

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-502682

(P2017-502682A)

(43) 公表日 平成29年1月26日(2017.1.26)

| (51) Int.Cl.                  | F I                 | テーマコード (参考) |
|-------------------------------|---------------------|-------------|
| <b>C 1 2 N 1/19 (2006.01)</b> | C 1 2 N 1/19        | 4 B 0 6 5   |
| C 1 2 N 15/09 (2006.01)       | C 1 2 N 15/00 A     |             |
| C 1 2 N 15/00 (2006.01)       | C 1 2 N 15/00 Z N A |             |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 39 頁)

|               |                              |          |                       |
|---------------|------------------------------|----------|-----------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2016-546974 (P2016-546974) | (71) 出願人 | 505129079             |
| (86) (22) 出願日 | 平成27年1月16日 (2015. 1. 16)     |          | アンスティテュ ナシオナル ドゥ ラ    |
| (85) 翻訳文提出日   | 平成28年9月12日 (2016. 9. 12)     |          | ルシエルシュ アグロノミック        |
| (86) 国際出願番号   | PCT/IB2015/050346            |          | INSTITUT NATIONAL D   |
| (87) 国際公開番号   | W02015/107496                |          | E LA RECHERCHE AGRO   |
| (87) 国際公開日    | 平成27年7月23日 (2015. 7. 23)     |          | NOMIQUE               |
| (31) 優先権主張番号  | 1450349                      |          | フランス共和国, エフー75007 パリ  |
| (32) 優先日      | 平成26年1月16日 (2014. 1. 16)     |          | , リュ ドゥ リュニヴェルシテ, 147 |
| (33) 優先権主張国   | フランス (FR)                    |          |                       |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 二酸化炭素を使用するように改変された酵母

(57) 【要約】

本発明は、機能性タイプ I R u B i s C O 酵素と、クラス I I ホスホリブロキナーゼ ( p h o s p h o r i b u l o k i n a s e ) とを発現するように改変された酵母細胞に関する。これらの酵素の発現により、酵母にカルビン回路が再形成され、酵母が二酸化炭素を使用することができる。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

- a) 適切なプロモータの転写制御下において、バクテリアのフォーム I R u B i s C O 酵素の R b c L サブユニットをコードする配列を包含する発現カセットと、
- b) 適切なプロモータの転写制御下において、前記 R u B i s C O 酵素の R b c S サブユニットをコードする配列を包含する発現カセットと、
- c) 適切なプロモータの転写制御下において、前記 R u B i s C O 酵素の特異的シャペロン R b c X をコードする配列を包含する発現カセットと、
- d) 適切なプロモータの転写制御下において、一般的なバクテリアシャペロン G r o E S をコードする配列を包含する発現カセットと、
- e) 適切なプロモータの転写制御下において、一般的なバクテリアシャペロン G r o E L をコードする配列を包含する発現カセットと、を含む、形質転換酵母細胞。

10

## 【請求項 2】

前記シャペロン R b c X、前記 G r o E S、及び前記 G r o E L は、少なくとも 2 つの異なる生物種に由来する、請求項 1 に記載の酵母細胞。

## 【請求項 3】

前記シャペロン R b c X はシアノバクテリアシャペロンである、請求項 1 又は請求項 2 に記載の酵母細胞。

## 【請求項 4】

前記一般的なシャペロン G r o E S と G r o E L とのうちの少なくとも 1 つは、シアノバクテリアにも R u B i s C O 複合体を発現する他のバクテリアにも由来しない、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の酵母細胞。

20

## 【請求項 5】

請求項 1 の c)、d)、及び e) に記載の 3 つの前記発現カセットは、遺伝子情報の連続的ブロックを形成する、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の酵母細胞。

## 【請求項 6】

請求項 1 の c)、d)、及び e) に記載の前記発現カセットは、単一のエピソーム遺伝要素によって保持される、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の酵母細胞。

## 【請求項 7】

前記酵母はサッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 種に属する、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の酵母細胞。

30

## 【請求項 8】

前記バクテリアのフォーム I R u B i s C O 酵素はシアノバクテリアの R u B i s C O 酵素である、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の酵母細胞。

## 【請求項 9】

前記シアノバクテリアはシネコッカス (*Synechococcus*) 属に属する、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の酵母細胞。

## 【請求項 10】

適切なプロモータの転写制御下において、ホスホリプロキナーゼ (P R K) をコードする配列を包含する発現カセットをさらに含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の酵母細胞。

40

## 【請求項 11】

前記 P R K はクラス I I P R K である、請求項 10 に記載の酵母細胞。

## 【請求項 12】

前記クラス I I P R K は、スピナシア・オレラセア (*Spinacia oleracea*)、ユーグレナ・グラシリス (*Euglena gracilis*)、又はシネコッカス・エロンガタス (*Synechococcus elongatus*) の P R K から選択される、請求項 11 に記載の酵母細胞。

## 【請求項 13】

前記 P R K をコードする配列の転写を制御する前記プロモータは誘導型プロモータであ

50

る、請求項10～12のいずれか1項に記載の酵母細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は改変酵母株の作製に関し、該改変酵母株に炭素源として二酸化炭素を使用させることを目的とする。

【背景技術】

【0002】

人間や産業活動により二酸化炭素量が増加しており、これは深刻な気候変動を引き起こすと考えられる地球温暖化の原因となる温室効果の主な要因となっている。

10

【0003】

二酸化炭素の回収と有機化合物への転換は、特に光合成を背景として、自然に所定の有機体によりおこなわれている。

【0004】

光合成では、第1段階において光化学反応が介入し、その結果として光エネルギーがATPとNADPH/NADHとの形態において化学エネルギーに変換され、第2段階はカルビン回路と呼ばれ、化学エネルギーが二酸化炭素からの炭素を有機分子に取り込むために用いられる、という2つの段階が含まれる。

【0005】

カルビン回路の主要な酵素は、二酸化炭素分子を捕捉することでリブローズ1,5-2リン酸を2分子の3-ホスホグリセレートに変換するリブローズ1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ(RuBisCO)複合体である。

20

【0006】

種々のフォームのRuBisCOがあり(Tabita等、J Exp Bot、59、1515～24、2008年)、最も代表的なものはフォームIとフォームIIとである。フォームIは、大サブユニット(RbcL)と小サブユニット(RbcS)との2つのタイプのサブユニットからなる。この機能的酵素複合体は8つの大サブユニットと8つの小サブユニットとからなるヘキサデカマー(hexadecamer)である。これらのサブユニットの適切な会合には、少なくとも1つの特異的シャペロン、RbcXの介入をさらに必要とする(Liu等、Nature、463、197～202、2010年)。

30

【0007】

RuBisCOの基質であるリブローズ-1,5-2リン酸は、リブローズ-5-リン酸とATPとの反応によって形成され、この反応はホスホリブロキナーゼ(phosphoribulokinase、PRK)により触媒される。2つのクラスのPRKが知られ、プロテオバクテリアに見受けられるクラスI酵素は八量体である一方で、シアノバクテリア及び植物に見受けられるクラスII酵素は四量体又は二量体である。

【0008】

酵母などの非光合成生物体はRuBisCOもホスホリブロキナーゼも有さないが、一方で、ペントースの一般的代謝に介入することから他のカルビン回路酵素を含有する。

40

【0009】

カルビン回路を再構成し、二酸化炭素を使用させるために、酵母にRuBisCOとPRKとを導入することが提案されている。例として、Guadalupe-Medina等(Biotechnology for Biofuels、6、125、2013年)は、チオバシラス・デニトリフィカンス(Thiobacillus denitrificans)からのフォームIIのRuBisCO酵素とスピナシア・オレラセア(Spinacia oleracea)からのPRKとのサッカロマイセス・セレビスエ(Saccharomyces cerevisiae)における発現が、グリセロール形成を低減することによってエタノール産生を向上させることを報告している。

50

## 【0010】

しかしながら、酵母においてバクテリアのフォームIのRuBisCO酵素を発現することは今までできなかった。実際に、このフォームが複雑であるため、機能的酵素の再構築には、RbcL及びRbcSサブユニット並びにシャペロンRbcXの適切なストイキオメトリにおける同時発現と、酵素複合体におけるこれらのサブユニットの適切な会合が必要とされる。しかしながら発現ストイキオメトリの真核生物への転位（原核生物ではオペロンへの遺伝子の構造化によってもたらされる）は問題をもたらす。さらに、細胞内環境について真核生物と原核生物とに既に存在する相違点は、特に、酵素サブユニットを構成するペプチド鎖の折りたたみ及び/又はこれらのサブユニットの会合を妨げる翻訳後修飾にあらわれ得る。

10

## 【0011】

だが、発明者等は、これらのサブユニットを特異的シャペロンRbcX並びに一般的なバクテリアシャペロンGroES及びGroELと同時発現させることで、酵母において、シネココッカス・エロンガタス (*Synechococcus elongatus*) からのフォームIRuBisCO酵素の種々のサブユニットを発現することと、酵素複合体を再構築するためにこれらのサブユニットを会合することとに成功した。

## 【発明の概要】

## 【0012】

このように、本発明は、形質転換された酵母細胞、好ましくはサッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 細胞を目的とし、該細胞は、

20

- a) 適切なプロモータの転写制御下において、バクテリアのフォームIのRuBisCO酵素のRbcLサブユニットをコードする配列を包含する発現カセットと、
- b) 適切なプロモータの転写制御下において、前記RuBisCO酵素のRbcSサブユニットをコードする配列を包含する発現カセットと、
- c) 適切なプロモータの転写制御下において、前記RuBisCO酵素の特異的シャペロンRbcXをコードする配列を包含する発現カセットと、
- d) 適切なプロモータの転写制御下において、バクテリアシャペロンGroESをコードする配列を包含する発現カセットと、
- e) 適切なプロモータの転写制御下において、バクテリアシャペロンGroELをコードする配列を包含する発現カセットと、を含むことを特徴とする。

30

## 【0013】

本発明の特に新規の特徴は、上述のc)、d)、及びe)において言及されるシャペロンが、2つの異なる生物種に由来するという点である。好ましくは、3つのシャペロンは、その少なくとも1つがシアノバクテリアである少なくとも2つの遠隔のグラム陰性バクテリア種に由来する。例として、一般的なシャペロン (GroES、GroEL) は大腸菌 (*E. coli*) 由来であり、「特異的な」シャペロン (RbcX) はシネココッカス・エロンガタス (*Synechococcus elongatus*) 由来である。シャペロンの配列類似性 (アライメントにおける同一アミノ酸の割合) は、S・エロンガタスのGroEL1と大腸菌のGroELとで61%、S・エロンガタスのGroEL2と大腸菌のGroELとで56%、S・エロンガタスのGroEL1とGroEL2とで63%である。このように、65%の同一性しきい値により、大腸菌の一般的シャペロンとS・エロンガタスとは区別される。本明細書において、「GroES」と「GroEL」とは、シャペロン活性を有し、且つそれぞれ大腸菌K12のGroES及びGroELと65%~100%のアミノ酸同一性を有する、任意のタンパク質を指す。大腸菌からの一般シャペロンGroES及びGroELの変異体のシャペロン活性は、例えば、記載される本発明の実施形態の種々の実施例において、大腸菌からの天然GroES又はGroELをコードする発現カセットを、評価されるシャペロンの変異体によって置き換えることにより検証され得る。

40

## 【0014】

50

シャペロン R b c X は、G r o E L と G r o E S とから非常に隔たりがあり、その配列はこれら 2 つのシャペロンの配列とアライメントされることができない。本明細書において、「R b c X」とは、配列番号 3 によりコードされるシャペロン R b c X と (アミノ酸において) 50% を超える配列同一性を有し、且つ、このタンパク質の特異的シャペロン活性を保持する (これは本発明の配列番号 3 を包含する発現カセットを評価される任意の他の配列で置換することと、得られた R u B i s C O 活性を細胞抽出物におけるインビトロテストで測定することとにより、S ・エロンガタスの R u B i s C O の R b c L 及び R b c S サブユニットを発現する酵母において検証可能である)、任意のシアノバクテリアシャペロンを指す。好ましくは、本発明は、配列番号 3 によりコードされるシャペロン R b c X に対する (アミノ酸における) 配列同一性が 80% より高く、特に 90% より高いシャペロン R b c X で実施される。 10

【0015】

本発明の好ましい実施形態において、シャペロン R b c X は、例えばシネココッカス・エロンガタス (*Synechococcus elongatus*) からの、シアノバクテリアシャペロンである。

【0016】

本発明の他の好ましい実施形態において、一般的なシャペロン G r o E S と G r o E L との少なくとも 1 つは、シアノバクテリアにも R u B i s C O 複合体を発現する他のバクテリアにも由来しない。

【0017】

有利な実施形態において、3 つの発現カセットは遺伝子情報の連続的ブロックを形成する。また、3 つのシャペロンの発現カセットは単一のエピソーム遺伝要素により保持されることも有利であり得る。

【0018】

好ましくは、バクテリアのフォーム I の R u B i s C O 酵素は、有利にはシネココッカス属のシアノバクテリアからの、最も好ましくはシネココッカス・エロンガタスからの、シアノバクテリア R u B i s C O 酵素である。

