

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6342385号
(P6342385)

(45) 発行日 平成30年6月13日 (2018. 6. 13)

(24) 登録日 平成30年5月25日 (2018. 5. 25)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 P	7/42	(2006. 01)	C 1 2 P	7/42	Z N A
C 1 2 N	1/19	(2006. 01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	(2006. 01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	15/09	(2006. 01)	C 1 2 N	15/00	A

請求項の数 21 (全 47 頁)

(21) 出願番号 特願2015-507618 (P2015-507618)
 (86) (22) 出願日 平成25年4月25日 (2013. 4. 25)
 (65) 公表番号 特表2015-514433 (P2015-514433A)
 (43) 公表日 平成27年5月21日 (2015. 5. 21)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2013/001071
 (87) 国際公開番号 W02013/160762
 (87) 国際公開日 平成25年10月31日 (2013. 10. 31)
 審査請求日 平成28年3月8日 (2016. 3. 8)
 (31) 優先権主張番号 PCT/IB2012/001123
 (32) 優先日 平成24年4月26日 (2012. 4. 26)
 (33) 優先権主張国 国際事務局 (IB)

(73) 特許権者 507200961
 アディッソ・フランス・エス. エー. エス
 .
 A D I S S E O F R A N C E S . A .
 S .
 フランス国、9 2 1 6 0 アントニー、ブ
 ラース・デュ・ジェネラル・ドゥ・ゴール
 1 0、インムーブル・アントニー・パー
 ル・ドゥジエーム
 (74) 代理人 100108855
 弁理士 蔵田 昌俊
 (74) 代理人 100109830
 弁理士 福原 淑弘
 (74) 代理人 100103034
 弁理士 野河 信久

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 2, 4-ジヒドロキシ酪酸を生成する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

連続する、

a) マリル C o A シンターゼ、スクシニル C o A : (L) - マレート C o A トランスフェラーゼ、および / またはマリル C o A リアーゼの活性を有する酵素により触媒されることにより、マレートおよび / またはスクシニル C o A および / またはグリオキシレートマリル C o A に変換する第 1 の工程と、

b) マリル C o A レダクターゼ活性を有する酵素により触媒されることにより、工程 a) で得られたマリル C o A をマレート - 4 - セミアルデヒドに変換する第 2 の工程と、

c) 工程 b) で得られたマレート - 4 - セミアルデヒドを、D H B デヒドロゲナーゼを用いて 2 , 4 - D H B に変換する第 3 の工程と、を含む、2 , 4 - ジヒドロキシ酪酸 (2 , 4 - D H B) を調製するための方法。

【請求項 2】

工程 a) の前記酵素が、配列番号 1、配列番号 1 9 1、または配列番号 1 9 3 で示すポリペプチドのいずれか 1 つである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

工程 a) の前記酵素が、配列番号 2、配列番号 1 9 4 または配列番号 1 9 2 において規定される核酸のいずれか 1 つによってコードされるポリペプチドである、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

10

20

工程 b) の前記酵素は、マロニル C o A レダクターゼ、スクシニル C o A レダクターゼ、もしくは 3 - ヒドロキシ - 3 - メチルグルタリル - C o A (H M G - C o A) レダクターゼ、シンナモイル C o A レダクターゼ、もしくはアセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有する酵素の中から選ばれ、またはこれら酵素の修飾により得ることができる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

工程 b) の前記酵素が、配列番号 7、配列番号 10、もしくは配列番号 189 で示すポリペプチドのいずれか 1 つである、請求項 1 または 4 に記載の方法。

【請求項 6】

工程 b) の前記酵素が、配列番号 8、配列番号 11 配列番号 190 において規定される核酸のいずれか 1 つによってコードされるポリペプチドである、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記マロニル C o A レダクターゼが、配列番号 7 のポリペプチドで示されるスルホロブストコダイイ (*Sulfolobus tokodaii*) のマロニル C o A レダクターゼ野生型酵素に比べた場合、P 111、L 152、T 154、L 202、G 203、D 204、Y 206、D 207、K 209、T 210、T 238、T 239、D 295、R 318 の少なくとも 1 つの位置において少なくとも 1 つの変異を含み、前記位置における天然に生じるアミノ酸が、他の 19 種類の天然に存在するタンパク質構成アミノ酸のいずれか 1 つによって、すなわち、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、またはバリンのいずれかによって置きかえられている、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記マロニル C o A レダクターゼを配列番号 202 で示す、または配列番号 201 の核酸によってコードする、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

