCGGCGTTGTTAGTTACCTGAATACTATCGATTTTAAGGCTGTAGTT
 GATAAAGCGCTTGAAGGCGATAAGAAATGTGCACTGATTTATGAAGCTTTACCTTCCAGGTAGC
 AAAAGAGATTGCTAAATGTTCAACCGTTTTAAAGGAAATGTTGATGCCATTATCTTAACAGGCG
 GCATTGCTTACAACGAGCATGTATGTAATGCCATTGAGGATCGCGTAAATTCATTGCACCTGTA
 GTTCGTTATGGTGGCGAAGATGAACTGCTGGCACTGGCAGAAGGTGGACTGCGCGTTTTACGCGG
 CGAAGAAAAAGCGAAGGAATACAAATAA (配列番号65)

図 24

【手続補正 2 4】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 2 4 - 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 24 - 2】

C.

ATGTATCGTCTGCTGATTATCAATCCTGGCTCGACCTCAACTAAAATTGGTATTTATGACGATGA
 AAAAGAGATATTTGAGAAAACGTTACGTCATAGCGCTGAAGAGATTGAAAAATATAACACTATTT
 TTGATCAATTTTCAAGTTCCGCAAGAATGTGATTCTCGATGCGCTGAAAGAAGCAAACATTGAAGTC
 AGTTTCGCTGAATGCGGTAGTTGGTTCGCGGCGGTCTGCTGAAGCCAATTGTCAGCGGCACTTATGC
 GGTAAATCAAAAAATGCTGGAAGACCTGAAAGTGGGCGTTTCAAGGGCAGCATGCCAGCAATCTTG
 GTGGCATTATTGCCAATGAAATCGCCAAAGAAATCAATGTTCCGGCATAACATCGTTGATCCGGTT
 GTTGTGGATGAGCTGGATGAAGTTAGCCGTATCAGCGGAATGGCTGACATTTCCACGTAAAAGTAT
 TTTCCATGCACTGAATCAAAAAGCGGTTGCGCGTCTGCTATGCAAAGAAGTTGGTAAAAAATACG
 AAGATCTTAATCTGATCGTGGTGCATATGGGTGGCGGTACTAGCGTCCGTACTCATAAAGATGGT
 CGCGTGATTGAAGTTAATAACACTTGATGGCGAAGGTCCATTCTCACCAGAACGTAGCGGTGG
 CGTTCCAATTGGCGATCTGGTACGTTTGTGCTTCAGCAACAAATATACTTGAAGAAGTGATGA
 AAAAGATAAACGGCAAAGGCGGCGTTGTTAGTTACCTGAATACTATCGATTTTAAAGGCGGTAGTT
 GATAAAGCGCTGGAAGGCGATAAGAAATGTGCACTGATTTATGAAGCGTTACCTTCCAGGTGGC
 AAAAGAGATTGGTAAATGTTCAACCGTTCTGAAAGGCAATGTTGATGCCATTATCTTGACCGGCG
 GCATTGCTTACAACGAGCATGTTTGTAAATGCCATTGAGGATCGCGTAAAATTCATTGCACCTGTG
 GTTCGTTATGGTGGCGAAGATGAACTGCTGGCACTGGCAGAAGGTGGTCTGCGCGTTTTACGCGG
 CGAAGAAAAAGCGAAAGAATACAAATAA (配列番号66)

D.

ATGTATCGTCTGCTGATTATCAACCCGGGCAGCACCTCAACCAAATTTGGTATTTACGACGATGA
 AAAAGAGATTTTTGAAAAAACGCTGCGTCACAGCGCAGAAGAGATTGAAAAATACAACACCATTT
 TCGATCAGTTCCAGTTCCGCAAAAACGTGATTCTCGATGCGCTGAAAGAAGCCAATATTGAAGTC
 TCCTCGCTGAATGCGGTGGTTCGTCGCGGCGGTCTGCTGAAACCGATTGTCAGCGGCACTTATGC
 GGTTAATCAGAAAATGCTGGAAGATCTGAAAGTGGGCGTGCAGGGGCAGCATGCCAGCAATCTCG
 GCGGCATTATCGCCAATGAAATCGCCAAAGAGATCAACGTGCCGGCTTATATCGTCGATCCGGTG
 GTGGTTGATGAACTGGATGAAGTCAGCCGTATCAGCGGCATGGCGGATATTCGCGTAAAAGCAT
 TTTCCATGCGCTGAATCAGAAAGCGGTTGCGCGTCTGCTATGCCAAAGAAGTGGGTAAAAAATATG
 AAGATCTTAATCTGATTGTGGTGCATATGGGCGGCGGCACCAGCGTCGGTACGCATAAAGATGGT
 CGCGTGATTGAAGTGAATAACACGCTGGATGGCGAAGGGCCGTTCTCGCCGGAACGTAGCGGCGG
 CGTGCCGATTGGCGATCTGGTGCCTGTGTTTTAGCAATAAATACACCTACGAAGAAGTGATGA
 AAAAAATCAACGGCAAAGGCGGCGTGGTTAGCTATCTGAATACCATCGATTTTAAAGCGGTGGTT
 GATAAAGCGCTGGAAGGCGATAAAAAATGCGCGCTGATTTATGAAGCGTTTACCTTCCAGGTGGC
 GAAAGAGATTGGTAAATGTTCAACCGTGCTGAAAGGCAACGTTGATGCCATTATTCTGACCGGCG
 GCATTGCTTATAACGAACATGTTTGTAAATGCCATTGAAGATCGCGTGAATTTATTGCGCCGGTG
 GTGCGTTACGGCGGCGAAGATGAACTGCTGGCGCTGGCGGAAGGCGGTCTGCGCGTGCTGCGCGG
 CGAAGAAAAAGCGAAAGAGTACAAATAA (配列番号67)

図 24 (続き)

【手続補正 25】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 27

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 27】

A.

ATGAATAAAGACACACTAATACCTACAACCTAAAGATTTAAAAGTAAAAACAAATGGTGAAAAACAT
 TAATTTAAAGAACTACAAGGATAATTCTTCATGTTTCGGAGTATTCGAAAATGTTGAAAATGCTA
 TAAGCAGCGCTGTACACGCACAAAAGATATTATCCCTTCATTATACAAAAGAGCAAAAGAGAAAAA
 ATCATAACTGAGATAAGAAAGGCCGCATTACAAAATAAAGAGGTCTTGGCTACAATGATTCTAGA
 AGAAACACATATGGGAAGATATGAGGATAAAATATTAAAACATGAATTGGTAGCTAAATATACTC
 CTGGTACAGAAGATTTAACTACTACTGCTTGGTCAGGTGATAATGGTCTTACAGTTGTAGAAATG
 TCTCCATATGGTGTTATAGGTGCAATAACTCCTTCTACGAATCCAACCTGAACTGTAATATGTAA
 TAGCATAGGCATGATAGCTGCTGGAAATGCTGTAGTATTTAACGGACACCCATGCGCTAAAAAAT
 GTGTTGCCTTTGCTGTTGAAATGATAAATAAGGCAATTATTTTCATGTGGCGGTCCCTGAAAATCTA
 GTAACAACTATAAAAAATCCAACCTATGGAGTCTCTAGATGCAATTATTAAGCATCCTTCAATAAA
 ACTTCTTTGCGGAACTGGGGGTCCAGGAATGGTAAAAACCCTCTTAAATTCTGGTAAGAAAGCTA
 TAGGTGCTGGTGCTGGAATCCACCAGTTATTGTAGATGATACTGCTGATATAGAAAAGGCTGGT
 AGGAGCATCATTGAAGGCTGTTCTTTTGATAATAATTTACCTTGTATTGCAGAAAAAGAAGTATT
 TGTTTTTGAAGATGTTGCAGATGATTTAATATCTAACATGCTAAAAAATAATGCTGTAATTATAA
 ATGAAGATCAAGTATCAAAATTAATAGATTTAGTATTACAAAAAATAATGAACTCAAGAATAC
 TTTATAAACAAAAATGGGTAGGAAAAGATGCAAAATTATTCTTAGATGAAATAGATGTTGAGTC
 TCCTTCAAATGTTAAATGCATAATCTGCGAAGTAAATGCAAATCATCCATTTGTTATGACAGAAC
 TCATGATGCCAATATTGCCAATTGTAAGAGTTAAAGATATAGATGAAGCTATTAAATATGCAAAG
 ATAGCAGAACAAAATAGAAAACATAGTGCCTATATTTATTCTAAAAATATAGACAACCTAAATAG
 ATTTGAAAGAGAAATAGATACTACTATTTTGTAAAGAATGCTAAATCTTTTGCTGGTGTTGGTT
 ATGAAGCAGAAGGATTTACAACTTTCACTATTGCTGGATCTACTGGTGAGGGAATAACCTCTGCA
 AGGAATTTTACAAGACAAAGAAGATGTGTACTTGCCGGCTAA (配列番号68)

B.

MNKDTLIPTTKDLKVKTNGENINLKNYKDNSSCFGVFENVENAIISSAVHAQKILSLHYTKQREK
 IITEIRKAALQNKEVLATMILEETHMGRYEDKILKHELVAKYTPGTEDLT'TAWSGDNGLTVVEM
 SPYGVIGAITPSTNPETVINCISGMIAAGNAVVFNGHPCAKKCVAFVAVEMINKAII SCGGPENL
 VTTIKNPTMESLDAIIKHPSIKLLCGTGGPGMVKTLNLSGKKAIGAGAGNPPVIVDDTADIEKAG
 RSIIEGCSFDNNLPCIAEKEVFVENVADDLISNMLKNNAVIINEDQVSKLIDLVLQKNNETQEY
 FINKKWVGKDAKLFLDEIDVESPSNVKCIICEVNNANHPFVMTLMMPILPVVRVKDIDEAIIKYAK
 IAEQNRKHSAYIIYSKNIDNLNRFEREIDTTIFVKNAKSFAGVGYEAEFTTFTIAGSTGEGITSA
 RNFTRQRRCVLAG (配列番号69)

図 27

【手続補正 26】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 28 - 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 28 - 1】

A.

