

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2013 年 12 月 5 日(05.12.2013)



(10) 国際公開番号

WO 2013/179722 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C12N 9/88 (2006.01)
C08F 36/08 (2006.01) C12P 5/02 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/056866
- (22) 国際出願日: 2013 年 3 月 12 日(12.03.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2012-123724 2012 年 5 月 30 日(30.05.2012) JP
特願 2012-123728 2012 年 5 月 30 日(30.05.2012) JP
- (71) 出願人: 株式会社ブリヂストン(BRIDGESTONE CORPORATION) [JP/JP]; 〒1048340 東京都中央区京橋一丁目 10 番 1 号 Tokyo (JP). 味の素株式会社(AJINOMOTO CO., INC.) [JP/JP]; 〒1048315 東京都中央区京橋一丁目 15 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 林 泰行(HAYASHI, Yasuyuki); 〒1878531 東京都小平市小川東町 3-1-1 株式会社ブリヂストン 技術センター内 Tokyo (JP). 原田 美奈子(HARADA, Minako); 〒1878531 東京都小平市小川東町 3-1-1 株式会社ブリヂストン 技術センター内 Tokyo (JP). ▲高▼岡 紗彩(TAKAOKA, Saaya); 〒1878531 東京都小平市小川東町 3-1-1 株式会社ブリヂストン 技術センター内 Tokyo (JP). 福島 靖王(FUKUSHIMA, Yasuo); 〒1878531 東京都小平市小川東町 3-1-1 株式会社ブリヂストン 技術センター内 Tokyo (JP). 横山 敬一(YOKOYAMA, Keiichi); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 西尾 陽介(NISHIO, Yosuke); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 田島 義教(TAJIMA, Yoshinori); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1-1 味の素株式

会社内 Kanagawa (JP). 三原 洋子(MIHARA, Yoko); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 中田 國夫(NAKATA, Kunio); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 酒井 宏明, 外(SAKAI, Hiroaki et al.); 〒1006020 東京都千代田区霞が関三丁目 2 番 5 号 霞が関ビルディング 酒井国際特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: ISOPRENE SYNTHASE AND POLYNUCLEOTIDE ENCODING SAME, AND METHOD FOR PRODUCING ISOPRENE MONOMER

(54) 発明の名称: イソプレシンターゼおよびそれをコードするポリヌクレオチド、ならびにイソプレンモノマーの製造方法

(57) Abstract: The invention provides a useful means for establishing an excellent isoprene monomer production system. Specifically, the invention provides polynucleotides and the like of (a), (b), or (c) below: (a) polynucleotide containing (i) a base sequence represented by SEQ ID NO: 1 or (ii) a base sequence comprising nucleotide residue numbers 133-1785 in the base sequence represented by SEQ ID NO: 1; (b) polynucleotide containing a base sequence having 90% or greater identity with the base sequences (i) or (ii) above, and encoding a protein having isoprene synthase activity; or (c) a polynucleotide that hybridizes with a polynucleotide comprising a base sequence complementary to the base sequences (i) or (ii) above, under stringent conditions, and encodes a protein having isoprene synthase activity.

(57) 要約: 本発明は、優れたイソプレンモノマー生産系の確立に有用な手段を提供する。具体的には、本発明は、以下 (a)、(b) または (c) のポリヌクレオチドなどを提供する: (a) (i) 配列番号 1 で表される塩基配列、もしくは (ii) 配列番号 1 で表される塩基配列中の 133~1785 番目のヌクレオチド残基からなる塩基配列を含むポリヌクレオチド; (b) 前記 (i) もしくは (ii) の塩基配列と 90% 以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつイソプレシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド; または (c) 前記 (i) もしくは (ii) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつイソプレシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。



WO 2013/179722 A1

明 細 書

発明の名称：

イソプレンシンターゼおよびそれをコードするポリヌクレオチド、ならびにイソプレンモノマーの製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、イソプレンシンターゼおよびそれをコードするポリヌクレオチドなどに関する。

背景技術

[0002] タイヤ業界及びゴム工業界において、天然ゴムは非常に重要な原材料である。新興国を中心とするモータリゼーションで今後需要が拡大していく中で、森林伐採規制やパームとの競合で農園拡大は容易でないことから天然ゴムの収量増加は見込みにくく、需給バランスはタイトになっていくことが予想される。天然ゴムに代わる材料として、合成ポリイソプレンがあるが、原料モノマー（イソプレン（2-メチルー1，3-ブタジエン））は、主にナフサのクラッキング解により得られたC5留分から抽出することで得られる。しかし近年、クラッカーのフィードのライト化に伴い、イソプレンの生産量は減少傾向にあり、供給が懸念されている。また、近年では石油価格の変動の影響も強く受けることから、イソプレンモノマーの安定した確保のために、非石油資源由来でイソプレンを安価に生産する系の確立が要望されている。

[0003] このような要望に対して、単離された葛又はポプラ由来のイソプレンシンターゼ遺伝子及びこれらの変異体を発酵生産用の菌に組み込むことにより得られる形質転換体を用いて、イソプレンモノマーを生産する方法が開示されている（特許文献1および2参照）。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特表2011-505841号公報

特許文献2：特表2011-518564号公報

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Kesselmeier J. ら *Journal of Atmospheric Chemistry*、第33巻、第23-88頁、1999

非特許文献2：Monson R. K. ら *Plant Physiology*、第98巻、第1175-1180頁、1992年

非特許文献3：Kuzma J. ら *Plant Physiology*、第101巻、第435-440頁、1993年

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] しかしながら、特許文献1および2に記載のイソプレンスンターゼの有する酵素活性は、低く、これらのイソプレンスンターゼ遺伝子を用いても、生産性の高いイソプレンモノマーを生産するという点では未だ改良の余地があった。

[0007] 本発明は上記事情に鑑みてなされたものであり、優れたイソプレンモノマー生産系の確立に有用な手段を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究した結果、ムクナ (*Mucuna pruriens*) 由来のイソプレンスンターゼが、イソプレンモノマー生産能に優れることを見出し、本願発明を完成するに至った。

[0009] すなわち、本願発明は、以下のとおりである。

〔1〕 以下 (a)、(b) または (c) のポリヌクレオチド：

(a) (i) 配列番号1で表される塩基配列、もしくは (ii) 配列番号1で表される塩基配列中の133-1785番目のヌクレオチド残基からなる塩基配列を含むポリヌクレオチド；

(b) 前記 (i) もしくは (ii) の塩基配列と90%以上の同一性を有す

る塩基配列を含み、かつイソプレンスインターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；または

(c) 前記 (i) もしくは (i i) の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつイソプレンスインターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

〔2〕前記ポリヌクレオチドがムクナに由来する、〔1〕のポリヌクレオチド。

〔3〕以下 (A)、(B) または (C) のタンパク質：

(A) (i') 配列番号 2 で表される全長アミノ酸配列、もしくは (i i') 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列中の 45～594 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含むタンパク質；

(B) 前記 (i') もしくは (i i') のアミノ酸配列と 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつイソプレンスインターゼ活性を有するタンパク質；または

(C) 前記 (i') もしくは (i i') のアミノ酸配列において 1 個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつイソプレンスインターゼ活性を有するタンパク質。

〔4〕〔1〕もしくは〔2〕のポリヌクレオチド、または〔3〕のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

〔5〕〔4〕の発現ベクターが宿主に導入されることにより作製された形質転換体。

〔6〕前記宿主が、メチルエリスリトールリン酸経路によるジメチルアリルニリン酸の合成能を有する、〔5〕の形質転換体。

〔7〕前記宿主が大腸菌である、〔6〕の形質転換体。

〔8〕前記形質転換体が、メバロン酸経路およびメチルエリスリトールリン酸経路の双方によるジメチルアリルニリン酸の合成能を有する、〔5〕～〔7〕のいずれかの形質転換体。

〔９〕宿主が、コリネバクテリウム属、パントエア属、エンテロバクター属、またはサッカロミセス属に属する微生物である、〔５〕の形質転換体。

〔１０〕〔５〕～〔９〕のいずれかの形質転換体を用いて、〔３〕のタンパク質を生成することを含む、〔３〕のタンパク質の製造方法。

〔１１〕〔３〕のタンパク質の存在下において、ジメチルアリルニリン酸からイソプレンモノマーを生成することを含む、イソプレンモノマーの製造方法。

〔１２〕〔５〕～〔９〕のいずれかの形質転換体の培養によりイソプレンモノマーが生成される、〔１１〕の方法。

〔１３〕前記形質転換体の培養により培地中の炭素源からジメチルアリルニリン酸が供給される、〔１２〕の方法。

〔１４〕以下（Ｉ）および（ＩＩ）を含む、イソプレンポリマーの製造方法：

（Ｉ）〔１１〕～〔１３〕のいずれかの方法によりイソプレンモノマーを生成すること；

（ＩＩ）イソプレンモノマーを重合してイソプレンポリマーを生成すること。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、優れたイソプレンモノマー生産系を確立することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図１は、種々の植物の葉乾燥物の単位重量あたりのイソプレン発生量を示す図である。

[図2]図２は、種々の植物の葉から抽出された総タンパク質量あたりのイソプレン発生量を示す図である。

[図3]図３は、染色体固定したメバロン酸経路下流とその周辺領域の概要を示す図である。

[図4]図４は、染色体における t a c プロモーターで支配されたメバロン酸経

路下流とその周辺領域の概要を示す図である。

発明を実施するための形態

[0012] <イソプレニンターゼをコードするポリヌクレオチド>

本発明は、イソプレニンターゼをコードするポリヌクレオチドを提供する。

イソプレニンターゼは、ジメチルアリルジホスフェートをイソプレンに転換する酵素である。本発明者らは、まず、同一の高温条件下での、種々の植物におけるイソプレン生産能を評価した。この結果、ムクナのイソプレン生産能が、特許文献1および2において報告されている葛及びポプラのイソプレン生産能よりも、数倍から数十倍高いことが見出された。しかしながら、この高イソプレン生産能が当該植物の高いジメチルアリルジホスフェート生産能によるのか、当該植物がイソプレニンターゼを高生産することによるのか、あるいは当該植物が保有するイソプレニンターゼの酵素比活性が高いことによるのかは明らかになっていなかった。特にムクナについては、非特許文献2および3でM o n s o nらおよびK u z m aらにより硫酸分画により部分精製された酵素を用いて、イソプレニンターゼ活性のpH依存性などが調べられていたが、ムクナ比活性が葛及びポプラと比べて高いかどうかは明らかになっていなかった。そこで、本発明者らは、ムクナおよび葛の葉から硫酸分画によりイソプレニンターゼを部分精製し、粗抽出液の比活性を調べた。この結果、ムクナのイソプレニンターゼ比活性が葛のイソプレニンターゼ比活性よりも、数倍から数十倍高いことが見出された。測定されたムクナのイソプレニンターゼ比活性は特許文献1および2において報告されているポプラ粗酵素のイソプレニンターゼ比活性値よりも、数倍から数十倍高いことも明らかとなった。以上のことから、ムクナが高機能イソプレニンターゼを有している可能性が示唆された。

[0013] 次いで、ムクナにおけるイソプレニンターゼ遺伝子の塩基配列を解析した。解析方法の一例を以下に説明する。

植物において、イソプレニンターゼは葉のみで発現していること、並び

に、強光下及び高温下でその発現量は上昇することが知られている。そのため、先ず、光照射下且つ40℃の温度下で、イソプレシンターゼのmRNAを転写誘導したムクナの葉からTotal RNAを抽出した。抽出したTotal RNAについて、分解していないこと、又はゲノムDNAが混入していないことを確認した。次いで、このTotal RNAを二本鎖化後断片化し、3'末端にpoly A配列を有する断片の塩基配列のみを高速シーケンサーを用いて解析した。得られた断片配列において、重複する配列を連結し、複数のコンティグ配列を得た。これらコンティグ配列に対して、BLAST検索を行ったところ、登録されている既知の葛及びポプラのイソプレシンターゼ遺伝子配列と相同性（塩基配列の同一性）を有するコンティグ配列が抽出され、ムクナ由来イソプレシンターゼ遺伝子の部分配列が得られた。この部分配列に基づき、定法により5' RACE（Rapid Amplification of cDNA Ends）を行い、配列番号1で表されるムクナ由来イソプレシンターゼ遺伝子の完全長の塩基配列を解析した。

このムクナ由来イソプレシンターゼのcDNAは、例えば、解析されたムクナ由来イソプレシンターゼ遺伝子の塩基配列情報に基づいて設計したプライマーと、上述した方法を用いて得られたTotal RNAを鋳型として、RT-PCRにより得られる。

[0014] 一実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、(i) 配列番号1で表される塩基配列、もしくは(ii) 配列番号1で表される塩基配列中の133～1785番目のヌクレオチド残基からなる塩基配列を含むポリヌクレオチドである。配列番号1で表される塩基配列は、配列番号2で表されるアミノ酸配列をコードし、1～132番目のヌクレオチド残基からなる塩基配列は、推定上の葉緑体移行シグナルをコードし、133～1785番目のヌクレオチド残基からなる塩基配列は、成熟イソプレシンターゼのアミノ酸配列をコードし得る。

[0015] 別の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、上記(i) もしくは(ii)

i i) の塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつイソプレシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドである。塩基配列との同一性%は、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%以上であってもよい。イソプレシンターゼ活性とは、ジメチルアリルニリン酸 (DMA PP) からイソプレンを生成する活性をいう (以下同様)。

[0016] 塩基配列の同一性%および後述するようなアミノ酸配列の同一性%は、例えばKarlinおよびAltschulによるアルゴリズムBLAST (Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 5873 (1993))、PearsonによるFASTA (Methods Enzymol., 183, 63 (1990))を用いて決定することができる。このアルゴリズムBLASTに基づいて、BLASTP、BLASTNとよばれるプログラムが開発されているので (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>参照)、これらのプログラムをデフォルト設定で用いて、塩基配列およびアミノ酸配列の同一性%を計算してもよい。また、アミノ酸配列の相同性としては、例えば、Lipman-Pearson法を採用している株式会社ゼネティックスのソフトウェアGENETYX Ver 7.0.9を使用し、ORFにコードされるポリペプチド部分全長を用いて、Unit Size to Compare=2の設定でSimilarityをpercentage計算させた際の数値を用いてもよい。塩基配列およびアミノ酸配列の同一性%として、これらの計算で導き出される値のうち、最も低い値を採用してもよい。

[0017] さらに別の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、上記(i)もしくは(i i)の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズし、かつイソプレシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドである。

[0018] 「ストリンジেন্টな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。このような条件

を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、高い同一性を有する実質的に同一のポリヌクレオチド同士、例えば上述した同一性%を有するポリヌクレオチド同士がハイブリダイズし、それより低い相同性を示すポリヌクレオチド同士がハイブリダイズしない条件である。具体的には、このような条件としては、 $6 \times \text{SSC}$ （塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム）中、約 45°C でのハイブリダイゼーション、続いて、 $0.2 \times \text{SSC}$ 、 0.1% SDS 中、 $50 \sim 65^{\circ}\text{C}$ での1または2回以上の洗浄が挙げられる。

[0019] 本発明のポリヌクレオチドは、DNAであってもRNAであってもよいが、DNAであることが好ましい。本発明のポリヌクレオチドは、ムクナに由来し得る。本発明のポリヌクレオチドはまた、後述する本発明のタンパク質をコードするものであってもよい。

[0020] <イソプレニンシンターゼ>

本発明はまた、イソプレニンシンターゼ活性を有するタンパク質を提供する。イソプレニンシンターゼ活性は、上述したとおりである。

[0021] 一実施形態では、本発明のタンパク質は、(i') 配列番号2で表される全長アミノ酸配列、もしくは(i i') 配列番号2で表されるアミノ酸配列中の45～594番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含むタンパク質である。配列番号2で表されるアミノ酸配列中の1～44番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は、推定上の葉緑体移行シグナルをコードし、45～594番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は、成熟イソプレニンシンターゼをコードし得る。

[0022] 別の実施形態では、本発明のタンパク質は、上記(i') もしくは(i i') のいずれか一つのアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつイソプレニンシンターゼ活性を有するタンパク質である。アミノ酸配列との同一性%は、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%以上であってもよい。

[0023] さらに別の実施形態では、本発明のタンパク質は、上記(i') もしくは(i i') のアミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸残基が変異

しているアミノ酸配列を含み、かつイソプレニンターゼ活性を有するタンパク質である。アミノ酸残基の変異としては、例えば、アミノ酸残基の欠失、置換、付加および挿入が挙げられる。1個もしくは数個のアミノ酸残基の変異は、アミノ酸配列中の1つの領域に導入されてもよいが、複数の異なる領域に導入されてもよい。用語「1個もしくは数個」は、タンパク質の立体構造や活性を大きく損なわない範囲を示すものである。タンパク質の場合における用語「1もしくは数個」が示す数は、例えば、1～100個、好ましくは1～80個、より好ましくは1～50個、1～30個、1～20個、1～10個または1～5個である。本発明のタンパク質は、ヒスチジントグ等の精製用タグを有していてもよい。

[0024] 本発明のタンパク質のイソプレニンターゼ活性は、同一条件で測定された場合、上記(i')もしくは(i i')のいずれか一つのアミノ酸配列を含むタンパク質のイソプレニンターゼ活性の50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上または95%以上の活性を有することが好ましい。また、本発明のタンパク質は、安定性の観点から、所定の緩衝液〔例、50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、0,15 mM MgCl₂溶液〕中で4℃にて48時間保存した場合に、残存活性が30%以上、40%以上、50%以上、60%以上または65%以上であることが好ましい。

[0025] 本発明のタンパク質は、目的活性を保持し得る限り、触媒ドメイン中の部位、および触媒ドメイン以外の部位に変異が導入されていてもよい。目的活性を保持し得る、変異が導入されてもよいアミノ酸残基の位置は、当業者に自明である。具体的には、当業者は、1) 同種の活性を有する複数のタンパク質のアミノ酸配列(例、配列番号2により表されるアミノ酸配列、および他のイソプレニンターゼのアミノ酸配列)を比較し、2) 相対的に保存されている領域、および相対的に保存されていない領域を明らかにし、次いで、3) 相対的に保存されている領域および相対的に保存されていない領域から、それぞれ、機能に重要な役割を果たし得る領域および機能に重要な役割

を果たし得ない領域を予測できるので、構造・機能の相関性を認識できる。
したがって、当業者は、イソプレシンターゼのアミノ酸配列において変異が導入されてもよいアミノ酸残基の位置を特定できる。

[0026] アミノ酸残基が置換により変異される場合、アミノ酸残基の置換は、保存的置換であってもよい。本明細書中で用いられる場合、用語「保存的置換」とは、所定のアミノ酸残基を、類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換することをいう。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該分野で周知である。例えば、このようなファミリーとしては、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電性極性側鎖を有するアミノ酸（例、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、 β 位分岐側鎖を有するアミノ酸（例、スレオニン、バリン、イソロイシン）、芳香族側鎖を有するアミノ酸（例、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）、ヒドロキシル基（例、アルコール性、フェノール性）含有側鎖を有するアミノ酸（例、セリン、スレオニン、チロシン）、および硫黄含有側鎖を有するアミノ酸（例、システイン、メチオニン）が挙げられる。好ましくは、アミノ酸の保存的置換は、アスパラギン酸とグルタミン酸との間での置換、アルギニンとリジンとヒスチジンとの間での置換、トリプトファンとフェニルアラニンとの間での置換、フェニルアラニンとバリンとの間での置換、ロイシンとイソロイシンとアラニンとの間での置換、およびグリシンとアラニンとの間での置換であってもよい。

[0027] <発現ベクター>

本発明は、発現ベクターを提供する。本発明の発現ベクターは、本発明のポリヌクレオチド、または本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む。

[0028] 本発明の発現ベクターとしては、例えば、宿主においてタンパク質を発現させる細胞系ベクター、およびタンパク質翻訳系を利用する無細胞系ベクターが挙げられる。発現ベクターはまた、プラスミド、または組込み型 (i n t e g r a t i v e) ベクターであってもよい。発現ベクターはさらに、D N AベクターまたはR N Aベクターであってもよい。

細胞系ベクターとしては、宿主に適した公知の発現ベクターが用いられる。例えば、大腸菌においてはp B R 3 2 2誘導体に代表されるC o l E系プラスミド、p 1 5 Aオリジンを持つp A C Y C系プラスミド、p S C系プラスミド、B a c系等のF因子由来ミニFプラスミドが挙げられる。その他、t r cやt a c等のトリプトファンプロモーター、l a cプロモーター、T 7プロモーター、T 5プロモーター、T 3プロモーター、S P 6プロモーター、アラビノース誘導プロモーター、コールドショックプロモーター、テトラサイクリン誘導性プロモーター等を有する発現ベクターも挙げられる。

無細胞系ベクターとしては、細胞系ベクターにおいて挙げられたT 7プロモーターを有する発現ベクターやT 3プロモーターを有する発現ベクター；S P 6プロモーター又はT 7プロモーターを有するp E U系プラスミド等の小麦無細胞タンパク質合成用ベクター等が挙げられる。

[0029] 無細胞系ベクターを用いたタンパク質合成においては、先ず、転写系を用いて、目的タンパク質のc D N Aを転写して、m R N Aを合成する。係る転写系としては、R N Aポリメラーゼにより転写させる従来公知のものが挙げられる。R N Aポリメラーゼとしては、例えばT 7 R N Aポリメラーゼが挙げられる。