工程 c) を、D H B デヒドロゲナーゼ活性を有する酵素によって触媒する、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記酵素が、メチルブチルアルデヒドレダクターゼ、スクシニクセミアルデヒドレダクターゼ、4 - ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼ、またはアルコールデヒドロゲナーゼである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

工程 c) の前記酵素を、
(1) 配列番号 14、配列番号 16、配列番号 32、配列番号 34、配列番号 36、配列番号 187、もしくは配列番号 185 で規定されるポリペプチド、または、
(2) 上記 (1) のポリペプチドの 1 つまたは 2 つのアミノ酸が変異したバリエーションで、上記 (1) のポリペプチド酵素活性を維持しているバリエーション、
によって表す、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

工程 c) の前記酵素が、配列番号 15、配列番号 17、配列番号 33、配列番号 35、配列番号 37、配列番号 188、または配列番号 186 において規定される核酸のいずれか 1 つによってコードされるポリペプチドである、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

工程 a)、b)、および c) を、工程 a)、b)、または c) に記載する酵素活性を有する酵素の少なくとも 1 つを異種性に発現する修飾された微生物によって行う、請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

工程 a)、b)、および c) を同じ微生物内で行う、請求項 1 から 13 のいずれか一項

10

20

30

40

50

に記載の方法。

【請求項 15】

請求項 1 から 13 のいずれか一項において規定した、工程 a)、b)、および c) の触媒作用に必要な酵素活性を有する酵素をコードする遺伝子が、2, 4 - D H B を生成するために導入された変異微生物。

【請求項 16】

腸内細菌科、クロストリジウム科、バシラス科、ストレプトミセス科、ストレプトコッカス科、メチロバクテリウム科 (Methylobacteriaceae)、およびコリネバクテリウム科の中から選択される細菌、または、サッカロミセス科、ピキア科、およびシゾサッカロミセス科の中から選択される酵母である、請求項 15 に記載の微生物。

10

【請求項 17】

大腸菌、枯草菌、コリネバクテリウムグルタミカム、クロストリジウムアセトブチリカム、メチロバクテリウムエキストロクエンシス、もしくは乳酸菌の中から選択される細菌、または、サッカロミセスセレビシエ、シゾサッカロミセスポンベ、クルイベロミセスラクチス、クルイベロミセスマルキシアヌス、ピキアジャディニ、ピキアスティピティス、もしくはピキアパストリの中から選択される酵母である、請求項 16 に記載の微生物。

【請求項 18】

ホスホエノールピルベートカルボキシラーゼ、ホスホエノールピルベートカルボキシナーゼ、ピルベートカルボキシラーゼ、イソシトレートリアーゼ、ピルベートカルボキシラーゼ、およびヘキソース共輸送体パーミアーゼの中から選択される酵素活性の少なくとも 1 つの発現が増大し、かつ/またはラクテートデヒドロゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、アセテートキナーゼ、ホスフェートアセチルトランスフェラーゼ、ピルベートオキシダーゼ、イソシトレートリアーゼ、フマレートレダクターゼ、フマラーゼ、2 - オキソグルタレートデヒドロゲナーゼ、ピルベートキナーゼ、マリック酵素、ホスホグルコースイソメラーゼ、ホスホエノールピルベートカルボキシラーゼ、ホスホエノールピルベートカルボキシナーゼ、ピルベートホルメートリアーゼ、スクシニクセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、糖輸送 (sugar-transporting) ホスホトランスフェラーゼ、アスパルテートアミノトランスフェラーゼ、グリオキシレートレダクターゼ、マレートシンターゼ、またはメチルグリオキサルシンターゼの中から選択される酵素活性の少なくとも 1 つが低減している、請求項 15 から 17 のいずれか 1 項に記載の微生物。

20

30

【請求項 19】

全ての¹大腸菌の p p c、p c k、a c e A、g a l P；乳酸菌からの p y c A の中から選択される遺伝子の少なくとも 1 つを過剰発現し、かつ/または l d h A、a d h E、a c k A、p t a、p o x B、f o c A、p f l B、s a d、g a b A B C、s f c A、m a e B、p p c、p y k A、p y k F、m g s A、f r d A B C D、s u c A B、p t s I、p t s G、p g i、f u m A B C、a l d A、l l d D、i c l R、a c e B、a s p C、g h r A B の中から選択される遺伝子の少なくとも 1 つを欠失した大腸菌である、請求項 18 に記載の微生物。

【請求項 20】

請求項 15 から 19 のいずれか一項に記載の修飾された微生物を、適切な培養培地中で培養する工程と、

40

前記培養培地から 2, 4 - D H B を回収する工程とを含む、2, 4 - D H B を生成する方法。

【請求項 21】

前記 2, 4 - D H B をさらに精製する、請求項 20 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の概要】