ATGAATAAAGACACACTAATACCTACAACCTAAAGATTTAAAAGTAAAAACAAATGGTGAAAACAT
 TAATTTAAAGAACTACAAGGATAATTCTTCATGTTTCGGCGTATTTCGAAAATGTTGAAAATGCTA
 TAAGCAGCGCTGTACACGCACAAAAGATATTATCCCTTCATTATACAAAAGAGCAACGTGAAAAA
 ATCATAACTGAGATAAGAAAGGCCGCATTACAAAATAAAGAGGTCTTGGCTACAATGATTCTGGA
 AGAAACACATATGGGACGTTATGAGGATAAAAATATTTAAAACATGAATTGGTAGCTAAATATACTC
 CTGGTACAGAAGATTTAACTACTACTGCCTGGTCAGGTGATAATGGTCTGACAGTTGTAGAAATG
 TCTCCATATGGTGTTATTGGTGCAATAACTCCTTCTACGAATCCAACCTGAAACTGTAATATGTAA
 TAGCATAGGCATGATTGCTGCTGGAAATGCTGTAGTATTTAACGGACACCCATGCGCTAAAAAAT
 GTGTTGCCTTTGCTGTTGAAATGATAAATAAGGCAATTATTTTCATGTGGCGGTCTGAAAAATCTG
 GTAACAACCTATAAAAAATCCAACCATGGAGTCTCTGGATGCAATTATTAAGCATCCTTCAATAAA
 ACTTCTTTGCGGAACTGGGGGTCCAGGAATGGTAAAAACCCTGTTAAATTCTGGTAAGAAAGCTA
 TAGGTGCTGGTGCTGGAAATCCACCAGTTATTGTCTGATGATACTGCTGATATAGAAAAGGCTGGT
 CGTAGCATCATTGAAGGCTGTTCTTTTGATAATAATTTACCTTGTATTGCAGAAAAAGAAGTATT
 TGTTTTTGAGAAATGTTGCAGATGATTTAATATCTAACATGCTAAAAAATAATGCTGTAATTATAA
 ATGAAGATCAAGTATCAAAATTAATCGATTTAGTATTACAAAAAATAATGAAACTCAAGAATAC
 TTTATAAACAAAAAATGGGTAGGAAAAGATGCAAAATTATTCCTCGATGAAATAGATGTTGAGTC
 TCCTTCAAATGTTAAATGCATAATCTGCGAAGTAAATGCAATCATCCATTTGTTATGACAGAAC
 TGATGATGCCAATATTGCCAATTGTACGCGTTAAAGATATCGATGAAGCTATTAAATATGCAAAG
 ATAGCAGACAAAAATAGAAAACATAGTGCCTATATTTATTCTAAAAATATCGACAACCTGAATCG
 CTTTGAACGTGAAATAGATACTACTATTTTGTAAAGAAATGCTAAATCTTTTGCTGGTGTTGGTT
 ATGAAGCAGAAGGATTTACAACCTTTCACCTATTGCTGGATCTACTGGTGAGGGAATAACCTCTGCA
 CGTAATTTTACACGCCAACGTGCTGTGTACTTGCCGGCTAA (配列番号70)

B.

ATGAATAAAGACACACTGATCCCTACAACCTAAAGATTTAAAAGTAAAAACAAATGGTGAAAACAT
 TAATTTAAAGAACTACAAAAGATAATAGCAGTTGTTTCGGCGTATTTCGAAAATGTTGAAAATGCTA
 TCAGCAGCGCTGTACACGCACAAAAGATATTATCGCTGCATTATACAAAAGAGCAACGTGAAAAA
 ATCATCACTGAGATACGTAAGGCCGCATTACAAAATAAAGAGGTGCTGGCTACAATGATTCTGGA
 AGAAACACATATGGGACGTTATGAGGATAAAAATATTTAAAACATGAACTGGTAGCTAAATATACTC
 CTGGTACAGAAGATTTAACTACTACTGCCTGGAGCGGTGATAATGGTCTGACAGTTGTAGAAATG
 TCTCCATATGGTGTTATTGGTGCAATAACTCCTTCTACCAATCCAACCTGAAACTGTAATTTGTAA
 TAGCATTTGGCATGATTGCTGCTGGAAATGCTGTAGTATTTAACGGACACCCATGCGCTAAAAAAT
 GTGTTGCCTTTGCTGTTGAAATGATCAATAAGGCAATTATTAGCTGTGGCGGTCCGGAAAAATCTG
 GTAACAACCTATAAAAAATCCAACCATGGAGTCTCTGGATGCCATTATTAAGCATCCTTCAATAAA
 ACTGCTTTGCGGAACTGGCGGTCCAGGAATGGTAAAAACCCTGTTAAATTCTGGTAAGAAAGCTA
 TTGGTGCTGGTGCTGGAAATCCACCAGTTATTGTCTGATGATACTGCTGATATTGAAAAGGCTGGT
 CGTAGCATCATTGAAGGCTGTTCTTTTGATAATAATTTACCTTGTATTGCAGAAAAAGAAGTATT
 TGTTTTTGAGAAATGTTGCAGATGATTTAATATCTAACATGCTGAAAAAATAATGCTGTAATTATCA
 ATGAAGATCAGGTATCAAAATTAATCGATTTAGTATTACAAAAAATAATGAAACTCAAGAATAC
 TTTATCAACAAAAAATGGGTAGGTAAAGATGCAAAATTATTCCTCGATGAAATCGATGTTGAGTC
 TCCTTCAAATGTTAAATGCATTATCTGCGAAGTGAATGCCAATCATCC

図 28

【手続補正 27】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 28 - 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 28 - 2】

ATTTGTTATGACAGAACTGATGATGCCAATATTGCCAATTGTGCGCGTTAAAGATATCGATGAAG
CTATTAAATATGCAAAGATTGCAGAACAAAATAGAAAACATAGTGCCTATATTTATAGCAAAAAT
ATCGACAACCTGAATCGCTTTGAACGTGAAATCGATACTACTATTTTTTTGTAAAGAATGCTAAATC
TTTTGCTGGTGTGGTTATGAAGCAGAAGGATTTACCACTTTCACTATTGCTGGATCTACTGGTG
AGGGCATAACCTCTGCACGTAATTTTACCCGCCAACGTCGCTGTGTACTGGCCGGCTAA (配列番号
71)

C.

ATGAATAAAGACACGCTGATCCCGACAACCTAAAGATCTGAAAGTAAAAACCAATGGTGAAAACAT
TAATCTGAAGAACTACAAAGATAATAGCAGTTGTTTCGGCGTATTTCGAAAATGTTGAAAATGCTA
TCAGCAGCGCGGTACACGCACAAAAGATACTCTCGCTGCATTATACCAAAGAGCAACGTGAAAAA
ATCATCACTGAGATCCGTAAGGCCGCATTACAAAATAAAGAGGTGCTGGCAACAATGATTCTGGA
AGAAACACATATGGGACGTTATGAGGATAAAATACTGAAACATGAACTGGTGGCGAAATATACGC
CTGGTACTGAAGATTTAACCACCACTGCCTGGAGCGGTGATAATGGTCTGACCGTTGTGGAAATG
TCGCCTTATGGTGTATTGGTGCAATTACGCCTTCAACCAATCCAACCTGAAACGGTAATTTGTAA
TAGCATTGGCATGATTGCTGCTGGAATGCGGTAGTATTTAACGGTCACCCCTGCGCTAAAAAAT
GTGTTGCCCTTTGCTGTTGAAATGATCAATAAAGCGATTATTAGCTGTGGCGGTCCGGAAAAATCTG
GTAACCACTATAAAAAATCCAACCATGGAGTCGCTGGATGCCATTATTAAGCATCCTTCAATCAA
ACTGCTGTGCGGCACTGGCGGTCCAGGAATGGTGAAAACCTGCTGAATAGCGGTAAAGAAAGCGA
TTGGTGTGGTGTGCTGGAATCCACCAGTTATTGTGCTGATGATACTGCTGATATTGAAAAAGCGGT
CGTAGCATCATTGAAGGCTGTTCTTTTGATAATAATTTACCTTGTATTGCAGAAAAAGAAGTATT
TGTTTTTTGAGAATGTTGCCGATGATCTGATCTCTAACATGCTGAAAAATAATGCGGTGATTATCA
ATGAAGATCAGGTTAGCAAACTGATCGATCTGGTATTACAAAAAATAATGAACTCAAGAATAC
TTTATCAACAAAAAATGGGTAGGTAAAGATGCAAACTGTTCCCTCGATGAAATCGATGTTGAGTC
GCCTTCAAATGTTAAATGCATTATCTGCGAAGTGAATGCCAATCATCCATTTGTGATGACCGAAC
TGATGATGCCAATTTTGCCGATTGTGCGCGTTAAAGATATCGATGAAGCGATTAAATATGCAAAG
ATTGCAGAACAAAATCGTAAACATAGTGCCTATATTTATAGCAAAAATATCGACAACCTGAATCG
CTTTGAACGTGAAATCGATAACCACTATTTTTGTGAAGAATGCTAAATCTTTTGCTGGTGTGGTT
ATGAAGCAGAAGGTTTTACCACTTTCACTATTGCTGGAAGCACCGGTGAAGGCATTACCTCTGCA
CGTAATTTTACCCGCCAACGTCGCTGTGTACTGGCCGGCTAA (配列番号72)

D.