【0019】

本発明の好ましい実施形態において、前述の細胞は、f) 適切なプロモータの転写制御下において、P R K、好ましくは、例えばスピナシア・オレラセア (*Spinacia oleracea*)、ユーグレナ・グラシリス (*Euglena gracilis*)、又はシネココッカス・エロンガタスなどのクラス I I P R K をコードする配列を包含する、発現カセットをさらに含む。 30

【0020】

酵母細胞において目的の遺伝子を発現するために使用可能な広範な種々の手段 (プロモータ、発現ベクターカセット、形質転換法) が当該技術分野において利用可能である (参考として例えば「酵母遺伝学における方法 (Methods in Yeast Genetics)」D. Amberg、D. Burke 及び J. Strathern、Cold Spring Harbor Laboratory Press、2005 年)。

【0021】

本発明の文脈において使用可能なプロモータは、構成型プロモータ、即ち大部分の細胞状態と環境条件とで活性であるプロモータと、外因性の物理的又は化学的刺激によって活性化又抑制され、これらの刺激の存否の結果として種々のレベルの発現を誘導する誘導型プロモータとを含む。 40

【0022】

発現カセット a) ~ e) について、例えば T E F 1、T D H 3、P G I 1、P G K、A D H 1 などの構成型プロモータが好ましくは用いられる。好適には、これらのプロモータはカセットによって異なり得る。

【0023】

P R K 発現カセット f) について、誘導型プロモータが好ましくは用いられ得る。例と 50

して、ドキシサイクリンによって発現が抑制され、故にその非存在下で誘導される TetO-7 プロモータが言及され得る。

【0024】

本発明の文脈において使用可能な他の誘導型プロモータは、特に tetO-2、GAL10、GAL10-cyc1、PHO5 プロモータである。

【0025】

本発明の発現カセットは、転写ターミネータや、必要であれば増幅因子などの他の転写調節要素など、このタイプの構成に一般的な配列をさらに含む。

【0026】

種々の発現カセットによって発現されるタンパク質の相対的なストイキオメトリは、本発明の最適な実施形態において多くは重要な役割を果たす。以下の実験の項に記載される酵母における同時発現のシステムは特にこれに関連する。しかしながら、本発明はこのシステムの使用に限定されず、少なくとも同等の作用を有する記載の要素の発現の任意の変形で適用可能であり、それらは例えば以下に記載の実施例のうちの一つを再現することによって測定可能である。

10

【0027】

本発明の発現カセットは宿主細胞の染色体 DNA に挿入されるか、及び / 又は 1 つ以上の染色体外複製単位 (レプリコン) によって保持されることが可能である。

【0028】

本発明の酵母株は、同一種の株について共通の培地条件下で成長可能である。有利には、これらの培地は少なくとも 90% 二酸化炭素を含む雰囲気下で調製される。

20

【0029】

本発明は、サッカロマイセス・セレビシエにおける RuBisCO 複合体と PRK との発現を記述する非限定的実施例を示す、以下のさらなる説明により理解が深まる。

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1】図1は、形質転換株の溶解物全体の解析を示す。図1Aは、11.5、11.15、11.7、11.17、11.9、11.19、11.5、11.19株の溶解物全体の SDS-PAGE 解析を示す。図1Bは、14.5、14.12、14.6、14.7、16.3、16.5、16.6株の溶解物全体の抗HA免疫検出による解析を示す。

30

【図2】図2は、溶解物全体 (図面左側の四角) と、RbcL、RbcS、及び RbcX を同時発現する 16.5株の、分子量により分類された画分と、RbcX を発現する対照株 16.3 との免疫検出による解析を示す。

【図3】図3は、11.9、18.3、及び 22.2株の抽出物全体と、S・エロンガタスと大腸菌のシャペロンとからの RbcL、RbcS、及び RbcX を同時発現する 22.2株の分子量によって分類された画分との、非変性ゲルにおける、そして抗 RbcL 抗体を用いた免疫検出による解析を示す。同時に、18.3株 (左側) 及び 22.2株 (右側) の分子量によって分類された画分も示される。

【図4】図4は、種々の反応時間 (0、10及び60分) で得られた、検出 3-ホスホグリセラートの量 (185及び186の m/e、即ち ES<sup>-</sup>の炭素における非標識 3-ホスホグリセラートと <sup>13</sup>C 標識 3-ホスホグリセラートのイオン) を示す。左側には <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> の存在下でおこなわれた実験が示され、右側には <sup>12</sup>CO<sub>2</sub> の存在下でおこなわれたものが示される。

40

【図5】図5は、通常の雰囲気での、細胞の生存性における種々の PRK の発現の影響を示す。2 µg/ml ドキシサイクリンを含む CSM 選択培地における液体内で各株を成長させる。2 OD の当量 (600 nm での OD) を収集し、2回洗浄してドキシサイクリンを除去する。10倍希釈物を調製する。10 µl の希釈物を、(2 µg/ml ドキシサイクリンを含む又は非含むの) 寒天平板上に細胞懸濁剤の滴 (一連の段階希釈) の形態で堆積させ、通常の雰囲気において 28 °C でインキュベートする。

【図6】図6は、CO<sub>2</sub> 豊富な雰囲気での、細胞の生存性における種々の PRK の発現の

50

影響を示す。2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ドキシサイクリンを含むCSM選択培地における液体内で各株を成長させる。2 ODの当量(600 nmでのOD)を収集し、2回洗浄してドキシサイクリンを除去する。10倍希釈物を調製する。10  $\mu\text{l}$ の希釈物を、(2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ドキシサイクリン含有又は非含有の)寒天平板上に、細胞懸濁剤の滴(一連の段階希釈)の形態で堆積させ、少なくとも90:10(v/v)の二酸化炭素/空気を含有する雰囲気を含む閉じた袋内において28 でインキュベートする。

【図7】図7は、各株について最大成長率 $\mu$ ( $\mu_{\text{max}}$ )の比率を示す。濃い灰色の棒は、tetOプロモータの誘導状態(高発現レベル)を示し(ドキシサイクリン非含有培地)、薄い灰色の棒は、tetOプロモータの(部分的な)抑制状態(低発現レベル)を示す(2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ドキシサイクリン含有培地)。

【図8】図8は、種々の抽出物において、溶出時間の関数としてのリブローズ-1,5-2リン酸(モル質量309 g/モル)の検出を示す。左側のパネルはCSM選択培地を含有する閉管において成長させたW303-1B株のクロマトグラムを示し、真ん中のパネルは閉管及びCSM選択培地において成長させたCENPK株のクロマトグラムを示し、右側のパネルは閉管及び最小培地において成長させたCENPK株について得られたクロマトグラムを示す。

【図9】図9は、CEN.PK3と4との株における合成Rubisco複合体の酵素活性の評価を示す。PRKはホスホリブロキナーゼであり、RbcSLXはRbcL、RbcS、及びRBCX遺伝子の産生物であり、GroESLは大腸菌からのGroEL及びGroES遺伝子の産生物である。

【図10】図10は、ウシ炭酸脱水酵素の存在下及び非存在下における、完全エンジニアリング(complete engineering)を含む酵母CEN-PK3の抽出物のRubisco活性を示す。

【図11】図11は、嫌気培養時のエタノールとバイオマスとの濃度における変化を示す(Rub:RbcS+RbcL、Prk:ホスホリブロキナーゼ、シャペロン:RbcX+(GroES+GroEL)大腸菌)。 はCEN.PK13b株、 はCEN.PK3株を示す。

【図12】図12は、好気培養時のバイオマス、ホルマー、及びグルコースの濃度における変化を示す(Rub:RbcS+RbcL、Prk:ホスホリブロキナーゼ、シャペロン:RbcX+(GroES+GroEL)大腸菌)。バイオマス生成(g/l、左側縦軸)について、 はCEN.PK2株(RbcL、RbcS、RbcX、GroES\_\_coli、GroEL\_\_coli)、 はCEN.PK3株(PRK、RbcL、RbcS、RbcX、GroES\_\_coli、GroEL\_\_coli)を示す。グルコース消費(g/l、左側縦軸)について、 はCEN.PK2株、 はCEN.PK3株を示す。ホルマー消費(g/l、右側縦軸)について、 はCEN.PK2株、 はCEN.PK3株を示す。

【図13】図13は、完全エンジニアリング(CEN.PK3(PRK、RbcL、RbcS、RbcX、GroES\_\_coli、GroEL\_\_coli))を含む株か、又はPRKなし(CEN.PK2(RbcL、RbcS、RbcX、GroES\_\_coli、GroEL\_\_coli))でおこなわれたメタボローム解析の抜粋である。解析は、特に、フラクトース-6P(F6P)、フラクトース-1,6diP(FBP)、グルコース-6P(G6P)、セドヘプツロース-7P(S7P)、キシルロース-5P(Xylu5P)、リブローズ-5P(Ribu5P)、リボース-5P(Rib5P)、リブローズ-1,5diP(RibuDP)、グリセラート-3P(Gly3P)の激しい蓄積を示す。

【図14】図14は、本発明の改変酵母細胞についての代謝シミュレーションを示す。

【発明を実施するための形態】

【0031】

(実施例)

[実施例1: サッカロマイセス・セレビスエ(SACCHAROMYCES CERE 50

10

20

30

40

V I S I A E ) 酵母におけるシネココッカス・エロンガタス ( S Y N E C H O C O C C U S E L O N G A T U S ) R u B i s C O 複合体の発現と会合]

シネココッカス・エロンガタス p C C 6 3 0 1 からの R u B i s C O の R b c S 及び R b c L サブユニットと特定のシャペロン R b c X とをコードし、酵母における発現に最適化された合成遺伝子を調製し、プラスミド p B S I I ( G e n e c u s t 社) にクローニングした。また、コード配列の 3 末端に H A タグを追加した変異体も構築した。

【 0 0 3 2 】

これらの合成遺伝子の配列 ( H A タグ無し ) は、添付の配列表において配列番号 1 ( R b c L )、配列番号 2 ( R b c S )、及び配列番号 3 ( R b c X ) の番号のもとに示される。

10

【 0 0 3 3 】

大腸菌 ( E . c o l i ) シャペロン G r o E S 及び G r o E L をコードする配列を、大腸菌培養から増幅し、プラスミド p S C - B - a m p / k a n ( S t r a t a g e n e 社) にクローニングした。

【 0 0 3 4 】

クローニングベクターから収集された配列を酵母発現ベクターに導入した。以下の表 1 にこれらの宿主ベクターを示す。

【 0 0 3 5 】

【表 1】

| 名称     | 酵母の複製開始点 | 選択マーカ | 転写カセット (プロモーターターミネータ) | 大腸菌レプリコン  |
|--------|----------|-------|-----------------------|-----------|
| pFPP5  | 2u       | URA3  | pGAL10-CYC1-tPGK      | 使用 (AmpR) |
| pFPP10 | 2u       | URA3  | pTDH3- -tADH          | 使用 (AmpR) |
| pFPP11 | 2u       | URA3  | pTDH3- -tCYC1         | 使用 (AmpR) |
| pFPP12 | 2u       | URA3  | pTGI1- -tCYC1         | 使用 (AmpR) |
| pFPP13 | ARS-CEN6 | LEU2  | pTEF1-tPGK            | 使用 (AmpR) |

20

【 0 0 3 6 】

注 : p G A L 1 0 - C Y C 1 は G A L 1 0 遺伝子の U A S と C Y C 1 遺伝子の転写開始点からなる合成プロモータである ( P o m p o m 他、 M e t h o d s E n z y m o l 、 2 7 2 、 5 1 6 4 、 1 9 9 6 年 ) 。

【 0 0 3 7 】

このように得られた発現カセットは以下の表 2 に示される。

【 0 0 3 8 】

30

【表 2】

| 名称    | プロモータ | オープンリーディングフレーム | タグ | ターミネータ |
|-------|-------|----------------|----|--------|
| CAS1  | TEF1p | RbcL-          | HA | PGK    |
| CAS2  | TEF1p | RbcS-          | HA | PGK    |
| CAS3  | TEF1p | RbcX-          | HA | PGK    |
| CAS4  | PGI1p | RbcX           | なし | CYC1   |
| CAS5  | TDH3p | RbcL-          | HA | ADH1   |
| CAS6  | TDH3p | RbcL           | なし | ADH1   |
| CAS16 | TEF1  | RbcS           | なし | PGK    |
| CAS17 | TDH3  | RbcL-          | HA | PGK    |
| CAS18 | TDH3  | RbcL           | なし | ADH    |
| CAS19 | TEF1p | RbcX           | なし | PGK    |
| CAS20 | PGI1  | RbcX-          | HA | CYC1   |
| CAS21 | PGI1p | GroES          | なし | CYC1   |
| CAS22 | TDH3  | GroEL          | なし | ADH    |

10

20

## 【0039】

特定のベクターにおいて、2又は3つのカセットを挿入した。そのため、プラスミドを大腸菌 (*Escherichia coli*) DH5 バクテリアにおいて増幅し、マキシプレップによって調製し、そして適切な制限酵素で消化した。最後に、フラグメントをT4リガーゼ (Fermentas社) によってライゲーションで宿主ベクターに組み込む。構築ベクターのリストは以下の表3に示される。