【0001】

本発明は、マレートおよび/またはグリオキシレートおよび/またはスクシニル C o A をマリル C o A に、マリル C o A をマレート - 4 - セミアルデヒドに変換し、次いで前記

50

マレート - 4 - セミアルデヒドを、2, 4 - ジヒドロキシ酪酸 (2, 4 - DHB) に変換する合成経路を行うことにより、マレートおよび / またはグリオキシレートおよび / またはスクシニル CoA から 2, 4 - ジヒドロキシ酪酸を生成する新規な方法に関する。

【0002】

本出願内に列挙するカルボン酸は、その塩 (例えば、2, 4 - ジヒドロキシブチレート) または酸の形態 (例えば、2, 4 - ジヒドロキシ酪酸) のもとに等しく命名されるものである。

【0003】

2, 4 - ジヒドロキシ酪酸 (等しく、2, 4 - DHB または DHB) は、経済的な関心を相当集めている化合物である。DHB は、水性媒質中、適切な pH に調節することにより、 γ -ヒドロキシ- γ -ブチロラクトンに容易に変換することができる。 γ -ヒドロキシ- γ -ブチロラクトンは、動物栄養において大きな市場を有する、メチオニン代替品である 2 - ヒドロキシ-4 - (メチルチオ)-ブチレート (HMTB) (US 2009/318715) の生成に卓越した前駆物質である。現在、 γ -ヒドロキシ- γ -ブチロラクトンは、 γ -ブチロラクトンの位におけるハロゲン化、引き続きアルカリ媒質中のハロゲン原子のヒドロキシル基による置換を伴う多段プロセスにより、 γ -ブチロラクトンから派生する (US 2009/318715)。

【0004】

原油価格の増大から、DHB を再生可能な資源から生成する必要性が生じている。微生物は、バイオマス由来の原料、例えば、糖または有機酸を、多種多様な異なる化学物質に変換することができる (Werpy および Petersen, 2004)。生化学情報およびゲノム情報量の増大に伴い、微生物が天然に生じる代謝中間体を高収率および高生産性で過剰生産するように、微生物を修飾することが可能である (Bailey, 1991)。生成する微生物の最適化はしばしば、数ある中でも対象の代謝産物の生合成に必要とされる酵素の過剰発現、および生成物のフィードバック阻害の軽減を確実にする代謝ネットワークの合理的な操作を必要とする。別の可能性は、対象の代謝産物の生成を触媒する新規な酵素系の実行である。

【0005】

代謝工学の取り組み、および酵素触媒は、対象の代謝産物に通じる代謝経路の生化学および調節の詳しい知識を必要とする。2, 4 - DHB 生成の場合、この情報は入手可能ではない。スクシニクセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ欠損を有する患者における 2, 4 - DHB の出現を報告する研究がいくつかあるが (Shinkar, 2002)、DHB 生成に係る酵素反応は同定されていない。したがって、2, 4 - DHB の、発酵による生成または酵素的生成には、(i) 身近な前駆物質を 2, 4 - DHB に変換する熱力学的に実行可能な経路の同定、(ii) 経路において個々の反応工程を触媒することができる酵素の同定または構築、および (iii) 適切な生成生物体におけるその経路酵素の機能的発現が必要とされる。

【0006】

本発明は、一目的として、これらの必要性を満たす必要がある。

【0007】

したがって、本発明の一目的は、マレートおよび / またはグリオキシレートおよび / またはスクシニル CoA をマリル CoA に変換する第 1 の工程と、マリル CoA をマレート - 4 - セミアルデヒドに変換する第 2 の工程と、マレート - 4 - セミアルデヒドを 2, 4 - DHB に変換する第 3 の工程とを含む、2, 4 - DHB を生成する方法である。

【0008】

したがって、本発明の一目的は、マレートを、マリル CoA シンテターゼ活性を保有する酵素の作用によってマリル CoA に変換し [1.1]、かつ / またはスクシニル CoA を、スクシニル CoA : (L) - マレート CoA トランスフェラーゼ活性を有する酵素の作用によってマリル CoA に変換し [1.2]、かつ / またはグリオキシレートを、マリル CoA リアーゼ活性を保有する酵素の作用によってマリル CoA に変換する [1.3]