次いで、翻訳系である無細胞タンパク質合成系を用いて、m R N Aを翻訳し、タンパク質を合成する。この系にはリボゾーム、翻訳開始因子、翻訳伸長因子、解離因子、アミノアシル t R N A合成酵素等、翻訳に必要な要素が含まれている。このようなタンパク質翻訳系として、大腸菌抽出液、ウサギ網状赤血球抽出液、小麦胚芽抽出液等が挙げられる。

更に、上記翻訳に必要な要素が独立に精製された因子のみからなる再構成

型無細胞タンパク質合成系が挙げられる。

尚、細胞系ベクターを用いたタンパク質合成については、＜形質転換体＞において後述する。

細胞系ベクター又は無細胞系ベクターを用いて合成されたタンパク質を精製してもよい。精製方法としては、塩析法や各種クロマトグラフィーを用いた方法が挙げられる。発現ベクターが目的タンパク質のN末端又はC末端にヒスチジンタグ等のタグ配列を発現するように設計されている場合には、ニッケルやコバルト等、このタグに親和性を有する物質を用いたアフィニティーカラムによる精製方法が挙げられる。その他、イオン交換クロマトグラフィーやゲルろ過クロマトグラフィー等、適宜組み合わせて精製することにより、本発明のタンパク質の純度を高めることができる。

[0030] ＜形質転換体＞

本発明は、本発明の発現ベクターを含む形質転換体を提供する。本発明の形質転換体は、本発明の発現ベクターが宿主に導入されたものである。本発明に用いられる宿主としては、細菌又は真菌が好ましい。細菌としては、グラム陽性菌であってもグラム陰性菌であってもよい。

[0031] グラム陽性細菌としては、バシラス (*Bacillus*) 属細菌、リステリア (*Listeria*) 属細菌、スタフィロкокカス (*Staphylococcus*) 属細菌、ストレプトкокカス (*Streptococcus*) 属細菌、エンテロкокカス (*Enterococcus*) 属細菌、クロストリジウム (*Clostridium*) 属細菌、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属細菌、ストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属細菌等が挙げられ、バシラス (*Bacillus*) 属細菌、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属細菌が好ましい。

バシラス (*Bacillus*) 属細菌としては、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、炭疽菌 (*Bacillus anthracis*)、セレウス菌 (*Bacillus cereus*) 等が挙げられ、枯草菌

(*Bacillus subtilis*) がより好ましい。

コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属細菌としては、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*)、コリネバクテリウム・エフィシエンス (*Corynebacterium efficiens*)、コリネバクテリウム・カルナエ (*Corynebacterium callunae*) 等が挙げられ、コリネバクテリウム・グルタミカムがより好ましい。

[0032] グラム陰性細菌としては、エシェリキア (*Escherichia*) 属細菌、パントエア (*Pantoea*) 属細菌、サルモネラ (*Salmonella*) 属細菌、ビブリオ (*Vibrio*) 属細菌、セラチア (*Serratia*) 属細菌、エンテロバクター (*Enterobacter*) 属細菌等が挙げられ、エシェリキア (*Escherichia*) 属細菌、パントエア (*Pantoea*) 属細菌、エンテロバクター (*Enterobacter*) 属細菌が好ましい。

エシェリキア (*Escherichia*) 属細菌としては、大腸菌 (*Escherichia coli*) が好ましい。

パントエア (*Pantoea*) 属細菌としては、パントエア・アナナティス (*Pantoea ananatis*)、パントエア・スチュアルティ (*Pantoea stewartii*)、パントエア・アグロメランス (*Pantoea agglomerans*)、パントエア・シトレア (*Pantoea citrea*) 等が挙げられ、パントエア・アナナティス (*Pantoea ananatis*)、パントエア・シトレア (*Pantoea citrea*) が好ましい。また、パントエア属細菌としては、欧州特許出願公開0952221号に例示された株を使用してもよい。パントエア属細菌の代表的な株としては、例えば、欧州特許出願公開0952221号に開示されるパントエア・アナナティスAJ13355株 (FERM BP-6614) およびパントエア・アナナティスAJ13356株 (FERM BP-6615) が挙げられる。

エンテロバクター (*Enterobacter*) 属細菌としては、エンテロバクター・アグロメランス (*Enterobacter agglomerans*)、エンテロバクター・アエロゲネス (*Enterobacter aerogenes*) 等が挙げられ、エンテロバクター・アエロゲネス (*Enterobacter aerogenes*) が好ましい。また、エンテロバクター属細菌としては、欧州特許出願公開0952221号に例示された菌株を使用してもよい。エンテロバクター属細菌の代表的な株としては、例えば、エンテロバクター・アグロメランス ATCC 12287 株、エンテロバクター・アエロゲネス ATCC 13048 株、エンテロバクター・アエロゲネス NBRC 12010 株 (*Biotechnol Bioeng.* 2007 Mar 27; 98 (2) : 340-348)、エンテロバクター・アエロゲネス AJ 110637 (FERM BP-10955) 株等が挙げられる。エンテロバクター・アエロゲネス AJ 110637 株は、2007年8月22日付で独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6) に受託番号 FERM P-21348 として寄託され、2008年3月13日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-10955 の受領番号が付与されている。

[0033] 真菌としては、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、シゾサッカロミセス (*Schizosaccharomyces*) 属、ヤロウイア (*Yarrowia*) 属、トリコデルマ (*Trichoderma*) 属、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、フザリウム (*Fusarium*) 属、ムコール (*Mucor*) 属の微生物等が挙げられ、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、シゾサッカロミセス (*Schizosaccharomyces*) 属、ヤロウイア (*Yarrowia*) 属、またはトリコデルマ (*Trichoderma*) 属の微生物が好ましい。

サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属の微生物としては、サッカロミセス・カールスベルゲンシス (*Saccharomyces ca*

rlsbergensis)、サッカロミセス・セレビスエー (*Saccharomyces cerevisiae*)、サッカロミセス・ディアスタティクス (*Saccharomyces diastaticus*)、サッカロミセス・ドウグラシー (*Saccharomyces douglasii*)、サッカロミセス・クルイベラ (*Saccharomyces kluyveri*)、サッカロミセス・ノルベンシス (*Saccharomyces norbensis*)、サッカロミセス・オビフォルミス (*Saccharomyces oviiformis*) が挙げられ、サッカロミセス・セレビスエー (*Saccharomyces cerevisiae*) が好ましい。

シゾサッカロミセス (*Schizosaccharomyces*) 属の微生物としては、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) が好ましい。

ヤロウイア (*Yarrowia*) 属の微生物としては、ヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) が好ましい。

トリコデルマ (*Trichoderma*) 属の微生物としては、トリコデルマ・ハルジアヌム (*Trichoderma harzianum*)、トリコデルマ・コニングイー (*Trichoderma koningii*)、トリコデルマ・ロンギフラキアム (*Trichoderma longibrachiatum*)、トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*)、トリコデルマ・ビリデ (*Trichoderma viride*) が挙げられ、トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) が好ましい。

その他、本発明に用いられる宿主としては、イソプレンスインターゼの基質であるジメチルアリルニリン酸の合成に関与するメバロン酸 (MVA) 経路および／またはメチルエリスリトールリン酸 (MEP) 経路によるジメチルアリルニリン酸 (DMAPP) の合成能を備えていれば特に限定されず、昆虫細胞、動物細胞、植物細胞等であってもよい。

[0034] 本発明の形質転換体は、さらにイソプレンシンターゼの基質であるジメチルアリルニリン酸 (DMA PP) を合成する経路が強化されていてもよい。このような強化のため、イソペンテニルニリン酸 (IPP) からジメチルアリルニリン酸 (DMA PP) への変換能を有するイソペンテニルニリン酸デルタイソメラーゼの発現ベクターが、本発明の形質転換体に導入されてもよい。また、IPP および／または DMA PP の生成に関連するメバロン酸経路および／またはメチルエリスリトールリン酸経路に關与する 1 以上の酵素の発現ベクターが、本発明の形質転換体に導入されてもよい。このような酵素の発現ベクターは、プラスミド、または組込み型 (i n t e g r a t i v e) ベクターであってもよい。このような酵素の発現ベクターはまた、DNA ベクターまたは RNA ベクターであってもよい。このような酵素の発現ベクターはさらに、メバロン酸経路および／またはメチルエリスリトールリン酸経路に關与する複数の酵素 (例、1 種、2 種、3 種または 4 種以上) を発現するものであってもよく、例えば、ポリシストロニック mRNA の発現ベクターであってもよい。メバロン酸経路および／またはメチルエリスリトールリン酸経路に關与する 1 以上の酵素の由来は、宿主に対して同種であってもよいし、異種であってもよい。メバロン酸経路および／またはメチルエリスリトールリン酸経路に關与する酵素の由来が宿主に対して異種である場合、例えば、宿主が上述したような細菌 (例、大腸菌) であり、かつ、メバロン酸経路に關与する酵素が真菌 (例、サッカロミセス・セレビシエ) に由来するものであってもよい。また、宿主が、メチルエリスリトールリン酸経路に關与する酵素を固有に産生するものである場合、宿主に導入される発現ベクターは、メバロン酸経路に關与する酵素を発現するものであってもよい。

[0035] イソペンテニルニリン酸デルタイソメラーゼ (EC: 5. 3. 3. 2) としては、例えば、Idi1p (ACCESSION ID NP_015208)、AT3G02780 (ACCESSION ID NP_186927)、AT5G16440 (ACCESSION ID NP_197148)、および Idi (ACCESSION ID NP_417365) が

挙げられる。

[0036] メバロン酸 (MVA) 経路に関与する酵素としては、例えば、メバロン酸キナーゼ (EC: 2. 7. 1. 36; 例1、Erg12p、ACCESSION ID NP_013935; 例2、AT5G27450、ACCESSION ID NP_001190411)、ホスホメバロン酸キナーゼ (EC: 2. 7. 4. 2; 例1、Erg8p、ACCESSION ID NP_013947; 例2、AT1G31910、ACCESSION ID NP_001185124)、ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ (EC: 4. 1. 1. 33; 例1、Mvd1p、ACCESSION ID NP_014441; 例2、AT2G38700、ACCESSION ID NP_181404; 例3、AT3G54250、ACCESSION ID NP_566995)、アセチル-CoA-C-アセチルトランスフェラーゼ (EC: 2. 3. 1. 9; 例1、Erg10p、ACCESSION ID NP_015297; 例2、AT5G47720、ACCESSION ID NP_001032028; 例3、AT5G48230、ACCESSION ID NP_568694)、ヒドロキシメチルグルタリル-CoAシンターゼ (EC: 2. 3. 3. 10; 例1、Erg13p、ACCESSION ID NP_013580; 例2、AT4G11820、ACCESSION ID NP_192919; 例3、MvaS、ACCESSION ID AAG02438)、ヒドロキシメチルグルタリル-CoAリダクターゼ (EC: 1. 1. 1. 34; 例1、Hmg2p、ACCESSION ID NP_013555; 例2、Hmg1p、ACCESSION ID NP_013636; 例3、AT1G76490、ACCESSION ID NP_177775; 例4、AT2G17370、ACCESSION ID NP_179329、EC: 1. 1. 1. 88、例、MvaA、ACCESSION ID P13702)、アセチル-CoA-C-アセチルトランスフェラーゼ/ヒドロキシメチルグルタリル-CoAリダクターゼ (EC: 2. 3. 1. 9/1. 1. 1. 34、例

、MvaE、ACCESSION ID AAG02439) が挙げられる。
。

[0037] メチルエリスリトールリン酸 (MEP) 経路に関与する酵素としては、例えば、1-デオキシ-D-キシルロース-5-リン酸シンターゼ (EC: 2. 2. 1. 7、例1、Dxs、ACCESSION ID NP_414954; 例2、AT3G21500、ACCESSION ID NP_566686; 例3、AT4G15560、ACCESSION ID NP_193291; 例4、AT5G11380、ACCESSION ID NP_001078570)、1-デオキシ-D-キシルロース-5-リン酸リダクトイソメラーゼ (EC: 1. 1. 1. 267; 例1、Dxr、ACCESSION ID NP_414715; 例2、AT5G62790、ACCESSION ID NP_001190600)、4-ジホスホシチジル-2-C-メチル-D-エリスリトールシンターゼ (EC: 2. 7. 7. 60; 例1、IspD、ACCESSION ID NP_417227; 例2、AT2G02500、ACCESSION ID NP_565286)、4-ジホスホシチジル-2-C-メチル-D-エリスリトールキナーゼ (EC: 2. 7. 1. 148; 例1、IspE、ACCESSION ID NP_415726; 例2、AT2G26930、ACCESSION ID NP_180261)、2-C-メチル-D-エリスリトール-2, 4-シクロニリン酸シンターゼ (EC: 4. 6. 1. 12; 例1、IspF、ACCESSION ID NP_417226; 例2、AT1G63970、ACCESSION ID NP_564819)、1-ヒドロキシ-2-メチル-2-(E)-ブテニル-4-ニリン酸シンターゼ (EC: 1. 17. 7. 1; 例1、IspG、ACCESSION ID NP_417010; 例2、AT5G60600、ACCESSION ID NP_001119467)、4-ヒドロキシ-3-メチル-2-ブテニルニリン酸レダクターゼ (EC: 1. 17. 1. 2; 例1、IspH、ACCESSION ID NP_414570; 例2、AT4G34350、AC

CESSION ID NP__567965) が挙げられる。

[0038] 遺伝子が組込まれた発現ベクターの宿主への導入（形質転換）は従来公知の方法を用いて行うことができる。例えば、カルシウム処理された菌体を用いるコンピテント細胞法や、エレクトロポレーション法等が挙げられる。また、プラスミドベクター以外にもファージベクターを用いて、菌体内に感染させ導入する方法によってもよい。

[0039] 更に、本発明の形質転換体において、イソプレンスインターゼの基質であるジメチルアリルニリン酸を合成するメバロン酸経路又はメチルエリスリトールリン酸経路の酵素をコードする遺伝子が導入されていてもよい。

係る酵素としては、ピルビン酸塩とD-グリセルアルデヒド-3-ホスフェートを1-デオキシ-D-キシロース-5-ホスフェートに転換する1-デオキシ-D-キシロース-5-ホスフェートシンターゼ；イソペンテニルニリン酸をジメチルアリルニリン酸に転換するイソペンチルジホスフェートイソメラーゼ等が挙げられる。

[0040] 本発明の形質転換体から本発明のタンパク質を抽出・精製して用いてもよく、本発明のタンパク質を発現する形質転換体を培養してイソプレンを生産してもよい。

[0041] <イソプレンモノマーおよびイソプレンポリマーの製造方法>

本発明は、イソプレンモノマーの製造方法を提供する。本発明のイソプレンモノマーの製造方法は、本発明のタンパク質の存在下において、ジメチルアリルニリン酸からイソプレンモノマーを生成することを含む。

[0042] 本発明のイソプレンモノマーの製造方法は、本発明のタンパク質の存在下で行われる限り特に限定されず、例えば、本発明のタンパク質自体（例、精製タンパク質）を用いる酵素反応系を利用して、または本発明のタンパク質を産生する本発明の形質転換体の培養により行うことができる。好ましくは、本発明の形質転換体の培養により行われる。本発明のイソプレンモノマーの製造方法において本発明の形質転換体を用いる場合、イソプレンモノマーの原料となるジメチルアリルニリン酸は、本発明の形質転換体により、培地

中の炭素源から効率的に供給される。本発明の形質転換体は、培地中の炭素源から、イソプレンモノマーを主にアウトガスとして生産するため、形質転換体から発生するガスを採取することにより、イソプレンモノマーが回収される。イソプレンシンターゼの基質であるジメチルアリルニリン酸は、培地中の炭素源を素に、宿主内のメバロン酸経路又はメチルエリスリトールリン酸経路で合成される。

本発明の形質転換体を培養する培地としては、イソプレンに転換されるための炭素源を含むことが好ましい。炭素源としては、単糖類、二糖類、オリゴ糖類、多糖類等の炭水化物；ショ糖を加水分解した転化糖；グリセロール；メタノール、ホルムアルデヒド、ギ酸塩、一酸化炭素、二酸化炭素等の炭素数が1の化合物（以下、C1化合物という。）；コーン油、パーム油、大豆油等のオイル；アセテート；動物油脂；動物オイル；飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸等の脂肪酸；脂質；リン脂質；グリセロ脂質；モノグリセライド、ジグリセライド、トリグリセライド等のグリセリン脂肪酸エステル；微生物性タンパク質、植物性タンパク質等のポリペプチド；加水分解されたバイオマス炭素源等の再生可能な炭素源；酵母エキス；又はこれらを組み合わせたものが挙げられる。窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機アンモニウム塩、大豆加水分解物などの有機窒素、アンモニアガス、アンモニア水等を用いることができる。有機微量栄養源としては、ビタミンB1、L-ホモセリンなどの要求物質または酵母エキス等を適量含有させることが望ましい。これらの他に、必要に応じて、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム、鉄イオン、マンガンイオン等が少量添加される。なお、本発明で用いる培地は、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じてその他の有機微量成分を含む培地であれば、天然培地、合成培地のいずれでもよい。

[0043] 単糖類としては、ケトトリオース（ジヒドロキシアセトン）、アルドトリオース（グリセルアルデヒド）等のトリオース；ケトテトロース（エリトロース）、アルドテトロース（エリトロース、トレオース）等のテトロース

；ケトペントース（リブロース、キシロース）、アルドペントース（リボース、アラビノース、キシロース、リキソース）、デオキシ糖（デオキシリボース）等のペントース；ケトヘキソース（プシコース、フルクトース、ソルボース、タガトース）、アルドヘキソース（アロース、アルトロース、グルコース、マンノース、グロース、イドース、ガラクトース、タロース）、デオキシ糖（フコース、フクロース、ラムノース）等のヘキソース；セドヘプツロース等のヘプトースが挙げられ、フルクトース、マンノース、ガラクトース、グルコース等のC 6 糖；キシロース、アラビノース等のC 5 糖の炭水化物が好ましい。

二糖類としては、スクロース、ラクトース、マルトース、トレハロース、ツラノース、セロビオース等が挙げられ、スクロース、ラクトースが好ましい。

オリゴ糖類としては、ラフィノース、メレジトース、マルトトリオース等の三糖類；アカルボース、スタキオース等の四糖類；フラクトオリゴ糖（FOS）、ガラクトオリゴ糖（GOS）、マンナンオリゴ糖（MOS）等のその他のオリゴ糖類が挙げられる。

多糖類としては、グリコーゲン、デンプン（アミロース、アミロペクチン）、セルロース、デキストリン、グルカン（ β 1, 3-グルカン）が挙げられ、デンプン、セルロースが好ましい。

[0044] 微生物性タンパク質としては、酵母または細菌由来のポリペプチドが挙げられる。

植物性タンパク質としては、大豆、コーン、キャノーラ、ジャトロファ、パーム、ピーナッツ、ヒマワリ、ココナッツ、マスタード、綿実、パーム核油、オリーブ、紅花、ゴマ、亜麻仁由来のポリペプチドが挙げられる。

[0045] 脂質としては、C 4 以上の飽和、不飽和脂肪酸を 1 以上含む物質が挙げられる。

[0046] オイルとしては、C 4 以上の飽和、不飽和脂肪酸が 1 以上含み、室温で液体の脂質が好ましく、大豆、コーン、キャノーラ、ジャトロファ、パーム、

ピーナッツ、ヒマワリ、ココナッツ、マスタード、綿実、パーム核油、オリーブ、紅花、ゴマ、亜麻仁、油性微生物細胞、ナンキンハゼ、又はこれらの2以上の組み合わせからなるものが挙げられる。

[0047] 脂肪酸としては、式 RCOOH （「R」は炭化水素基を表す。）で表される化合物が挙げられる。

不飽和脂肪酸は、「R」に少なくとも1の炭素-炭素二重結合を有する化合物であり、オレイン酸、バクセン酸、リノール酸、パルミテライジン酸、アラキドン酸等が挙げられる。

飽和脂肪酸は、「R」が飽和脂肪族基である化合物であり、ドコサン酸、イコサン酸、オクタデカン酸、ヘキサデカン酸、テトラデカン酸、ドデカン酸等が挙げられる。

中でも、脂肪酸としては、1以上のC2からC22の脂肪酸が含まれるものが好ましく、C12脂肪酸、C14脂肪酸、C16脂肪酸、C18脂肪酸、C20脂肪酸、C22脂肪酸が含まれるものがより好ましい。

また、炭素源としては、これら脂肪酸の塩、誘導体、誘導体の塩も挙げられる。塩としては、リチウム塩、カリウム塩、ナトリウム塩等が挙げられる。

[0048] また、炭素源としては、脂質、オイル、油脂、脂肪酸、グリセリン脂肪酸エステルとグルコース等の炭水化物との組み合わせが挙げられる。

[0049] 再生可能な炭素源としては、加水分解されたバイオマス炭素源が挙げられる。

バイオマス炭素源としては、木、紙、及びパルプの廃材、葉状植物、果肉等のセルロース系基質；柄、穀粒、根、塊茎等の植物の一部が挙げられる。

バイオマス炭素源として用いられる植物としては、コーン、小麦、ライ麦、ソルガム、トリティケイト、コメ、アワ、大麦、キャッサバ、エンドウマメ等のマメ科植物、ジャガイモ、サツマイモ、バナナ、サトウキビ、タピオカ等が挙げられる。