ATGAATAAAGATACGCTGATCCCGACCACCAAAGATCTGAAAGTAAAAACCAACGGCGAAAAATAT
CAACCTGAAAACTATAAAGATAACAGCAGTTGCTTTGGCGTGTGTTGAAAACGTTGAAAACGCCA
TCTCCAGCGCGGTGCATGCGCAAAAAATTTCTCTCGCTGCATTACACCAAAGAGCAGCGTGAAAAA
ATTATCACCGAAATCCGTAAAGCGGCGCTGCAAAACAAAGAAGTGCTGGCAACCATGATCCTGGA
AGAAACGCATATGGGGCGTTATGAAGATAAAATTCTGAAACATGAACTGGTGGCGAAATACACGC
CGGGCACTGAAGATCTGACCACCACCGCCTGGAGCGGCGATAACGGCCTGACCGTGGTGGAGATG
TCGCCTTATGGCGTGATTGGCGCGATTACGCCGTCAACCAACCCGACCGAAACGGTGATTTGTAA
CAGCATTGGCATGATTGCCGCGGGTAATGCGGTGGTGTGTTAACGGTCATCCCTGCGCGAAAAAAT
GTGTGGCGTTTGCCGTTGAGATGATCAACAAAGCGATTATCAGCTGCGGCGGCCCCGAAAAATCTG
GTGACCACCATCAAAAATCCGACCATGGAATCGCTGGATGCCATTATCAACATCCTTCCATCAA
ACTGCTGTGCGGCACCGGCGGCCCCGGGCATGGTGAAAACGCTGCTGAACAGCGGTAAAAAAGCGA
TTGGCGCGGGCGCGGGTAACCCGCCGGTGATTGTGCTGATGACACCGCCGATATT

図 28 (続き)

【手続補正 28】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 28 - 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 28 - 3】

GAAAAAGCGGGGCGTAGCATTATTGAAGGCTGTTCTTTTGATAACAACCTGCCCTGCATTGCCGA
 AAAAGAAGTGTGTTGTCTTTGAAAACGTCGCCGATGATCTGATCAGCAATATGCTGAAAAACAACG
 CGGTGATTATCAATGAAGATCAGGTTAGCAAACCTGATCGATCTGGTGCTGCAAAAAACAACGAA
 ACGCAGGAATATTTTATCAACAAAAAATGGGTGGTAAAGATGCCAAACTGTTCTCGATGAAAT
 CGATGTTGAATCGCCGTCTAACGTGAAATGTATTATCTGCGAAGTGAACGCCAACCATCCGTTTG
 TGATGACCGAACTGATGATGCCGATTCTGCCGATTGTGCGCGTGAAAGATATCGATGAAGCGATT
 AAATATGCCAAAATTGCCGAACAAAACCGTAAACACAGCGCCTATATTTACAGCAAAAAATATCGA
 TAACCTGAACCGCTTTGAACGTGAAATCGATACCACCATTTTTGTGAAAAATGCCAAAAGTTTTG
 CCGGCGTTGGTTATGAAGCGGAAGGTTTTACCACCTTTACCATTGCCGGTAGCACCGGCGAAGGC
 ATTACCAGCGCCCGTAATTTTACCCGCCAGCGTCGCTGCGTGCTGCGGGCTAA (配列番号73)

図 28 (続き)

【手続補正 29】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 3 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 3 1】

A.

ATGAAAGCTGCAGTAGTAGAGCAATTTAAGGAACCATTAAAAATTAAAGAAGTGGAAGGCCATC
 TATTTTCATATGGCGAAGTATTAGTCCGCATTAAAGCATGCGGTGTATGCCATACGGACTTGCACG
 CCGCTCATGGCGATTGGCCAGTAAACCAAACTTCCTTTAATCCCTGGCCATGAAGGAGTCGGA
 ATTGTTGAAGAAGTCGGTCCGGGGGTAACCCATTTAAAAGTGGGAGACCGCGTTGGAATTCCTTG
 GTTATATTCTGCGTGCGGCCATTGCGAATATTGTTTAAAGCGGACAAGAAGCATTATGTGAACATC
 AACAAAACGCCGGCTACTCAGTCGACGGGGGTTATGCAGAATATTGCAGAGCTGCGCCAGATTAT
 GTGGTGAAAAATTCCTGACAACCTTATCGTTTGAAGAAGCTGCTCCTATTTTTCTGCGCCGGAGTTAC
 TACTTATAAAGCGTTAAAAGTCACAGGTACAAAACCGGGAGAATGGGTAGCGATCTATGGCATCG
 GCGGCCTTGGACATGTTGCCGTCCAGTATGCGAAAGCGATGGGGCTTCATGTTGTTGCAGTGGAT
 ATCGGCGATGAGAACTGGAACCTTGCAAAAGAGCTTGGCGCCGATCTTGTTGTAAATCCTGCAAA
 AGAAAATGCGGCCCAATTTATGAAAGAGAAAGTCGGCGGAGTACACGCGGCTGTTGTGACAGCTG
 TATCTAAACCTGCTTTTCAATCTGCGTACAATCTTATCCGCAGAGGCGGCACGTGCGTGCTTGTC
 GGATTACCGCCGGAAGAAATGCCTATTCGAATCTTTGATACGGTATTAAACGGAATTTAAATTAT
 CCGTTCCATTGTGCGGCACGCGGAAAGACTTGCAAGAAGCGCTTCAGTTGCTGCAGAAGGTAAAG
 TAAAAACCATTTATGAAGTGCAACCTCTTGAAAAAATTAACGAAGTATTTGACAGAATGCTAAAA
 GGAGAAATTAACGGACGGGTTGTTTAAACGTTAGAAAATAATAATTAA (配列番号74)

B.

MKAAVVEQFKEPLKIKEVEKPSISYGEVLVRIKACGVCHTDLHAAHGDWVPVKPLPLIPGHEGVG
 IVEEVGPGVTHLKVGDVRVGI PWLYSACGHCEYCLSGQEALCEHQONAGYSVDGGYAEYCRAAPDY
 VVKIPDNLSFEEAAPIFCAGVTTYKALKVGTGKPGEWVAIYIGLGHVAVQYAKAMGLHVVAVD
 IGDEKLELAKELGADLVVNPAKENAAQFMKEKVGGVHAAVVTAVSKPAFQSAYNSIRRGCTCVLV
 GLPPEEMPIPIFDTVLNGIKIIGSIVGTRKDLQEALQFAAEGKVKTIIIEVQPLEKINEVFDRMLK
 GEINGRVVLTLENNN (配列番号75)

図 31

【手続補正 30】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 3 5 - 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 3 5 - 2】

AAAAACCTCGATGCAGGTAAAGCTGGCGTGGAAGTTGACGATCGCGGCTTCATCCGCGTTGACAAA
CAAATGCGCACCAACGTGCCGCACATCTTTGCTATCGGCGATATCGTCGGTCAGCCGATGCTGGCGC
ACAAAGGTGTCCATGAAGGCCACGTTGCCGCAGAAGTTATCTCCGGTCTGAAACACTACTTCGATCC
GAAAGTGATCCCATCCATCGCCTACACTAAACCAGAAGTGGCATGGGTGCGTCTGACCGAGAAAGA
AGCGAAAGAGAAAGGCATCAGCTACGAAACCGCCACCTTCCCGTGGGCTGCTTCCGGCCGTGCTAT
CGTTCTGACTGCGCAGATGGTATGACCAAAGTATCTTCGACAAAGAGACCCACCGTGTTATCGGC
GGCGCGATTGTCGGCACCAACGGCGGCGAGCTGCTGGGTGAGATCGGCCTGGCTATCGAGATGGG
CTGTGACGCTGAAGACATCGCCCTGACCATCCACGCTACCCGACTCTGCACGAGTCCGTTGGCCTG
GCGGCGGAAGTGTTCAAGGCAGCATCACCGACCTGCCAAACGCCAAAGCGAAGAAAAAGTAACT
TTTTCTTTCAGGAAAAAAGCATAAGCGGCTCCGGGAGCCGCTTTTTTATGCCTGATGTTTAGAACTA
TGTCACTGTTTATAAACCGCTACACCTCATACATACTTTAAGGGCGAATTCTGCAGATATCCATCACA
CTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGCACATCCGGCAATTAAGGCGGCTAACACGCCGCTTT
TTTACGTCTGCAATTTACCTTTCCAGTCTTCTTGCTCCACGTTGAGAGAGACGTTGCGATACTGCTGA
CCGTTGCTCGTTATTCAGCCTGACAGTATGGTTACTGTCGTTTAGACGTTGTGGGCGGCTCTCCTGAA
CTTTCTCCCGAAAAACCTGACGTTGTTGAGGTGATGCCGATTGAACACGCTGGCGGGCGTTATCACG
TTGCTGTTGATTCAGTGGGCGCTGCTGTACTTTTTCCTT (配列番号76)

図35(続き)

【手続補正 3 1】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 3 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 3 6】

		セクション1					
	(1)	1	10	20	30	40	52
EC-IpdA	(1)	MMSTEIKTQVVVLGAGPAGYSAAFRCADLGLETVIVERYNTLGGVCLNVGCI					
KP-IpdA 突然変異	(1)	MMSTEIKTQVVVLGAGPAGYSAAFRCADLGLETVIVERYSTLGGVCLNVGCI					
		セクション2					
	(53)	53	60	70	80	90	104
EC-IpdA	(53)	PSKALLHVAKVIEEAKALAEHGIVFGEPKTDIDKIRTWKEKVINQLTGGLAG					
KP-IpdA 突然変異	(53)	PSKALLHVAKVIEEAKALAEHGIVFGEPKTDIDKIRTWKEKVIITQLTGGLAG					
		セクション3					
	(105)	105	110	120	130	140	156
EC-IpdA	(105)	MAKGRKVKVVNGLGKFTGANTLEVEGENGKTVINFDNAIIAAGSRPIQLPFI					
KP-IpdA 突然変異	(105)	MAKGRKVKVVNGLGKFTGANTLEVEGENGKTVINFDNAIIAAGSRPIQLPFI					
		セクション4					
	(157)	157	170	180	190		208
EC-IpdA	(157)	PHEDPRIWDSTDAL ELKEVPERLLVMGGGIIGLEMGT VYHALG SQIDVVEMF					
KP-IpdA 突然変異	(157)	PHEDPRVWDSTDAL ELKSVPKRMLVMGGGIIGLEMGT VYHALG SEIDVVEMF					
		セクション5					
	(209)	209	220	230	240	250	260
EC-IpdA	(209)	DQVIPAADKDI VKVFTKRISK KFNLMLET KVTAVEAKEDGIYV TMEGKKAPA					
KP-IpdA 突然変異	(209)	DQVIPAADKDV VKVFTKRISK KFNLMLEAKVTAVEAKEDGIYV S TMEGKKAPA					
		セクション6					
	(261)	261	270	280	290	300	312
EC-IpdA	(261)	EPQRYDAVLVAIGRVPNGKNLDAGKAGVEVDDR GFIRVDKQLRTNVPHIFAI					
KP-IpdA 突然変異	(261)	EAQRYDAVLVAIGRVPNGKNLDAGKAGVEVDDR GFIRVDKQMR TNVPHIFAI					
		セクション7					
	(313)	313	320	330	340	350	364
EC-IpdA	(313)	GDIVGQPMLAHKGVHEGHVAAEVIAGKKHYFDPKVIPS IAYTEPEVAWVGLT					
KP-IpdA 突然変異	(313)	GDIVGQPMLAHKGVHEGHVAAEVIISGLKHYFDPKVIPS IAYTKPEVAWVGLT					
		セクション8					
	(365)	365	370	380	390	400	416
EC-IpdA	(365)	EKEAKEKGISYETATFPWAASGRAIASDCADGMTKLIFDKE SHRVIGGAIVG					
KP-IpdA 突然変異	(365)	EKEAKEKGISYETATFPWAASGRAIASDCADGMTKLIFDKE THRVIGGAIVG					
		セクション9					
	(417)	417	430	440	450		468
EC-IpdA	(417)	TNGGELLGEIGLAIEMGCD AEDIALTIHAHPTLHESVGLAAEFV EGSITDLP					
KP-IpdA 突然変異	(417)	TNGGELLGEIGLAIEMGCD AEDIALTIHAHPTLHESVGLAAEFV EGSITDLP					
	(469)	469	476				
EC-IpdA	(469)	NPKAKKK- (配列番号77)					
KP-IpdA 突然変異	(469)	NAKAKKK- (配列番号78)					