## 【0040】

30

【表 3】

| 名称     | 起源タイプ       | カセット1 | カセット2 | カセット3  | マーカ  | 宿主ベクター        |
|--------|-------------|-------|-------|--------|------|---------------|
| pFPP6  | 2u          | CAS1  | なし    | なし     | URA3 | pFPP5         |
| pFPP7  | 2u          | CAS2  | なし    | なし     | URA3 | pFPP5         |
| pFPP18 | 2u          | CAS2* | CAS6  | なし     | URA3 | pFPP5/pFPP10  |
| pFPP19 | 2u          | CAS2  | CAS6  | なし     | URA3 | pFPP5/pFPP10  |
| pFPP23 | ARS416-CEN6 | CAS3  | なし    | なし     | LEU2 | pFPP13        |
| pFPP40 | 2u          | CAS5  | なし    | なし     | URA3 | pFPP10        |
| pFPP45 | 2u          | CAS6  | CAS16 | なし     | URA3 | pFPP5/pFPP10  |
| pFPP48 | 2u          | CAS20 | なし    | なし     | URA3 | pFPP12        |
| pFPP49 | 2u          | CAS19 | なし    | なし     | LEU2 | pFPP12/pFPP13 |
| pFPP55 | ARS415-CEN6 | CAS19 | CAS21 | CAS22  | LEU2 | pFPP13        |
| pFPP56 | ARS415-CEN6 | CAS19 | CAS21 | CAS22* | LEU2 | pFPP13        |

10

20

## 【0041】

\*は逆方向を示す。

## 【0042】

S.セレビス工酵母細胞(W303.1B株)を形質転換するために種々のベクター又はベクターの組合せを用いた。

## 【0043】

これらのベクター及びベクターの組合せを以下の表4に示す。

30

## 【0044】

【表 4】

| 形質転換株  | 親株         | ベクター<br>ー1 | ベクター<br>ー2 | ベクター<br>ー3 | 発現タンパク質 (§ はHAタグとのC末端融合を示す) |          |          |           |           |     |
|--------|------------|------------|------------|------------|-----------------------------|----------|----------|-----------|-----------|-----|
|        |            |            |            |            | Rbc<br>S                    | Rbc<br>L | Rbc<br>X | GroE<br>S | GroE<br>L | PRK |
| 11. 19 | W303       | pCM185     | pFPP23     | pFPP19     | X §                         | X        | X §      |           |           |     |
| 18. 3  | W303       | pFPP45     | pFPP49     |            | X                           | X        | X        |           |           |     |
| 22. 2  | W303       | pFPP45     | pFPP56     |            | X                           | X        | X        | X         | X         |     |
| 22. 3  | W303       | pFPP45     | pFPP55     |            | X                           | X        | X        | X         | X         |     |
| 30. 1  | W303       | pCM185     |            |            |                             |          |          |           |           |     |
| 11. 5  | W303       | pCM185     | pFL36      | pFPP5      |                             |          |          |           |           |     |
| 11. 7  | W303       | pCM185     | pFL36      | pFPP18     | X §                         | X        |          |           |           |     |
| 11. 9  | W303       | pCM185     | pFL36      | pFPP19     | X §                         | X        |          |           |           |     |
| 11. 15 | W303       | pCM185     | pFPP23     | pFPP5      |                             |          | X §      |           |           |     |
| 11. 17 | W303       | pCM185     | pFPP23     | pFPP18     | X §                         | X        | X §      |           |           |     |
| 14. 5  | W303       | pFPP6      |            |            |                             | X §      |          |           |           |     |
| 14. 12 | W303       | pFPP40     |            |            |                             | X §      |          |           |           |     |
| 14. 6  | W303       | pFPP7      |            |            | X §                         |          |          |           |           |     |
| 14. 7  | W303       | pFPP23     |            |            |                             |          | X §      |           |           |     |
| 16. 3  | W303       | pFPP48     |            |            |                             |          | X §      |           |           |     |
| 16. 5  | W303       | pFPP43     | pFPP23     |            | X §                         | X §      | X §      |           |           |     |
| 16. 6  | W303       | pFPP43     |            |            | X §                         | X §      |          |           |           |     |
| yFB3   | CEN.<br>PK | pFPP45     | pFPP20     | pFPP56     | X                           | X        | X        | X         | X         | X   |

10

20

30

## 【 0 0 4 5 】

注：pCM185はプラスミドATCC87659、pFL36はプラスミドATCC77202を示す。

## 【 0 0 4 6 】

形質転換に用いられたプラスミドの選択マーカに適した市販のCSM培地(MP Biomedicals社)で補完したYNB培地(6.7g/l硫酸アンモニウム、20g/lグルコース、寒天用20g/l寒天で補完した窒素源非含有酵母(yeast without nitrogen base))において、形質転換細胞を、周囲空気下30で成長させた。培養を、対数期終了の一代前に4で冷却することで停止した。

40

## 【 0 0 4 7 】

各培養から一定分量を取り、変性SDSゲルにおいて全タンパク質を解析するため、細胞をSDSの存在下においてソーダで溶解する。

## 【 0 0 4 8 】

培養の残余を遠心分離し、スフェロプラストを、高張性ソルビトール培地(1.2Mソルビトール)においてザイモリエース・サイトヘリカーゼ混合物で細胞壁の酵素消化をすることで調製する。スフェロプラストを、飽和濃度のPMSF及びEDTA(プロテアーゼ阻害剤)の存在下で高張性ソルビトール培地において洗浄し、等張性ソルビトール培地

50

(0.6 M)においてピペッティングの反復と弱い音波処理とで破碎する。大きな破片を除くための低速(1500 rpm)で、そして中程度のサイズの破片とミトコンドリアとを収集するために中速(4000 rpm)で遠心分離した後、上清を収集し、pHを6.5~7.0に維持した80%飽和の硫酸アンモニウムでタンパク質を沈殿させた。沈殿物を再溶解し、プロテアーゼ阻害剤の存在下で透析し、そしてセファクリルS300カラム(GEヘルスケア社)において分子ふるいにより分画する。ゲル解析のため、溶出された画分をプールにおいて合わせる。

#### 【0049】

全溶解物と、分子量により分類された画分( $10^4 \sim 1.5 \times 10^6$ ダルトンの天然球状タンパク質の範囲)とを変性SDS-PAGEゲル及び非変性ゲルにおいて解析する(クマシーブルーPAGEで予備染色)。全タンパク質の解析のため、ゲルをクマシーブルーで染色し、ボンソーレッドでプロットを染色する。RbcL、RbcS、及びRbcXタンパク質を、電荷ナイロンへの電気移動後に免疫検出によって検出する。RbcLの場合、検出は抗RbcL抗体を用いて直接的におこなわれ、RbcSとRbcXの場合には抗HAタグ抗体を介して非直接的におこなわれることができる。タグの存在により複合体の折りたたみ又は会合が影響を受けないことを検証するために、タグタンパク質の同時発現あり又はなしを交互におこないながら種々の実験を繰り返した。

10

#### 【0050】

図1は、形質転換株の全溶解物の解析を示す。

#### 【0051】

2つのサブユニットを酵母において発現させる。RbcLは、(抽出物の全タンパク質の非特異的染色によって可視である)高レベルで発現される。RbcS発現レベルは定量化されていないが、抗HA免疫検出に基づきRbcLのものと同様であると考えられる。2つのタンパク質は分解の兆候を示さず(不鮮明な又は複数のバンドはない)、優れた折りたたみの質と内在性プロテアーゼに対する抵抗性を示す。シャペロンRbcXも発現され、分解の兆候を示さない。3つの成分を同時発現するためのプラスミド系が運用され、種々の成分の発現との干渉を特に示さない。

20

#### 【0052】

図2は、全溶解物(図面左側の四角)と、RbcL、RbcS、及びRbcXを同時発現する16.5株及びRbcXを発現するその対照16.3株の分子量によって分類された画分との免疫検出による解析を示す。

30

#### 【0053】

RbcLサブユニットの単峰性分布が500 kDa以上のサイズの複体内で観察されるものの、単離されたサブユニットの質量は55 kDaである。反対に、RbcSとRbcXとの分布は二峰性であり、一方はRbcLについて観察されるものと同様のサイズであり、他方は単離されたRbcS及びRbcXタンパク質のものに近い小さいサイズに相当する。天然Rubisco複合体は、これらの条件下で、天然ゲルや非特異的染色により、予期されるサイズ(約500 kDa)でしっかりと可視されない。しかし、非常に大きい複合体はRbcLの免疫検出によって(予期されるサイズよりも大きい)約750~1000 kDaで検出可能である。

40

#### 【0054】

図3は、11.9、18.3、及び22.2株の全抽出物と、S.エロンガタスからのRbcL、RbcS、及びRbcX並びに大腸菌からのシャペロンを同時発現する22.2株の分子量で分類された画分との、非変性ゲルにおける解析と次の抗RbcL抗体を用いる免疫検出との結果を示す。同時に、18.3株(左側)及び22.2株(右側)の分子量によって分類された画分も示される。

#### 【0055】

結果は、シャペロンGroES及びGroELとの同時発現がこれらのシャペロンの非存在下で検出された高分子量複合体(約750~1000 kDa)のサイズ低下をもたらし、RbcL、RbcS、RbcX、GroES、及びGroELを同時発現する細胞に

50

において、天然 RuBisCO 複合体について予期されるサイズ (約 500 kDa) に対応する明確に定義されたバンドが観察されることを示す。

【0056】

これらの結果は、原核生物のフォーム I の RuBisCO 複合体が *S.セレピシエ* 細胞において発現及び適切に会合されることが可能であり、この会合が一般シャペロン GroES と GroEL との存在によって向上されることを示す。

【0057】

インビトロにおける RuBisCO 活性の解析のため、yFB3 株の可溶性タンパク質抽出がおこなわれる。用いられたプラスミドの選択マーカに適した (yFB3 株用ロイシン、ウラシル、及びトリプトファン非含有培地)、市販の CSM 培地 (MP Biomedicals 社) を含んで 6.7 g/l 硫酸アンモニウム、20 g/l グルコース、寒天用 20 g/l 寒天で補完された、YNB (窒素源非含有酵母) 培地において、細胞を、周囲空気下 30 で成長させる。対数期終了の一世代前に 4 で冷却することで、培養を停止する。培養物を遠心分離し、スフェロプラストを、高張性ソルビトール培地 (1.2 M ソルビトール) においてザイモリエース・サイトヘリカーゼ混合物で細胞壁の酵素消化をすることで調製する。スフェロプラストを、1 mM の PMSF 及び EDTA (プロテアーゼ阻害剤) の存在下で高張性ソルビトール培地において洗浄し、等張性ソルビトール培地 (0.6 M) において反復ピペティングと弱い音波処理とで破碎する。大きな破片を除くために低速 (200 g で 5 分間) で、そして中程度のサイズの破片とミトコンドリアとを収集するために中速 (1500 g で 10 分間) で遠心分離した後、上清を収集する。

10

20

【0058】

タンパク質抽出物における活性のテストを、2 mM リブローズ 2 リン酸 (RIDP) と yFB3 抽出物の 0.5 mg/ml 全タンパク質との存在下で、50 mM の TRIS/HCl (pH 7.5)、60 mM の NaHCO<sub>3</sub> (<sup>13</sup>C 又は <sup>12</sup>C)、10 mM の MgCl<sub>2</sub> においておこなう。t = 10 分及び t = 60 分で 100 µl の反応混合物を取り出し、2 µl の HCl を添加することで反応を停止し、そして試料を 9300 g で 10 分間遠心分離して HPLC/MS により解析する (10 mM のトリブチルアミンアセテート/アセトニトリル、pH 6.0 勾配を伴う逆相イオン対 C18)。代謝物を負イオンエレクトロスプレー質量分析により検出し、基準化合物のものと比較したその m/e 比と溶出時間とに基づいて特定する。

30

【0059】

結果を図 4 に示す。

【0060】

<sup>13</sup>CO<sub>2</sub> の存在下において、60 分で形成された 3 - ホスホグリセラートのラベル比は、予期されたように 52% である。図 4 の下部に示されるように、実際に RuBisCO により触媒された反応は、1 つの CO<sub>2</sub> 分子と 1 つの RIDP 分子からの 2 つの 3 - ホスホグリセレート分子の形成である。<sup>12</sup>CO<sub>2</sub> の存在下において、3 - ホスホグリセレートは形成されるが、その非ラベル化形態においてのみである。

【0061】

このように、抽出物内に存在する RuBisCO は CO<sub>2</sub> の炭素を取り込んで、3 - ホスホグリセラートを産生することが可能である。

40

【0062】

[ 実施例 2 : サッカロマイセス・セレピシエ酵母におけるホスホリブロキナーゼ発現 ]  
シネココッカス・エロンガタス (Syn)、ロドバクター・スフェロイデス (Rhodobacter sphaeroides, Rsph)、ロドシュードモナス・パルストリス (Rhodospseudomonas palustris, Rpal)、スピナシア・オレラセア (Spinacia oleracea, Sole)、ユーグレナ・グラシリス (Euglena gracilis, Egra) である 5 つの異なる由来の PRK をコードし、酵母における発現に最適化され、そして C 末端 HA タグを有するか又は有しない、合成遺伝子を調製した。これら合成遺伝子の配列 (HA タグ無し) は、添付の配