[0050] バイオマス等の再生可能な炭素源を細胞培地に添加する際には、前処理することが好ましい。前処理としては、酵素的な前処理、化学的な前処理、酵素的な前処理と化学的な前処理の組み合わせが挙げられる。

再生可能な炭素源を細胞培地に添加する前に、その全部または一部を加水分解することが好ましい。

[0051] また、炭素源としては、酵母エキス、または酵母エキスと、グルコース等の他の炭素源との組み合わせが挙げられ、酵母エキスと、二酸化炭素やメタノール等のC1化合物との組み合わせが好ましい。

[0052] 本発明において、形質転換体の培養方法としては、細胞を生理食塩水と栄養源を含む標準的な培地で培養することが好ましい。

培養培地としては、特に限定されず、Luria Bertani (LB) ブロス、Sabouraud Dextrose (SD) ブロス、Yeast medium (YM) ブロス等の一般的に市販されている既成の培地が挙げられる。特定の宿主の培養に適した培地を適宜選択して用いることができる。

[0053] 細胞培地には適切な炭素源の他に、適切なミネラル、塩、補助因子、緩衝液、及び培養に適していること、またはイソプレネン産出を促進することが当業者にとって公知の成分が含まれていることが望ましい。

本発明の形質転換体において、本発明のタンパク質の発現を維持するために、糖、金属塩、抗菌物質等を培地に添加しておくことが好ましい。

[0054] 本発明の形質転換体の培養条件としては、本発明のタンパク質の発現が可能な条件であれば、特に限定されず、標準的な細胞培養条件を用いることができる。

培養温度としては、20℃～37℃が好ましく、ガス組成としては、CO₂濃度が約6%～約84%であることが好ましく、pHが、約5～約9であることが好ましい。

また、宿主の性質に応じて好気性、無酸素性、又は嫌気性条件下で培養を行うことが好ましい。

[0055] 培養方法としては、形質転換体をバッチ培養法、流加培養法、連続培養法等の公知の発酵方法を用いて培養する方法が挙げられる。

バッチ培養法は、発酵開始時に培地組成物に仕込み、宿主を培地に植菌し、pHや酸素濃度等の制御を行いながら形質転換体の培養を行う方法である。

バッチ培養法による形質転換体の培養において、形質転換体は、穏やかな誘導期から対数増殖期を経て最終的に成長速度が減少または停止する定常期に至る。イソプレンは、対数増殖期や定常期の形質転換体によって産出される。

[0056] 流加培養法は、上述したバッチ法に加えて、発酵プロセスが進行するに従い徐々に炭素源を添加する方法である。流加培養法は、カタボライト抑制により形質転換体の代謝が抑制される傾向があり、培地中の炭素源の量を制限することが好ましいときに有効である。流加培養法は、制限された量または過剰な量のグルコース等の炭素源を用いて行うことができる。

[0057] 連続培養法は、一定の速度でバイオリアクターに所定量の培地を連続的に供給しながら、同時に同量の培養液を抜き取る培養法である。連続培養法では培養物を一定の高密度に保つことができ、培養液中の形質転換体は主に対数増殖期にある。

適宜、培地の一部または全部を入れ換えることにより、栄養素の補給を行うことができ、形質転換体の生育に悪影響を及ぼす可能性のある代謝副産物、及び死細胞の蓄積を防ぐことができる。

[0058] 本発明の発現ベクターが有するプロモーターとしては、構成的プロモーターや誘導的プロモーターが挙げられる。本発明の発現ベクターがlacプロモーター等の誘導的プロモーターを有している場合には、培養液中に、例えばIPTG（イソプロピルーβ-チオガラクトピラノシド）を添加して、本発明のタンパク質の発現を誘導してもよい。

[0059] 本発明の形質転換体を培養することにより得られるイソプレンモノマーの生産量の評価方法としては、ヘッドスペース法により気相を採取し、この気

相をガスクロマトグラフィー法で分析する方法が挙げられる。

詳細には、密封したバイアル中で形質転換体を含む培養液を振蕩しながら培養したときのヘッドスペース中のイソプレンモノマーを、標準的なガスクロマトグラフィーを用いて分析する。次いで、検量線を用いて、ガスクロマトグラフィー測定カーブから得られる面積を、形質転換体のイソプレンモノマー生産量に換算する。

[0060] 本発明の形質転換体を培養することにより得られるイソプレンモノマーの回収方法としては、ガストリッピング、分留、或いは、固相に吸着させたイソプレンモノマーの熱若しくは真空による固相からの脱着、又は溶媒による抽出等が挙げられる。

ガストリッピングでは、アウトガスから連続的にイソプレンガスを除去する。このようなイソプレンガスの除去は種々の方法で行うことができ、固相への吸着、液相への分離、又はイソプレンガスを直接凝縮させる方法が挙げられる。

[0061] イソプレンモノマーの回収は一段階又は多段階で行うことができる。イソプレンモノマーを一段階で回収する場合には、アウトガスからのイソプレンモノマーの分離と、イソプレンモノマーの液相への変換を同時に行う。イソプレンモノマーをアウトガスから直接凝縮させて液相にすることもできる。イソプレンモノマーを多段階で回収する場合には、オフガスからのイソプレンモノマーの分離と、イソプレンモノマーの液相への変換とを順次行う。例えば、イソプレンモノマーを固相に吸着させ、溶媒で固相から抽出する方法が挙げられる。

[0062] 更に、イソプレンモノマーの回収方法は、イソプレンモノマーを精製する工程が含まれていてもよい。精製工程としては、液相抽出物からの蒸留による分離や各種クロマトグラフィーが挙げられる。

[0063] 本発明のタンパク質は、従来のイソプレンシンターゼと比較してイソプレン生産能に優れるため、本発明のタンパク質を発現する形質転換体を用いて、イソプレンモノマーを効率よく生産することができる。

[0064] 本発明はまた、イソプレンポリマーの製造方法を提供する。本発明のイソプレンポリマーの製造方法は、以下（Ⅰ）および（ⅠⅠ）を含む：

（Ⅰ）本発明の方法によりイソプレンモノマーを生成すること；

（ⅠⅠ）イソプレンモノマーを重合してイソプレンポリマーを生成すること

。

[0065] 工程（Ⅰ）は、上述した本発明のイソプレンモノマーの製造方法と同様に行うことができる。工程（ⅠⅠ）におけるイソプレンモノマーの重合は、当該分野で公知の任意の方法により行うことができる。

実施例

[0066] 次に実施例を示して本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0067] 実施例 1：植物におけるイソプレン生産能の検討

1-1）葉乾燥物の単位重量あたりのイソプレン発生量の測定

先ず、植物におけるイソプレン生産能を検討するため、植物における葉乾燥重量 1 g あたりのイソプレン発生量を測定した。植物としては、ムクナ、ヤナギ（シダレヤナギ）、モミジバフウ、ギンコウバイ、葛を用いた。

イソプレン発生量測定には、ガス交換式デシケーター（商品名：真空デシケーター、アズワン社製）を、インキュベーター（商品名：グロースチェンバーMLR-351HSANYO社製）内に收容し、ガス交換式デシケーター内に設置した気体攪拌用ファンを作動させガス交換式デシケーターの空間内の雰囲気気を攪拌させつつ、インキュベーターを高温誘導条件（照度 100 $\mu\text{mol E}/\text{m}^2/\text{s}$ で 40℃）に設定した。ガス交換式デシケーター内の雰囲気気の温度が 40℃ になった後、プランターに植えられたムクナ植物体を收容し、ガス交換式デシケーターを密閉した状態で 3 時間保持した。次いで、吸引ポンプにより、シリコンチューブ、吸着管および気体採取管を介して、ガス交換式デシケーター内の空間から、ムクナが放出したガス成分を吸引した。これにより、吸着管において、ムクナが放出したガス成分に含まれる水蒸気（水分）を吸着、分離するとともに、水蒸気が分離されたガス成分を

気体採取管に導き、気体採取管において、そのガス成分を採取した。次いで、ガスクロマトグラフ（商品名：GC-FID6890、Agilent社製）を用いて、気体採取管に採取されたガス成分に含まれるイソプレンを定量分析した。

植物の葉乾燥重量は、新鮮個葉の葉面積と、80℃の乾熱器によって新鮮個葉を8時間乾燥させたときの乾燥重には非常に良い正の相関関係が成り立つので、葉面積からの乾燥重換算式を導いておき、イソプレン発生量測定に用いたムクナ植物体の全葉面積から乾燥重を推定した。

植物における葉乾燥重量1gあたりのイソプレン発生量はムクナ植物体全体からのイソプレン発生量を植物体全体の葉の乾燥重量推定値で割ることにより求めた。

その結果、ムクナが葉乾燥物の単位重量あたりのイソプレン発生量に優れることが明らかとなった（図1）。

[0068] 1-2) 総タンパク質量あたりのイソプレン発生量の測定

次いで、種々の植物の葉から抽出された総タンパク質量あたりのイソプレン発生量を測定した。植物としては、ムクナ（サンプル1、2）、ヤナギ（シダレヤナギ）、モミジバフウ、ギンコウバイ、クズを用いた。

タンパク質抽出には、バッファー液（50mM Tris-HCl, 20mM MgCl, 5% Glycerol, 0.02% Triton-X100, pH8.0）を作成し、使用直前にPolyclar AT 10%、DTT 20mM、Protease Complete tablet（1tablet/50ml）Benzamidine-HCl 1mM（それぞれ終濃度）となるように加え蛋白抽出バッファーとして用いた。5gサンプルに対してタンパク抽出バッファー50ml加えて、氷上で冷やしておいた乳鉢でよく摩砕した後、2重に重ねたMiraclothで摩砕液を濾過し、濾液を12000Gで20分、40000Gで40分遠心分離した上清を取得し粗抽出液とした。

次いで、この粗抽出液について硫安分画を行った。硫安の終濃度40%か

ら55%の範囲で析出する蛋白を40000Gで40分遠心分離し、得られた沈殿を蛋白抽出バッファーに再溶解させて硫安画分を得た。

総（硫安画分）タンパク質量は、ブラッドフォード法で硫安画分を測定することで求めた。標準蛋白Bovine serum albuminについて、ブラッドフォード試薬を反応させ分光光度計で測定した波長595nmの吸光度に対する蛋白量の検量線を作成した。50倍希釈した硫安画分液について同様に波長595nmの吸光度を測定し、標準蛋白の検量線から総（硫安画分）蛋白量を推定した。

イソプレン発生量は、4mlガラスバイアルに粗抽出液ないしは100℃で煮沸処理した粗酵素液を100μl入れ、次いで0.5M MgCl₂溶液を2μl、0.2M DMAPP溶液を5μl加え、セプタム付きスクリーキャップをしっかりと締めたあと、ゆるやかに振とう攪拌し40℃恒温槽にセットした。0.5時間、1時間、2時間後に、ガスタイトシリンジでHeadspace気層を0.5~2mlサンプリングしガスクロマトグラフ（商品名：GC-FID6890、Agilent社製）を用いてイソプレン発生量を測定した。粗酵素での0.5時間、1時間、2時間後の発生量は、それぞれの測定値から100℃で煮沸処理した粗酵素液の測定値を引いて求めた。1時間あたりのイソプレン発生量からTotal蛋白1mgあたりの酵素活性（比活性）を求めた。なお、イソプレン発生量の測定は、イソプレンシンターゼの基質であるDMAPPの量を一定に行った。

その結果、ムクナが総タンパク質量あたりのイソプレン発生量に優れることが明らかとなった（図2、表1）。以上より、ムクナがイソプレン生産能に優れることが示された。

[0069]

[表1]

表1. 総タンパク質量あたりのイソプレネン発生量 (クズ対比指数)

	0時間*	0.5時間*	1時間*	2時間*	比活性指数 (クズを1とする)
ムクナ1	0	16.947	61.895	160.632	16.87842808
ムクナ2	0	0	183.587	449.514	47.23274141
モミジバフウ	0	0	22.063	46.132	4.847325838
シダレヤナギ	0	0	9.756	24.39	2.562782389
ギンコウバイ	0	0	0	27.451	2.884417358
クズ	0	0	6.662	9.517	1

*単位は $\mu\text{g isoprene}/\text{mg protein}$

[0070] 実施例2: ムクナ由来イソプレネンシンターゼ遺伝子のクローニング

2-1) サンプルング時間の検討

40℃の温度下で1, 2, 3, 5時間光照射したムクナの葉が放出するイソプレネンをサンプルングし、後述するガスクロマトグラフィーにてイソプレネン生産量を定量したところ、それぞれ4, 8, 12, 10 $\mu\text{g isoprene}/\text{g DW leaf}$ のイソプレネンの生産が確認され、最適な光照射時間は、3時間であることが確認された。

[0071] 2-2) Total RNA溶解液の抽出

以下の手順でムクナの葉からTotal RNA溶解液を抽出した。

(1) 40℃の温度下で3時間光照射したムクナの葉をサンプルングした。

(2) 葉組織100mgを液体窒素ですばやく凍結しながら乳鉢で粉碎した後、RNaseフリーの2mlエッペンドルフチューブに液体窒素ごと分注し、液体窒素を気化させた。

(3) このエッペンドルフチューブに、RNeasy Plant Kit (キアゲン社製) に備え付けの溶解バッファーRLT (2-メルカプトエタノール含有) を450 μl 添加し、ボルテックスで激しく混和し、葉組織溶解物を得た。

(4) この葉組織溶解物をRNeasy Plant Kit に備え付けのQIAshredder スピンカラムにかけ、15000 rpm、2分間、

遠心分離を行った。

(5) カラム濾液の上清のみを、RNaseフリーの新たな2mlエッペンドルフチューブに分注した後、このカラム濾液上清の1/2容量の特級エタノールを添加し、ピペッティングにより混和し、約650 μ lの溶液を得た。

(6) この溶液をRNeasy Plant Kitに備え付けのRNeasyスピンカラムにかけ、10000rpm、15秒間、遠心分離を行い、濾液を捨てた。

(7) このRNeasyスピンカラムに、RNeasy Plant Kitに備え付けのRW1バッファ700 μ lを添加し、10000rpm、15秒間、遠心分離を行い、濾液を捨てた。

(8) このRNeasyスピンカラムに、RNeasy Plant Kitに備え付けのBPEバッファ500 μ lを添加し、10000rpm、15秒間、遠心分離を行い、濾液を捨てた。

(9) このRNeasyスピンカラムに、再度、BPEバッファ500 μ lを添加し、10000rpm、2分間、遠心分離を行い、濾液を捨てた。

(10) このRNeasyスピンカラムを、RNeasy Plant Kitに備え付けの2ml回収用チューブにセットし、15000rpm、1分間、遠心分離を行い、濾液を捨てた。

(11) このRNeasyスピンカラムを、RNeasy Plant Kitに備え付けの1.5ml回収用チューブにセットした。

(12) ピペットマンを用いて、このRNeasyスピンカラムに、RNeasy Plant Kitに備え付けのRNaseフリーの蒸留水を、RNeasyスピンカラムの膜に直接添加し、10000rpm、1分間、遠心分離を行い、Total RNAを回収した。このステップを2回繰り返す、約100 μ lのTotal RNAを得た。

[0072] 2-3) ムクナ由来イソプレニンターゼ遺伝子の塩基配列の解析

抽出したTotal RNA溶解液について、バイオアナライザ（アジレ

ント・テクノロジー社)のRNA用nanoチップを用いて、RNAの品質チェックを行い、溶解液中にゲノムDNAの混入がなく、溶解液中のRNAが分解していないことを確認した。

このTotal RNAを、逆転写酵素を用いて二本鎖化した後、ネブラライザーを用いて断片化した。3'末端にpoly A配列を有する198179個の断片の塩基配列を、454 Titanium FLX高速シーケンサー(ロッシュアプライドサイエンス社製)を用いて解析した。得られた断片配列において、重複する配列を連結し、13485個のコンティグ配列を得た。これらコンティグ配列に対して、BLAST検索を行ったところ、登録されている既知の葛及びポプラのイソプレニンターゼ遺伝子配列と相同性(塩基配列の同一性)を有する6個のコンティグ配列が抽出された。更に配列を詳細に解析したところ、この6個のコンティグ配列のうち3個は、同一の遺伝子由来のものであることが分かり、ムクナ由来イソプレニンターゼ遺伝子の部分配列が得られた。この部分配列に基づき、5' RACEを行い、配列番号1で表されるムクナ由来イソプレニンターゼ遺伝子の完全長の塩基配列を得た。

[0073] 実施例3：各植物種由来イソプレニンターゼの発現プラスミドの調製

3-1) *Pueraria montana* var. *lobata* (葛)
由来イソプレニンターゼの化学合成

P. montana var. *lobata*由来、イソプレニンターゼの塩基配列、及びアミノ酸配列は既に知られている(ACCESSION: AAQ84170: *P. montana* var. *lobata* (葛) *isoprene synthase* (IspS))。 *P. montana* 由来IspSタンパク質のアミノ酸配列、及び遺伝子の塩基配列を配列番号3、及び配列番号4にそれぞれ示す。IspS遺伝子を、*E. coli*で効率的に発現させる為に *E. coli* のコドン使用頻度に最適化し、更に葉緑体移行シグナルが切断されたIspS遺伝子を設計し、これをIspSKと名付けた。IspSKの塩基配列を配列番号5に示す。IspSK遺伝子は

化学合成された後、pUC57 (GenScript 社製) にクローニングされ、得られたプラスミドを pUC57-IspSK と名付けた。

[0074] 3-2) *Populus alba* x *Populus tremula*
(ポプラ) 由来イソプレニンターゼの化学合成

P. alba x *P. tremula* 由来、イソプレニンターゼの塩基配列、及びアミノ酸配列は既に知られている (ACCESSION: CAC35696: *P. alba* x *P. tremula* (ポプラ) isoprene synthase)。 *P. alba* x *P. tremula* 由来 IspS タンパク質のアミノ酸配列、及び遺伝子の塩基配列を配列番号 6、及び配列番号 7 にそれぞれ示す。この塩基配列を基に、前記と同様に、*E. coli* のコドン使用頻度に最適化し、更に葉緑体移行シグナルが切断された IspS 遺伝子を設計し、これを IspSP と名付けた。IspSP の塩基配列を配列番号 8 に示す。IspSP 遺伝子は化学合成された後、pUC57 (GenScript 社製) にクローニングされ、得られたプラスミドを pUC57-IspSP と名付けた。

[0075] 3-3) *Mucuna pururiens* (ムクナ) 由来イソプレニンターゼの化学合成

M. pururiens 由来イソプレニンターゼの塩基配列を基に、前記と同様に、*E. coli* のコドン使用頻度に最適化された IspS 遺伝子を設計し、葉緑体移行シグナルが付与されたものを IspSM (L) と名付け、葉緑体移行シグナルを切断したものを IspSM と名付けた。IspSM (L) の塩基配列を配列番号 9 に、IspSM の塩基配列を配列番号 10 に示す。IspSM 遺伝子と IspSM (L) 遺伝子は、それぞれ化学合成された後、pUC57 (GenScript 社製) にクローニングされ、得られたプラスミドを pUC57-IspSM と pUC57-IspSM (L) と名付けた。

[0076] 3-4) 発現用プラスミド pSTV28-Ptac-Ttrp の構築

E. coli で各植物種由来 IspS を発現させる為の発現用プラスミド

pSTV28-Ptac-Ttrpを構築した。始めに、tacプロモーター（同意語：Ptac）領域（deBoer, et al., (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 80, 21-25）及びE. coli由来トリプトファンオペロンのターミネーター（同意語Ttrp）領域（Wu et al., (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 75, 5442-5446）を含み、5'末端にKpnIサイト、3'末端にBamHIサイトを有するDNA断片（Ptac-Ttrp）を化学合成した（Ptac-Ttrpの塩基配列を配列番号11に示す）。得られたPtac-TtrpのDNA断片をKpnI、及びBamHIにて消化処理し、同様にKpnI、及びBamHIで消化処理したpSTV28（タカラバイオ社製）とをDNA Ligaseによるライゲーション反応によって連結した。得られたプラスミドをpSTV28-Ptac-Ttrpと名付けた（塩基配列を配列番号12に示す）。本プラスミドは、Ptac下流にIspS遺伝子をクローニングすることで、IspS遺伝子の発現増幅が可能となる。

[0077] 3-5) 各植物種由来IspS遺伝子発現用プラスミドの構築

E. coliでIspSK遺伝子、IspSP遺伝子、IspSM遺伝子、及びIspSM(L)遺伝子を発現させる為のプラスミドは次の手順で構築した。pUC57-IspSKを鋳型として、配列番号13と配列番号14の塩基配列からなる合成オリゴヌクレオチド、pUC57-IspSPを鋳型として、配列番号15と配列番号16の塩基配列からなる合成オリゴヌクレオチド、pUC57-IspSMを鋳型として、配列番号17と配列番号18の塩基配列からなる合成オリゴヌクレオチド、更にはpUC57-IspSM(L)を鋳型として、配列番号19と配列番号20の塩基配列からなる合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして、Prime Starポリメラーゼ（タカラバイオ社製）を用いてPCRを行った。反応溶液はキットに添付された組成に従って調整し、98℃にて10秒、54℃にて20秒、68℃にて120秒の反応を40サイクル行った。その結果、IspSK遺伝