図 36

【手続補正 3 2】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 3 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 3 8】

ataataatacatatgaaccatgcgagttacgggcctataagccaggcgagatatgatctatatcaatttctcatctataatgctttgtta
 gtatctcgtcgcgacttaataaagagagagtagtgtaaagctgacaaccctttgatctttacttctgctgcaatggccaaagtgg
 ccgaagaggcggtgtctataaagcaacgaaacatccgcttaagactttctatctggcgattaccgccggtgtttcatctcaatcgattc
 accactggcacaggcacaGAAGGTAGGTGTTACatgtcagaacgtttacacaatgacgtggatcctattattat (配列番号79)

図 38

【手続補正 3 3】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 3 9 - 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 3 9 - 2】

ACAAATGCGCACCAACGTGCCGCACATCTTTGCTATCGGCGATATCGTCGGTCAGCCGATGCTGGCG
 CACAAAGGTGTCCATGAAGGCCACGTTGCCGCAGAAAGTTATCTCCGGTCTGAAACACTACTTCGATC
 CGAAAGTGATCCCATCCATCGCCTACCTAAACCAGAAAGTGGCATGGGTCCGGTCTGACCGAGAAAAG
 AAGCGAAAGAGAAAGGCATCAGCTACGAAACCGCCACCTTCCCGTGGGCTGCTTCCGGCCGTGCTA
 TCGCTTCTGACTGCGCAGATGGTATGACCAAAGTATCTTCGACAAAGAGACCCACCGTGTATCGG
 CGGCGCGATTGTGCGGCACCAACGCGCGGCGAGCTGCTGGGTGAGATCGGCCTGGCTATCGAGATGG
 GCTGTGACGCTGAAGACATCGCCCTGACCATCCACGCTCACCCGACTCTGCACGAGTCCGTTGGCCT
 GGCGGCGGAAGTGTTTGAAGGCAGCATCACCGACCTGCCAAACGCCAAAGCGAAGAAAAAGTAAC
 TTTTCTTTTTCAGGAAAAAAGCATAAGCGGCTCCGGGAGCCGCTTTTTTATGCCTGATGTTTAGAACT
 ATGTCATGTTTATACAAACCGCTACACCTCATACATACTTTAAGGGCGAATTCTGCAGATATCCATCAC
 ACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGCACATCCGGCAATTAAGGGCGAATTCTGCAGATATCCATCAC
 TTTTACGTCTGCAATTTACCTTTCCAGTCTTCTTGCTCCACGTTTACAGAGAGACGTTTGCATACTGCTG
 ACCGTTGCTCGTTATTCAGCCTGACAGTATGGTTACTGTGCTTTAGACGTTGTGGGCGGCTCTCCTGA
 ACTTTCTCCGAAAAACCTGACGTTGTTTCAAGGTGATGCCGATTGAACACGCTGGCGGGCGTTATCAC
 GTTGCTGTTGATTAGTGGGCGCTGCTGTACTTTTCTTAAACACCTGGCGCTGCTCTGGTGATGCG
 GACTGAATACGCTCACGCGCTGCGTCTCTCGCTGCTGGTTCTGCGGGTTAGTCTGCATTTTCTCGCG
 AACCGCCTGGCGCTGCTCAGGCGAGGCGGACTGAATGCGCTCACGCGCTGCCTCTCTCGCTGCTG
 GATCTTCGGGTTAGTCTGCATTCTCTCGGAACTGCCTGGCGCTGCTCAGGCGAGGCGGACTGATAA
 CGCTGACGAGCGGCGTCTTTTGTGCTGGGTGAGTGGTGGCGACGGCTGAAGTCGTGGAAGTCG
 TCATAGCTCCATAGTGTTCAGCTTCATTAACCGCTGTGCCGCTGCCTGACGTTGGGTACCTCGTGT
 AATGACTGGTGCGGCGTGTGTTGCTGAAACTGATTTGCTGCCGCTGACGCTGGCTGTGCGCGC
 GTTGGGGCAGGTAATTGCGTGGCGCTCATTCCGCCGTTGACATCGGTTTGATGAAACCGCTTTGCCA
 TATCTGATCATGATAGGGCACACCATACGGTAGTTTGGATTGTGCCGCCATGCCATATTCTTATCA
 GTAAGATGCTCACCGGTGATACGGTTGAAATTGTTGACGTCGATATTGATGTTGTGCGCGTTGTGTT
 GCCAGCCATTACCGTCACGATGACCGCCATCGTGGTGATGATAATCAT (配列番号80)

図39(続き)

【手続補正 3 4】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 4 1 B

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 4 1 B】

FRT

AS-mdh-Kan

XbaI

```

1  CAAAAACCG GAGTCTGTGC TCCGGTTTTT TATTATCCGC TAATCAATTA CATATGAATA TCTCCTTAG TTCTATTCC GAAGTTCCTA TTCTCTAGAA
   GTTTTTTGGC CTCAGACAGC AGGCCAAAAA ATAATAGGCG ATTAGTTAAT GTATACTTAT AGGAGGAATC AAGGATAAGG CTTCAAGGAT AAGAGATCTT
   FRT
101 AGTATAGGAA CTTCCGGCGC CCTACCTGTG ACGGAAGATC ACTTCGCAGA ATAAATAAAT CCTGGTGTCC CTGTTGATAC CGGGAAGCCC TGGGCCAACT
   TCATATCCTT GAAGCCGCGC GGATGGACAC TGCCCTCTAG TGAAGCGTCT TATTTATTTA GGACCACAGG GACAACATAG GCCCTTCGGG ACCCGGTTGA
201 TTTGGCGAAA ATGAGACGTT GATCGGCACG TAAGAGGTTT CAACCTTCAC CATAATGAAA TAAGATCACT ACCGGCGCTA TTTTGTGAGT TGTCGAGATT
   AAACCGCTTT TACTCTGCAA CTAGCCGTGC ATTCTCCAAG GTTGAAAGTG GTATTACTTT ATTCTAGTGA TGGCCCGCAT AAAAAACTCA ACAGCTCTAA
   Cat
   MetGluLys LysIleThr GlyTyrThrThr ValAspIle SerGlnTrp HisArgLysGlu HisPheGlu AlaPheGln
301 TTCAGGAGCT AAGGAAGCTA AAATGGAGAA AAAATCACT GGATATACCA CCGTGTATAT ATCCCAATGG CATCGTAAAG AACATTTTGA GGCATTTTCA
   AAGTCTTCCA TTCCTTGAT TTTACCTCTT TTTTGTAGTA CCTATATGGT GGCAACTATA TAGGGTTACC GTAGCATTTT TGTAAACT CCGTAAAGTC
   Cat
   SerValAlaGln CysThrTyr AsnGlnThr ValGlnLeuAsp IleThrAla PheLeuLys ThrValLysLys AsnLysHis LysPheTyr ProAlaPheIle
401 TCAGTTGCTC AATGTACCTA TAACCAGACC GTTCAGCTGG ATATTACGGC CTTTTTAAAG ACCGTAAAGA AAAATAAGCA CAAGTTTAT CCGGCCITTA
   AGTCAACGAG TTACATGGAT ATTGGTCTGG CAAGTCGACC TATAATGCCG GAAAAATTC TGGCATTTCT TTTTATTGCT GTTCAAATA GGCCGAAAT
   Cat
   ·IHisIleLeu AlaArgLeu MetAsnAlaHis ProGluLeu ArgMetAla MetLysAspGly GluLeuVal IleTrpAsp SerValHisPro CysTyrThr
501 TTCACATTCT TCCCGCGCTG ATGAATGCTC ATCCCGAATT ACGTATGGCA ATGAAGACAG GTGAGCTGCT GATATGGGAT AGTGTTCACC CTGTTCAC
   AAGTGAAGA ACGGGCGGAC TACTTACGAG TAGGCCTTAA TGCATACCGT TACTTTCTGC CACTCGACCA CTATACCTTA TCACAAGTGG GAACAATGTG
   Cat
   ·ValPheHis GluGlnThrGlu ThrPheSer SerLeuTrp SerGluTyrHis AspAspPhe ArgGlnPhe LeuHisIleTyr SerGlnAsp ValAlaCys
601 CGTTTTCCAT GAGCAACTTC AAACGTTTTT ATCGCTCTGG AGTGAATACC ACGACGATTT CCGGCAGTTT CTACACATAT ATTCGCAAGA TGTGGCGTGT
   GCAAAAGGTA CTCGTTTGAC TTGCAAAAG TAGCGAGACC TCATTATGG TGCTGCTAAA GGCCTCAAA GATGTGTATA TAAGCGTTCT ACACCGCACA
   Cat
   TyrGlyGluAsn LeuAlaTyr PheProLys GlyPheIleGlu AsnMetPhe PheValSer AlaAsnProTrp ValSerPhe ThrSerPhe AspLeuAsnVal
701 TACGCTGAAA ACCTGGCCTA TTTCCCTAAA GGGTTTATG AGAATATGTT TTTGCTCTCA GCCATCCCT GGGTGAGTTT CACCACTTTT GATTTAACG
   ATGCCACTTT TGGACCGGAT AAAGGATTT CCCAATAAC TCTTATACAA AAAGCAGAGT CCGTTAGGGA CCCACTCAAA GTGCTCAAAA CTAAATTTC
   Cat
   ·ValaAsnMet AspAsnPhe PheAlaProVal PheThrMet GlyLysTyr TyrThrGlnGly AspLysVal LeuMetPro LeuAlaIleGln ValHisHis
801 TGGCCAATAT GGACAACTTC TTGCCCCCG TTTTCACCAT GGGCAATAT TATACGCAAG GCGACAAGGT GCTGATGCGG CTGGCGATTC AGGTTTCATC
   ACCGTTTATA CCTGTTGAAG AAGCGGGGCG AAAAGTGCTA CCGTTTATA ATATCGCTTC CGCTGTTCCA CGACTACGCG GACCGCTAAG TCCAAGTAGT
   Cat
   ·AlaValCys AspGlyPheHis ValGlyArg CysLeuMet AsnThrThrVal LeuArg** * (配列番号82)
901 TCCGTTTTGT GATGGCTTCC ATGTCGGCAG ATGCTTAATG AATACAACAG TACTCGCATG AGTGGCAGG CGGGCGGTAA GCGCGGCCAT TTAAATGAAG
   ACGCAACA CTACCGAAG TACAGCGCTC TACGAATTAC TTATGTGTC ATGACGTAC TCACCGTCCC GCGCGCATTT CCGCGCGGTA AATTACTTC
   FRT
1001 TTCTATTCC GAAGTTCCTA TTCTCTAGAA AGTATAGGAA CTTCGAAGCA GCTCCAGCCT ACACCTTCT CTAGGCTGA CTGTTTGCAT AAAAATTCAT
   AAGGATAAGG CTTCAAGGAT AAGAGATCTT TCATATCCTT GAAGTTCCT CGAGCTCGGA TGTGGGAAGA AGTCCCGACT GACAAACGTA TTTTAACTA
   S-mdh-Kan
1101 CTGTATGCAC AATA (配列番号81)
   GACATACGTG TTAT