50

列表において、それぞれ配列番号 4 ~ 8 の番号のもとに示される。

【 0 0 6 3 】

R s p h と R p a l との P R K は、R s p h では八量体として、R p a l では六量体として、天然形態において存在するクラス I P R K である。S o l e、E g r a、及び S y n キナーゼは、その天然形態が S o l e、E g r a については二量体、S y n については四量体であるクラス I I キナーゼである。

【 0 0 6 4 】

ロドバクター・スフェロイデス ( R s p h )、ロドシュードモナス・パルストリス ( R p a l )、ユーグレナ・グラシリス ( E g r a )、及びスピナシア・オレラセア ( S o l e ) 配列は、Genecust 社により合成され、pBlueScript II + プラスミドで提供された。プラスミドを大腸菌 ( Escherichia coli ) DH5 バクテリアにおいて増幅した。各プラスミドについて、マキシプレップ抽出をおこない、BamHI 及び PstI 酵素で消化する。そして消化産物を SYBER Safe を含む 0.8% アガロースゲルに堆積させた。50V で 30 分間、1 倍の TAE 緩衝剤内で移動をおこなう。オープンリーディングフレームに対応するバンド ( R p a l からの P R K では 972 bp、R s p h では 966 bp、E g r a では 1461 bp、S o l e では 1277 bp ) をゲルから切り出し、Fermentas 社のゲル抽出キットで DNA を抽出する。最後に、ドキシサイクリンで抑制可能な tetO プロモータの制御下において、フラグメントを T4 リガーゼ ( Fermentas 社 ) によってライゲーションでベクター pCM185、pCM188-2、及び pCM188-7 に組み込み、それぞれ発現ベクター pFPP20、pJLP1、pJLP2、pJLP3、pJLP4 を得る。

10

20

【 0 0 6 5 】

得られたカセット及び発現ベクターは以下の表 5 に示される。

【 0 0 6 6 】

【表 5】

| 名称        | 由来タイプ       | プロモーター | ターミネーター | オープンリーディングフレーム       | マーカ  | 宿主ベクター   |
|-----------|-------------|--------|---------|----------------------|------|----------|
| pCM18-5   | ARS416-CEN4 | Tet07  | CYC1    | ∅                    | TRP1 | ∅        |
| pCM18-8-2 | ARS416-CEN4 | Tet07  | CYC1    | ∅                    | URA3 | ∅        |
| pCM18-8-7 | ARS416-CEN4 | Tet07  | CYC1    | ∅                    | URA3 | ∅        |
| pFPP2-0   | ARS416-CEN4 | Tet07  | CYC1    | PRK S. エロンガタス        | TRP1 | pCM185   |
| pFPP2-1   | ARS416-CEN4 | Tet02  | CYC1    | PRK S. エロンガタス        | URA3 | pCM188-2 |
| pFPP2-2   | ARS416-CEN4 | Tet07  | CYC1    | PRK S. エロンガタス        | URA3 | pCM188-7 |
| pJLP1     | ARS416-CEN4 | Tet07  | CYC1    | PRK E. グラシリス HA タグ   | TRP1 | pCM185   |
| pJLP2     | ARS416-CEN4 | Tet07  | CYC1    | PRK R. スフェロイデス HA タグ | TRP1 | pCM185   |
| pJLP3     | ARS416-CEN4 | Tet07  | CYC1    | PRK R. パルストリス HA タグ  | TRP1 | pCM185   |
| pJLP4     | ARS416-CEN4 | Tet07  | CYC1    | PRK S. オレラセア HA タグ   | TRP1 | pCM185   |

10

20

30

## 【0067】

これらのベクターを、S. セレピシエの W303.1B 株と、CNPK 株との細胞を形質転換するために用いた。これらの株の前者は典型的な実験株、後者は準産業的株である。

## 【0068】

Chen 等 (Curr Genet., 1992 年、21、83-4) のプロトコルに従って形質転換をおこない、各形質転換及びサブクロニング段階では、tetO プロモーターの抑制に適した 2 μg/ml のドキシサイクリン濃度が維持された。形質転換細胞を、2 μg/ml ドキシサイクリンの存在下、-80 で、グリセロール含有培地 (50% グリセロール) において保存した。

40

## 【0069】

得られた形質転換株を以下の表 6 に示す。

## 【0070】

【表 6】

| 形質転換株 | 親株    | ベクタ<br>ー1 | ベクタ<br>ー2 | ベクタ<br>ー3 | 発現PRK    |
|-------|-------|-----------|-----------|-----------|----------|
| 11.5  | W303  | pCM185    | pFL36     | pFPP5     |          |
| 30.2  | W303  | pFPP20    |           |           | PRKsyn   |
| 11.6  | W303  | pFPP20    | pFL36     | pFPP5     | PRKsyn   |
| yJL1  | W303  | pJLP1     |           |           | PRK Egra |
| yJL2  | W303  | pJLP2     |           |           | PRK Rsph |
| yJL3  | W303  | pJLP3     |           |           | PRK Rpal |
| yJL4  | W303  | pJLP4     |           |           | PRK Sole |
| yJL5  | CENPK | pFPP20    |           |           | PRKsyn   |
| yJL6  | CENPK | pJLP1     |           |           | PRK Egra |
| yJL7  | CENPK | pJLP2     |           |           | PRK Rsph |
| yJL8  | CENPK | pJLP3     |           |           | PRK Rpal |
| yJL9  | CENPK | pJLP4     |           |           | PRK Sole |

10

20

## 【0071】

PRK発現の抑制に適する $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度のドキシサイクリンを含むかつプラスミド選択の支援に適する市販のCSM培地(MP Biomedicals社)を含むYNB培地( $6.7\text{g}/\text{l}$ 硫酸アンモニウム、 $20\text{g}/\text{l}$ グルコース、寒天用 $20\text{g}/\text{l}$ 寒天で補完された窒素源非含有酵母)において、ストックした形質転換細胞を前培養にする。

## 【0072】

細胞生存性における種々のPRK発現の影響を、ドキシサイクリンの存在又は非存在下において寒天培地上で評価した。各株を、 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ ドキシサイクリンを含むCSM選択培地の液体において成長させる。 $2\text{OD}$ の当量( $600\text{nm}$ でのOD)を収集し、2回洗浄してドキシサイクリンを除去する。 $10$ 倍希釈物を調製する。 $10\mu\text{l}$ の希釈物を、( $2\mu\text{g}/\text{ml}$ ドキシサイクリンを含む又は非含有の)寒天平板上に、細胞懸濁剤の滴(一連の段階希釈)の形態で堆積させ、通常の雰囲気、又は代替的に閉じた袋内においてその雰囲気が少なくとも $90:10$ ( $v/v$ )の二酸化炭素/空気を含むものにおいて、 $28^\circ\text{C}$ でインキュベートする。

30

## 【0073】

通常の雰囲気での結果を図5に示し、 $\text{CO}_2$ 豊富な雰囲気での結果を図6に示す。

## 【0074】

すべてのPRKは、(誘導された)高発現レベルのW3031B株においていくらか毒性があるということが言及される。しかし、CENPK株では毒性は相当低いと見られ、SynPRKのみが誘導状態において毒性を有する。

40

## 【0075】

他の実験では、W303.1B株において、酸素が少なくかつ二酸化炭素が豊富な雰囲気においては毒性が大きく弱められることが示される。

## 【0076】

細胞成長における種々のPRK発現の影響を液体培地内の培養において評価した。株を、( $2\mu\text{g}/\text{ml}$ ドキシサイクリン含有又は非含有の)閉管内のCSM選択培地において成長させる。 $600\text{nm}$ で光学密度を測定することで固定相に入るまで成長をモニターする。各株について、株と対照株(株+空のプラスミド)との最大成長率 $\mu$ (単位時間毎の個体群の増加)の関係が測定される。

50

## 【0077】

各株についての最大成長率  $\mu$  ( $\mu_{max}$ ) の比率を図7に示す。

## 【0078】

これらの結果において、CNPK 113-7D株についてのキナーゼの毒性がW303.1B株のものよりも低いことが確認される。

## 【0079】

用量(誘導レベル)反応(成長率)毒性作用はW303.1BのSoloキナーゼのみについて観察される。

## 【0080】

W303.1Bにおいて、弱くそして強く発現されたRpai、RspH、Synキナーゼの重大な毒性が観察される。毒性はEgraキナーゼではより低いと見られる。

10

## 【0081】

炭素循環の中心であるリブローズ-1,5-ビスリン酸代謝の解析のため、細胞を洗浄してドキシサイクリンを除き、そして、使用されるプラスミドの選択マーカに適した市販のCSM培地(MP Biomedicals社)で補完されて6.7g/l硫酸アンモニウム、20g/lグルコース、(寒天用20g/l寒天)で補完されたYNB(窒素源非含有酵母)培地における30の培養液に細胞を入れる。培養物を、培地量1に対して3~10の容積の空気(補充されない)を超えた酸素供給のない閉管内で調製する。このように、培養に由来する二酸化炭素は培養管の容積内に維持される。この手順により、発現の毒性は抑えられる。

20

## 【0082】

Luo他(J. Chromatography A 1147:153-164、2007年)が記載したプロトコルに従って、代謝を、-80で60:40(v/v)のメタノール・水に培養物を希釈することで遮断した(混合物はドライアイス・アセトニトリル浴で-40に維持される)後、高速の遠心分離(温度は-20に維持される)をおこない、0.3Mのソーダを含有するメタノール・水(60:40v/v)混合物内の細胞溶解物を-80で凍結する。

## 【0083】

解凍後、一定分量を氷酢酸で中和し、遠心分離して、上清をHPLC/MS(pH6.0勾配、トリブチルアミンアセテート/アセトニトリルでの逆相イオン対C18)により解析する。代謝物を負イオンエレクトロスプレー質量分析により検出し、基準化合物のものと比較したそのm/e比と溶出時間とに基づいて特定する。

30

## 【0084】

結果を図8に示す。

## 【0085】

反応から産生されたリブローズ-1,5-2リン酸の蓄積レベルにより推定される活性レベル(発現レベルに対して標準化されない)は、

- ・SynPRKでは抑制条件においてすら非常に高く(50%の誘導レベル)、この活性は細胞内ATPのレベルの重大な降下が付随する毒性を伴い、

- ・最小培地におけるEgraとSoloとのPRKについては検出可能であるがより弱く、

40

- ・RspHとRpaiとのPRKに用いられた条件下では検出不可能であり、

- ・SynPRKについては、培地次第で、リブローズ-1,5-2リン酸蓄積レベルが富栄養培地より栄養の乏しい培地においてはるかに高い、

ということが見受けられる。

## 【0086】

これらの観察全体から、クラスIIキナーゼのみがS.セレビシエにおいて高レベルのリブローズ2リン酸の蓄積をもたらすということが示される。

## 【0087】

[実施例3:酵母に発現されたRubisco複合体の機能性及びそれを制御するパラ

50

メータの調査による、インピトロにおける「カーボイースト(carboyeast)」エンジニアリングを含む株の表現型特性]

図4に記載されるように、人工的RuBisCO複合体の機能性は、完全又は部分的エンジニアリングを含む酵母抽出物からの合成基質(リブローズ2リン酸)におけるRuBisCO活性をテストすることと、それが触媒する反応産生物、つまり3-グリセロリン酸の出現を評価することによって、インピトロにおいて示された。

【0088】

<3.1.使用構成と使用株>

本実施例は、以下の表7~表9に記載の構成と形質転換株とを用いておこなわれた。

【0089】

表7は発現カセットを示す。

【0090】

【表7】

| 名称    | プロモータ  | オープンリーディングフレーム       | タグ | ターミネータ |
|-------|--------|----------------------|----|--------|
| CAS6  | TDH3p  | RbcL S. エロンガタス、最適化   | なし | ADH1t  |
| CAS7  | Tet07p | PRK S. エロンガタス、最適化    | なし | CYC1t  |
| CAS16 | TEF1p  | RbcS S. エロンガタス、最適化   | なし | PGKt   |
| CAS19 | TEF1p  | RbcX S. エロンガタス、最適化   | なし | PGKt   |
| CAS21 | PGI1p  | GroES 大腸菌            | なし | CYC1t  |
| CAS22 | TDH3p  | GroEL 大腸菌            | なし | ADH1t  |
| CAS23 | PGI1p  | GroES S. エロンガタス、最適化  | なし | CYC1t  |
| CAS25 | TDH3p  | GroEL2 S. エロンガタス、最適化 | なし | ADH1t  |
| CAS28 | PGI1p  | ポリリンカー               | なし | CYC1t  |
| CAS33 | TEF1p  | ポリリンカー               | なし | PGKt   |