子、I s p S P 遺伝子、I s p S M 遺伝子、及び I s p S M (L) 遺伝子を含む、P C R 産物を取得した。同様に、p S T V 2 8 - P t a c - T t r p を、配列番号 2 1 と配列番号 2 2 の塩基配列からなる合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして、P r i m e S t a r ポリメラーゼ（タカラバイオ社製）を用いて P C R を行った。反応溶液はキットに添付された組成に従って調整し、9 8 °C にて 1 0 秒、5 4 °C にて 2 0 秒、6 8 °C にて 2 1 0 秒の反応を 4 0 サイクル行った。その結果、p S T V 2 8 - P t a c - T t r p を含む、P C R 産物を取得した。その後、精製された I s p S K 遺伝子、I s p S P 遺伝子、I s p S M 遺伝子、及び I s p S M (L) 遺伝子遺伝子断片と、p S T V 2 8 - P t a c - T t r p の P C R 産物を、I n - F u s i o n H D C l o n i n g K i t (C l o n t e c h 社製) を用いて連結した。得られた I s p S K 遺伝子発現用プラスミドを p S T V 2 8 - P t a c - I s p S K、I s p S P 遺伝子発現用プラスミドを p S T V 2 8 - P t a c - I s p S P、I s p S M 遺伝子発現用プラスミドを p S T V 2 8 - P t a c - I s p S M、I s p S M (L) 遺伝子発現用プラスミドを p S T V 2 8 - P t a c - I s p S M (L) と命名した。

[0078]

[表2]

表2. 各植物種由来 I s p S 遺伝子発現用プラスミドの構築に利用したプライマー配列

増幅対象	配列名称	配列 (5' -)
IspSK	Ptac-IspS (K) F	GATAACAATTTACACAATAATTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATAA TGTGTGCGACCTCTTCTCAATTTACTCAG (配列番号 1 3)
IspSK	IspS (K) R-MCSR	ACGGCCAGTGAATTCTTAGACATACATCAGCTGGTTAATCGG (配列番号 1 4)
IspSP	Ptac-IspS (P) F	GATAACAATTTACACAATAATTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATAA TGTGCTCTGTTTCTACCGAGAACGTTTCC (配列番号 1 5)
IspSP	IspS (P) R-MCSR	ACGGCCAGTGAATTCTTAACGTTTGAACGGCAGAATCGGTTCCG (配列番号 1 6)
IspSM	Ptac-IspS (M) F	GATAACAATTTACACAATAATTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATAA TGTCCGCCGTTTCAAGCCA (配列番号 1 7)
IspSM	IspS (M) R-MCSR	ACGGCCAGTGAATTCTTAGTTAATCGGGAACGGGT (配列番号 1 8)
IspSM (L)	Ptac-IspS (M (L)) F	GATAACAATTTACACAATAATTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATAA TGGCTACCAACCCGTCCTGTCTGTCAACC (配列番号 1 9)
IspSM (L)	IspS (M (L)) R-MCSR	ACGGCCAGTGAATTCTCAGTTAATCGGGAACGGGT (配列番号 2 0)
pSTV28-Ptac-Ttrp	pSTV28-F	GTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCC (配列番号 2 1)
pSTV28-Ptac-Ttrp	pSTV28-R	GAATTCACCTGGCCGTCGTTTTACAACG (配列番号 2 2)

[0079] 実施例4 : E. coli 由来粗酵素抽出液を用いた各植物種由来イソプレシンターゼの酵素活性測定

4-1) イソプレシン生産能を有するE. coli MG1655株の構築

E. coli MG1655株 (ATCC700926) のコンピテントセルを調整後、エレクトロポレーション法により pSTV28-Ptac-Ttrp、pSTV28-Ptac-IspSK、pSTV28-Ptac-IspSP、pSTV28-Ptac-IspSM、更に pSTV28-Ptac-IspSM (L) を導入し、60 (mg/L) のクロラムフェニコールを含むLBプレートに均一に塗布し、37℃にて18時間培養した。その後、得られたプレートから、クロラムフェニコール耐性を示す形質転換体を取得した。E. coli MG1655株に pSTV28-Ptac-Ttrp が導入された株をMG1655/pSTV28-Ptac-Ttrp株、pSTV28-Ptac-IspSKが導入された株をMG1655

／pSTV28-Ptac-IspSK株、pSTV28-Ptac-IspSPが導入された株をMG1655／pSTV28-Ptac-IspSP株、pSTV28-Ptac-IspSMが導入された株をMG1655／pSTV28-Ptac-IspSM株、更にpSTV28-Ptac-IspSM(L)が導入された株をMG1655／pSTV28-Ptac-IspSM(L)株と命名した。

[0080] 4-2) 粗酵素抽出液の調製方法

MG1655／pSTV28-Ptac-Ttrp株、MG1655／pSTV28-Ptac-IspSK株、MG1655／pSTV28-Ptac-IspSP株、MG1655／pSTV28-Ptac-IspSM株、及びMG1655／pSTV28-Ptac-IspSM(L)株を、60(mg/L)のクロラムフェニコールを含むLBプレートに均一に塗布し、37℃にて18時間培養した。得られたプレートから、1/6プレート分の菌体を60(mg/L)のクロラムフェニコールを含むLB20mlを張り込んだ坂口フラスコに接種し、37℃にて6時間培養した。培養液より菌体を5000rpm、4℃、5分の条件で遠心分離し、氷冷したイソプレシンターゼバッファー(50mM Tris-HCl(pH8.0)・20mM MgCl₂・5%グリセロール)にて2回洗浄した。洗浄菌体を同バッファー1.8mlに懸濁した。2ml容のマルチビーズショッカー専用チューブに約0.9mlの破碎用ビーズ(YBG01, 直径0.1mm)と菌体懸濁液0.9mlを入れ、安井器械製マルチビーズショッカー(MB701(S)型)にて2500rpm、4℃、30秒ON・30秒OFFを3サイクルの条件で菌体を破碎した。破碎後チューブを20000g、4℃、20分の条件で遠心し、上清を粗酵素抽出液とした。

[0081] 4-3) イソプレシンターゼ活性の測定

MG1655／pSTV28-Ptac-Ttrp株、MG1655／pSTV28-Ptac-IspSK株、MG1655／pSTV28-Ptac-IspSP株、MG1655／pSTV28-Ptac-IspSM

株、MG1655/pSTV28-Ptac-IspSM(L)株の粗酵素抽出液（総タンパク量として2mgを含む量）とイソプレンバッファーを合わせて0.5mlをヘッドスペースバイアル（Perkin Elmer社製 22mL CLEAR CRIMP TOP VIAL cat#B0104236）に入れ、0.5M $MgCl_2$ 溶液0.025mlと0.2M DMAPP（cayman製, Catalog No. 63180）溶液0.01mlを加えて軽く攪拌した後、すぐにヘッドスペースバイアル用キャップブチルゴムセプタム付（Perkin Elmer社製CRIMPS cat#B0104240）にて密栓、37℃にて2時間保温した。

反応終了後、バイアルのヘッドスペース中のイソプレン濃度をガスクロマトグラフィーにより測定した。以下にガスクロマトグラフィーの分析条件を記載する。

[0082] Headspace Sampler (Perkin Elmer社製 Turbo Matrix 40)

バイアル保温温度 40℃

バイアル保温時間 30min

加圧時間 3.0min

注入時間 0.02min

ニードル温度 70℃

トランスファー温度 80℃

キャリアガス圧力（高純度ヘリウム） 124kPa

[0083] ガスクロマトグラフィー（島津社製 GC-2010 Plus AF）

カラム（Rxi（登録商標）-1ms：長さ30m、内径0.53mm、液相膜厚1.5 μ m cat#13370）

カラム温度 37℃

圧力 24.8kPa

カラム流量 5mL/min

流入方法 スプリット 1:0（実測1:18）

トランスファー流量 90 mL

GC注入量 1.8 mL (トランスファー流量×注入時間)

カラムへの試料注入量 0.1 mL

注入口温度 250℃

検出機 FID (水素 40 mL/min、空気 400 mL/min、メ
イクアップガス ヘリウム 30 mL/min)

検出器温度 250℃

[0084] イソプレン標準試料の調整

試薬イソプレン (比重0.681) を冷却したメタノールで10、100、1000、10000、100000倍希釈し、添加用標準溶液を調整した。その後、水1 mLを入れたヘッドスペースバイアルに各添加用標準溶液を、それぞれ1 μ L 添加し、標準試料とした。

[0085] 表3に各菌株の反応2時間後のイソプレン生成量を記載した。

[0086] [表3]

表3. 反応2時間後のイソプレン生成量

菌株名	イソプレン生成量 (mg/L)
MG1655/pSTV28-Ptac-Ttrp	0.10 $\pm$ 0.01
MG1655/pSTV28-Ptac-IspSK	0.45 $\pm$ 0.02
MG1655/pSTV28-Ptac-IspSM	28.93 $\pm$ 6.04
MG1655/pSTV28-Ptac-IspSM (L)	5.06 $\pm$ 0.13
MG1655/pSTV28-Ptac-IspSP	0.10 $\pm$ 0.01

[0087] 表3の結果から、イソプレン生成量の高い順に、MG1655/pSTV28-Ptac-IspSM株MG1655/pSTV28-Ptac-IspSM (L) 株、MG1655/pSTV28-Ptac-IspSK株となり、MG1655/pSTV28-Ptac-IspSP株とMG1655/pSTV28-Ptac-Ttrp株はほぼ同等の値となった。上記の結果から、ムクナ由来イソプレンシンターゼを導入した株の粗酵素抽出液が最も高いイソプレン生成活性を示した。

[0088] 実施例5 : E. coli MG1655株における、各植物種由来イソプレンシンターゼの導入効果

実施例4の粗酵素活性の結果から、葉緑体移行シグナルを欠失したムクナ由来のイソプレニンターゼで最も高い活性が確認された。その為、葉緑体移行シグナルを欠失した全てのイソプレニンターゼ導入株について、グルコースからのイソプレニン生産能を比較した。MG1655/pSTV28-Ptac-Ttrp株、MG1655/pSTV28-Ptac-IspSK株、MG1655/pSTV28-Ptac-IspSP株、及びMG1655/pSTV28-Ptac-IspSM株を、60 (mg/L) のクロラムフェニコールを含むLBプレートに均一に塗布し、37℃にて18時間培養した。得られたプレートから、1白金耳分の菌体を、ヘッドスペースバイアル中のM9グルコース培地1 mLに接種し、ヘッドスペースバイアル用キャップブチルゴムセプタム付 (Perkin Elmer社製CRIMP SCat #B0104240) で密栓後、往復振とう培養装置 (120 rpm) で、30℃にて24時間培養を行った。M9グルコース培地の組成は表4に記載のとおりである。

[0089] [表4]

表4. M9 グルコース培地組成

Glucose	1.0 g/L
Na ₂ HPO ₄	6.0 g/L
KH ₂ PO ₄	3.0 g/L
NaCl	0.5 g/L
NH ₄ Cl	1.0 g/L
1 M MgSO ₄ (オートクレーブ済)	1.0 ml
1 M CaCl ₂ (オートクレーブ済)	0.1 ml

更にクロラムフェニコールが終濃度60 (mg/L)になるように添加した。1Lに調整後、濾過滅菌を行った。

[0090] 培養終了後、バイアルのヘッドスペース中のイソプレニン濃度をガスクロマトグラフィーにより測定した。また、OD値は分光光度計 (HITACHI U-2900) によって600 nmで測定した。表5に各菌株の培養終了時のイソプレニン濃度とOD値を記載した。

[0091]

[表5]

表5. MG1655/pSTV28-Ptac-Ttrp株、MG1655/pSTV28-Ptac-IspSK株、MG1655/pSTV28-Ptac-IspSP株、及びMG1655/pSTV28-Ptac-IspSM株の培養終了時における、イソプレレン生産量 ($\mu\text{g/L}$) とOD値

菌株名	OD値	イソプレレン生産量 ($\mu\text{g/L}$)
MG1655/pSTV28-Ptac-Ttrp	1.68 $\pm$ 0.04	ND
MG1655/pSTV28-Ptac-IspSK	1.60 $\pm$ 0.09	43 $\pm$ 6
MG1655/pSTV28-Ptac-IspSM	1.45 $\pm$ 0.03	56 $\pm$ 7
MG1655/pSTV28-Ptac-IspSP	1.59 $\pm$ 0.07	26 $\pm$ 3

[0092] 表5の結果から、イソプレレン生産量は高い順に、MG1655/pSTV28-Ptac-IspSM株、MG1655/pSTV28-Ptac-IspSK株、MG1655/pSTV28-Ptac-IspSP株、そしてMG1655/pSTV28-Ptac-Ttrp株となった。上記の結果から、野生株では、ムクナ由来イソプレレンシンターゼを導入した株が最も高いイソプレレン生産能を示した。

[0093] 実施例6：MEP（メチルエリスリトール）経路を強化した*E. coli* MG1655株における、各植物種由来イソプレレンシンターゼの導入効果
6-1) *dxs* 遺伝子発現用プラスミド (pMW219-*dxs*) の構築
イソプレレンシンターゼを導入した*E. coli*でMEP経路を構成する*dxs* 遺伝子 (1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase) の発現強化を行うと、イソプレレン生成量が向上する事が既に報告されている (Appl. Microbiol. Biotechnol., (2011) 90, 1915-1922)。そこで、*dxs* 遺伝子の発現を強化した株においても、イソプレレンシンターゼの由来の違いで、イソプレレン生産能に相違が生じるかを確認した。*E. coli* K-12株のゲノムの全塩基配列 (Genbank Accession No. U00096) は既に明らかにされている (Science, (1997) 277, 1453-1474)。遺伝子増幅を行うためにpMW219 (ニッポンジーン社製) を用いた。本プラスミドは、マルチクローニングサイトに目的遺伝子を導入する事で、イソプロピルー β -チオガラクトピラノシド (

I P T G) を添加時に目的遺伝子の発現量を増加させる事が出来る。E. coli のゲノム配列の *dxs* 遺伝子の塩基配列 (Gene ID: 945060 Locus tag b0420) に基づいて、配列番号 23 と配列番号 24 の塩基配列からなる合成オリゴヌクレオチドを合成した。その後、E. coli MG1655 株のゲノムを鋳型として、配列番号 23 と配列番号 24 の塩基配列からなる合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして、Prime Star ポリメラーゼ (タカラバイオ社製) を用いて PCR を行った。反応溶液はキットに添付された組成に従って調整し、98℃にて 10 秒、54℃にて 20 秒、68℃にて 120 秒の反応を 40 サイクル行った。その結果、*dxs* 遺伝子を含む、PCR 産物を取得した。同様に、pMW219 を鋳型として、配列番号 25 と配列番号 26 の塩基配列からなる合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして、Prime Star ポリメラーゼ (タカラバイオ社製) を用いて PCR を行った。反応溶液はキットに添付された組成に従って調整し、98℃にて 10 秒、54℃にて 20 秒、68℃にて 240 秒の反応を 40 サイクル行った。その結果、pMW219 を含む、PCR 産物を取得した。その後、精製された *dxs* 遺伝子断片と、pMW219 の PCR 産物を、In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech 社製) を用いて連結した。得られた *dxs* 遺伝子発現用プラスミドを pMW219-*dxs* と命名した。

[0094] [表6]

表 6. *dxs* 遺伝子発現用プラスミドの構築に利用したプライマー配列

配列名称	配列 (5' -)
<i>dxs</i> -F	CAGGAACAGCTATGAGTTTTGATATTGCCAAATACCCGAC (配列番号 23)
<i>dxs</i> -R	GCTGCCACTCCTGCTATACTCGTCATAC (配列番号 24)
pMW219-F	CATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATC (配列番号 25)
pMW219-R	AGCAGGAGTGGCAGCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGAT (配列番号 26)

[0095] 6-2) イソプレレン生産能を有する E. coli MG1655 株への pMW219-*dxs* の導入

MG1655 / pSTV28-Ptac-Ttrp 株、MG1655 / pSTV28-Ptac-IspSK 株、MG1655 / pSTV28-Pt

a c - l s p S M株、更にMG1655 / p S T V 2 8 - P t a c - l s p S P株のコンピテントセルを調整後、エレクトロポレーション法によりpMW219-dxsを導入し、60 (mg/L) のクロラムフェニコールと50 (mg/L) のカナマイシン塩酸塩を含むLBプレートに均一に塗布し、37℃にて18時間培養した。得られたプレートから、クロラムフェニコールとカナマイシンに耐性を示す形質転換体を取得した。MG1655 / p S T V 2 8 - P t a c - T t r p株、MG1655 / p S T V 2 8 - P t a c - l s p S K株、MG1655 / p S T V 2 8 - P t a c - l s p S M株、更にMG1655 / p S T V 2 8 - P t a c - l s p S P株にpMW219-dxsがそれぞれ導入された株をMG1655 / p S T V 2 8 - P t a c - T t r p / pMW219-dxs株、MG1655 / p S T V 2 8 - P t a c - l s p S K / pMW219-dxs株、MG1655 / p S T V 2 8 - P t a c - l s p S M / pMW219-dxs、更にMG1655 / p S T V 2 8 - P t a c - l s p S P / pMW219-dxsと命名した。

[0096] 6-3) DXSの発現を強化したE. coli MG1655株における、各植物種由来イソプレニンターゼの導入効果

MG1655 / p S T V 2 8 - P t a c - T t r p / pMW219-dxs株、MG1655 / p S T V 2 8 - P t a c - l s p S K / pMW219-dxs株、MG1655 / p S T V 2 8 - P t a c - l s p S M / pMW219-dxs株、更にMG1655 / p S T V 2 8 - P t a c - l s p S P / pMW219-dxs株を、60 (mg/L) のクロラムフェニコールと50 (mg/L) のカナマイシン塩酸塩を含むLBプレートに均一に塗布し、37℃にて18時間培養した。その後、実施例5に記載したヘッドスペースバイアルでの培養評価を実施した。培養終了時のイソpren生産量 (μ g/L) とOD値を表7に記載した。

[0097]

[表7]

表7. DXSが強化された*E. coli* MG1655株を宿主として、各種イソプレニンターゼを強化した株の培養終了時におけるイソpren生産量 ($\mu\text{g/L}$) とOD値

菌株名	OD値	イソpren生産量 ($\mu\text{g/L}$)
MG1655/pSTV28- <i>Ptac</i> - <i>Ttrp</i> /pMW219- <i>dxs</i>	1.46 $\pm$ 0.04	ND
MG1655/pSTV28- <i>Ptac</i> - <i>IspSK</i> /pMW219- <i>dxs</i>	1.13 $\pm$ 0.02	101 $\pm$ 28
MG1655/pSTV28- <i>Ptac</i> - <i>IspSM</i> /pMW219- <i>dxs</i>	1.76 $\pm$ 0.06	126 $\pm$ 23
MG1655/pSTV28- <i>Ptac</i> - <i>IspSP</i> /pMW219- <i>dxs</i>	2.21 $\pm$ 0.12	42 $\pm$ 17

[0098] 表7の結果から、イソpren生産量が高い順に、MG1655/pSTV28-*Ptac*-*IspSM*/pMW219-*dxs*株、MG1655/pSTV28-*Ptac*-*IspSK*/pMW219-*dxs*株、MG1655/pSTV28-*Ptac*-*IspSP*/pMW219-*dxs*株、そしてMG1655/pSTV28-*Ptac*-*Ttrp*/pMW219-*dxs*株となった。上記の結果から、MEP経路強化株においても、ムクナ由来イソprenシンターゼを導入した株が最も高いイソpren生産能を示した。

[0099] 実施例7: MVA (メバロン酸) 経路を導入した*E. coli* MG1655株における、各植物種由来イソprenシンターゼの導入効果

7-1) 酵母由来のメバロン酸経路下流遺伝子のクローニング

メバロン酸経路の下流領域は*Saccharomyces cerevisiae*より取得した (WO2009076676, *Saccharomyces Genome database* <http://www.yeastgenome.org/#NucleicAcidsRes>, Jan 2012; 40:D700-D705) *S. cerevisiae*のゲノムDNAを鋳型とし、メバロン酸キナーゼをコードするERG12遺伝子、ホスホメバロン酸キナーゼをコードするERG8遺伝子、ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼをコードするERG19遺伝子、イソペンテニルニリン酸デルタイソメラーゼをコードするIDI1遺伝子を次に示すプライマーを用いたPCR反応により増幅した (表8)。PCR酵素にはタカラバイオ社より販売されているPrimeSTAR MAX Premixを利用し、98℃、2分、(98℃、10秒、55℃、5秒、72℃、5秒

／k b) × 30 サイクルの条件で反応を行った。PCR断片は制限酵素 Sma I で処理した pSTV28-Ptac-Ttrp ベクター (配列番号 12) に i n - f u s i o n クローニング法にて挿入し、クローニングと発現ベクター構築を行った。E. coli DH5α に形質転換を行い、各遺伝子の想定配列長を有するクローンを選抜した後、定法に従いプラスミド抽出を行い、シーケンスを確認した。これら増幅した遺伝子の塩基配列、およびその遺伝子がコードする酵素のアミノ酸配列は Saccharomyces Genome database <http://www.yeastgenome.org/#> にて取得可能である。

[0100] [表8]