```

図 41B

【手続補正 3 5】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 4 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 4 2】

TTATTTGGTGATATTGGTACCAATATCATGCAGCAAACGGTGCAACATTGCCGTGTCTCGTTGCTCTA
 AAAGCCCCAGGCGTTGTTGTAACCAGTCGACCAGTTTTATGTCATCTGCCACTGCCAGAGTCGTCAG
 CAATGTCATGGCTCGTTCGCGTAAAGCTTGCAGTTGATGTTGGTCTGCCGTTGCATCACTTTTCGCCG
 GTTGTTGTATTAATGTTGCTAATTGATAGCAATAGACCATCACCGCCTGCCCCAGATTGAGCGAAGG
 ATAATCCGCCACCATCGGCACACCAGTAAGAACGTCAGCCAACGCTAACTCTTCGTTAGTCAACCCG
 GAATCTTCGCGACCAAACACCAGCGCGGCATGGCTCATCCATGAAGATTTTCTCTAACAGCGGCA
 CCAGTTCAACTGGCGTGGCGTAGTAATGATATTCGCCCCGACTGCGCGCAGTGGTGGCGACAGTGA
 AATCGACATCGTGAACGATTCAGCCAATGTCGGGAAAACTTTAATATTATCAATAATATCACCAGAT
 CCATGTGCGACCCAGCGGGTGGCTGGCTCCAGGTGTGCCTGACTATCGACAATCCGAGATCGCTA
 AACCCCATCGTTTTATTGCCCCGCGCGCTGCCCAATATTTCTGCTCTGGCGGGTGGCGACCAGAAT
 AATCGTTATACGCATATTGCCACTCTTCTTGATCAAATAACCGCGAACCGGGTGATCACTGTCAACTT
 ATTACGCGGTGCGAATTTACAAATTTCTTAACGTAAGTCGCAGAAAAAGCCCTTTACTTAGCTTAAAAA
 AGGCTAAACTATTTCTGACTGTACTAACGGTTGAGTTGTTAAAAAATGCTACATATCCTTCTGTTTA
 CTTAGGATAATTTATAAAAAATAATCTCGACAATTGGATTACCCACGTTTATTAGTTGTATGATGC
 AACTAGTTGGATTATTAATAAATGTGACGAAAGCTAGCATTTAGATACGATGATTCATCAAAGTGT
 TAACGTGCTACAATTGAACTTGATATATGTCAACGAAGCGTAGTTTTATTGGGTGTCCGGCCCCCTCTT
 AGCCTGTTATGTTGCTGTTAAAATGGTTAGGATGACAGCCGTTTTTGACACTGTCGGGTCTGAGGG
 AAAGTACCCACGACCAAGCTAATGATGTTGTTGACGTTGATGGAAAGTGCATCAAGAACGCAATTAC
 GTACTTTAGTCATGTTACGCCGATCATGTTAATTTGCAGCATGCATCAGGCAGGTGAGGGACTTTTGT
 ACTTCCTGTTTCGATTTAGTTGGCAATTTAGGTAGCAAACGAATTCATCGGCTTTACCACCGTCAAAA
 AAAACGGCGCTTTTTAGCGCCGTTTTATTTTTCAACCTTATTTCCAGATACGTAACCTCATCGTCCGTT
 GTAACCTCTTTACTGGCTTTTCATTTTCGGCAGTGAAAACGCATACCGTCGATATTACGGGTACAAAA
 CATCATGCCGGCCAGCGCCACCACCAGCACACTGGTTCCCAACAACAGCGCGCTATCGGCAGAGTTG
 AGCAGTCCCCACATCACACCATCCAGCAACAACAGCGCGAGGGTAACAACATGCTGTTGCACCAAC
 CTTTCAATACCGCTTGCAAATAAATACCGTTTATTATCGCCCCAATCAGACTGGCGATTATCCATGCC
 ACGGTAAAACCGGTATGTTCAGAAAGCGCCAGCAAGAGCAAATAAAACATCACCAATGAAAGCCCC
 ACCAGCAAATATTGCAATTGGGTGTAAACGTTGCGCGGTGAGCGTTTCAAAAACAAAGAACGCCATA
 AAAGTCAGTGCAATCAGCAGAATGGCGTACTTAGTCGCCCCGTGAGTTAATTGGTATTGATCGGCTG
 GCGTCGTTACTGCGACGCTAAACGCCGGGAAGTTTTCCAGCCGGTATCATTGCCTGAAGCAAAACG
 CTCACCGAGATTATTAGCAAACAGCTGCTTTGCCAGTGCGCCTGAAAACCTGACTCGTAACTTCCC
 GTTTGGCTGGTAGAAAATCACCTAAAAAACTGGGATGCGGCCAGTTGCTGGTTAAGGTCATTTCTGCT
 ATTACGCCGCCAGGCACCACAGAAAGATCGCCGTTACCGCTTAAATTGAGGGCCATATTCAGCTTC
 AGGTTCTGCTTCCGCCAGTCCCCTTCAGGTAAGGGATATGCACGCCCTGCCCGCTTGCTCTAACCC
 GGTGCCGGGTTCAATGGTCAGCGCCGTTCCGTTAACTTCAGGCGCTTTCACCACCAATAACCACGC
 GCATCCCCGACGCTAATCACAATAAATGGCTTGCTTAAGGTGATATTTGGCGGTTGAGTTCGCTAA
 GACGCGAAACATCGAAATCGGCTTTTAACGTTAAATCACTGTGCCAGACCTGACCGGTATAAATCCC
 TATCTTGCGTTCTTCCACGTTCTGATTGCCATCAACCATCAATGACTCAGGTAACCAAAAAATGGATAA
 AACTTCGTTTCCGCTGCAGGGTTTTAT (配列番号83)