10

20

30

【0091】

表8は発現ベクターを示す(カセットについては表7を参照)。

【0092】

【表 8】

| 名称     | 由来タイプ       | カセット<br>ト1 | カセット<br>ト2 | カセット<br>ト3 | 栄養要<br>求性マ<br>ーカ | 宿主ベ<br>クター | 大腸菌<br>レプリ<br>コン |
|--------|-------------|------------|------------|------------|------------------|------------|------------------|
| pFPP13 | ARS415-CEN6 | CAS33      | なし         | なし         | LEU2             | pFL36      | 使用<br>(AmpR)     |
| pFFP53 | ARS415-CEN6 | CAS19      | CAS28      | なし         | LEU2             | pFL36      | 使用<br>(AmpR)     |
| pFFP56 | ARS415-CEN6 | CAS19      | CAS21      | CAS22*     | LEU2             | pFL36      | 使用<br>(AmpR)     |
| pFB05  | ARS415-CEN6 | CAS19      | CAS25*     | CAS21      | LEU2             | pFFP56     | 使用<br>(AmpR)     |
| pFB07  | ARS415-CEN6 | CAS23      | CAS22*     | CAS19      | LEU2             | pFFP56     | 使用<br>(AmpR)     |
| pFB08  | ARS415-CEN6 | CAS23      | CAS25*     | CAS19      | LEU2             | pFFP56     | 使用<br>(AmpR)     |
| pFB09  | ARS415-CEN6 | CAS21      | CAS22*     | なし         | LEU2             | pFFP56     | 使用<br>(AmpR)     |
| pFPP45 | 2 $\mu$     | CAS6       | CAS16      | なし         | URA3             | PYeDP51    | 使用<br>(AmpR)     |
| pFPP20 | ARS416-CEN4 | CAS7       | なし         | なし         | TRP              | pCM185     | 使用<br>(AmpR)     |

10

20

30

【0093】

\*は逆方向を示す。

【0094】

表9はプラスミドと株との組合せを示す(表8を参照)。

【0095】

【表 9】

| 組合<br>せ番<br>号 | 親株              | ベクタ<br>ー1 | ベクタ<br>ー2 | ベクタ<br>ー3 | 発現タンパク質  |          |          |            |           |           |  |
|---------------|-----------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------|----------|------------|-----------|-----------|--|
|               |                 |           |           |           | Rb<br>cS | Rbc<br>L | Rb<br>cX | PRKs<br>yn | Gro<br>ES | GroE<br>L |  |
| 1b            | CEN. PK<br>1605 | pYeDP51   | pCM185    | pFPP13    |          |          |          |            |           |           |  |
| 2             | CEN. PK<br>1605 | pFPP45    | pCM185    | pFPP56    | X        | X        | X        |            | col<br>i  | coli      |  |
| 3             | CEN. PK<br>1605 | pFPP45    | pFPP20    | pFPP56    | X        | X        | X        | syn        | col<br>i  | coli      |  |
| 4             | CEN. PK<br>1605 | pFPP45    | pFPP20    | pFPP53    | X        | X        | X        | syn        |           |           |  |
| 5             | CEN. PK<br>1605 | pFPP45    | pCM185    | pFPP53    | X        | X        | X        |            |           |           |  |
| 13b           | CEN. PK<br>1605 | PYeDP51   | pCM185    | pFPP56    |          |          | X        |            | col<br>i  | coli      |  |
| 15            | CEN. PK<br>1605 | PYeDP51   | pFPP20    | pFPP56    |          |          | X        | syn        | col<br>i  | coli      |  |
| 17b           | CEN. PK<br>1605 | pFPP45    | pFPP20    | pFPP13    | X        | X        |          | syn        |           |           |  |
| 101           | CEN. PK<br>1605 | pFPP45    | pFPP20    | pFB08     | X        | X        | X        | Syn        | syn       | L2<br>syn |  |

10

20

30

## 【0096】

(Synは*S. エロンガタス*、coliは大腸菌、L2synは*S. エロンガタス*のGroEL2を表す)

## 備考

1. pCM185は市販のプラスミド(ATCC87659)である。

## 【0097】

2. pFL36は市販のプラスミド(ATCC77202)である。

40

## 【0098】

3. PYeDP51は「空の」プラスミドであり、Urban P、Mignotte C、Kazmaier M、Delorme F、Pompom Dの、*Arabidopsis thaliana*の2種の遠い関係にあるNADPHチトクロームP450レダクターゼのクローニング、酵母での発現、及びP450 CYP73A5とのカップリングの特性化(Cloning, yeast expression, and characterization of the coupling of two distantly related *Arabidopsis thaliana* NADPH-cytochrome P450 reductases with P450 CYP73A5、*J Biol Chem.*、1997年8月1日、272(31)

50

: 19176-86)の文献に記載される。

【0099】

4. 他の省略形は、データバンクに記載されるS・セレビスエ遺伝子に関する。

【0100】

5. 合成遺伝子について、RuBisCO会合(RbcX)に特異的なシャペロンと、一般的シャペロンGroES、GroEL1、及びGroEL2とをコードするシネコッカス・エロンガタス遺伝子は、独自の不均質なコドンバイアスがある酵母のために再コードした後、再合成され、pCC6301(市販)にクローニングした。

【0101】

6. 大腸菌シャペロンGroES及びGroELをバクテリアから増幅し、pSC-B-amp/kan(Stratagene社)にクローニングし、発現ベクターにおいて再コードすることなく会合した(実施例1を参照)。

【0102】

7. シネコッカス・エロンガタスRbcS、RbcL、RbcX、及びPRK配列は実施例1と実施例2とに記載した。

【0103】

8. シネコッカス・エロンガタスシャペロンをコードするcDNAの再コード配列は、配列表(配列番号9~11)に記載され、酵母の2分子を同時形質転換することで、予め線状化されたベクターpUC57に相同組換えにより挿入される。同様に、ORFを、以前の構成からPCRによって増幅し、ベクターpFPP56によって保持されるプロモータとターミネータとに相同である側部領域を生成する。このため、酵母株に対してPCR産生物と予め線状化されたベクターpFPP56とで同時形質転換することによって相同組換えによるクローニングが可能になり、表7に記載のカセットによって表8に記載の種々の発現ベクターを生成する。

【0104】

<3.2.合成RuBisCO複合体の酵素活性の評価>

CEN-PK3とCEN-PK4株の可溶性タンパク質の抽出のため、用いられるプラスミドの選択マーカに適した(ロイシン、ウラシル、及びトリプトファン非含有培地)市販のCSM培地(MP Biomedicals社)を含んで6.7g/l硫酸アンモニウム、20g/lグルコース、寒天用20g/l寒天で補完された、YNB(窒素源非含有酵母)培地において、細胞を、振動させながら周囲空気下30で成長させる。対数期終了の一代前に4で冷却することで、培養を停止する。培養物を遠心分離し、スフェロプラストを、高張性ソルビトール培地(1.2Mソルビトール)においてザイモリエース・サイトヘリカーゼ混合物で細胞壁の酵素消化をすることで調製する。スフェロプラストを、1mMのPMSF及びEDTA(プロテアーゼ阻害剤)の存在下で高張性ソルビトール培地において洗浄し、等張性培地(0.6Mソルビトール)において反復ピペティングと弱い音波処理とで破碎する。大きな破片を除くために低速(200gで5分間)で、そして中程度のサイズの破片とミトコンドリアとを収集するために中速(1500gで10分間)で遠心分離した後、上清を収集する。

【0105】

タンパク質抽出物における活性のテストを、2mMリブローズニリン酸(RiDP)と抽出物の0.05mg/ml全タンパク質との存在下で、50mMのTRIS/HCl(pH7.5)、60mMのNaHCO<sub>3</sub>、10mMのMgCl<sub>2</sub>においておこなう。種々の時間で60µlの反応混合物を取り出し、2µlのHCl(12.1M)を添加することで反応を停止し、試料を9300gで10分間遠心分離してHPLC/MSにより解析する(10mMのトリブチルアミンアセテート/アセトニトリル、pH6.0勾配を伴う逆相イオン対C18)。代謝物を負イオンエレクトロスプレー質量分析により検出し、基準化合物のものと比較したそのm/e比と溶出時間とに基づいて特定する。

【0106】

結果を図9に示す。図面は、横座標の種々の反応時間で得られた検出3-ホスホグリセ

10

20

30

40

50

ラートのモル数 ( 1 8 5 の m / e ) を縦座標において表す。

【 0 1 0 7 】

「カーボイースト ( c a r b o y e a s t ) 」エンジニアリングとして言及される完全エンジニアリング ( C E N - P K 3 の R b c S + R b c L + P R K + シャペロン R b c X と大腸菌の G r o E S と G r o E L ) と、非制限基質とについて、合成 R u B i s C O 酵素の触媒活性からもたらされる産生物量は、時間について直線的に増加するということが注目される。このように、エンジニアリングによって酵母に発現された R u B i s C O 複合体は機能的且つ安定的である。

【 0 1 0 8 】

R u B i s C O 複合体の折りたたみに特化したシャペロン R b c X と一般バクテリアのシャペロン G r o E S 、 G r o E L とのペアの会合は不可欠である ( 図 9 及び表 1 0 ) ことが明らかに見て取れる。

【 0 1 0 9 】

しかしながら、記載のテスト条件下において、S . エロンガタスからの特異的シャペロン R b c X と会合された、大腸菌からの一般的バクテリアのシャペロン ( G r o E S 及び G r o E L ) の組合せの同時発現は、すべての要素が同一の有機体である S . エロンガタスに由来する同様の会合よりも、S . エロンガタスから、R u B i s C O 複合体の機能性を再構築するためにさらに効果的である ( 表 1 0 、 1 及び 3 行 ) 。

【 0 1 1 0 】

表 1 0 において、インビトロにおける R u B i s C O 活性のテストを、グルコース上で成長させ且つ第 1 列に示されたエンジニアリングを含む C E N - P K 株の抽出物から、前述されたものと同様の手順に従っておこなった。室温で、2 m M リブローズニリン酸を含む 2 0 0 μ l の反応量における、酵母の可溶性抽出物からの 0 . 0 1 ~ 0 . 0 2 m g のタンパク質との 8 0 分のインキュベーションの間にテストをおこなう。活性を、形成 3 - ホスグリセラートの n m o l / 分 / 抽出物における全タンパク質の m g で示される。

【 0 1 1 1 】

【表 1 0 】

| 株                |  | A  | B  | C   |
|------------------|--|----|----|-----|
| CEN. PK 3        | R b c S / R b c L / R b c X / P R K / ( G r o E S / G r o E L ) 大腸菌          | 20 | 13 | 20  |
| CEN. PK 2        | R b c S / R b c L / R b c X / ( G r o E S / G r o E L ) 大腸菌                  | ND | 5  | 2.5 |
| CEN. PK 1<br>0 1 | R b c S / R b c L / R b c X / P R K / ( G r o E S / G r o E L 2 ) S . エロンガタス | ND | ND | 1.5 |

【 0 1 1 2 】

< 3 . 3 . 合成 R u B i s C O は  $^{13}C$  標識  $CO_2$  を取り込んで、反応産生物に組込む >

上述 ( 図 4 ) された同位体取込み実験は、標識 3 - グリセロリン酸の定量化によって表され、これは、 $^{13}C$  標識ピカーボネート分子から炭素を固定することによりリブローズニリン酸から標識 3 - グリセロリン酸を産生する R u B i s C O 複合体の能力を示す。

【 0 1 1 3 】

< 3 . 4 . R u B i s C O 活性は炭酸脱水酵素の存在によって増加する >  
炭酸脱水酵素は、溶媒和二酸化炭素へのピカーボネートの相互変換を触媒することによって既知の反応補助因子である。この実施例では、そうした反応の予期される挙動を確認する。興味深いことに、インビトロにおける活性テストは、上述された R u B i s C O 活

性テストの反応量に  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  の最終濃度のウシ炭酸脱水酵素を添加することで、RuBisCO複合体の能力を3～4倍増加させることを示す(図10)。複合体周囲の $\text{CO}_2$ 濃度の最適化により、再構成された活性の最小値を示す前述のテストで観察された活性が顕著に増加されることが提示される。その他の因子もインビボにおいて寄与し得り、故に測定値は単なる最小値である。

【0114】

[実施例4：エンジニアリングを含む株の表現型特性]

<4.1. 嫌気培養はエタノール産生の増加を示す>

前培養を化学的合成培地において調製した。 $1\text{ml}$ のストック管(-80)を解凍後、これを用いて、( $20\text{g}/\text{l}$ グルコースで補完された $0.1\text{g}/\text{l}$ ギ酸を含有する) $10\text{ml}$ の培地を含むペニシリンボトル( $100\text{ml}$ )に植え付けをおこない、18時間30で、 $120\text{rpm}$ においてインキュベートした。PRK遺伝子の存在下で見受けられる毒性の問題を避けるため、前培養物を、嫌気状態において(事前に窒素を流したボトル)、ドキシサイクリン( $2\mu/\text{ml}$ )の存在下で調製した。

10

【0115】

そして、前培養物を生理食塩水( $\text{NaCl}$ 、 $9\text{g}/\text{l}$ )で3回洗浄し(遠心分離、再懸濁、15秒間の攪拌)、細胞のペレットをドキシサイクリン非含有培地に再懸濁した。