表 8. メバロン酸経路下流遺伝子のクローニングに利用したプライマー配列

増幅遺伝子	配列名称	配列 (5' -)
ERG12	MVK-IFS_5742-33-1	ACACAAGGAGACTCCCATGTCATTACCGTTCTTAACCTCT (配列番号 27)
ERG12	MVK-IFA_5742-33-2	GGAAGTGGCGGCTCCCGGGTTATTATGAAGTCCATGGTAAATTCGT (配列番号 28)
ERG8	PMK-IFS_5742-33-3	ACACAAGGAGACTCCCATGTCAGAGTTGAGAGCCTTCA (配列番号 29)
ERG8	PMK-IFA_5742-33-4	GGAAGTGGCGGCTCCCGGGTTATTATTTATCAAGATAAGTTTCCGG (配列番号 30)
ERG19	MVD-IFS_5742-33-5	ACACAAGGAGACTCCCATGACCGTTTACACAGCATCC (配列番号 31)
ERG19	MVD-IFA_5742-33-6	GGAAGTGGCGGCTCCCGGGTTATTATTCCTTTGGTAGACCAGTCTT (配列番号 32)
IDI1	yIDI-IFS_5742-33-7	ACACAAGGAGACTCCCATGCCCCATGGTGCAGTATC (配列番号 33)
IDI1	yIDI-IFA_5742-33-8	GGAAGTGGCGGCTCCCGGGTTATTATAGCATTCTATGAATTTGCCGT GTC (配列番号 34)

[0101] 7-2) メバロン酸経路下流の人工オペロンの構築

メバロン酸キナーゼとホスホメバロン酸キナーゼを直鎖状に並べた配列の構築を、I n - f u s i o n クローニング法にて行った。Saccharomyces cerevisiae のゲノム DNA を鋳型とし、メバロン酸キナーゼをコードする ERG12 遺伝子、ホスホメバロン酸キナーゼをコードする ERG8 遺伝子を表 9 に示すプライマーを用いた PCR 法により増幅した。PCR 酵素には東洋紡より販売されている KOD plus を利用し

、94℃、2分、（94℃、15秒、45℃、30秒、68℃、1分／kb）×30サイクル、68℃、10分の条件で反応を行った。PCR断片は制限酵素SmaIで処理したpUC118ベクターにinfusionクローニング法にて挿入し、クローニングと発現ベクター構築を行った。E. coli JM109に形質転換を行い、各遺伝子の想定配列長を有するクローンを選抜した後、定法に従いプラスミド抽出を行い、シーケンスを確認した。作成したプラスミドをpUC-mvk-pmkと名付けた。pUC-mvk-pmkの塩基配列を配列番号35に示す。

[0102] [表9]

表9. メバロン酸キナーゼ、ホスホメバロン酸キナーゼの連結に利用したプライマー配列

増幅遺伝子	配列名称	配列 (5' -)
ERG12	KKS1-6038-2-1	TCGAGCTCGGTACCCATGTCATTACCGTTCTTAAGTCTCT (配列番号36)
ERG12	KKA1-6038-2-2	TTAAGGGTGCAGGCCTATCGCAAATTAGCTTATGAAGTCCATGGTAAATT CGT (配列番号37)
ERG8	KKS2-6083-2-3	GGCCTGCACCCCTTAAGGAGGAAAAAACATGTCAGAGTTGAGAGCCTTCA (配列番号38)
ERG8	KKA2-6083-2-4	CTCTAGAGGATCCCCTTATTTATCAAGATAAGTTTCCGG (配列番号39)

[0103] ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼとイソペンテニルニリン酸デルタイソメラーゼを直鎖状に並べた配列の構築を、Infusionクローニング法にて行った。Saccharomyces cerevisiaeのゲノムDNAを鋳型とし、ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼをコードするERG19遺伝子、イソペンテニルニリン酸デルタイソメラーゼをコードするIDI1遺伝子を表10に示すプライマーを用いたPCR法により増幅した。PCR酵素には東洋紡より販売されているKOD plusを利用し、94℃、2分、（94℃、15秒、45℃、30秒、68℃、1分／kb）×30サイクル、68℃、10分の条件で反応を行った。PCR断片は制限酵素SmaIで処理したpTWV228ベクターにinfusionクローニング法にて挿入し、クローニングと発現ベクター構築を行った。E. coli DH5αに形質転換を行い、各遺伝子の想定配列長を有するクローンを選抜した後、定法に従いプラスミド抽出を行い、シーケンスを確認

した。作成したプラスミドを pTWV-dmd-yidi と名付けた。pTWV-dmd-yidi の塩基配列を配列番号 40 に示す。

[0104] [表10]

表 10. ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ、イソペンテニルニリン酸デルタイソメラーゼの連結に利用したプライマー配列

増幅遺伝子	配列名称	配列 (5' -)
ERG19	DyIS1-6083-2-5	TCGAGCTCGGTACCCATGACCGTTACACAGCATCC (配列番号 41)
ERG19	DyIA1-6083-2-6	TTTTTTACCTCCTAAGGGCGATGCAGCGAATTGATCTTATTCCTTTGGT AGACCAGTCTT (配列番号 42)
IDI1	DyIS2-6083-2-7	TAGGAGGTAAAAAAAATGACTGCCGACAACAATAGTATGCCCCATGGTG CAGTATC (配列番号 43)
IDI1	DyIA2-6083-2-8	CTCTAGAGGATCCCCTTATAGCATTCTATGAATTTGCCTGTC (配列番号 44)

[0105] メバロン酸キナーゼ、ホスホメバロン酸キナーゼ、ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼとイソペンテニルニリン酸デルタイソメラーゼを直鎖状に並べた配列の構築を、In-fusion クローニング法にて行った。pUC-mvk-pmk を鋳型とし表 11 に示すプライマーを用いてメバロン酸キナーゼとホスホメバロン酸キナーゼ配列を PCR 法により増幅し、pTWV-dmd-yidi を鋳型とし表 11 に示すプライマーを用いてジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼとイソペンテニルニリン酸デルタイソメラーゼを PCR 法により増幅した後、pTrcHis2B ベクターに In-fusion クローニング法にてクローニングを行うことで 4 種の酵素遺伝子を直鎖状に並べた発現プラスミドの構築を行った。PCR 酵素にはタカラバイオ社より販売されている PrimeSTAR HS DNA ポリメラーゼを利用し、98℃、2 分、(98℃、10 秒、52℃、5 秒、72℃、1 分/kb) × 30 サイクル、72℃、10 分の条件で反応を行った。PCR 断片は、制限酵素 NcoI と PstI で処理した pTrcHis2B ベクターに in-fusion クローニング法にて挿入し、発現ベクター構築を行った。E. coli JM109 に形質転換を行い、目的配列長を有するクローンを選抜した後、定法に従いプラスミド抽出を行い、シーケンスを確認した。

。構築した発現ベクターを p T r c - K K D y I (β) と名付けた。p T r c - K K D y I (β) の塩基配列を配列番号 4 5 に示す。

[0106] [表11]

表 1 1 . p T r c - K K D y I (β) 構築に際し酵素遺伝子増幅に利用したプライマー配列

鋳型プラスミド	配列名称	配列 (5' -)
pUC-mvk-pmk	KKDS2_6038-3-2	GAGGAATAAACCATGTCATTACCGTTCTTAAGTTCT (配列番号 4 6)
pUC-mvk-pmk	KKMyIA_6038-2-9	AAGGGCGAATTCTGCATGCAGCTACCTTAAGTTATTTATCAAGAT AAGTTTCCGG (配列番号 4 7)
pTWV-dmd-yidi	KMS_6038-6-1	GCAGAATTCGCCCTTAAGGAGGAAAAAAAAA ATGACCGTTTACACAGCATCC (配列番号 4 8)
pTWV-dmd-yidi	KDyIA_6038-3-3	CCATATGGTACCAGCTGCAGTTATAGCATTCTATGAATTTGCCTG TC (配列番号 4 9)

[0107] 7 - 3) メバロン酸経路下流の染色体固定

メバロン酸キナーゼ、ホスホメバロン酸キナーゼ、ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼとイソペンテニルニリン酸デルタイソメラーゼを直鎖状に並べた配列を染色体上で発現させる事とした。遺伝子の発現にはグルコースイソメラーゼプロモーターを利用し、転写終結には E . c o l i の a s p A 遺伝子の転写終結領域を利用した (W O 2 0 1 0 0 3 1 0 6 2) 。染色体固定部位として T n 7 の転移部位を用いた (M o l Gen Genet . 1 9 8 1 ; 1 8 3 (2) : 3 8 0 - 7) 。染色体固定後の薬剤マーカーとしては c a t 遺伝子を利用した。表 1 2 に示すプライマーを利用して、E . c o l i のゲノムを鋳型とした P C R により染色体固定領域の内、T n 7 下流領域の増幅を行った。P C R 酵素にはタカラバイオ社より販売されている P r i m e S T A R HS DNA ポリメラーゼを利用し、9 8 ° C 、 2 分、 (9 8 ° C 、 1 0 秒、 5 2 ° C 、 5 秒、 7 2 ° C 、 1 分 / k b) × 3 0 サイクル、 7 2 ° C 、 1 0 分 の条件で反応を行った。表 1 2 に示すプライマーを利用して、p M W 1 1 8 - a t t L - C m - a t t R プラスミドを鋳型とした P C R によりスファージアタッチメント部位を含む c a t 遺伝子領域の増幅を行った (W O 2 0 1 0 - 0 2 7 0 2 2) 。P C R 酵素にはタカラバイオ社より販売されている P r i m e S T A R HS DNA ポリメラーゼを利用し、 9 5 ° C

、3分、(95℃、1分、34℃、30秒、72℃、40秒)×2サイクル、(95℃、30秒、50℃、30秒、72℃、40秒)×25サイクル、72℃、5分の条件で反応を行った。表12に示すプライマーを利用して、pTrc-KKdyI(β)を鋳型としたPCRによりプロモータと転写終結領域を付与したメバロン酸経路下流配列(以下KKdyIと略す)の増幅を行った。PCR酵素にはタカラバイオ社より販売されているPrimeSTAR HS DNAポリメラーゼを利用し、98℃、2分、(98℃、10秒、52℃、5秒、72℃、1分/kb)×30サイクル、72℃、10分の条件で反応を行った。これらのPCR産物と、制限酵素SmaIで処理したpMW219を用い、In-Fusionクローニング法によりベクター構築を行った。E. coli JM109に形質転換を行い、目的配列長を有するクローンを選抜した後、定法に従いプラスミド抽出を行い、シーケンスを確認した。得られたプラスミドをpMW219-KKdyI-TaspAと名づけた。pMW219-KKdyI-TaspAの塩基配列を配列番号50に示す。

[0108] 次に、表13に示すプライマーを利用して、E. coliのゲノムを鋳型としたPCRにより染色体固定領域の内、Tn7上流領域の増幅を行った。PCR酵素にはタカラバイオ社より販売されているPrimeSTAR HS DNAポリメラーゼを利用し、98℃、2分、(98℃、10秒、52℃、5秒、72℃、1分/kb)×30サイクル、72℃、10分の条件で反応を行った。PCR産物と、制限酵素SalIで処理したpMW219-KKdyI-TaspAを用い、In-Fusionクローニング法によりベクター構築を行った。E. coli JM109に形質転換を行い、目的配列長を有するクローンを選抜した後、定法に従いプラスミド抽出を行い、シーケンスを確認した。得られたプラスミドをpMW-Tn7-Pgi-KKdyI-TaspA-Tn7と名づけた。構築したプラスミドの配列を配列番号51に示す。

[0109] 続いて、λ-Red法を用いてクロラムフェニコール耐性遺伝子、グルコ

ースイソメラーゼプロモーター、メバロン酸経路下流オペロン、aspA遺伝子転写終結領域を含む領域の染色体固定を行った。染色体固定用の断片は、プラスミドpMW-Tn7-Pgi-KKDyI-TaspA-Tn7を抽出後、制限酵素PvuIとSalIで処理した後、精製することで調整した。E. coli MG1655に温度感受性の複製能を有するプラスミドpKD46を含むE. coli MG1655（以下MG1655/pKD46と表記する）をエレクトロポレーションするために用いた。プラスミドpKD46 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, vol. 97, No. 12, p6640-6645] は、アラビノース誘導性ParaBプロモーターに制御されるλRedシステムの遺伝子（λ、β、exo遺伝子）を含むλファージの合計2154塩基のDNAフラグメント（GenBank/EMBL アクセッション番号 J02459, 第31088番目～33241番目）を含む。エレクトロポレーションの後、クロラムフェニコール耐性を獲得したコロニーを取得した。続いてゲノムDNAを抽出し、表14に示すプライマーを用いたPCRにより目的領域が染色体に固定されていることを確認した。更に、PCR断片の配列を確認することで目的領域の配列を確認した。染色体固定したメバロン酸経路下流とその周辺領域の塩基配列を配列番号52に、構築概要を図3に示す。得られた変異体をMG1655 cat-Pgi-KKDyIと名づけた。

[0110] MG1655 cat-Pgi-KKDyIの薬剤マーカーを以下の手順で除去した。MG1655 cat-Pgi-KKDyIのコンピテントセルを作成後pMW-int-xisを導入した。pMW-int-xisは、λファージのインテグラーゼ（Int）をコードする遺伝子、エキシジョナーゼ（Xis）をコードする遺伝子を搭載し、温度感受性の複製能を有するプラスミドである（WO2007/037460、特開2005-058827）。

[0111] pMW-int-xisの導入により、λファージのアタッチメントサイトであるattL及びattRで挟まれた領域にあるクロラムフェニコール

耐性遺伝子が染色体から脱落する。その結果として、宿主はクロラムフェニコール耐性を失うことが知られている。そこで、得られたコロニーからクロラムフェニコール感受性株を取得した。この後、42度、LB培地で6時間培養の後、LBプレート培地に塗布し、コロニーを出現させた。この中からアンピシリン耐性を失ったクローンを選抜することで、薬剤耐性を除去した。このようにして取得した変異体をMG1655 Pgi-KKdyIと名づけた。

[0112] [表12]

表12. pMW219-KKdyI-TaspA構築に用いたPCR断片作成用プライマー

鋳型DNA	増幅領域	配列名称	配列 (5' -)
E. coli ⁺ /Δ	Tn7下流	Tn7dS_6038-7-1	TCGAGCTCGGTACCCTGTTTTTCCACTCTTCGTTCACTTT (配列番号53)
E. coli ⁺ /Δ	Tn7下流	Tn7dA_6038-7-2	AGGCTTCATTTTAATCAAACATCCTGCCAACTC (配列番号54)
pMW-attL-Cm-attR	attL-cat-attR	Tn7dattLcmS_6038-7-4	ATTAAATGAAGCCTGCTTTTTTAT (配列番号55)
pMW-attL-Cm-attR	attL-cat-attR	PgiattRcmA_6038-7-5	GGCATCGTCAAGGGCCGCTCAAGTTAGTATAA (配列番号56)
pTrec-KKdyI(β)	KKdyI	gil.2-MVK-S_6038-7-6	GCCCTTGACGATGCCACATCCTGAGCAAATAATTCAACCACTAATTGTGAGCGGATAACACAAGGAGGAAACAGCTATGTCATTACCGTTCTTAACCTC (配列番号57)
pTrec-KKdyI(β)	KKdyI	pMW-TaspA-yIDIA_6038-7-7	CTCTAGAGGATCCCCGGCCCCAAGAAAAAAGGCACGTCATCTGACGTGCCTTTTTTATTTGTAGACGCGTTGTTATAGCATTCTATGAATTTGCCT (配列番号58)

[0113] [表13]

表13. pMW-Tn7-Pgi-KKdyI-TaspA-Tn7構築に用いたPCR断片作成用プライマー

鋳型DNA	増幅領域	配列名称	配列 (5' -)
E. coli ⁺ /Δ	Tn7上流	Tn7upSv02_6038-24-1	ATCCTCTAGAGTCGAAAGAAAAATGCCCGCTTACG (配列番号59)
E. coli ⁺ /Δ	Tn7上流	Tn7upAv02_6038-24-2	ATGCCTGCAGGTCGACTGTACAGTCTGGCGAAACCG (配列番号60)

[0114] [表14]

表14. メバロン酸経路下流の染色体固定確認用PCRのプライマー

配列名称	配列 (5' -)
Tn7v02-F_6038-22-5	ACGAACTGCTGTGCAAGGTT (配列番号61)
Tn7v02-R_6038-22-6	GGTGTACGCCAGGTTGTTCT (配列番号62)

[0115] 7-4) 染色体上メバロン酸経路下流のプロモーター置換

染色体上のメバロン酸経路下流オペロンのプロモーターを λ -red法により置換した。PCRの鋳型として、attL-Tet-attR-Ptacを有するゲノム断片を使用した。これは、tacプロモーターとテトラサイクリン耐性薬剤マーカー及び入ファージのアタッチメントサイトであるattL及びattRが並ぶものである。これらの配列を配列番号63に示す。表15に示すプロモーターを用いてPCR断片を調整した。PCR酵素にはタカラバイオ社より販売されているLA-Taqポリメラーゼを利用し、92℃、1分、(92℃、10秒、50℃、20秒、72℃、1分/kb)×40サイクル、72℃、7分の条件で反応を行った。PCR産物を精製し、温度感受性の複製能を有するプラスミドpKD46を含むMG1655 Pgi-KKdyI (以下MG1655 Pgi-KKdyI/pKD46と表記する)をエレクトロポレーションするために用いた。プラスミドpKD46 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, vol. 97, No. 12, p6640-6645]は、アラビノース誘導性ParaBプロモーターに制御される λ Redシステムの遺伝子(λ 、 β 、exo遺伝子)を含む入ファージの合計2154塩基のDNAフラグメント (GenBank/EMBL アクセッション番号 J02459, 第31088番目~33241番目)を含む。プラスミドpKD46はPCR産物をMG1655 Pgi-KKdyIに組み込むために必要である。

[0116] エレクトロポレーション用のコンピテントセルは次のようにして調製した。100mg/Lのアンピシリンを含んだLB培地中で30℃、一晚培養したMG1655 Pgi-KKdyI/pKD46を、アンピシリンとL-アラビノース(1mM)を含んだ5mLのLB培地で100倍希釈した。得られた希釈物を30℃で通気しながらOD600が約0.6になるまで生育させた後、氷冷した10%グリセロール溶液で3回洗浄することによってエレクトロポレーションに使用できるようにした。エレクトロポレーションは50 μ Lのコンピテントセルと約100ngのPCR産物を用いて行った。

。エレクトロポレーション後のセルは1 mLのSOC培地〔モレキュラークロニング：実験室マニュアル第2版、Sambrook, J. ら、Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989年)〕を加えて37℃で1時間培養した後、LB寒天培地上、37℃で平板培養し、クロラムフェニコール耐性組換え体を選択した。次に、pK D 4 6 プラスミドを除去するために、テトラサイクリン入りのLB寒天培地上、37℃で継代し、得られたコロニーのアンピシリン耐性を試験し、pK D 4 6 が脱落しているアンピシリン感受性株を取得した。テトラサイクリン耐性遺伝子によって識別できるtacプロモーター置換を含む変異体を取得した。得られた変異体をMG1655 tet-Ptac-KK Dy I と名づけた。

[0117] 薬剤マーカーを以下の手順で除去した。MG1655 tet-Ptac-KK Dy I のコンピテントセルを作成後pMW-int-xisを導入した。pMW-int-xisは、λファージのインテグラーゼ(Int)をコードする遺伝子、エクシジョナーゼ(Xis)をコードする遺伝子を搭載し、温度感受性の複製能を有するプラスミドである(WO2007/037460、特開2005-058827)。pMW-int-xisの導入により、λファージのアタッチメントサイトであるattL及びattRで挟まれた領域にあるテトラサイクリン耐性遺伝子が染色体から脱落する。その結果として、宿主はテトラサイクリン耐性を失うことが知られている。そこで、得られたコロニーからテトラサイクリン感受性株を取得した。この後、42℃、LB培地で6時間培養の後、LBプレート培地に塗布し、コロニーを出現させた。この中からアンピシリン耐性を失ったクローンを選抜することで、薬剤耐性を除去した。得られた変異体をMG1655 Ptac-KK Dy I と名づけた。染色体上にてtacプロモーターで支配されたメバロン酸経路下流およびその周辺領域の塩基配列を配列番号64に、概要を図4に示す。

[0118]

[表15]

表 15. プロモーター置換のためのPCR断片作成用プライマー

配列名称	配列 (5' -)
APtacKKDyIv03_6038-3 6-5	gataaagtccttcagtcctgatttaaataagcgttgatattcagtcgaattactgaagc ctgccttttttatac (配列番号 65)
SPtacKKDyIv02_6038-3 6-3	tcacccaaaaataataacccttcccggtgcagaagttaagaacggtaatgaCATggc agtctcccttgtgtga (配列番号 66)

[0119] 7-5) MG1655 Ptac-KKDyI株への各植物種由来イソプレ
ンシンターゼの導入

MG1655 Ptac-KKDyI株のコンピテントセルを調整後、エレクトロポレーション法によりpSTV28-Ptac-Ttrp、pSTV28-Ptac-IspSK、pSTV28-Ptac-IspSM、更にpSTV28-Ptac-IspSPを導入し、60 (mg/L)のクロラムフェニコールを含むLBプレートに均一に塗布し、37℃にて18時間培養した。得られたプレートから、クロラムフェニコール耐性を示す形質転換体を取得した。MG1655 Ptac-KKDyI株にpSTV28-Ptac-Ttrpが導入された株をMG1655 Ptac-KKDyI/pSTV28-Ptac-Ttrp株、pSTV28-Ptac-IspSKが導入された株をMG1655 Ptac-KKDyI/pSTV28-Ptac-IspSK株、pSTV28-Ptac-IspSMが導入された株をMG1655 Ptac-KKDyI/pSTV28-Ptac-IspSM株、pSTV28-Ptac-IspSPが導入された株をMG1655 Ptac-KKDyI/pSTV28-Ptac-IspSP株と命名した。