【手続補正 3 6】

【補正対象書類名】図面
【補正対象項目名】図 4 3
【補正方法】変更
【補正の内容】
【図 4 3】

AAGCCACAGCAGGATGCCACTGCAACAAAGGTGATCACACCGGAAACGCGATGGAGAATGGACG
CTATCGCCGTGATGGGGAACCGGATGGTCTGTAGGTCCAGATTACAGGTCTTTGTTTTTTCACATT
CTTATCATGAATAACGCCACATGCTGTTCTTATTATCCCTGGGGACTACGGGCACAGAGGTTAACT
TTCTGTTACCTGGAGACGTCGGGATTTCTTCTCCGGTCTGCTTGCGGGTCAGACAGCGTCCTTTCT
ATAACTGCGCGTCATGCAAAACACTGCTTCCAGATGCGAAAACGACACGTTACAACGCTGGGTGGCT
CGGGATTGCAGGGTGTTCGGGAGACCTGGCGGCAGTATAGGCTGTTCAAAAATCATTACAATTAA
CCTACATATAGTTTGTGGGTTTTATCCTGAACAGTGATCCAGGTCACGATAACAACATTTATTTAAT
TTTTAATCATCTAATTTGACAATCATTCAACAAAGTTGTTACAAACATTACCAGGAAAAGCATATAAT
GCGTAAAAGTTATGAAGTCGGTATTTACCTAAGATTAACCTATGTAAACAGTGTGGAAGTATTGACC
AATTCATTGCGGACAGTTATTAGTGGTAGACAAGTTTAATAATTGCGATTGCTAAGTACTTGATTGCG
CATTTATTGCTCATCAATGGATCCTTTACCTGCAAGCGCCAGAGCTCTGTACCCAGGTTTTCCCTCT
TTCACAGAGCGGCGAGCCAAATAAAAAACGGGTAAAGCCAGGTTGATGTGCGAAGGCAAATTTAA
GTTCCGGCAGTCTTACGCAATAAGGCGCTAAGGAGACCTTAAATGGCTGATACAAAAGCAAAACTC
ACCCTCAACGGGGATACAGCTGTTGAACTGGATGTGCTGAAAGGCACGCTGGGTCAAGATGTTATT
GATATCCGTAATCTCGGTTCAAAGGTGTGTTACCTTTGACCCAGGCTTCACTTCAACCGCATCCTG
CGAATCTAAAATTACTTTTATTGATGGTGATGAAGGTATTTTGTGACCCGCGGTTTCCCGATCGATC
AGCTGGCGACCGATTCTAACTACCTGGAAGTTTGTACATCCTGCTGAATGGTGAAAAACCGACTCA
GGAACAGTATGACGAATTTAAACTACGGTGACCCGTACATCATGATCCACGAGCAGATTACCCGT
CTGTTCCATGCTTTCCGTCGCGACTCGCATCCAATGGCAGTCATGTGTGGTATTACCGGCGCGCTGG
CGGCGTTCTATCACGACTCGCTGGATGTTAAATCCTCGTCACCGTGAAATTGCCGCGTTCTCCTG
CTGTCGAAAATGCCGACCATGGCCGCGATGTGTTACAAGTATTCCATTGGTCAGCCATTTGTTTACCC
GCGCAACGATCTCTCCTACGCCGGTAACCTCCTGAATATGATGTTCTCCACGCCGTGCGAACCCTATG
AAGTTAATCCGATTCTGGAACGTGCTATGGACCGTATTCTGATCCTGCACGCTGACCATGAACAGAA
CGCCTCTACCTCCACCGTGCGTACCGCTGGCTCTTCGGGTGCGAACCCGTTTGCCTGTATCGCAGCA
GGTATTGCTTCACTGTGGGGACCTGCGCACGGCGGTGCTAACGAAGCGGCGCTGAAAATGCTGGAA
GAAATCAGCTCCGTTAAACACATTCCGGAATTTGTCGTCGTGCGAAAGACAAAAATGATTCTTTCCG
CCTGATGGGCTTCGGTCACCGCGTGTACAAAATTACGACCCGCGCGCCACCGTAATGCGTGAAACC
TGCCATGAAGTGCTGAAAGAGCTGGGCACGAAGGATGACCTGCTGGAAGTGGCTATGGAGCTGGA
AAACATCGCGCTGAACGACCCGTAATTTATCGAGAAGAACTGTACCCGAACGTCGATTTCTACTCT
GGTATCATCCTGAAAGCGATGGGTATTCCGTCTTCATGTTACCGTCATTTTCGCAATGGCACGTAC
CGTTGGCTGGATCGCCACTGGAGCGAAATGCACAGTGACGGTATGAAGATTGCCCGTCCGCGTCA
GCTGTATACAGGATATGAAAAACGCGACTTTAAAGCGATATCAAGCGTTAATGGTTGATTGCTAAG
TTGTAAATATTTTAAACCCGCCGTTTCATATGGCGGGTTGATTTTATATGCCTAAACACAAAAAATTGT
AAAAATAAAATCCATTAACAGACCTATATAGATATTTAAAAAGAATAGAACAGCTCAAATTATCAGC
AACCCAATACTTTCAATTAATAAATTCATGGTAGTCGCATTTATAACCCTATGAAAATGACGTCTATCT
ATACCCCCCTATATTTTATTCATCATACAACAAATTCATGATACCAATAATTTAGTTTTGCATTTAATAA
AACTAACATATTTTTAAGCAAACTAAAACTAGCAATAATCAAATACGATATTCTGGCGTAGCTAT
ACCCCTATTCTATATCCTTAAAGGACTCTGTTATGTTTAAAGGACAAAAACATTGGCCGCACTGGCC
GTATCTCTGCTGTTCACTGCACCTGTTTATGCTGCTGATGAAGGTTCTGGCGAAATTCATTTAAGGG
GGAGGTTATTGAAGCACCTTGTAATTCATCCAGAAGATATTGATAAAAAACATAGATCTTGACAA
GTCACGACAACCCATATAAACCGGGAGCATCATAGCAATAAAGTGCCGTCGACATTCGCTTGATCA
ACTGTGATCTGCCTGCTTCTGACAACGGTAGCGGAATGCCGGTATCCAAAGTTGGCGTAACCTTCGA
TAGCACGGCTAAGACAACCTGGTGCTACGCCTTTGTTGAGCAACACCAGTGCAGGCGAAGCAACTGG
GGTCGGTGACGACTGATGGACAAAATGACGGTAACATCGTATTAGGTTAGCCGCGCCAGATCT
TGACCTGGATGCAAGCTCATCAGAACAGACGCTGAACTTTTTCGCCTGGAT (配列番号84)

図 43

【手続補正 3 7】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 48 - 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 48 - 2】

AGGACGAATTCACCTCTGTTCTAACACCCTCGTTTTCAATATATTTCTGTCTGCATTTTATTCAAATTCT
GAATATACCTTCAGATATCCTTAAGGAATTGTCGTTACATTCGGCGATATTTTTCAAGACAGGTTCT
TACTATGCATTCCACAGAAGTCCAGGCTAAACCTCTTTTAGCTGGAAAGCCCTGGGTTGGGCACTG
CTCTACTTTTGGTTTTCTCTACTCTGCTACAGGCCATTATTTACATCAGTGTTATAGTGGCACTAAC
GGCATTGCGGACTCGCTGTTATTAGTTCGCTGTGGTTGATCCCGGTATTCCTCTTTCCGAAGCGGAT
TAAAATTATTGCCGCAGTAATCGGCGTGGTGCTATGGGCGGCCTCTCTGGCGGCGCTGTGCTACTAC
GTCATCTACGGTCAGGAGTTCTCGCAGAGCGTTCTGTTTGTGATGTTGAAACCAACACCAACGAAG
CCAGCGAGTATTTAAGCCAGTATTTAGCCTGAAAATTGTGCTTATCGCGCTGGCCTATACGGCGGT
GGCAGTTCTGCTGTGGACACGCCTGCGCCCGGTCTATATCCAAAGCCGTGGCGTTATGTTGTCTCTT
TTGCCCTGCTTTATGGCTTGATTCTGCATCCGATCGCCATGAATACGTTTATCAAAAACAAGCCGTTT
GAGAAAACGTTGGATAACCTGGCCTCGCGTATGGAGCCTGCCGCACCGTGGCAATTCTGACCGGC
TATTATCAGTATCGTCAGCACTAACTCGCTAACAAAGTTACTGAATGAAAATAATGCCTTGCCGCC
ACTGGCTAATTTCAAAGATGAATCGGGTAACGAACCGCGCACTTTAGTGCTGGTGATTGGCGAGTC
GACCCAGCGCGGACGCATGAGTCTGTACGGTTATCCGCGTGAAACACGCGGAGCTGGATGCGCT
GCATAAAACCGATCCGAATCTGACCGTGTTAATAACGTAGTTACGTCTCGTCCGTACACCATTGAAA
TCCTGCAACAGGCGCTGACCTTTGCCAATGAAAAGAACCCGGATCTGTATCTGACGCAGCCGTCGCT
GATGAACATGATGAAACAGGCGGGTTATAAACCTTC (配列番号85)

【手続補正 38】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 5 2 - 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 5 2 - 2】

CGGTCGTGCTTTTCGACAACGGTATCATCTGCTCAGGCGAACAGAGCATCATCTACAACGAGGCTGAC
AAGGAAGCAGTTTTTCACAGCATTCCGCAACCACGGTGCATATTTCTGTGACGAAGCCGAAGGAGAT
CGGGCTCGTGACGCTATCTTCGAAAATGGAGCCATCGCGAAAGATGTAGTAGGTGAGAGCGTTGCC
TTCATTGCCAAGAAAGCAAACATCAATATCCCCGAGGGTACCCGTATTCTCGTTGTTGAAGCTCGCG
GCGTAGGAGCAGAAGACGTTATCTGTAAGGAAAAGATGTGTCCCGTAATGTGCGCCCTCAGCTACA
AGCACTTCGAAGAAGGTGTAGAAATCGCACGTACGAACCTCGCCAACGAAGGTAACGGCCACACCT
GTGCTATCCACTCCAACAATCAGGCACACATCATCTCGCAGGATCAGAGCTGACGGTATCTCGTAT
CGTAGTGAATGCTCCGAGTGCCACTACAGCAGGCGGTACATCCAAAACGGTCTTGCCGTAACCAAT
ACGCTCGGATGCGGATCATGGGGTAATAACTCTATCTCGAGAACTTCACTTACAAGCACCTCCTCA
ACATTTACGCATCGCACCGTTGAATTCAAGCATTACATCCCCGATGACAAAGAAAATCTGGGAACT
CTAATCTAGCAAGAGGAGAAGTCGACATGCAACTTTTCAAACCTCAAGAGTGTAACACATCACTTTGA
CACTTTTGCAGAATTTGCCAAGGAATTCTGTCTTGGAGAACGCGACTTGGTAATTACCAACGAGTTC
ATCTATGAACCGTATATGAAGGCATGCCAGCTCCCCTGCCATTTTGTATGCAGGAGAAAATATGGGC
AAGGCGAGCCTTCTGACGAAATGATGAATAACATCTTGGCAGACATCCGTAATATCCAGTTCGACCG
CGTAATCGGTATCGGAGGAGGTACGGTTATTGACATCTCTAACTTTTCTGTTCTGAAAGGATTAAAT
GATGTACTCGATGCATTCGACCGCAAAATACCTCTTATCAAAGAGAAAGAACTGATCATTGTGCCCA
CAACATGCGGAACGGGTAGCGAGGTGACGAACATTTCTATCGCAGAAATCAAAGCCGTACACCA
AAATGGGATTGGCTGACGATGCCATTGTTGCAGACCATGCCATCATCATACCTGAACTTCTGAAGAG
CTTGCTTTTCACTTCTACGCATGCAGTGCAATCGATGCTCTTATCCATGCCATCGAGTCATACGTATC
TCCTAAAGCCAGTCCATATTCTCGTCTGTTCAAGTGGGCGGCTTGGGACATTATCCTGGAAGTATTCA
AGAAAATCGCCGAACACGGCCCTGAATACCGCTTCGAAAAGCTGGGAGAAATGATCATGGCCAGCA
ACTATGCCGGTATAGCCTTCGGAATGCAGGAGTAGGAGCCGTCCACGCACTATCCTACCCGTTGGG
AGGCAACTATCACGTGCCGCATGGAGAAGCAAACCTATCAGTTCTTCACAGAGGTATTCAAAGTATAC
CAAAAGAAGAATCCTTTTCGGCTATATAGTCGAACTCAACTGGAAGCTCTCCAAGATACTGAACTGCC
AGCCCGAATACGTATATCCGAAGCTGGATGAACTTCTCGGATGCCTTCTTACCAAGAAACCTTTGCAC
GAATACGGCATGAAGGACGAAGAGGTAAGAGGCTTTGCGGAATCAGTGCTTAAGACACAGCAAAG
ATTGCTCGCCAACAACCTACGTAGAGCTTACTGTAGATGAGATCGAAGGTATCTACAGAAGACTCTAC
TAATCTAGAAAGCTTCTAGAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCTTTTC
GTTTTATCTGTTGTTTGTGCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGCCCTAGACCTAGGC
GTTGCGGTGCGACACGTCTTGAGCGATTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTA
GAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTCATATGGACCATGGCTAATCCCAT (配
列番号86)