【0116】

前培養物に由来するこれらの細胞を、 $0.05$ (又は $0.1\text{g}/\text{l}$ )の初期光学密度を得るために植え付けた。開始培養量は、好気状態において $50\text{ml}$ ( $250\text{ml}$ のバフフル付きエルレンマイヤーフラスコ)又は嫌気状態において $35\text{ml}$ ( $100\text{ml}$ ペニシリンボトル)であった。

20

【0117】

すべてのグルコースが消費されるか又はエタノール産生が停止した後、培養を停止した。

【0118】

嫌気培養は、酵母におけるその影響を評価するために、完全カーボイーストエンジニアリング又は単離要素を含む株を表現型的に特徴づけることを可能にした。

【0119】

図11と表11とは、グルコース上の嫌気培養時に、完全カーボイーストエンジニアリング(RuBisCO\_\_PRK\_\_シャペロン)又は( $\text{RbcS} + \text{RbcL} + \text{PRK} + \text{RbcX} + (\text{GroES} + \text{GroEL})$ 大腸菌)が、カルビン回路を組み込まない同一株( $\text{RbcX} + (\text{GroES} + \text{GroEL})$ 大腸菌)と比較して、エタノール産生の向上をもたらしたことを示す。バイオマス産生量の損失に対し( $0.035$ 対 $0.051\text{g}/\text{g}$ )、消費グルコースから産生されたエタノールの産生量は7%増加し( $0.49\text{g}/\text{g}$ 対 $0.46\text{g}/\text{g}$ )、エタノール産生に対する炭素の明らかな再分配を示す。

30

【0120】

表11は、嫌気培養時のエタノールとバイオマスとの産生量(PRKはホスホリプロキナーゼである)。

【0121】

40

【表 1 1】

| 遺伝子型             |     |       | 産生量   |       |
|------------------|-----|-------|-------|-------|
|                  |     |       | バイオマス | エタノール |
| R u B i s C<br>O | PRK | シャペロン | g/g   | g/g   |
| -                | -   | +     | 0.051 | 0.46  |
| +                | +   | +     | 0.035 | 0.49  |

10

## 【 0 1 2 2 】

< 4 . 2 . インピボにおける R u B i s C O 複合体機能の研究 >

## 実験プロトコル

前培養を化学的合成培地において調製した。1 ml のストック管 ( - 8 0 ) を解凍後、これを用いて、( 2 0 g / l グルコースで補完された 0 . 1 g / l ギ酸を含有する ) 1 0 m l の培地を含むペニシリンボトル ( 1 0 0 m l ) に植え付けをおこない、3 0 で 1 8 時間、1 2 0 r p m においてインキュベートした。P R K 遺伝子の存在下で見受けられる毒性の問題を避けるため、前培養物を、嫌気状態において ( 事前に窒素を流したボトル ) 、ドキシサイクリン ( 2 μ / m l ) の存在下で調製した。

20

## 【 0 1 2 3 】

そして、前培養物を生理食塩水 ( N a C l 、 9 g / l ) で 3 回洗浄し ( 遠心分離、再懸濁、1 5 秒間の攪拌 ) 、細胞のペレットをドキシサイクリン非含有培地に再懸濁した。

## 【 0 1 2 4 】

前培養物に由来するこれらの細胞を、0 . 5 g / l ギ酸と 0 . 5 g / l グルコースとを含有する培地に植え付けた。開始培養量は 2 5 m l であった ( 2 5 0 m l のバツフル付きエルレンマイヤーフラスコ ) 。

## 【 0 1 2 5 】

非標識グルコースで補完又は非補完の <sup>1 3</sup> C 標識又は非標識ホルマートにおいて、種々の酵母株を成長させる。ホルマートからの炭素同位体の取込みを示すため、安定的な細胞代謝物の同位体成分、エルゴステロールを解析する。細胞培養物を 1 0 0 0 0 r p m で 5 分間遠心分離して、ペレットを 7 m l のクロロホルム / メタノール ( 2 : 1 ) 再懸濁し、1 0 0 0 0 r p m で 5 分間遠心分離した。上清を 2 m l の T E で補完し、1 0 0 0 0 r p m で 5 分間の遠心分離後にクロロホルム相を収集し、窒素流のもとで蒸発させた。残渣を 5 0 0 μ l のメタノールに再懸濁する。試料を、A m i n e x H P X 8 7 H <sup>+</sup> ( 3 0 0 m m x 7 . 8 m m ) カラムを備えたクロマトグラフ ( W a t e r A l l i a n c e 2 6 9 0 ) において高速液体クロマトグラフィ ( H P L C ) により解析する。

30

## 【 0 1 2 6 】

## 結果

酵母において細胞の外部から内部への C O <sub>2</sub> 輸送は自然なプロセスではなく、S . エロソングタスにおける特殊化されたアクアポリンなどのトランスポータの同時発現によりこれをおこなうことが可能な補足的エンジニアリングが待たれることから、酵母デヒドロゲナーゼによって二酸化炭素へと酸化可能であるギ酸が、細胞内二酸化炭素源として用いられた。この二酸化炭素は、R u B i s C O 複合体を介して有機材料に再取込みされる可能性がある。つまり、<sup>1 3</sup> C 標識ホルマートの存在下において、バイオマスに同位体を取込むことが期待される。しかし、酵母に他の自然なアナプレロティック反応 ( C O <sub>2</sub> を固定可能 ) があることから、これらの条件下において、R u B i s C O 複合体の非存在下においてすら <sup>1 3</sup> C 取込みから顕著なバックグラウンドノイズ ( 標識の 3 ~ 4 % ) が観察され、観察される同位体取込みにおける R u B i s C O の寄与がはっきりと分からない理由が説

40

50

明される。代謝経路の解析は、この第1の実験に使用された条件がインビボにおける RuBisCO 活性の同位体測定に実際には適さないことを示す。しかしながら、炭素源としてホルマートではなくグルコースを用いて培地に添加されるときに標識バイカーボネートのインビボにおける取込みがなかったことは、実際には CO<sub>2</sub> (又はバイカーボネート/カーボネート) 輸送の問題を理由とするものであり、代謝の問題のためではないということが、この実験により確認できたということが言及される必要がある。

#### 【0127】

故に、ギ酸消費の動態や、エンジニアリングあり又はなしの株の生存性維持などのコンセプトを示す他の証拠が言及される。唯一の炭素源としてギ酸を使用することについて、少なくともホルマートデヒドロゲナーゼの補足的エンジニアリングのない場合においては、エネルギー源が不十分であるため株は成長できないということに触れておく必要がある。生存性の維持のみがこれらの条件において観察可能である。しかしながら、このエネルギーバランスは少量のグルコースを添加することで改善可能である。

10

#### 【0128】

炭素源としてのホルマートの使用

ギ酸における成長を評価するため、ギ酸 (0.45 g/l) とグルコース (0.55 g/l) とにおける好気培養を用いて、完全カーボイーストエンジニアリング又は単離要素を含む株を表現的に特性化した。ギ酸は酵母において CO<sub>2</sub> に代謝されることができ、ホルマートデヒドロゲナーゼによってパワーが減少 (H<sub>2</sub>) するが、酵母は唯一の炭素源としてのギ酸において成長することができない。

20

#### 【0129】

図12は、好気培養時に、RuBisCOの基質を産生できない PRK (CEN.PK2: RbcS + RbcL + RbcX + (GroES + GroEL) 大腸菌) を欠失した同一株と比較して、完全カーボイーストエンジニアリング (CEN.PK3: RbcS + RbcL + PRK + RbcX + (GroES + GroEL) 大腸菌) が、ギ酸の完全消費を導いたということを示す。同時に、バイオマス産生の向上が観察されるが、グルコース消費は同様なままである。このように、完全エンジニアリングを有する株はギ酸を形質転換するより優れた能力を有する。

#### 【0130】

< 4.3. 酵母における RuBisCO 依存カルビン回路の導入は中心代謝における生合成経路の均衡をインビボにおいて変える >

30

この研究の課題は、RuBisCO (及びシャペロン) とホスホリプロキナーゼとの機能的同時発現による、酵母におけるカルビン回路の導入が、インビボにおけるエンジニアリングの機能性と合致する方向に内部代謝プロファイルを大きく改変するというを示すことである。この代謝プロファイルは、完全又は部分のみのエンジニアリングを保持する株の培養と、HPLC (逆相イオン対クロマトグラフィ) に連結された質量分析によるリン酸メタボロームの比較分析との後に評価された。

#### 【0131】

テスト株は、完全エンジニアリング含有株 (CEN.PK3) とその PRK 欠失株 (CEN.PK2) である。用いられるプラスミドの選択マーカに適した (ロイシン、ウラシル、及びトリプトファン非含有培地) 市販の CSM 培地 (MP Biomedicals 社) を含んで 6.7 g/l 硫酸アンモニウム、20 g/l グルコース、寒天用 20 g/l 寒天で補完された YNB (窒素源非含有酵母) 培地において、細胞を、振動させながら周囲空気下 30 °C で成長させる。対数期終了の一世代前に 4 °C で冷却することで、培養を停止する。5 ml の 80% (v/v) メタノール/水 + 10 mM の AcNH<sub>4</sub> でクエンチした、1 ml の対数増殖期細胞由来のタンパク質抽出物において、解析をおこなう。遠心分離後、ペレットを -80 °C で保管する。<sup>13</sup>C で標識した純代謝物標準物質の混合物 150 µl が直ちに添加された、5 ml の 75% (v/v) エタノール/水、10 mM AcNH<sub>4</sub> にペレットを懸濁することによって抽出をおこなう (IDMS 法)。80 °C で 5 分のインキュベーションと液体窒素浴における急冷後に、遠心分離を用いて破片を取り除く。

40

50

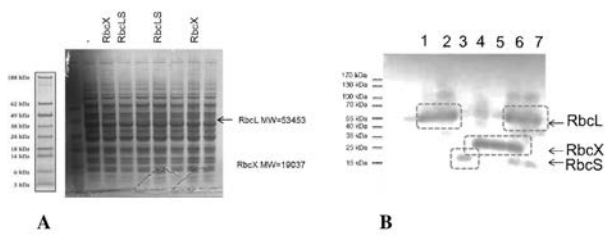
【 0 1 3 2 】

絶対的定量化のため I D M S 法を用いる。この解析において、リブローズ - 1 , 5 - ピスリン酸の絶対的定量化は、適切な標準物質が利用不可のため得られなかったが、酵母におけるこの化合物の濃度を推測する（おそらくは低く推測する）ことが可能な非同位体の外部キャリブレーションによって置き換えられた。

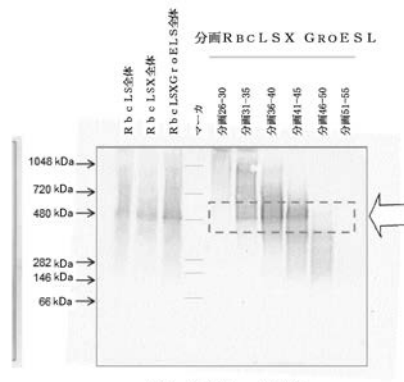
【 0 1 3 3 】

図 1 3 に示される結果は、カルビン回路の再構築が考えられる細胞内合成経路の再均衡化を示唆し、これは図 1 4 の代謝シミュレーションにより示される。

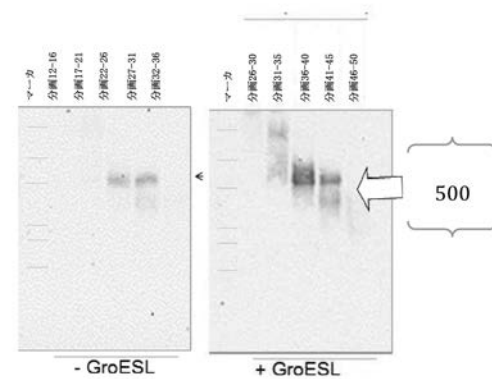
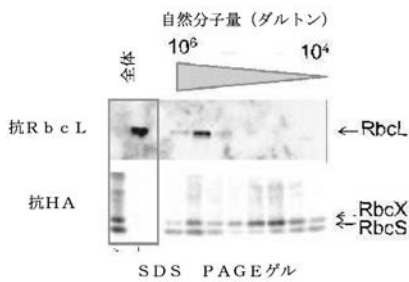
【 図 1 】