[0120] 7-6) MVA経路を強化したMG1655株における、各植物種由来イソ
プレシンターゼの導入効果

MG1655 Ptac-KKDyI/pSTV28-Ptac-Ttrp株、MG1655 Ptac-KKDyI/pSTV28-Ptac-IspSK株、MG1655 Ptac-KKDyI/pSTV28-Ptac-IspSM株、更にMG1655 Ptac-KKDyI/pSTV2

8-Ptac-IspSP株を、60 (mg/L) のクロラムフェニコールを含むLBプレートに均一に塗布し、37℃にて18時間培養した。得られたプレートから、1白金耳分の菌体を、ヘッドスペースバイアル中 (Perkin Elmer社製 22 mL CLEAR CRIMP TOP VIAL cat #B0104236) のM9グルコース (メバロン酸含有) 培地1 mLに接種し、その後、実施例2に記載した方法に従って、培養評価を実施した。M9グルコース (メバロン酸含有) 培地の組成を表16に記載した。培養終了時のイソプレン生産量とOD値を表17に記載した。

[0121] [表16]

表16. M9グルコース (メバロン酸含有) 培地の組成

Glucose	2.0 g/L
Na ₂ HPO ₄	6.0 g/L
KH ₂ PO ₄	3.0 g/L
NaCl	0.5 g/L
NH ₄ Cl	1.0 g/L
Mevalonic acid (ADEKA社製)	1.0 g/L
1 M MgSO ₄ (オートクレーブ済)	1.0 ml
1 M CaCl ₂ (オートクレーブ済)	0.1 ml
クロラムフェニコールが終濃度60 (mg/L)になるように添加した。1Lに調整後、濾過滅菌を行った。	

[0122] [表17]

表17. MG1655 Ptac-KKDyl/pSTV28-Ptac-Ttrp株、MG1655 Ptac-KKDyl/pSTV28-Ptac-IspSK株、MG1655 Ptac-KKDyl/pSTV28-Ptac-IspSM株、更にMG1655 Ptac-KKDyl/pSTV28-Ptac-IspSP株の培養終了時における、イソプレン生産量 (mg/L) とOD値

菌株名	OD値	イソプレン生産量 (mg/L)
MG1655 Ptac-KKDyl/pSTV28-Ptac-Ttrp	2.08 ± 0.07	0.07 ± 0.01
MG1655 Ptac-KKDyl/pSTV28-Ptac-IspSK	2.48 ± 0.13	30.96 ± 3.04
MG1655 Ptac-KKDyl/pSTV28-Ptac-IspSM	2.48 ± 0.09	57.13 ± 15.00
MG1655 Ptac-KKDyl/pSTV28-Ptac-IspSP	1.95 ± 0.09	0.52 ± 0.01

[0123] 表17の結果から、イソプレン生産量の高い順に、MG1655 Ptac-KKDyl/pSTV28-Ptac-IspSM株、MG1655

P t a c - K K D y I / p S T V 2 8 - P t a c - I s p S K 株、M G 1 6 5 5 P t a c - K K D y I / p S T V 2 8 - P t a c - I s p S P 株、そして M G 1 6 5 5 P t a c - K K D y I / p S T V 2 8 - P t a c - T t r p 株となった。上記の結果から、M V A 経路導入株においても、ムクナ由来イソプレニンターゼを導入した株が最も高いイソpren生産能を示した。

[0124] 実施例 8 : *Corynebacterium glutamicum* 由来粗酵素抽出液を用いた各植物種由来イソprenシンターゼの酵素活性測定

1) 各植物種由来 I s p S 遺伝子発現用プラスミドの構築

コリネ型細菌として *C. glutamicum* 2256 株 (ATCC 13869) を利用した (Okumura et al., 1962, Santamaria et al., 1984, Tsuchida et al., 1986)。 *C. glutamicum* で I s p S K 遺伝子、I s p S P 遺伝子、及び I s p S M 遺伝子を発現させる為のプラスミドは次の手順で構築した。pUC57-I s p S K を鋳型として、配列番号 67 と配列番号 68 に示す合成オリゴヌクレオチド、pUC57-I s p S P を鋳型として、配列番号 69 と配列番号 70 に示す合成オリゴヌクレオチド、更には pUC57-I s p S M を鋳型として、配列番号 71 と配列番号 72 に示す合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして、Prime Star ポリメラーゼ (タカラバイオ社製) を用いて PCR を行った。反応溶液はキットに添付された組成に従って調製し、98℃にて 10 秒、55℃にて 5 秒、72℃にて 120 秒の反応を 30 サイクル行った。その結果、I s p S K 遺伝子、I s p S P 遺伝子、及び I s p S M 遺伝子を含む、PCR 産物を取得した。次に Elongation Factor Tu のプロモーター配列 (以下、P₀₄₈₀) を取得する目的で *C. glutamicum* 2256 株の染色体 DNA を鋳型とした PCR を行った。I s p S K 遺伝子と P₀₄₈₀ を組み合わせる目的で、PCR のプライマーとして配列番号 73 と配列番号 74 に示す合成ヌクレオチドを利用した。また、I s p S P 遺伝子と P₀₄₈₀ を組み合わ

せる目的で、PCRのプライマーとして配列番号73と配列番号75に示す合成ヌクレオチドを利用した。また、IspSM遺伝子とP₀₄₈₀を組み合わせる目的で、PCRのプライマーとして配列番号73と配列番号76に示す合成オリゴヌクレオチドを利用した。PCRにはPrime Starポリメラーゼ（タカラバイオ社製）を用いた。反応溶液はキットに添付された組成に従って調製し、98℃にて10秒、55℃にて5秒、72℃にて30秒の反応を30サイクル行った。その結果、P₀₄₈₀を含むPCR産物を取得した。P₀₄₈₀の配列情報を配列番号77に示す。続いてC. glutamicumとE. coliのシャトルベクター・pVK9を制限酵素XbaI（タカラバイオ社製）にて消化した（Miwa et al., 1985）。pVK9の配列情報を配列番号78に示す。精製したIspSK遺伝子、IspSP遺伝子、及びIspSM遺伝子遺伝子断片と、P₀₄₈₀のPCR産物、XbaIにて消化後精製したpVK9を、In-Fusion HD Cloning Kit（Clontech社製）を用いて連結した。得られたIspSK遺伝子発現用プラスミドをpVK9-P₀₄₈₀-IspSK、IspSP遺伝子発現用プラスミドをpVK9-P₀₄₈₀-IspSP、IspSM遺伝子発現用プラスミドをpVK9-P₀₄₈₀-IspSMと命名し、これらの配列情報をそれぞれ配列番号79、80、81に示した。

[0125] 2) イソプレレン生産能を有するC. glutamicum 2256株の構築

C. glutamicum 2256株をCM-Dex培地4mlを容れた試験管に植菌し、30℃、120rpmにて対数増殖期まで培養した。この菌体を集菌し、氷冷した10%グリセロールにて2～3回洗浄後、100～200倍程度に濃縮したものをコンピテントセルとした。コンピテントセルとpVK9、pVK9-P₀₄₈₀-IspSK、pVK9-P₀₄₈₀-IspSP、pVK9-P₀₄₈₀-IspSMの各プラスミドDNAとを良く混合し、パルス印加を行った。パルス印加は、BIORAD社・GenePulserXCellを使用し、1.8kV、25μF、200Ωの条件で実施し

た。バルス印加後、CM-Dex培地にて約1～2時間回復培養を行い、その後、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含むCM-Dexプレート培地に塗布し、 30°C にて18～24時間培養した。培養後のプレートから、カナマイシン耐性を示す形質転換体を取得した。CM-Dex培地の組成を表18に示す。C. glutamicum 2256株にpVK9が導入された株を2256/pVK9株、pVK9-P₀₄₈₀-IspSKが導入された株を2256/pVK9-P₀₄₈₀-IspSK株、pVK9-P₀₄₈₀-IspSPが導入された株を2256/pVK9-P₀₄₈₀-IspSP株、pVK9-P₀₄₈₀-IspSMが導入された株を2256/pVK9-P₀₄₈₀-IspSM株と命名した。

[0126] [表18]

表18. CM-Dex培地組成

Glucose	5 g/L
Polypeptone	10 g/L
Yeast Extract	10 g/L
KH ₂ PO ₄	1 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.4 g/L
FeSO ₄ ·H ₂ O	0.01 g/L
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.01 g/L
Urea	3 g/L
大豆加水分解物	1.2 g/L(総窒素濃度として)
pH7.5 (NaOH)	
120℃20分にて滅菌した。	

必要に応じてカナマイシンが終濃度50 (mg/L)になるように添加した。

プレートの場合、寒天20g/Lを添加した。

[0127] 3) 粗酵素抽出液の調製方法

2256/pVK9株、2256/pVK9-P₀₄₈₀-IspSK株、2256/pVK9-P₀₄₈₀-IspSP株、及び2256/pVK9-P₀₄₈₀-IspSM株を、50 (mg/L)のカナマイシンを含むCM-Dexプレートに均一に塗布し、 30°C にて18時間培養した。培養後のプレート

から、1/6プレート分の菌体を50 (mg/L) のカナマイシンを含むC
M-Dex培地20mlを張り込んだ坂口フラスコに接種し、30℃にて6
時間培養した。培養液より菌体を5000rpm、5分の条件で遠心操作に
より分離し、イソプレンスインターゼバッファー (50mM Tris-HC
l (pH 8.0)・20mM MgCl₂・5%グリセロール) にて2回洗浄
した。洗浄後の菌体を同バッファー1.8mlに懸濁した。2ml容積のマ
ルチビーズショッカー専用チューブに約0.9mlの破砕用ビーズ (YBG
01, 直径0.1mm) と菌体懸濁液0.9mlを入れ、安井器械製マルチ
ビーズショッカー (MB701 (S) 型) にて2500rpm、60秒ON
・60秒OFFを6サイクルの条件で菌体を破砕した。菌体破砕操作後、チ
ューブを20000g、20分の条件の遠心操作により上清画分を得て、こ
れを粗酵素抽出液とした。

[0128] 4) イソプレンスインターゼ活性の測定

2256/pVK9株、2256/pVK9-P₀₄₈₀-IspSK株、2
256/pVK9-P₀₄₈₀-IspSP株、及び2256/pVK9-P<sub>04
80</sub>-IspSM株の粗酵素抽出液のタンパク質濃度をビシンコニン酸法 (B
CA法) により測定した。測定試薬として、BCA Protein As
say Reagent Kit (サーモサイエンティフィック社、Cat
. #23227) を用いた。総タンパク量として2mgの粗酵素抽出液とイ
ソプレンバッファーを合わせて0.5mlとなるよう調製し、これをヘッド
スペースバイアルに入れ、その後、0.5M MgCl₂溶液0.025ml
と0.2M DMAPP (cayman製, Catalog No. 6318
0) 溶液0.01mlを加えて軽く攪拌した後、すぐに密栓し37℃、2時
間の条件で反応を行った。反応後、バイアルのヘッドスペース中のイソプレ
ン濃度をガスクロマトグラフィーにより測定した。ヘッドスペースバイアル
として、Perkin Elmer社製 22mL CLEAR CRIM
P TOP VIAL cat#B0104236を、密栓用のキャップと
して、Perkin Elmer社製ヘッドスペースバイアル用キャップブ

チルゴムセプタム付 cat # B0104240 を利用した。

表 19 に各菌株の反応 2 時間後のイソプレレン生成量を記載した。

[0129] [表19]

表 19. 2256/pVK9 株、2256/pVK9-P₀₄₈₀-IspSK 株、2256/pVK9-P₀₄₈₀-IspSP 株、及び 2256/pVK9-P₀₄₈₀-IspSM 株の反応 2 時間後におけるイソプレレン生成量

菌株名	イソプレレン生成量(mg/L)		
<i>C.glutamicum</i> 2256/pVK9	0.05	±	0.02
<i>C.glutamicum</i> 2256/pVK9-P ₀₄₈₀ -IspSP	0.05	±	0.02
<i>C.glutamicum</i> 2256/pVK9-P ₀₄₈₀ -IspSK	0.68	±	0.14
<i>C.glutamicum</i> 2256/pVK9-P ₀₄₈₀ -IspSM	3.48	±	0.55

[0130] 表 19 の結果から、イソプレレン生成量は高い順に、2256/pVK9-P₀₄₈₀-IspSM 株、2256/pVK9-P₀₄₈₀-IspSK 株となり、2256/pVK9-P₀₄₈₀-IspSP 株と 2256/pVK9 株は同等となった。上記の結果から、ムクナ由来イソプレレンシンターゼを導入した株の粗酵素抽出液が最も高いイソプレレン生成活性を示した。

[0131] 実施例 9 : *Corynebacterium glutamicum* 2256 株における、各植物種由来イソプレレンシンターゼの導入効果

1) *C. glutamicum* 2256 株における、各植物種由来イソプレレンシンターゼの導入効果

2256/pVK9 株、2256/pVK9-P₀₄₈₀-IspSK 株、2256/pVK9-P₀₄₈₀-IspSP 株、及び 2256/pVK9-P₀₄₈₀-IspSM 株を、50 (mg/L) のカナマイシンを含む CM-Dex プレートに均一に塗布し、30℃にて 18~24 時間培養した。得られたプレートから、1 白金耳分の菌体を、ヘッドスペースバイアル内の MM-グルコース培地 1 mL に接種し、密栓後、往復振とう培養装置で、30℃にて 120 rpm、24 時間の培養を行った。ヘッドスペースバイアルとして Perkin Elmer 社製 22 mL CLEAR CRIMP TOP VIAL cat # B0104236 を、密栓用のキャップとして Perkin Elmer 社製ヘッドスペースバイアル用キャップブチルゴムセプタ

ム付 c a t # B O 1 0 4 2 4 0 を利用した。

MM-グルコース培地の組成は表 2 0 に記載のとおりである。

[0132] [表20]

表 2 0 . MM-グルコース培地組成

Glucose	10 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.5 g/L
Urea	2 g/L
MOPS	40 g/L
KH ₂ PO ₄	0.5 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.25 g/L
CaCl ₂	10 mg/L
FeSO ₄	10 mg/L
MnSO ₄	10 mg/L
CuSO ₄	0.02 mg/L
biotin	50 μg/L
Vitamin B1	100 μg/L
プロトカテ酸	15 mg/L
pH7.0 (KOH)	

必要に応じてカナマイシンが終濃度50 (mg/L)になるように添加した。

1Lに調製後、濾過滅菌を行った。

[0133] 培養終了後、バイアルのヘッドスペース中のイソプレン濃度をガスクロマトグラフィーにより測定した。また、OD値は分光光度計 (H I T A C H I U-2900) によって660nmで測定した。

表 2 1 に各菌株の培養終了時のイソプレン濃度を記載した。

[0134] [表21]

表 2 1 . 2256/pVK9株、2256/pVK9-P₀₄₈₀-IspSK株、2256/pVK9-P₀₄₈₀-IspSP株、及び2256/pVK9-P₀₄₈₀-IspSM株の培養終了時における、イソプレン生産量 (μg/L)

菌株名	OD値			イソプレン生産量(μg/L)		
<i>C. glutamicum</i> 2256/pVK9	2.22	±	0.06	N.D.		
<i>C. glutamicum</i> 2256/pVK9-P ₀₄₈₀ -ispSP	2.48	±	0.02	N.D.		
<i>C. glutamicum</i> 2256/pVK9-P ₀₄₈₀ -ispSK	2.38	±	0.09	21.9	±	0.2
<i>C. glutamicum</i> 2256/pVK9-P ₀₄₈₀ -ispSM	2.33	±	0.13	24.2	±	0.1

[0135] 表 2 1 の結果から、イソプレン生産量は高い順に、2256/pVK9-

P₀₄₈₀-IspSM株、2256/pVK9-P₀₄₈₀-IspSK株となった。2256/pVK9株、2256/pVK9-P₀₄₈₀-IspSP株からイソプレンは未検出となった。上記の結果から、*C. glutamicum* 2256の野生株において、ムクナ由来イソプレンシンターゼを導入した株が最も高いイソプレン生産能を示した。

[0136] 実施例10：P. ananatis由来粗酵素抽出液を用いた各植物種由来イソプレンシンターゼの酵素活性測定

1) イソプレン生産能を有するP. ananatis AJ13355株の構築

P. ananatis AJ13355株のコンピテントセルを調製後、エレクトロポレーション法によりpSTV28-Ptac-Ttrp、pSTV28-Ptac-IspSK、pSTV28-Ptac-IspSP、更にpSTV28-Ptac-IspSMを導入し、60 (mg/L) のクロラムフェニコールを含むLBプレートに均一に塗布し、30℃にて18時間培養した。その後、得られたプレートから、クロラムフェニコール耐性を示す形質転換体を取得した。P. ananatis AJ13355株にpSTV28-Ptac-Ttrpが導入された株をAJ13355/pSTV28-Ptac-Ttrp株、pSTV28-Ptac-IspSKが導入された株をAJ13355/pSTV28-Ptac-IspSK株、pSTV28-Ptac-IspSPが導入された株をAJ13355/pSTV28-Ptac-IspSP株、pSTV28-Ptac-IspSMが導入された株をAJ13355/pSTV28-Ptac-IspSM株と命名した。

[0137] 2) 粗酵素抽出液の調製方法

実施例4に記載してある方法に順じて、粗酵素活性を測定した。AJ13355/pSTV28-Ptac-Ttrp株、AJ13355/pSTV28-Ptac-IspSK株、AJ13355/pSTV28-Ptac-IspSP株、及びAJ13355/pSTV28-Ptac-IspS

M株を、60 (mg/L) のクロラムフェニコールを含むLBプレートに均一に塗布し、30℃にて18時間培養した。得られたプレートから、1/6プレート分の菌体を60 (mg/L) のクロラムフェニコールを含むLB20mlを張り込んだ坂口フラスコに接種し、34℃にて6時間培養した。培養液より菌体を6000rpm、4℃、5分の条件で遠心分離し、氷冷したイソペンシンターゼバッファー (50mM Tris-HCl (pH8.0)・20mM MgCl₂・5%グリセロール) にて2回洗浄した。洗浄菌体を同バッファー1.8mlに懸濁した。2ml容のマルチビーズショッカー専用チューブに約0.9mlの破砕用ビーズ (YBG01, 直径0.1mm) と菌体懸濁液0.9mlを入れ、安井器械製マルチビーズショッカー (MB701 (S) 型) にて2500rpm、4℃、30秒ON・30秒OFFを3サイクルの条件で菌体を破砕した。破砕後チューブを20000g、4℃、20分の条件で遠心し、上清を粗酵素抽出液とした。

[0138] 3) イソペンシンターゼ活性の測定

AJ13355/pSTV28-Ptac-Ttrp株、AJ13355/pSTV28-Ptac-IspSK株、AJ13355/pSTV28-Ptac-IspSP株、及びAJ13355/pSTV28-Ptac-IspSM株の粗酵素抽出液 (ブラッドフォード法にて総タンパク量として2mgになるように定量した) とイソペンバッファーを合わせて0.5mlをヘッドスペースバイアル (Perkin Elmer社製 22mL CLEAR CRIMP TOP VIAL cat#B0104236) に入れ、0.5M MgCl₂溶液0.025mlと0.2M DMAPP (cayman製, Catalog No. 63180) 溶液0.01mlを加えて軽く攪拌した後、すぐにヘッドスペースバイアル用キャップブチルゴムセプタム付 (Perkin Elmer社製CRIMPS cat#B0104240) にて密栓、37℃にて2時間保温した。

反応終了後、バイアルのヘッドスペース中のイソペン濃度をガスクロマトグラフィーにより測定した。

[0139] [表22]

表 2 2. *P. ananatis* AJ13355株におけるイソプレニンターゼ活性の測定結果

菌株名	イソプレニン生成量 (mg/L)
AJ13355/pSTV28-Ptac-Ttrp	0.13 ± 0.02
AJ13355/pSTV28-Ptac-IspSK	0.58 ± 0.10
AJ13355/pSTV28-Ptac-IspSM	13.42 ± 1.67
AJ13355/pSTV28-Ptac-IspSP	0.23 ± 0.04

[0140] 表 2 2 の結果から、イソプレニン生成量は高い順に、AJ13355/pSTV28-Ptac-IspSM株、AJ13355/pSTV28-Ptac-IspSK株となり、AJ13355/pSTV28-Ptac-IspSP株、AJ13355/pSTV28-Ptac-Ttrp株となった。上記の結果から、ムクナ由来イソプレニンターゼを導入した株の粗酵素抽出液が最も高いイソプレニン生成活性を示した。

[0141] 実施例 11 : *P. ananatis* AJ13355株における、各植物種由来イソプレニンターゼの導入効果

P. ananatis AJ13355株においても、葉緑体移行シグナルを欠失した全てのイソプレニンターゼ導入株について、グルコースからのイソプレニン生産能を比較した。AJ13355/pSTV28-Ptac-Ttrp株、AJ13355/pSTV28-Ptac-IspSK株、AJ13355/pSTV28-Ptac-IspSP株、及びAJ13355/pSTV28-Ptac-IspSM株を、60 (mg/L) のクロラムフェニコールを含むLBプレートに均一に塗布し、30℃にて18時間培養した。得られたプレートから、1白金耳分の菌体を、ヘッドスペースバイアル中のM9グルコース培地1mLに接種し、ヘッドスペースバイアル用キャップブチルゴムセプタム付 (Perkin Elmer社製CRIMP Scat #B0104240) で密栓後、往復振とう培養装置 (120rpm) で、30℃にて24時間培養を行った。培養終了後、バイアルのヘッドスペース中のイソプレニン濃度をガスクロマトグラフィーにより測定し、OD値は分光光度計 (HITACHI U-2900) によって600nmで測定した。表 2 3 に各菌株の培養終了時のイソプレニン濃度とOD値を記載し