10

20

30

40

50

、第1の反応(図1を参照されたい)を含む、2,4-DHBを生成する方法である。第2の反応において[2]、マリルCoAを、マリルCoAレダクターゼ活性を保有する酵素の作用によってマレート-4-セミアルデヒドに変換する。第3の反応において[3]、マレート-4-セミアルデヒドを、DHBデヒドロゲナーゼ活性を保有する酵素の作用によってDHBに変換する。より正確に、反応[3]は、経路の生合成的意味において、マレート-4-セミアルデヒドレダクターゼ活性を担う酵素によって触媒される。

【0009】

本発明の別の一側面内では、2,4-DHBを生成する方法の第1の工程は、マレート、スクシニルCoA、またはグリオキシレートをマリルCoAにそれぞれ変換する、マリルCoAシンテターゼ(マレートチオキナーゼまたはマレートコエンザイムAリガーゼ(ADP形成性)EC6.2.1.9と等しく命名された)、スクシニルCoA:(L)-マレートCoAトランスフェラーゼ(EC2.8.3)、またはマリルCoAリアーゼ(EC4.1.3.24)活性を有する酵素に關与する。

【0010】

前記酵素は、ホルムアルデヒドの固定にセリンサイクルを使用するメチロトロフ細菌において(Chistoserdovaら、2009;Smejkalovaら、2010;Vuilleumierら、2009)、グリオキシレートサイクルおよびイソシトレートリアーゼ活性と独立のアセテート同化経路に依存する細菌において(Meisterら、2005)、ならびに独立栄養性の増殖に3-ヒドロキシプロピオネートCO₂固定サイクルを使用する細菌において(Zarzyckiら、2009)同定されている。

【0011】

上記の酵素と相同性を共有するタンパク質、例えば、機能的バリエーションまたは機能的フラグメントも、本発明の別の一側面である。

【0012】

マリルCoAシンテターゼは、2つのサブユニットであるMtkAおよびMtkBからなる。したがって、本発明によると、マリルCoAシンテターゼ活性を含んでいるタンパク質は、メチロピウムペトロレイフィルム(M.petroleiphilum)(YP 001022444およびYP 001022445)メチロバクターエクストロケンス(Methylobacter extorquens)(YP 002962851およびYP 002962852)のマリルCoAシンテターゼサブユニットであるMtkAおよびMtkB、またはメチロコッカスカプスラツス(M.capsulatus)(YP 114179およびYP 114180)のSucCおよびSucDの2つのサブユニットのタンパク質配列と、少なくとも30%の同一性、優先的に少なくとも50%、より優先的に70%の同一性を有する全てのポリペプチドを指定する。

【0013】

マリルCoAリアーゼはホモ6量体であり、アセテート同化にグリオキシレートサイクルを使用しない細菌において見出される(Meisterら、2005)。したがって、本発明によると、マリルCoAリアーゼ活性を含んでいるタンパク質は、メチロバクターエクストロケンス、ロドバクターカプスラツス(Rhodobacter capsulatus)、またはストレプトミセスセリカラー(Streptomyces coelicolor)のマリルCoAリアーゼであるMclのタンパク質配列に、少なくとも30%の同一性、優先的に少なくとも50%、より優先的に70%の同一性を有する全てのポリペプチドを指定する。

【0014】

本発明のさらなる一側面において、本発明のマリルCoAリアーゼは、配列番号1によって、またはその任意のバリエーションによって表される。

【0015】

スクシニル-CoA:(L)-マレートCoAトランスフェラーゼは、2つのサブユニットであるSmtAおよびSmtBからなる(Zarzyckiら、2009)(Friedmannら、2006)。したがって、本発明によると、スクシニル-CoA:(L)-マレートCoAトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質は、クロロフレクサスア

10

20

30

40

50

ウランディアカス (*Chloroflexus aurantiacus*) のスクシニル - C o A : (L) - マレート C o A トランスフェラーゼサブユニットの S m t A および S m t B のタンパク質配列 (配列番号 1 9 1 および配列番号 1 9 3 によって表され、または配列番号 1 9 2 および配列番号 1 9 4 によってコードされる) に、少なくとも 3 0 % の同一性、優先的に少なくとも 5 0 %、より優先的に 7 0 % の同一性を有する全てのポリペプチドを指定する。

【 0 0 1 6 】

より一般的に、本発明の意味内で、2つのタンパク質配列間の同一性は、当業者にはよく知られている方法によって決定することができる。このような方法の例には、C L U S T A L W (L a r k i n ら、2 0 0 7) ソフトウェア (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>、デフォルトパラメータはウェブサイトに示される) または B L A S T アラインメントプログラム (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>、デフォルトパラメータはウェブサイトに示される) の使用がある。