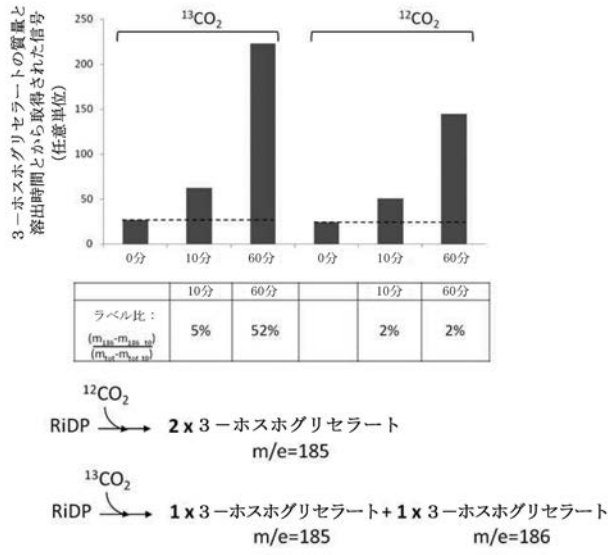
【 図 3 】



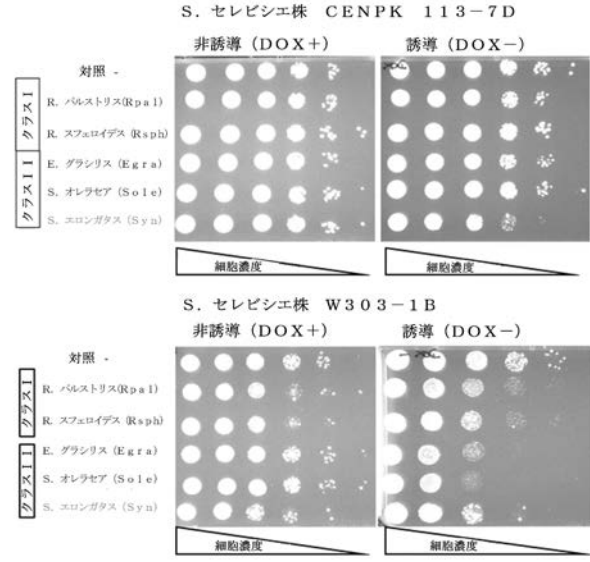
【 図 2 】



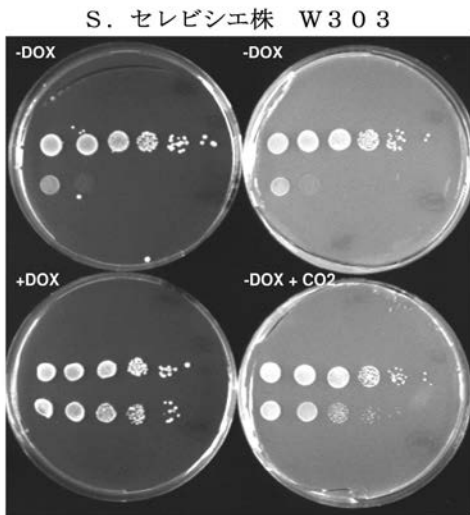
【 図 4 】



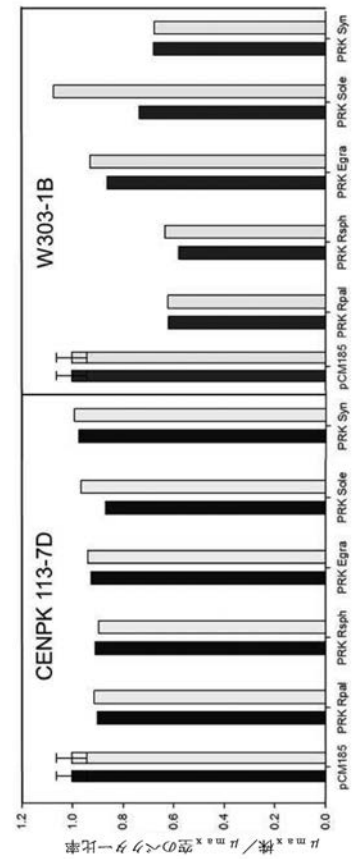
【 図 5 】



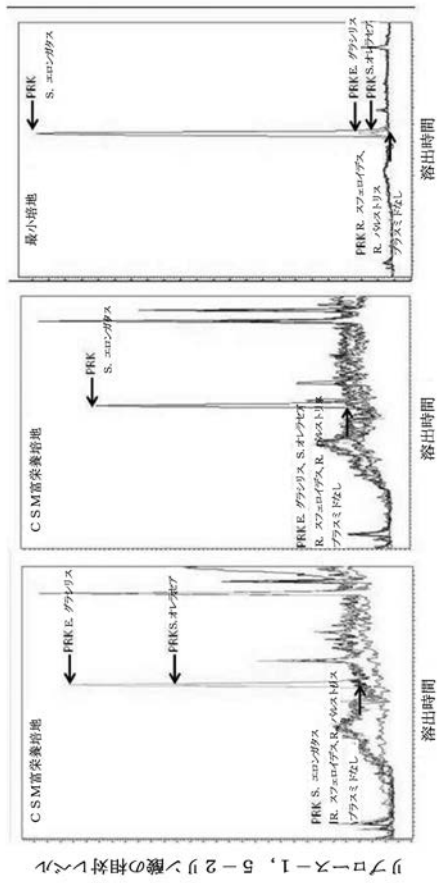
【 図 6 】



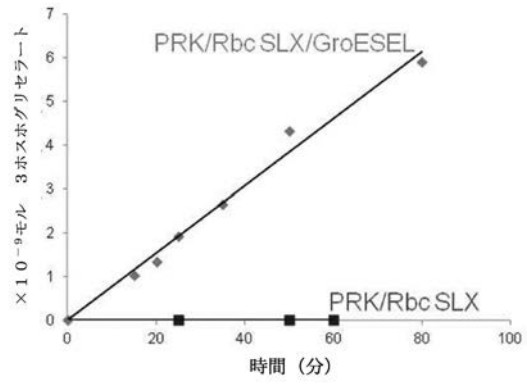
【 図 7 】



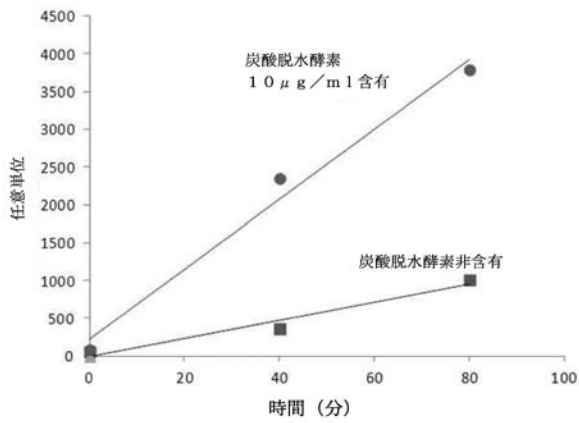
【 図 8 】



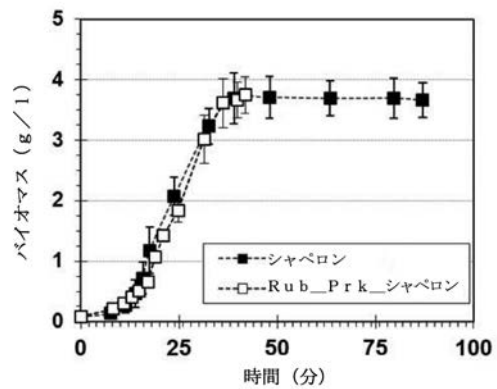
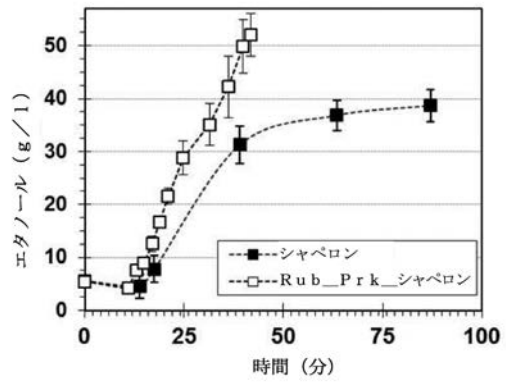
【 図 9 】



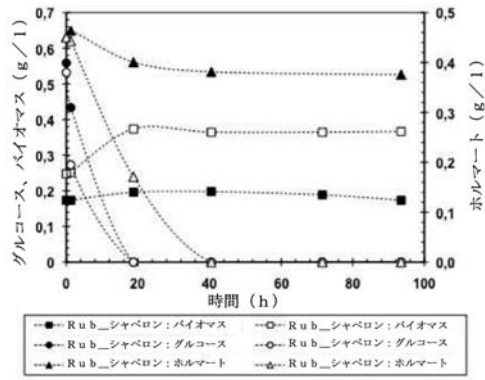
【 図 10 】



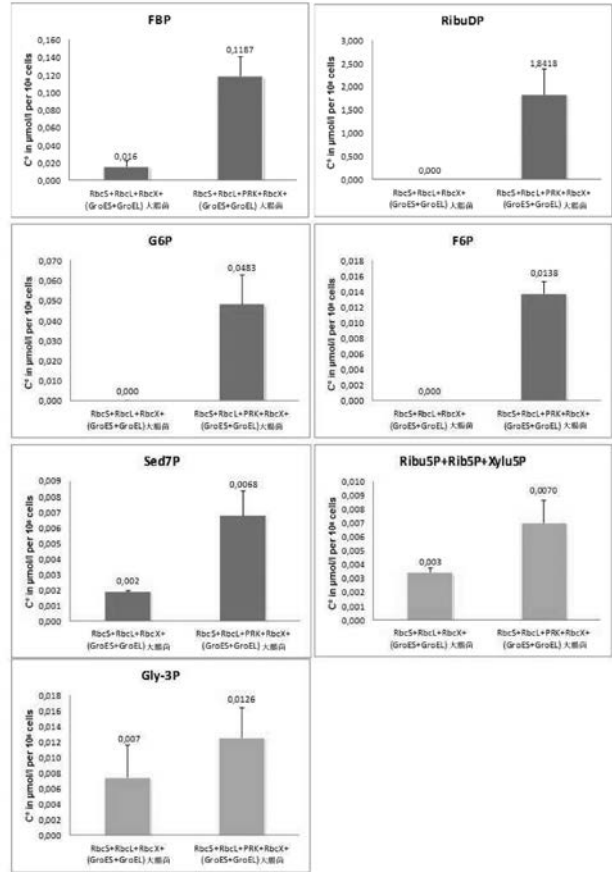
【 図 11 】



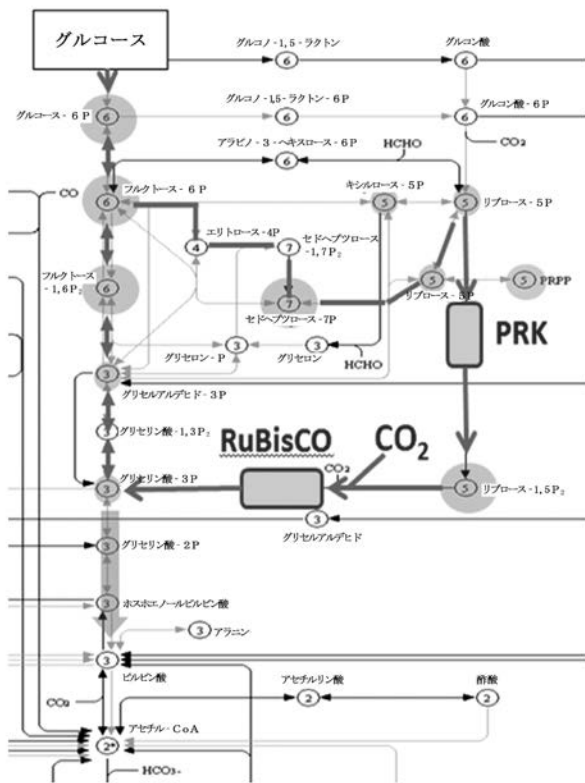
【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【配列表】