た。

[0142] [表23]

表 2 3 . AJ13355/pSTV28-Ptac-Ttrp株、AJ13355/pSTV28-Ptac-IspSK株、AJ13355/pSTV28-Ptac-IspSP株、及びAJ13355/pSTV28-Ptac-IspSM株の培養終了時における、イソプレノゲン生産量 ($\mu\text{g/L}$) と OD 値

菌株名	OD値	イソプレノゲン生産量 ($\mu\text{g/L}$)
AJ13355/pSTV28-Ptac-Ttrp	2.36 $\pm$ 0.11	N. D.
AJ13355/pSTV28-Ptac-IspSK	2.18 $\pm$ 0.09	50.0 $\pm$ 13.0
AJ13355/pSTV28-Ptac-IspSM	2.44 $\pm$ 0.11	63.0 $\pm$ 6.0
AJ13355/pSTV28-Ptac-IspSP	2.25 $\pm$ 0.18	12.0 $\pm$ 1.0

N. D. 検出されず

[0143] 表 2 3 の結果から、イソプレノゲン生産量は高い順に、AJ13355/pSTV28-Ptac-IspSM株、AJ13355/pSTV28-Ptac-IspSK株、AJ13355/pSTV28-Ptac-IspSP株、そしてAJ13355/pSTV28-Ptac-Ttrp株となった。上記の結果から、*P. ananatis* AJ13355株においても、ムクナ由来イソプレノゲンシンターゼを導入した株が最も高いイソプレノゲン生産能を示した。

[0144] 実施例 1 2 : *E. aerogenes* AJ110637 由来粗酵素抽出液を用いた各植物種由来イソプレノゲンシンターゼの酵素活性測定

1) イソプレノゲン生産能を有する *E. aerogenes* AJ110637 株の構築

E. aerogenes AJ110637 株のコンピテントセルを調製後、エレクトロポレーション法により pSTV28-Ptac-Ttrp、pSTV28-Ptac-IspSK、pSTV28-Ptac-IspSP、更に pSTV28-Ptac-IspSM を導入し、60 (mg/L) のクロラムフェニコールを含む LB プレートに均一に塗布し、37°C にて 18 時間培養した。その後、得られたプレートから、クロラムフェニコール耐性を示す形質転換体を取得した。*E. aerogenes* AJ110637 株に pSTV28-Ptac-Ttrp が導入された株を AJ110637/pSTV28-Ptac-Ttrp 株、pSTV28-Ptac-IspSK が導入された株を AJ110637/pSTV28-Ptac-IspSK 株、pSTV28-Ptac-IspSP が導入された株を AJ110637/pSTV28-Ptac-IspSP 株、pSTV28-Ptac-IspSM が導入された株を AJ110637/pSTV28-Ptac-IspSM 株と命名した。

pSK株、pSTV28-Ptac-IspSPが導入された株をAJ110637/pSTV28-Ptac-IspSP株、pSTV28-Ptac-IspSMが導入された株をAJ110637/pSTV28-Ptac-IspSM株と命名した。

[0145] 2) 粗酵素抽出液の調製方法

実施例4に記載してある方法に順じて、粗酵素活性を測定した。AJ110637/pSTV28-Ptac-Ttrp株、AJ110637/pSTV28-Ptac-IspSK株、AJ110637/pSTV28-Ptac-IspSP株、及びAJ110637/pSTV28-Ptac-IspSM株を、60 (mg/L) のクロラムフェニコールを含むLBプレートに均一に塗布し、37℃にて18時間培養した。得られたプレートから、1/6プレート分の菌体を60 (mg/L) のクロラムフェニコールを含むLB20mlを張り込んだ坂口フラスコに接種し、37℃にて4時間培養した。培養液より菌体を8000rpm、4℃、10分の条件で遠心分離し、氷冷したイソプレンスインターゼバッファー (50mM Tris-HCl (pH8.0)・20mM MgCl₂・5%グリセロール) にて2回洗浄した。洗浄菌体を同バッファー1.8mlに懸濁した。2ml容のマルチビーズショッカー専用チューブに約0.9mlの破砕用ビーズ (YBG01, 直径0.1mm) と菌体懸濁液0.9mlを入れ、安井器械製マルチビーズショッカー (MB701 (S) 型) にて2500rpm、4℃、30秒ON・30秒OFFを3サイクルの条件で菌体を破砕した。破砕後チューブを2000g、4℃、20分の条件で遠心し、上清を粗酵素抽出液とした。

[0146] 3) イソプレンスインターゼ活性の測定

AJ110637/pSTV28-Ptac-Ttrp株、AJ110637/pSTV28-Ptac-IspSK株、AJ110637/pSTV28-Ptac-IspSP株、及びAJ110637/pSTV28-Ptac-IspSM株の粗酵素抽出液 (ブラッドフォード法にて総タンパク量として2mgになるように定量した) とイソプレンバッファーを合わせ

て0.5 mlをヘッドスペースバイアル (Perkin Elmer社製 22 mL CLEAR CRIMP TOP IAL cat # B0104236) に入れ、0.5 M $MgCl_2$ 溶液0.025 mlと0.2 M DMAPP (cayman製, Catalog No. 63180) 溶液0.01 mlを加えて軽く攪拌した後、すぐにヘッドスペースバイアル用キャップブチルゴムセプタム付 (Perkin Elmer社製CRIMPS cat # B0104240) にて密栓、37℃にて2時間保温した。

反応終了後、バイアルのヘッドスペース中のイソプレン濃度をガスクロマトグラフィー

により測定した。

表24に各菌株の反応2時間後のイソプレン生成量を記載した。

[0147] [表24]

表24. *E. aerogenes* AJ110637株におけるイソプレンシンターゼ活性の測定結果

菌株名	イソプレン生成量 (mg/L)
AJ110637/pSTV28-Ptac-Ttrp	0.13 ± 0.02
AJ110637/pSTV28-Ptac-IspSK	0.30 ± 0.04
AJ110637/pSTV28-Ptac-IspSM	1.46 ± 0.18
AJ110637/pSTV28-Ptac-IspSP	0.17 ± 0.03

[0148] 表24の結果から、イソプレン生成量の高い順に、AJ110637/pSTV28-Ptac-IspSM株、AJ110637/pSTV28-Ptac-IspSK株、AJ110637/pSTV28-Ptac-IspSP株、そしてAJ110637/pSTV28-Ptac-Ttrp株となった。上記の結果から、ムクナ由来イソプレンシンターゼを導入した株の粗酵素抽出液が最も高いイソプレン生成活性を示した。

[0149] 実施例13: *E. aerogenes* AJ110637株における、各植物種由来イソプレンシンターゼの導入効果

E. aerogenes AJ110637株においても、葉緑体移行シグナルを欠失した全てのイソプレンシンターゼ導入株について、グルコースからのイソプレン生産能を比較した。AJ110637/pSTV28-Ptac-Ttrp株、AJ110637/pSTV28-Ptac-Isp

SK株、AJ110637/pSTV28-Ptac-IspSP株、及びAJ110637/pSTV28-Ptac-IspSM株を、60 (mg/L) のクロラムフェニコールを含むLBプレートに均一に塗布し、30℃にて18時間培養した。得られたプレートから、1白金耳分の菌体を、ヘッドスペースバイアル中のM9グルコース培地1 mLに接種し、ヘッドスペースバイアル用キャップブチルゴムセプタム付 (Perkin Elmer社製CRIMPS cat #B0104240) で密栓後、往復振とう培養装置 (120 rpm) で、30℃にて24時間培養を行った。培養終了後、バイアルのヘッドスペース中のイソプレン濃度をガスクロマトグラフィーにより測定し、OD値は分光光度計 (HITACHI U-2900) によって600 nmで測定した。表25に各菌株の培養終了時のイソプレン濃度とOD値を記載した。

[0150] [表25]

表25. AJ110637/pSTV28-Ptac-Ttrp株、AJ110637/pSTV28-Ptac-IspSK株、AJ110637/pSTV28-Ptac-IspSP株、及びAJ110637/pSTV28-Ptac-IspSM株の培養終了時における、イソプレン生産量 ($\mu\text{g/L}$) とOD値

菌株名	OD値	イソプレン生産量 ($\mu\text{g/L}$)
AJ110637/pSTV28-Ptac-Ttrp	3.12 $\pm$ 0.21	N. D.
AJ110637/pSTV28-Ptac-IspSK	3.08 $\pm$ 0.14	130.2 $\pm$ 14.3
AJ110637/pSTV28-Ptac-IspSM	3.20 $\pm$ 0.18	316.1 $\pm$ 26.2
AJ110637/pSTV28-Ptac-IspSP	3.09 $\pm$ 0.12	12.5 $\pm$ 0.8

N. D. 検出されず

[0151] 表25の結果から、イソプレン生産量が高い順に、AJ110637/pSTV28-Ptac-IspSM株、AJ110637/pSTV28-Ptac-IspSK株、AJ110637/pSTV28-Ptac-IspSP株、そしてAJ110637/pSTV28-Ptac-Ttrp株となった。上記の結果から、*E. aerogenes* AJ110637株においても、ムクナ由来イソプレンシンターゼを導入した株が最も高いイソプレン生産能を示した。

[0152] 実施例14: *Saccharomyces cerevisiae* 由来粗酵素抽出液を用いた各植物種由来イソプレンシンターゼの酵素活性測定

1) 各植物種由来IspS遺伝子発現用プラスミドの構築

*S. cerevisiae*で *IspSK* 遺伝子、*IspSP* 遺伝子、及び *IspSM* 遺伝子を発現させる為のプラスミドは次の手順で構築した。pUC57-*IspSK* を鋳型として、配列番号82と配列番号83に示す合成オリゴヌクレオチド、pUC57-*IspSP* を鋳型として、配列番号84と配列番号85に示す合成オリゴヌクレオチド、更にはpUC57-*IspSM* を鋳型として、配列番号86と配列番号87に示す合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして、Prime Starポリメラーゼ (Takara社製) を用いてPCRを行った。反応溶液はキットに添付された組成に従って調製し、98℃にて10秒、55℃にて5秒、72℃にて120秒の反応を30サイクル行った。その結果、*IspSK* 遺伝子、*IspSP* 遺伝子、及び *IspSM* 遺伝子を含む、PCR産物を取得した。一方、*S. cerevisiae* と *E. coli* のシャトルベクター・pYES2 (インビトロジェン社 Cat. no. V825-20) を制限酵素 *KpnI* (タカラバイオ社製) にて消化した。その後、精製された *IspSK* 遺伝子を含むPCR断片と *KpnI* にて消化後精製したpYES2を、In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech社製) を用いて連結した。得られた *IspSK* 遺伝子発現用プラスミドをpYES2-*IspSK* と命名した。同様に、精製された *IspSP* 遺伝子を含むPCR断片と *KpnI* にて消化後精製したpYES2を、In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech社製) を用いて連結した。得られた *IspSP* 遺伝子発現用プラスミドをpYES2-*IspSP* と命名した。同様に、精製された *IspSM* 遺伝子を含むPCR断片と *KpnI* にて消化後精製したpYES2を、In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech社製) を用いて連結した。得られた *IspSM* 遺伝子発現用プラスミドをpYES2-*IspSM* と命名した。

[0153] 2) イソプレネン生産能を有する *S. cerevisiae* S288C株の構築

S. cerevisiae S288C株のコンピテントセルをFroz

en-EZ Yeast Transformation Kit II (Z YMO RESEARCH社, Cat. no. T2001) を用いて調製した。同キットのプロトコールに従って、pYES2、pYES2-Is pSK、pYES2-Is pSP、更にpYES2-Is pSMを*S. cerevisiae* S288C株のコンピテントセルに導入し、SD-Uraプレートに均一に塗布し、30℃にて2日間培養した。その後、得られたプレートから、Ura要求性が消失した形質転換体を取得した。SD-Ura培地の組成は表26に記載のとおりである。*S. cerevisiae* S288C株にpYES2が導入された株をS288C/pYES2株、pYES2-Is pSKが導入された株をS288C/pYES2-Is pSK株、pYES2-Is pSPが導入された株をS288C/pYES2-Is pSP株、pYES2-Is pSMが導入された株をS288C/pYES2-Is pSM株と命名した。

[0154] [表26]

表26. SD-Ura培地

Yeast Nitrogen Base w/o AA (Difco, Cat.no. 291940)	6.7 g/L
-Ura DO supplement (Clontech, Cat.no. 630416)	0.77 g/L
Glucose	20 g/L (別殺菌)
Agar	20 g/L (必要時のみ)
pH 5.6-6.0 (KOH)	
120℃15分滅菌	

[0155] 3) 粗酵素抽出液の調製方法

S288C/pYES2株、S288C/pYES2-Is pSK株、S288C/pYES2-Is pSP株、及びS288C/pYES2-Is pSM株を、SD-Uraプレートに均一に塗布し、30℃にて24時間培養した。得られたプレートから、1/4プレート分の菌体をSD-Ura Galactose (SD-Ura培地のGlucoseをGalactoseに換えた培地) 培地50mlを張り込んだ坂口フラスコに接種し、30℃にて16時間培養した。SD-Ura Galactose培地の組成を表27に示す。培養液より菌体を3000rpm、5分の条件で遠心分離し

、イソペンシントーゼバッファー（50 mM Tris-HCl（pH 8.0）・20 mM MgCl₂・5%グリセロール）にて2回洗浄した。洗浄菌体を同バッファー1.8 mlに懸濁した。2 ml容のマルチビーズショッカー専用チューブに約0.9 mlの破碎用ビーズ（YBG05, 直径0.5 mm）と菌体懸濁液0.9 mlを入れ、安井器械製マルチビーズショッカー（MB701（S）型）にて2500 rpm、60秒ON・60秒OFFを12サイクルの条件で菌体を破碎した。破碎後チューブを20000 g、20分の条件で遠心し、上清を粗酵素抽出液とした。

[0156] [表27]

表 27. SD-Ura Galactose培地

Yeast Nitrogen Base w/o AA (Difco, Cat.no.291940)	6.7 g/L
-Ura D0 supplement (Clontech, Cat.no.630416)	0.77 g/L
Galactose	20 g/L(別殺菌)
Agar	20 g/L(必要時のみ)
pH 5.6-6.0 (KOH)	
120°C15分滅菌	

[0157] 4) イソペンシントーゼ活性の測定

S288C/pYES2株、S288C/pYES2-Is pSK株、S288C/pYES2-Is pSP株、及びS288C/pYES2-Is pSM株の粗酵素抽出液の粗酵素抽出液のタンパク質濃度をビシンコニン酸法（BCA法）により測定した。測定試薬として、BCA Protein Assay Reagent Kit（サーモサイエンティフィック社、Cat. #23227）を用いた。総タンパク量として0.4 mgの粗酵素抽出液とイソペンバッファーを合わせて0.25 mlとなるよう調製し、これをヘッドスペースバイアルに入れ、0.5 M MgCl₂溶液0.0125 mlと0.2 M DMAPP（cayman製, Catalog No. 63180）溶液0.005 mlを加えて軽く攪拌した後、すぐにヘッドスペースバイアル用キャップブチルゴムセプタム付（Perkin Elmer社製CRIMPS cat #B0104240）にて密栓、37°Cにて2時間の条件で反応を行った。反応後、バイアルのヘッドスペース中のイソペ

ン濃度をガスクロマトグラフィーにより測定した。ヘッドスペースバイアルとして、Perkin Elmer社製 22mL CLEAR CRIMP TOP VIAL cat #B0104236を、密栓用のキャップとして、Perkin Elmer社製ヘッドスペースバイアル用キャップブチルゴムセプタム付 cat #B0104240を利用した。

表28に各菌株の反応2時間後のイソプレン生成量を記載した。

[0158] [表28]

表28. S288C/pYES2株、S288C/pYES2-IspSK株、S288C/pYES2-IspSP株、及びS288C/pYES2-IspSM株の反応2時間後におけるイソプレン生成量

菌株名	イソプレン生成量(μ g/L)		
<i>S.cerevisiae</i> S288C/pYES2	70.33	±	5.64
<i>S.cerevisiae</i> S288C/pYES2-IspSP	66.74	±	0.09
<i>S.cerevisiae</i> S288C/pYES2-IspSK	86.02	±	3.05
<i>S.cerevisiae</i> S288C/pYES2-IspSM	119.72	±	6.57

[0159] 表28の結果から、イソプレン生成量の高い順に、S288C/pYES2-IspSM株、S288C/pYES2-IspSK株となり、S288C/pYES2-IspSP株とS288C/pYES2株は同等となった。上記の結果から、ムクナ由来イソプレンシンターゼを導入した株の粗酵素抽出液が最も高いイソプレン生成活性を示した。

[0160] 実施例15: *Saccharomyces cerevisiae* S288C株における、各植物種由来イソプレンシンターゼの導入効果

1) *S. cerevisiae* S288Cにおける、各植物種由来イソプレンシンターゼの導入効果

S288C/pYES2株、S288C/pYES2-IspSK株、S288C/pYES2-IspSP株、及びS288C/pYES2-IspSM株を、YPDプレートに均一に塗布し、30℃にて18~24時間培養した。得られたプレートから、1白金耳分の菌体を、ヘッドスペースバイアル中(Perkin Elmer社製 22mL CLEAR CRIMP TOP VIAL cat #B0104236)のSD-Ura2培地

(グルコース、ガラクトース各 1 g/L を含む) 1 mL に接種し、ヘッドスペースバイアル用キャップブチルゴムセプタム付 (Perkin Elmer 社製 CRIMPSCAT #B0104240) で密栓後、往復振とう培養装置にて、30°C 120 rpm の条件で 24 時間培養を行った。YPD 培地の組成を表 29 に、SD-Ura2 培地の組成は表 30 に記す。

[0161] [表29]

表 29. YPD 培地組成

Yeast Extract	10 g/L
Peptone	10 g/L
Glucose	20 g/L (別殺菌)
Agar	20 g/L (必要時のみ)
pH 5.6-6.0 (KOH)	
120°C 15 分滅菌	

[0162] [表30]

表 30. SD-Ura2 培地

Yeast Nitrogen Base w/o AA (Difco, Cat.no. 291940)	6.7 g/L
-Ura D0 supplement (Clontech, Cat.no. 630416)	0.77 g/L
Glucose	1 g/L (別殺菌)
Galactose	1 g/L (別殺菌)
Agar	20 g/L (必要時のみ)
pH 5.6-6.0 (KOH)	
120°C 15 分滅菌	

[0163] 培養終了後、バイアルのヘッドスペース中のイソプレン濃度をガスクロマトグラフィーにより測定した。

また、OD 値は分光光度計 (HITACHI U-2900) によって 600 nm で測定した。表 31 に各菌株の培養終了時のイソプレン濃度を記載した。

[0164] [表31]

表 31. S288C/pYES2 株、S288C/pYES2-IspSK 株、S288C/pYES2-IspSP 株、及び S288C/pYES2-IspSM 株の培養終了時における、イソプレン生産量 (μ g/L)

Strains	OD600	Isoprene (μ g/L)
<i>S.cerevisiae</i> S288C/pYES2_2	2.76 $\pm$ 0.48	ND
<i>S.cerevisiae</i> S288C/pYES2_ispSK_72	2.59 $\pm$ 0.09	13.05 $\pm$ 0.09
<i>S.cerevisiae</i> S288C/pYES2_ispSP_101	2.48 $\pm$ 0.20	ND
<i>S.cerevisiae</i> S288C/pYES2_ispSM_201	2.76 $\pm$ 0.18	16.15 $\pm$ 0.09

[0165] 表31の結果から、イソプレレン生産量は高い順に、S288C/pYES2-ispSM株、S288C/pYES2-ispSK株となった。S288C/pYES2株、S288C/pYES2-ispSP株からイソプレレンは未検出となった。上記の結果から、野生株では、ムクナ由来イソプレレンシンターゼを導入した株が最も高いイソプレレン生産能を示した。

[0166] 実施例16：イソプレレンシンターゼの安定性比較

1) 発現用プラスミドの構築

ムクナ由来イソプレレンシンターゼの大量発現用プラスミドの構築を次の手順で行った。ベクター部分について、pCold-TF (Takara社製、#3365、配列情報はGenBank/EMBL/DDBJ accession ID AB213654) を鋳型とし、配列番号88と配列番号89に示す合成オリゴヌクレオチドをプライマーとしたPCRを行った。インサートについてはpUC57-ispSMを鋳型とし、配列番号90と配列番号91に示す合成オリゴヌクレオチドをプライマーとしたPCRを行った。PCR法のポリメラーゼはPrimeSTAR HS (Takara社製) を利用し、反応溶液はキットに添付された組成に従って調製し、反応条件は95℃にて10秒、55℃にて5秒、72℃にて6分間を一連のサイクルとし、30回繰り返した。得られたこれらのDNA断片をIn-Fusion HD Cloning Kit (Clontech社製) を用いて連結した。構築したプラスミドをpCold-TF-ispSMと名付けた。pCold-TF-ispSMの塩基配列を配列番号92に示す。