【手続補正 39】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 53 - 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 53 - 2】

CGAGTTCATCAGCTCCGGTGAGGCCAAGTGGGGCCAATTGTCCAACGTCGTGCTGCTGTTACCGCAC
GGGCACGAGGGGCAGGGACCCGACCACACTTCTGCCCCGATCGAACGCTTCTTGACAGTTGTGGGCG
GAAGGTTTCGATGACCATCGCGATGCCGTCGACTCCGTCGAACTACTTCCACCTGCTACGCCGGCATG
CCCTGGACGGCATCCAACGCCCGCTGATCGTGTTACGCCCAAGTCGATGTTGCGTCACAAGGCCGC
CGTCAGCGAAATCAAGGACTTCACCGAGATCAAGTTCGCTCAGTGCTGGAGGAACCCACCTATGA
GGACGGCATCGGAGACCGCAACAAGGTGAGCCGGATCCTGCTGACCAAGTGGCAAGCTGTATTACGA
GCTGGCCGCCCCGAAGGCCAAGGACAACCGCAATGACCTCGCGATCGTGCGGCTTGAACAGCTCGC
CCCCGCTGCCAGGCGTCGACTGCGTGAAACGCTGGACCGCTACGAGAACGTCAAGGAGTTCTTCTG
GGTCCAAGAGGAACCGGCCAACCAGGGTGCCTGGCCGCGATTGCGGCTCGAACTACCCGAGCTGCT
GCCTGACAAGTTGGCCGGGATCAAGCGAATCTCGCGCCGGGCGATGTCAGCCCCGTCGTCAGGCTC
GTCGAAGGTGCACGCCGTCGAACAGCAGGAGATCCTCGACGAGGCGTTCGGCTAATCTAGCAAGA
GGAGAAGTCGACATGAAGTTATTAATAATTGGCACCTGATGTTTATAAATTTGATACTGCAGAGGAGT
TTATGAAATACTTTAAGGTTGGAAAAGGTGACTTTATACTTACTAATGAATTTTTATATAAACCTTTCC
TTGAGAAATTCAATGATGGTGCAGATGCTGTATTTAGGAGAAATATGGACTCGGTGAACCTTCTGA
TGAAATGATAACAATATAATTAAGGATATTGGAGATAACAATATAATAGAATTATTGCTGTAGGG
GGAGGATCTGTAATAGATATAGCCAAAATCCTCAGTCTTAAGTATACTGATGATTCATTGGATTTGTT
TGAGGGAAAAGTACCTCTTGTAATAAAACAAAGAATTAATTATAGTTCCAATACTACATGTGGAACAGGT
TCAGAAGTTACAAATGTATCAGTTGCAGAATTAAGAGAAAGACATACTAAAAAAGGAATTGCTTCA
GACGAATTATATGCAACTTATGCAGTACTTGTACCAGAATTTATAAAAGGACTTCCATATAAGTTTTT
TGTAACCAGCTCCGTAGATGCCTTAATACATGCAACAGAAGCTTATGTATCTCCAAATGCAAATCCTT
ATACTGATATGTTTAGTGTAAGCTATGGAGTTAATTTAAATGGATACATGCAAATGGTAGAGAA
AGGAAATGATTACAGAGTTGAAATAATTGAGGATTTTGTATAGGCAGCAATTATGCAGGTATAGCT
TTTGAAATGCAGGAGTGGGAGCGGTTACGCACTCTCATATCCAATAGGCGGAAATTATCATGTGC
CTCATGGAGAAGCAAATTATCTGTTTTTTACAGAAATATTTAAACTTATTATGAGAAAAATCCAAAT
GGCAAGATTAAGATGTAAATAAACTATTAGCAGGCATACTAAAATGTGATGAAAGTGAAGCTTAT
GACAGTTTATCACAACCTTTAGATAAATTATTGTCAAGAAAACCATTAAGAGAATATGGAATGAAAG
AGGAAGAAATTGAACTTTTGTGATTAGTAATAGAAGGACAGCAGAGACTGTTGGTAAACAATT
ATGAACCTTTTTCAAGAGAAGACATAGTAAACACATATAAAAAAGTTATATTAATCTAGAAAGCTTCCT
AGAGGCATCAAATAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTGTTTTATCTGTTGTTTGTG
GGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGCCCTAGACCTA (配列番号87)

図53 (続き)

【手続補正 40】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 55 - 5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 55 - 5】

```

4601  TTGCTTGGG ATTGTGCTGC TTTCAACGCC GACTGGGATA CTCTTTGACC ACGCAGGCTA CCAGACAGTT TTCTTCGCAA TTTCGGGTAT TGTCTGCCTG
      AACCGAACCC TAACACGACG AAAGTTGCGG CTGACCCCTAT GAGAACTGG TCGCTCCGAT GGTCTGTCAA AAGAAGCGTT AAAGCCCATATA ACAGACGGAC
      cscB
      ~~~~~
4701  ATGTTGCTAT TTGGCAITTTT CTTCTTGAGT AAAAAACGCG AGCAAATAGT TATGAAACG CCTGTACCTT CAGCAATATA GACGTAACT TTTTCGGTT
      TACAACGATA AACCGTAAAA GAAGAACTCA TTTTGTGCGC TCGTTTATCA ATACCTTTGC GGACATGGAA GTCGTTATAT CTGCATTGA AAAAGGCCAA
4801  GTTGTGATA GCTCTATATC CCTCAACCGG AAAATAATAA TAGTAAATG CTTAGCCCTG CTAATAATCG CCTAATCCAA ACGCCTCAT TATGTTCTGG
      CAACAGCTAT CGAGATATAG GGAGTTGGCC TTTTATTATT ATCATTTTAC GAATCGGGAC GATTATTAGC GGATTAGGTT TCGCGAGTAA GTACAAGACC
4901  TACAGTCGCT CAAATGTACT TCAGATGCGC GGTTCGCTGA TTTCCAGGAC ATTGTGCTCA TTCAGTGACC TGTCCCGTGT ATCAGCGTCC TCGGAATTCA
      ATGTCAGCGA GTTTACATGA AGTCTACGCG CCAAGCGACT AAAGTCTCTG TAACAGCAGT AAGTCACTGG ACAGGGCACA TAGTGCCAGG ACGCTTAAGT
5001  TCAAGGAATG CATTGCGGAG TGAAGTATCG AGTCACGCCA TATTTGCTCA CCGAAGATG AGTTTTGAGA TATTAAGGCA GGTGACTTTC ACTCACA (配列番号88)
      AGTTCCTTAC GTAACGCCCTC ACTTCATAGC TCAGTGCGGT ATAAAGCAGT GGGCTTCTAC TCAAACTCT ATAAATTCGT CCACTGAAAG TGAGTGT
      ~~~~~

```

アンチセンス_PRM

図55 (続き)

【手続補正書】

【提出日】令和1年9月24日(2019.9.24)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

本願明細書に実質的に記載された、新規な物、方法及び製造方法。

【手続補正書】

【提出日】令和1年9月24日(2019.9.24)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0423

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0423】

本出願全体を通じて、様々な文献を参照した。これらの文献の開示内容は、本発明が関係する技術分野の状況をより十分に説明するために、その全体が本出願において引用により本明細書に組み込まれている。本発明を、以上に示した実施例に関して説明したが、本発明の主旨から逸脱することなく様々な修正を加えることができることが理解されるべきである。

本件出願は、以下の構成の発明を提供する。

(構成1)

1,4-ブタンジオール(BDO)を生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含むBDO経路を有する微生物体を含む非天然微生物体であって、外因性スクシニル-CoAシンテターゼを発現し;外因性アルファ-ケトグルタレートデカルボキシラーゼを発現し、外因性スクシネートセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ及び4-ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼ並びに場合により4-ヒドロキシブチリル-CoA/アセチル-CoAトランスフェラーゼを発現し;外因性ブチレートキナーゼ及びホスホトランス

ブチリラーゼを発現し;外因性4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼを発現し;外因性4-ヒドロキシブタナールレダクターゼを発現し;外因性ピルベートデヒドロゲナーゼを発現し;好気性呼吸器制御調節系をコードする遺伝子を破壊し;外因性NADH非感受性シトレートシンターゼを発現し;外因性ホスホエノールピルベートカルボキシキナーゼを発現するように遺伝子改変されている、前記非天然微生物体。

(構成2)

前記スクシニル-CoAシンターゼが大腸菌sucCD遺伝子によってコードされる、構成1記載の非天然微生物体。

(構成3)