2017502682000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

|  |  |  |
|--|--|--|
|  |  | International application No<br>PCT/IB2015/050346  |
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER<br>INV. C12N1/16 C12N9/88 C12N9/12 C12P7/06 C12N15/81<br>ADD.  |  |  |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC  |  |  |
| B. FIELDS SEARCHED<br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>C12N C12P   |  |  |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  |  |  |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search  |  |  |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT   |  |  |
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.  |
| Y  | WO 2008/028019 A1 (BATTELLE MEMORIAL INSTITUTE [US]; DAI ZIYU [US]; LASURE LINDA L [US];) 6 March 2008 (2008-03-06) page 14 - page 22; claims 21-23<br>-----   | 1-13   |
| Y  | CHARI A ET AL: "Cellular strategies for the assembly of molecular machines", TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES, ELSEVIER, HAYWARDS, GB, vol. 35, no. 12, December 2010 (2010-12), pages 676-683, XP027510134, ISSN: 0968-0004, DOI: 10.1016/J.TIBS.2010.07.006 [retrieved on 2010-08-19] page 678 - page 679<br>-----<br>-/-- | 1-10   |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.  |  |  |
| * Special categories of cited documents :  |  |  |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed |  | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<br>"&" document member of the same patent family |
| Date of the actual completion of the international search<br><br>7 May 2015  |  | Date of mailing of the international search report<br><br>18/05/2015   |
| Name and mailing address of the ISA/<br>European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040,<br>Fax: (+31-70) 340-3016   |  | Authorized officer<br><br>Deleu, Laurent   |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

|   |
|---|
| International application No<br>PCT/IB2015/050346 |
|---|

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |   |                       |
|--|---|-----------------------|
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
| Y  | <p>ANDREAS BRACHER ET AL: "Crystal structure of a chaperone-bound assembly intermediate of form I Rubisco",<br/>NATURE STRUCTURAL &amp; MOLECULAR BIOLOGY,<br/>vol. 18, no. 8, 17 July 2011 (2011-07-17),<br/>pages 875-880, XP055139803,<br/>ISSN: 1545-9993, DOI: 10.1038/nsmb.2090<br/>figure 6</p>  | 1,3,7-10              |
| Y  | <p>-----</p> <p>CUIMIN LIU ET AL: "Coupled chaperone action in folding and assembly of hexadecameric Rubisco",<br/>NATURE,<br/>vol. 463, no. 7278,<br/>14 January 2010 (2010-01-14), pages<br/>197-202, XP055139806,<br/>ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature08651<br/>cited in the application<br/>page 201</p>  | 1,3,7-10              |
| Y  | <p>-----</p> <p>VÍCTOR GUADALUPE-MEDINA ET AL: "Carbon dioxide fixation by Calvin-Cycle enzymes improves ethanol yield in yeast",<br/>BIOTECHNOLOGY FOR BIOFUELS, BIOMED CENTRAL LTD, GB,<br/>vol. 6, no. 1, 29 August 2013 (2013-08-29)<br/>, page 125, XP021161929,<br/>ISSN: 1754-6834, DOI:<br/>10.1186/1754-6834-6-125<br/>cited in the application<br/>page 4 - page 6</p>                          | 2,4,<br>11-13         |
| Y  | <p>-----</p> <p>Hung-Chun Chang: "Mechanisms of De Novo Multi-domain Protein Folding in Bacteria and Eukaryotes",<br/><br/>2007, XP055187947,<br/>Retrieved from the Internet:<br/>URL:<a href="http://edoc.ub.uni-muenchen.de/6520/1/Chang_Hung-Chun.pdf">http://edoc.ub.uni-muenchen.de/6520/1/Chang_Hung-Chun.pdf</a><br/>[retrieved on 2015-05-07]<br/>page 100 - page 103</p>                        | 2,4                   |
| A  | <p>-----</p> <p>PIERRE GOLOUBINOFF ET AL: "GroE heat-shock proteins promote assembly of foreign prokaryotic ribulose biphosphate carboxylase oligomers in Escherichia coli",<br/>NATURE,<br/>vol. 337, no. 6202,<br/>5 January 1989 (1989-01-05), pages 44-47,<br/>XP055187918,<br/>ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/337044a0<br/>page 45 - page 47</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p> | 2,4                   |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

|   |
|---|
| International application No<br>PCT/IB2015/050346 |
|---|

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |   |                       |
|--|---|-----------------------|
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
| A  | WO 2013/066848 A1 (GINKGO BIOWORKS INC [US]; FISCHER CURT R [US]; CHE AUSTIN J [US]; SHET) 10 May 2013 (2013-05-10)<br>paragraph [0100] - paragraph [0101]<br>paragraph [0116]<br>paragraph [0133]<br>----- | 1-8                   |
| A  | WO 2008/135206 A2 (MAX PLANCK GESELLSCHAFT [DE]; HAYER-HARTL MANAJIT [DE]; HARTL ULRICH []) 13 November 2008 (2008-11-13)<br>claim 1; figure 7; example 1<br>-----  | 1-4                   |
| A  | WO 2009/036095 A1 (Joule BIOTECHNOLOGIES INC [US]; DEVROE ERIC [US]; BERRY DAVID [US]; AF) 19 March 2009 (2009-03-19)<br>page 31<br>page 59; claims 1-7,20<br>-----   | 1                     |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2015/050346

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s)                                  | Publication date                       |
|--|------------------|--|--|
| WO 2008028019 A1                       | 06-03-2008       | US 2008085341 A1<br>WO 2008028019 A1                     | 10-04-2008<br>06-03-2008               |
| WO 2013066848 A1                       | 10-05-2013       | US 2012064622 A1<br>US 2015037853 A1<br>WO 2013066848 A1 | 15-03-2012<br>05-02-2015<br>10-05-2013 |
| WO 2008135206 A2                       | 13-11-2008       | EP 1988168 A1<br>WO 2008135206 A2                        | 05-11-2008<br>13-11-2008               |
| WO 2009036095 A1                       | 19-03-2009       | US 2009191599 A1<br>WO 2009036095 A1                     | 30-07-2009<br>19-03-2009               |

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/IB2015/050346

| <b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b>  |   |   |
|--|---|---|
| INV. C12N1/16  | C12N9/88  | C12N9/12  |
| ADD.   |   | C12P7/06  |
|  |   | C12N15/81   |
| Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB  |   |   |
| <b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b>   |   |   |
| Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  |   |   |
| C12N C12P  |   |   |
| Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche  |   |   |
| Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)  |   |   |
| EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search  |   |   |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>  |   |   |
| Catégorie*   | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents  | no. des revendications visées   |
| Y  | WO 2008/028019 A1 (BATTELLE MEMORIAL INSTITUTE [US]; DAI ZIYU [US]; LASURE LINDA L [US];) 6 mars 2008 (2008-03-06) page 14 - page 22; revendications 21-23<br>-----   | 1-13  |
| Y  | CHARI A ET AL: "Cellular strategies for the assembly of molecular machines", TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES, ELSEVIER, HAYWARDS, GB, vol. 35, no. 12, décembre 2010 (2010-12), pages 676-683, XP027510134, ISSN: 0968-0004, DOI: 10.1016/J.TIBS.2010.07.006 [extrait le 2010-08-19] page 678 - page 679<br>-----<br>-/- | 1-10  |
| <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe  |   |   |
| * Catégories spéciales de documents cités:   |   |   |
| *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent<br>*E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date<br>*L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)<br>*O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens<br>*P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée |   | *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention<br>*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément<br>*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier<br>*Z* document qui fait partie de la même famille de brevets |
| Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  |   | Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  |
| 7 mai 2015   |   | 18/05/2015  |
| Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale<br>Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentiaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040<br>Fax: (+31-70) 340-3016  |   | Fonctionnaire autorisé<br><br>Deleu, Laurent  |

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/IB2015/050346

| C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS |   |                               |
|---|---|-------------------------------|
| Catégorie*                                      | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents  | no. des revendications visées |
| Y   | <p>ANDREAS BRACHER ET AL: "Crystal structure of a chaperone-bound assembly intermediate of form I Rubisco",<br/>NATURE STRUCTURAL &amp; MOLECULAR BIOLOGY,<br/>vol. 18, no. 8,<br/>17 juillet 2011 (2011-07-17), pages<br/>875-880, XP055139803,<br/>ISSN: 1545-9993, DOI: 10.1038/nsmb.2090<br/>figure 6</p> <p>-----</p>  | 1,3,7-10                      |
| Y   | <p>CUIMIN LIU ET AL: "Coupled chaperone action in folding and assembly of hexadameric Rubisco",<br/>NATURE,<br/>vol. 463, no. 7278,<br/>14 janvier 2010 (2010-01-14), pages<br/>197-202, XP055139806,<br/>ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature08651<br/>cité dans la demande<br/>page 201</p> <p>-----</p>  | 1,3,7-10                      |
| Y   | <p>VÍCTOR GUADALUPE-MEDINA ET AL: "Carbon dioxide fixation by Calvin-Cycle enzymes improves ethanol yield in yeast",<br/>BIOTECHNOLOGY FOR BIOFUELS, BIOMED CENTRAL LTD, GB,<br/>vol. 6, no. 1, 29 août 2013 (2013-08-29),<br/>page 125, XP021161929,<br/>ISSN: 1754-6834, DOI:<br/>10.1186/1754-6834-6-125<br/>cité dans la demande<br/>page 4 - page 6</p> <p>-----</p> | 2,4,<br>11-13                 |
| Y   | <p>Hung-Chun Chang: "Mechanisms of De Novo Multi-domain Protein Folding in Bacteria and Eukaryotes",<br/>2007, XP055187947,<br/>Extrait de l'Internet:<br/>URL:<a href="http://edoc.ub.uni-muenchen.de/6520/1/Chang_Hung-Chun.pdf">http://edoc.ub.uni-muenchen.de/6520/1/Chang_Hung-Chun.pdf</a><br/>[extrait le 2015-05-07]<br/>page 100 - page 103</p> <p>-----</p>     | 2,4                           |
| A   | <p>PIERRE GOLOUBINOFF ET AL: "GroE heat-shock proteins promote assembly of foreign prokaryotic ribulose biphosphate carboxylase oligomers in Escherichia coli",<br/>NATURE,<br/>vol. 337, no. 6202,<br/>5 janvier 1989 (1989-01-05), pages 44-47,<br/>XP055187918,<br/>ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/337044a0<br/>page 45 - page 47</p> <p>-----</p>                      | 2,4                           |

-/--

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/IB2015/050346

| C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS |   |                               |
|---|---|-------------------------------|
| Catégorie*                                      | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents  | no. des revendications visées |
| A   | WO 2013/066848 A1 (GINKGO BIOWORKS INC [US]; FISCHER CURT R [US]; CHE AUSTIN J [US]; SHET) 10 mai 2013 (2013-05-10)<br>alinéa [0100] - alinéa [0101]<br>alinéa [0116]<br>alinéa [0133]<br>----- | 1-8                           |
| A   | WO 2008/135206 A2 (MAX PLANCK GESELLSCHAFT [DE]; HAYER-HARTL MANAJIT [DE]; HARTL ULRICH []) 13 novembre 2008 (2008-11-13)<br>revendication 1; figure 7; exemple 1<br>-----                      | 1-4                           |
| A   | WO 2009/036095 A1 (Joule BIOTECHNOLOGIES INC [US]; DEVROE ERIC [US]; BERRY DAVID [US]; AF) 19 mars 2009 (2009-03-19)<br>page 31<br>page 59; revendications 1-7,20<br>-----                      | 1                             |

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/IB2015/050346

| Document brevet cité<br>au rapport de recherche | Date de<br>publication | Membre(s) de la<br>famille de brevet(s)                  | Date de<br>publication                 |
|---|------------------------|--|--|
| WO 2008028019 A1                                | 06-03-2008             | US 2008085341 A1<br>WO 2008028019 A1                     | 10-04-2008<br>06-03-2008               |
| WO 2013066848 A1                                | 10-05-2013             | US 2012064622 A1<br>US 2015037853 A1<br>WO 2013066848 A1 | 15-03-2012<br>05-02-2015<br>10-05-2013 |
| WO 2008135206 A2                                | 13-11-2008             | EP 1988168 A1<br>WO 2008135206 A2                        | 05-11-2008<br>13-11-2008               |
| WO 2009036095 A1                                | 19-03-2009             | US 2009191599 A1<br>WO 2009036095 A1                     | 30-07-2009<br>19-03-2009               |

## フロントページの続き

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

(71)出願人 508242067  
 アンスティテュ・ナショナル・デ・シヤンス・アブリケ・ドゥ・トゥールーズ  
 INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE  
 TOULOUSE  
 フランス国、エフ - 3 1 0 7 7 トールーズ・セデックス 4、アヴニュー・ドゥ・ランゲイユ  
 1 3 5

(71)出願人 502205846  
 サントル ナショナル ドゥ ラ ルシェルシュ シアンティフィク  
 フランス国 パリ セデックス 1 6 リュ ミシェル - アンジュ 3

(74)代理人 100121728  
 弁理士 井関 勝守

(74)代理人 100165803  
 弁理士 金子 修平

(72)発明者 ボンボン, デニス  
 フランス国 エフ - 3 1 3 2 0 ペシャブー リュ・アンリ・リュセル 5

(72)発明者 パーク, フェデリーク  
 フランス国 エフ - 6 3 0 0 0 クレルモン フェラン クォ・サブロン 4 3

(72)発明者 ルサージュ, ジュリー  
 フランス国 エフ - 3 1 4 5 0 ベルブロー アンパッス・デュ・ベルジエ 1 1

(72)発明者 ギユエ, ステファン  
 フランス国 エフ - 3 1 2 9 0 ヴァレーグ シェマン・デ・ロー・ヴィヴ 1 0

(72)発明者 ボンノ, フロランス  
 フランス国 エフ - 8 1 7 1 0 サイウー リュ・デ・オール 4 ビス

(72)発明者 マーク, ジリアン  
 フランス国 エフ - 3 1 2 0 0 トールーズ リュ・デ・ロワイヤン アパルトマン 5 4 ,  
 2

(72)発明者 ゴレット, ナタリー  
 フランス国 エフ - 3 1 2 9 0 ヴァレーグ シェマン・デ・ロー・ヴィヴ 1 0

(72)発明者 ビドー, カリヌヌ  
 フランス国 エフ - 3 1 8 1 0 レ・ヴェルネ リュ・デ・ラ・マルティニーク 3 6

(72)発明者 ボトネ, クリステル  
 フランス国 エフ - 3 1 8 6 0 パン ジュスタレ アンパッス・ペデノー 6 ビス

Fターム(参考) 4B065 AA01Y AA72X AB01 AC14 BA01 CA28 CA29