ポプラ由来イソプレレンシンターゼの大量発現用プラスミドの構築を次の手順で行った。ベクター部分について、pCold-TFを鋳型とし、配列番号88と配列番号89に示す合成オリゴヌクレオチドをプライマーとしたPCRを行った。インサートについてはpUC57-ispSPを鋳型とし、配列番号93と配列番号94に示す合成オリゴヌクレオチドをプライマーとしたPCRを行った。PCR法のポリメラーゼはPrimeSTAR HS (Takara社製) を利用し、反応溶液はキットに添付された組成に従っ

て調製し、反応条件は95℃にて10秒、55℃にて5秒、72℃にて6分間を一連のサイクルとし、30回繰り返した。得られたこれらのDNA断片をIn-Fusion HD Cloning Kit (Clontech社製)を用いて連結した。構築したプラスミドをpCold-TF-IspSPと名付けた。pCold-TF-IspSPの塩基配列を配列番号95に示す。

クズ由来イソプレニンターゼの大量発現用プラスミドの構築を次の手順で行った。ベクター部分について、pCold-TFを鋳型とし、配列番号88と配列番号89に示す合成オリゴヌクレオチドをプライマーとしたPCRを行った。インサートについてはpUC57-IspSKを鋳型とし、配列番号96と配列番号97に示す合成オリゴヌクレオチドをプライマーとしたPCRを行った。PCR法のポリメラーゼはPrimeSTAR HS (Takara社製)を利用し、反応溶液はキットに添付された組成に従って調製し、反応条件は95℃にて10秒、55℃にて5秒、72℃にて6分間を一連のサイクルとし、30回繰り返した。得られたこれらのDNA断片をIn-Fusion HD Cloning Kit (Clontech社製)を用いて連結した。構築したプラスミドをpCold-TF-IspSKと名付けた。pCold-TF-IspSKの塩基配列を配列番号98に示す。

これらの発現ベクターの構築においてイソプレニンターゼはtrigger factor (TF)をN末端に融合した蛋白質として発現するよう設計した。TFとイソプレニンターゼの融合タンパク質をTF-IspSと命名した。ムクナ由来イソプレニンターゼの融合タンパク質をTF-IspSM、ポプラ由来イソプレニンターゼの融合タンパク質をTF-IspSP、葛由来イソプレニンターゼの融合タンパク質をTF-IspSKと名付けた。

pCold-TF-IspSM, pCold-TF-IspSP, pCold-TF-IspSKそれぞれをE. coli BL21 (DE3)の

コンピテントセル (one shot BL 21 (DE3)、Life Technologies社製) にヒートショック法により形質転換を行った。42℃、30秒のヒートショックの後、SOC培地を用いた回復培養を37℃、1時間、120rpmの条件で実施した。その後、アンピシリン100mg/Lを含むLBプレートに全量播種し、37℃、14時間静置培養した。

[0167] 2) イソプレンスインターゼの大量調製のための培養

形成されたコロニーをピックし、アンピシリン100mg/Lを含む5mL LB培地に植菌した後、OD600=1.0になるまで37℃、200rpmで培養した。当該OD値に到達したことを確認した後、アンピシリン100mg/Lを含むLB培地100mLを張り込んだ500mL容量の坂口フラスコに全量を植菌し、OD600=1.0に到達するまで37℃、120rpmで培養した。その後、1Mイソプロピルーβ-チオガラクトピラノシド (IPTG) を終濃度1mMになるよう添加し、15℃、100rpmで終夜培養した。培養終了後、8000×g、10分で遠心分離して菌体を回収し、精製操作を行うまで-20℃にて保存した。

[0168] 3) イソプレンスインターゼの精製

イソプレンスインターゼの精製はHis-tagカラムを利用して行った。培養終了後のブロス100mLより得られた菌体を50mM リン酸バッファー (pH8)、500mM NaClからなる破砕バッファー240mLに懸濁し、超音波破砕機 (Sonifier 250、Baransan社製) を用いて、duty cycle 50%、output control 6の条件にて、8分間、氷上にて超音波破砕を実施した。超音波破砕後、14000×g、20分の遠心分離操作により破砕上清を得た。以下の精製操作は全て4℃にて実施した。polyprep column (BioRad社製) にHis-select Nickel affinity gel (Sigma社製) を、ベッドボリューム2mL相当をアプライし、重力法により充填した。次に破砕バッファー10mLをアプライし、重力

法で平衡化を実施した。このカラムに対し超音波破碎後の破碎上清を全量アプライし、TF-IspSをカラムに吸着させた。

アプライした破碎上清の全量がカラムを通過したことを確認した後、破碎バッファー10mLでカラムを洗浄した。更に、50mM tris-HCl (pH 8.0)、15mM MgCl₂からなる活性測定用バッファー10mLでカラムを追加洗浄した。その後、50mM tris-HCl (pH 8.0)、15mM MgCl₂、10mM imidazoleからなる洗浄液をカラムに4mLアプライし、通過液を廃棄した。最後に、50mM tris-HCl (pH 8.0)、15mM MgCl₂、200mM imidazoleからなる溶出液を4mLカラムにアプライし、TF-IspSの溶出を行った。溶出後のTF-IspSをゲル濾過カラム (amicon ultra MWCO100k (Millipore社)) で濃縮した。

続いて、TF-IspS融合タンパク質の融合部分を切断した。切断には、Factor Xa (Novagen社製) を利用した。反応バッファーは、50mM tris-HCl (pH 8.0)、100mM NaCl、5mM CaCl₂からなり、26U Factor Xaを添加し、4℃にて、14時間反応を行った。反応終了後の反応液を、His-Select Nickel Affinity gelに通過させることにより、TFのみがHis-Select Nickel Affinity gelに吸着する事を利用して、反応液中からTFを除去した。続いてゲル濾過カラム (amicon ultra MWCO50k、Millipore社) を用いてIspSを濃縮した。得られた濃縮液をNuPAGE 4-12% (Life Technologies社製) で展開し、純度検定を実施した。展開したゲルをCBB染色した結果、IspS以外の不純物由来のバンドが観測されなかったことから、純度は99%程度と推定した。

このようにして得られたIspSM溶液とIspSK溶液は、活性測定用バッファーに対して終濃度5% glycerolを添加して活性測定に供

するまで -80°C 冷凍庫で保存した。また、IspSP溶液は終濃度5% PEG600を添加して、活性測定に供するまで -80°C 冷凍庫で保存した。

[0169] 4) イソプレンスインターゼの活性測定

IspSM、IspSK、IspSPを氷上で解凍し、バッファー交換によりglycerolやPEG600を除去した。また、SDS-PAGE上の比色定量によりタンパク質濃度を統一した。イソプレン反応液 $50\mu\text{L}$ は、 50mM tris-HCl, $\text{pH}8.0$, 15mM MgCl_2 , 4mM DMAP, $1\mu\text{g}$ IspSから構成される。このイソプレン反応液 $50\mu\text{L}$ を 0.2mL 容積のPCR tube (日本ジェネティクス社製) に入れ、蓋に穴を穿った。次に、このチューブを $450\mu\text{L}$ の純水を張り込んだ 22mL バイアル (PerkinElmer社製) に入れ、直ちにヘッドスペースバイアル用キャップブチルゴムセプタム付 (PerkinElmer社製) で密栓した。イソプレン生成反応は 40°C にて238時間行った。発生したイソプレンの定量は、4-2) および4-3) に記載の方法に従った。結果を表32に示す。結果に示す通り、ムクナ由来イソプレンスインターゼはクズ由来イソプレンスインターゼと比較し10倍程度高いイソプレン生産能を有することが明らかとなった。

[0170] [表32]

表32. 各IspSのイソプレン蓄積量の比較 (238時間、 40°C 反応)

IspSの種類	isp ($\mu\text{mol/L/mg}$ IspS)	SEM (n=2)	IspSの濃度	IspSの純度
IspSM	254.7	4.2	20mg/L	>99%
IspSK	25.7	4.0	20mg/L	>99%

[0171] 5) イソプレンスインターゼの安定性の比較

上記の方法で精製した各IspSを、 50mM tris-HCl, $\text{pH}8.0$, 15mM MgCl_2 溶液にて、 4°C 、48時間保存した。上で述べた方法に従って、保存前後の各種イソプレンスインターゼが酵素反応により産出するイソプレン生産量をガスクロマトグラフィーにて解析した。保存前のイソプレン生産量で、保存後の生産量を割り返して比較した。その結果、

ムクナ由来イソプレンスンターゼは、葛由来イソプレンスンターゼ、ポプラ由来イソプレンスンターゼと比べ、優れた安定性を持つことが明らかになった。

[0172] [表33]

表 3 3 . 各IspSの残存活性の比較 (4℃、48時間保存後)

IspSの種類	残存活性
IspSM	66%
IspSK	9%
IspSP	23%

請求の範囲

- [請求項1] 以下（a）、（b）または（c）のポリヌクレオチド：
- （a）（i）配列番号1で表される塩基配列、もしくは（i i）配列番号1で表される塩基配列中の133～1785番目のヌクレオチド残基からなる塩基配列を含むポリヌクレオチド；
- （b）前記（i）もしくは（i i）の塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列を含み、かつイソプレンスインターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；または
- （c）前記（i）もしくは（i i）の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつイソプレンスインターゼ活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。
- [請求項2] 前記ポリヌクレオチドがムクナに由来する、請求項1記載のポリヌクレオチド。
- [請求項3] 以下（A）、（B）または（C）のタンパク質：
- （A）（i'）配列番号2で表される全長アミノ酸配列、もしくは（i i'）配列番号2で表されるアミノ酸配列中の45～594番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含むタンパク質；
- （B）前記（i'）もしくは（i i'）のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつイソプレンスインターゼ活性を有するタンパク質；または
- （C）前記（i'）もしくは（i i'）のアミノ酸配列において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されているアミノ酸配列を含み、かつイソプレンスインターゼ活性を有するタンパク質。
- [請求項4] 請求項1もしくは2記載のポリヌクレオチド、または請求項3記載のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター。
- [請求項5] 請求項4記載の発現ベクターが宿主に導入されることにより作製さ

れた形質転換体。

[請求項6] 前記宿主が、メチルエリスリトールリン酸経路によるジメチルアリルニリン酸の合成能を有する、請求項5記載の形質転換体。

[請求項7] 前記宿主が大腸菌である、請求項6記載の形質転換体。

[請求項8] 前記形質転換体が、メバロン酸経路およびメチルエリスリトールリン酸経路の双方によるジメチルアリルニリン酸の合成能を有する、請求項5～7のいずれか一項記載の形質転換体。

[請求項9] 宿主が、コリネバクテリウム属、パントエア属、エンテロバクター属、またはサッカロミセス属に属する微生物である、請求項5記載の形質転換体。

[請求項10] 請求項5～9のいずれか一項記載の形質転換体を用いて、請求項3記載のタンパク質を生成することを含む、タンパク質の製造方法。

[請求項11] 請求項3記載のタンパク質の存在下において、ジメチルアリルニリン酸からイソプレンモノマーを生成することを含む、イソプレンモノマーの製造方法。

[請求項12] 請求項5～9のいずれか一項記載の形質転換体の培養によりイソプレンモノマーが生成される、請求項11記載の方法。

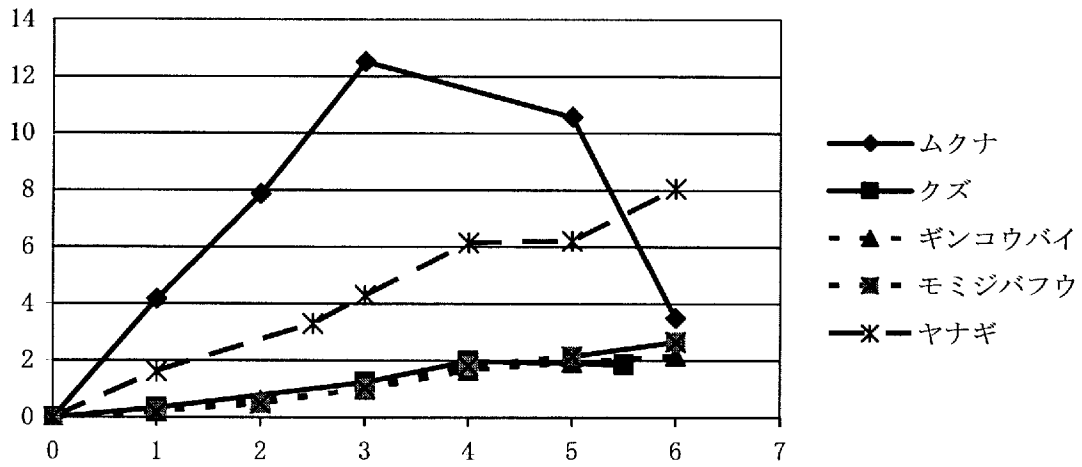
[請求項13] 前記形質転換体の培養により培地中の炭素源からジメチルアリルニリン酸が供給される、請求項12記載の方法。

[請求項14] 以下(Ⅰ)および(Ⅱ)を含む、イソプレンポリマーの製造方法：

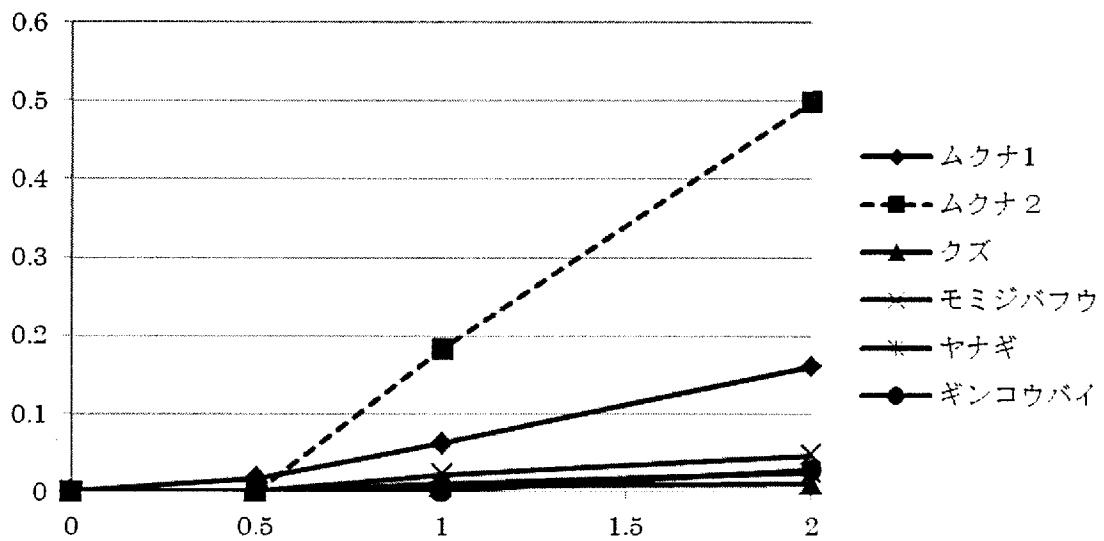
(Ⅰ) 請求項11～13のいずれか一項記載の方法によりイソプレンモノマーを生成すること；

(Ⅱ) イソプレンモノマーを重合してイソプレンポリマーを生成すること。

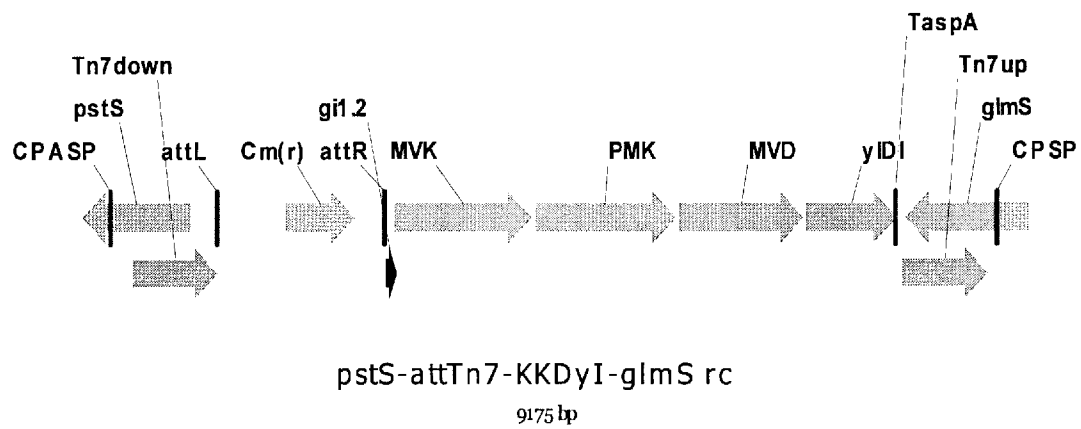
[図1]



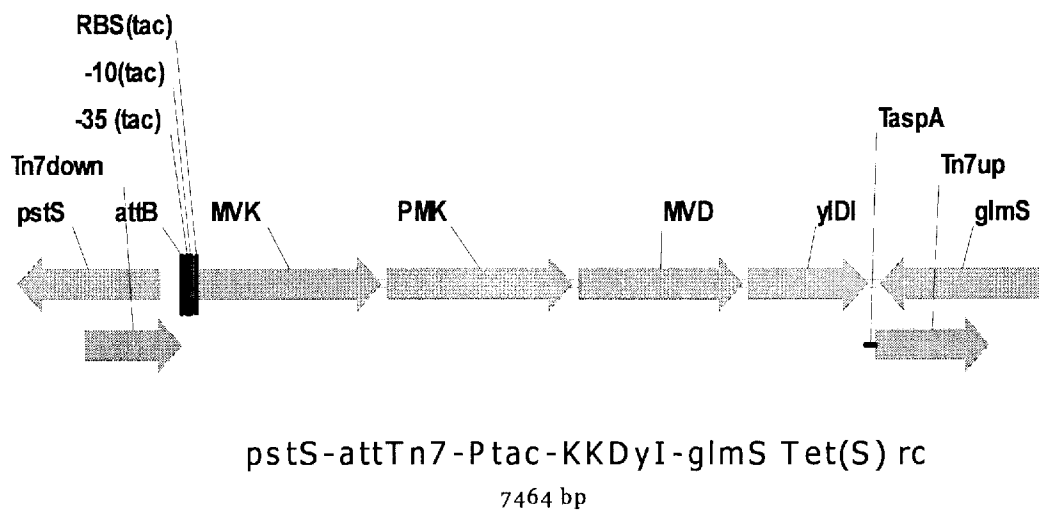
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/056866

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C08F36/08(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N9/88(2006.01)i, C12P5/02(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, C08F36/08, C12N1/21, C12N9/88, C12P5/02

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)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, JSTPlus (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> Y	JP 2011-505841 A (Danisco US Inc.), 03 March 2011 (03.03.2011), & US 2009/0203102 A1 & EP 2235190 A1 & WO 2009/076676 A2	<u>1-14</u> 1-14
Y	KUZMA J et al., Leaf Isoprene Emission Rate Is Dependent on Leaf Development and the Level of Isoprene Synthase, Plant Physiol., 1993, Vol. 101, No.2, pp.435-440	1-14
A	MONSON RK et al., Relationships among Isoprene Emission Rate, Photosynthesis, and Isoprene Synthase Activity as Influenced by Temperature, Plant Physiol., 1992, Vol.98, No.3, pp.1175- 1180	1-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"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)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"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

"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

"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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
28 March, 2013 (28.03.13)

Date of mailing of the international search report
09 April, 2013 (09.04.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/056866

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2011-518564 A (Danisco US Inc.), 30 June 2011 (30.06.2011), & US 2010/0003716 A1 & EP 2279251 A1 & WO 2009/132220 A2	1-14
A	ZHAO Y et al., Biosynthesis of isoprene in Escherichia coli via methylerythritol phosphate (MEP) pathway, Appl. Microbiol. Biotechnol., 2011.06, Vol.90, No.6, pp.1915-1922	1-14

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C08F36/08(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N9/88(2006.01)i, C12P5/02(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. C12N15/09, C08F36/08, C12N1/21, C12N9/88, C12P5/02			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, JSTPlus(JDreamII)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
X Y	JP 2011-505841 A (ダニスコ・ユーエス・インク) 2011.03.03, & US 2009/0203102 A1 & EP 2235190 A1 & WO 2009/076676 A2	1-14 1-14	
Y	KUZMA J et al., Leaf Isoprene Emission Rate Is Dependent on Leaf Development and the Level of Isoprene Synthase, Plant Physiol., 1993, Vol.101, No.2, pp.435-440	1-14	
☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 2 8 . 0 3 . 2 0 1 3		国際調査報告の発送日 0 9 . 0 4 . 2 0 1 3	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（I S A / J P） 郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官（権限のある職員） 西村 亜希子 電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8	4 N 3 4 3 5

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	MONSON RK et al., Relationships among Isoprene Emission Rate, Photosynthesis, and Isoprene Synthase Activity as Influenced by Temperature, Plant Physiol., 1992, Vol.98, No.3, pp.1175-1180	1-14
A	JP 2011-518564 A (ダニスコ・ユーエス・インク) 2011.06.30, & US 2010/0003716 A1 & EP 2279251 A1 & WO 2009/132220 A2	1-14
A	ZHAO Y et al., Biosynthesis of isoprene in Escherichia coli via methylerythritol phosphate (MEP) pathway, Appl. Microbiol. Biotechnol., 2011.06, Vol.90, No.6, pp.1915-1922	1-14