前記アルファ-ケトグルタレートデカルボキシラーゼがウシ結核菌sucA遺伝子によってコードされる、構成1記載の非天然微生物体。

(構成4)

前記スクシネートセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(CoA-依存性)、4-ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼ及び4-ヒドロキシブチリル-CoA/アセチル-CoAトランスフェラーゼがポルフィロモナス・ギンギバリスW83遺伝子によってコードされる、構成1記載の非天然微生物体。

(構成5)

前記ブチレートキナーゼ及びホスホトランスブチリラーゼがクロストリジウム・アセトブチリクムbuk1及びptb遺伝子によってコードされる、構成1記載の非天然微生物体。

(構成6)

前記4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼがクロストリジウム・ベイジェリンキーal d遺伝子によってコードされる、構成1記載の非天然微生物体。

(構成7)

前記4-ヒドロキシブタナールレダクターゼがゲオバシルス・サーモグルコシダシウスadh1遺伝子によってコードされる、構成1記載の非天然微生物体。

(構成8)

前記外因性ピルベートデヒドロゲナーゼがNADH非感受性である、構成1記載の非天然微生物体。

(構成9)

前記外因性ピルベートデヒドロゲナーゼがクレブシエラ肺桿菌lpdA遺伝子によってコードされる、構成1記載の非天然微生物体。

(構成10)

前記微生物のピルベートデヒドロゲナーゼサブユニット遺伝子の1つ以上が、ピルベートホルメトリアーゼプロモーターの制御下にある、構成1記載の非天然微生物体。

(構成11)

前記嫌気性呼吸器制御調節系の破壊がarcA遺伝子の破壊である、構成1記載の非天然微生物体。

(構成12)

マレートデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の破壊をさらに含む、構成1記載の非天然微生物体。

(構成13)

NADH非感受性シトレートシンターゼがgltaによってコードされる、構成1記載の非天然微生物体。

(構成14)

前記NADH非感受性シトレートシンターゼがgltaのR163L突然変異体によってコードされる、構成1記載の非天然微生物体。

(構成15)

前記ホスホエノールピルベートカルボキシキナーゼがヘモフィルス・インフルエンザホスホエノールピルベートカルボキシキナーゼ遺伝子によってコードされる、構成1記載の非天然微生物体。

(構成 1 6)

前記外因的に発現される酵素をコードする1つ以上の遺伝子が宿主生物体のfimD座に組み込まれている、構成1記載の非天然微生物体。

(構成 1 7)

前記生物体为非ホスホトランスフェラーゼスクロース取込み系を発現する、構成1記載の非天然微生物体。

(構成 1 8)

前記生物体が、内因性ラクテートデヒドロゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ及びピルベートホルメートリアーゼの破壊をさらに含む、構成1記載の非天然微生物体。

(構成 1 9)

前記BDO経路が、4-ヒドロキシブタノエートデヒドロゲナーゼ、スクシニル-CoAシンターゼ、CoA依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、4-ヒドロキシブチレート:CoAトランスフェラーゼ、4-ブチレートキナーゼ、ホスホトランスブチリラーゼ、アルファ-ケトグルタレートデカルボキシラーゼ、アルデヒドデヒドロゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ又はアルデヒド/アルコールデヒドロゲナーゼを含む、構成1記載の非天然微生物体。

(構成 2 0)

前記BDO経路が、4-アミノブチレートCoAトランスフェラーゼ、4-アミノブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-アミノブチレート-CoAリガーゼ、4-アミノブチリル-CoAオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、4-アミノブチリル-CoAトランスアミナーゼ又は4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼを含む、構成1記載の非天然微生物体。

(構成 2 1)

前記BDO経路が、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含む、構成20記載の非天然微生物体。

(構成 2 2)

前記BDO経路が、4-アミノブチレートCoAトランスフェラーゼ、4-アミノブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-アミノブチレート-CoAリガーゼ、4-アミノブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-アミノブチリル-CoAレダクターゼ、4-アミノブタン-1-オールデヒドロゲナーゼ、4-アミノブタン-1-オールオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)又は4-アミノブタン-1-オールトランスアミナーゼを含む、構成1記載の非天然微生物体。

(構成 2 3)

前記BDO経路が、4-アミノブチレートキナーゼ、4-アミノブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)、4-アミノブタン-1-オールデヒドロゲナーゼ、4-アミノブタン-1-オールオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、4-アミノブタン-1-オールトランスアミナーゼ、[(4-アミノブタノリル)オキシ]ホスホン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、[(4-アミノブタノリル)オキシ]ホスホン酸トランスアミナーゼ、4-ヒドロキシブチリルホスフェートデヒドロゲナーゼ又は4-ヒドロキシブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)を含む、構成1記載の非天然微生物体。

(構成 2 4)

前記BDO経路が1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含む、構成23記載の非天然微生物体。

(構成 2 5)

前記BDO経路が、アルファ-ケトグルタレート5-キナーゼ、2,5-ジオキソペンタン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)、2,5-ジオキソペンタン酸レダクターゼ、アルファ-ケトグルタレートCoAトランスフェラーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAヒドロラーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAリガーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAレダクターゼ、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ、アルファ-ケトグルタリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ又は5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱カルボキシル化)を含む、構成1

記載の非天然微生物体。

(構成 26)

前記BDO経路が、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含む、構成25記載の非天然微生物体。

(構成 27)

前記BDO経路が、グルタメートCoAトランスフェラーゼ、グルタミル-CoAヒドロラーゼ、グルタミル-CoAリガーゼ、グルタメート5-キナーゼ、グルタメート-5-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(リン酸化)、グルタミル-CoAレダクターゼ、グルタメート-5-セミアルデヒドレダクターゼ、グルタミル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸オキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、2-アミノ-5-ヒドロキシペンタン酸トランスアミナーゼ、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デカルボキシラーゼ、5-ヒドロキシ-2-オキソペンタン酸デヒドロゲナーゼ(脱カルボキシル化)を含む、構成1記載の非天然微生物体。

(構成 28)

前記BDO経路が、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含む、構成27記載の非天然微生物体。

(構成 29)

前記BDO経路が、3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ、3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼ、ビニルアセチル-CoA Δ -イソメラーゼ又は4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼを含む、構成1記載の非天然微生物体。

(構成 30)

前記BDO経路が、ホモセリンデアミナーゼ、ホモセリンCoAトランスフェラーゼ、ホモセリン-CoAヒドロラーゼ、ホモセリン-CoAリガーゼ、ホモセリン-CoAデアミナーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAリガーゼ、4-ヒドロキシブタ-2-エノエートレダクターゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ又は4-ヒドロキシブタ-2-エノイル-CoAレダクターゼを含む、構成1記載の非天然微生物体。

(構成 31)

前記BDO経路が、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含む、構成30記載の非天然微生物体。

(構成 32)

前記BDO経路が、スクシニル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)、4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ又は4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ(リン酸化)を含む、構成1記載の非天然微生物体。

(構成 33)

前記BDO経路が、スクシニル-CoAレダクターゼ、4-ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシブチレートキナーゼ、ホスホトランス-4-ヒドロキシブチリラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含む、構成32記載の非天然微生物体。

(構成 34)

前記BDO経路が、グルタメートデヒドロゲナーゼ、4-アミノブチレートオキシドレダクターゼ(脱アミノ化)、4-アミノブチレートトランスアミナーゼ、グルタメートデカルボキシラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAヒドロラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAリガーゼ又は4-ヒドロキシブタナールデヒドロゲナーゼ(リン酸化)を含む、構成1記載の非天然微生物体。

(構成 3 5)

前記BDO経路が、アルファ-ケトグルタレートデカルボキシラーゼ、4-ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAトランスフェラーゼ、4-ヒドロキシブチレートキナーゼ、ホスホトランス-4-ヒドロキシブチリラーゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ、4-ヒドロキシブチリル-CoAレダクターゼ(アルコール形成)又は1,4-ブタンジオールデヒドロゲナーゼをさらに含む、構成34記載の非天然微生物体。

(構成 3 6)

1,4-ブタンジオール(BDO)を生成するのに十分な量で発現されるBDO経路酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含むBDO経路を有する微生物体を含む非天然微生物体であって、表28の菌株3～20のいずれかに記載するように遺伝子改変されている、前記非天然微生物体。

(構成 3 7)

1,4-ブタンジオール(BDO)を生成するための方法であって、構成1から36のいずれかに記載の非天然微生物体を、BDOを生成するための条件下で、且つ十分な期間にわたって培養してBDOを生成することを含む、前記方法。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/09 Z

(72)発明者 ロベルト ハセルベクク
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 1 サン ディエゴ ウアテリドゲ クイルクルエ
 1 0 5 2 0

(72)発明者 カトヘリネ ジェイ. プジョル - バクルエイ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 1 サン ディエゴ ウアテリドゲ クイルクルエ
 1 0 5 2 0

(72)発明者 ウエイ ニウ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 1 サン ディエゴ ウアテリドゲ クイルクルエ
 1 0 5 2 0

(72)発明者 ジョフン ディー. トラウイクク
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 1 サン ディエゴ ウアテリドゲ クイルクルエ
 1 0 5 2 0

(72)発明者 ハルルイ イイム
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 1 サン ディエゴ ウアテリドゲ クイルクルエ
 1 0 5 2 0

(72)発明者 マルク ジェイ. ブルク
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 1 サン ディエゴ ウアテリドゲ クイルクルエ
 1 0 5 2 0

(72)発明者 ロビン イー. オステルホウト
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 1 サン ディエゴ ウアテリドゲ クイルクルエ
 1 0 5 2 0

(72)発明者 ジュン スン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 1 サン ディエゴ ウアテリドゲ クイルクルエ
 1 0 5 2 0

F ターム (参考) 4B064 AC05 CA02 CA19 CC24 DA16
 4B065 AA01Y AA23Y AA26X AA26Y AA29Y AA36Y AB01 BA02 BB03 BB05
 BB11 BB12 BB15 BB23 BB37 BC03 BC05 BC07 CA05

【外国語明細書】
2020005647000001.pdf