10

【 0 0 1 7 】

機能的バリエーションの語は、本出願内に具体的に記載する配列に比べた場合、実質的な配列の修飾を表してもよいが、オリジナルの酵素活性を依然として保持する酵素を包含する。

【 0 0 1 8 】

機能的フラグメントの語は、本発明によると、酵素の配列に含まれるアミノ酸がオリジナルのものよりも少なくともよいが、前記切断された酵素はオリジナルの酵素活性を依然として保持することを意味する。

20

【 0 0 1 9 】

前記酵素の改善は、少なくとも1つの変異によって得られてもよく、前記変異は、変異した酵素の、マレート、スクシニル C o A、またはグリオキシレートそれぞれのそれに対する活性および / または基質親和性を改善する。

【 0 0 2 0 】

本発明内で、「活性および / または基質親和性を改善する」との表現は、変異前の酵素が、

- 基質を用いることができず、かつ / または
- 反応の生成物を合成する最大特異的速度が少なくとも 3 倍低い、かつ / または
- マレート、スクシニル C o A、もしくはグリオキシレート、マリル C o A、もしくはマレート - 4 - セミアルデヒドに対する親和性が少なくとも 2 倍、より好ましくは 3 倍低い、

のいずれかであったことを意味する。

30

【 0 0 2 1 】

マリル C o A シンテターゼおよびマリル C o A リアーゼの活性は、それぞれ (S m e j k a l o v a ら、2 0 1 0) または (M e i s t e r ら、2 0 0 5) によって記載される酵素試験により測定することができる。スクシニル - C o A : (L) - マレート C o A トランスフェラーゼ活性は、(F r i e d m a n n ら、2 0 0 6) によって記載される通りに測定することができる。

40

【 0 0 2 2 】

なおさらなる一側面内で、本発明による 2 , 4 - D H B を生成する方法の第 2 の工程は、マリル C o A をマレート - 4 - セミアルデヒドに変換することを特徴とするマリル C o A レダクターゼ活性を有する酵素に關与する。

【 0 0 2 3 】

前記酵素は、マロニル C o A レダクターゼ、スクシニル C o A レダクターゼ、もしくは報告されている 3 - ヒドロキシ - 3 - メチルグルタル - C o A (H M G - C o A) レダクターゼ、シンナモイル C o A レダクターゼ、もしくはアセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有する酵素の間で同定することができ、またはこれらは前記酵素の修飾により得ることができる。

50

【0024】

マロニルCoAレダクターゼ（EC 1.2.1.75）およびスクシニルCoAレダクターゼ（EC 1.2.1.76）は、二酸化炭素固定のための修飾3-ヒドロキシプロピオネートサイクルを保有する細菌において（Alberら、2006；Kockelkorn & Fuchs、2009）、および嫌気性スクシネート分解経路（Seedorfら、2008；Sohling & Gottschalk、1993）を使用する細菌において見出された。HMG-CoAレダクターゼ（EC 1.1.1.38、EC 1.1.1.88）は、真核生物およびいくつかの細菌におけるイソプレノイドの生合成経路の一部である。シンナモイルCoAレダクターゼ（EC 1.2.1.44）は、リグニン生合成に関係する酵素である（Kawasakiら、2006）。アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ（EC 1.2.1.10）は、非常に多様な細菌において見出され、エタノール生成経路への進入またはアセトアルデヒドの解毒を触媒する。

10

【0025】

本発明のさらなる一側面内で、マリルCoAレダクターゼは、配列番号7もしくは配列番号10によって、またはその任意の機能的バリエーションもしくはその任意の機能的フラグメントによって表される。

【0026】

したがって、本発明によると、マロニルCoAレダクターゼ活性を有するタンパク質は、スルホロブストコダイイ（*Sulfolobus tokodaii*）のマロニルCoAレダクターゼであるMcr（配列番号7）のタンパク質配列に少なくとも30%の同一性を有する全てのポリペプチドを指定する。優先的に、これらは少なくとも50%、より優先的に70%の同一性を有する。

20

【0027】

クロロフレクサスアウランティアカス（*Chloroflexus aurantiacus*）のマロニルCoAレダクターゼ（配列番号190によってコードされる配列番号189）は、本発明の別の一側面を構成する。クロロフレクサスアウランティアカスのタンパク質配列に少なくとも30%の同一性を有するポリペプチドも本発明の一部である。優先的に、これらは少なくとも50%、より優先的に70%の同一性を有する。

【0028】

したがって、本発明によると、スクシニルCoAレダクターゼ活性を有するタンパク質は、ポルフィロモナスジンジバリス（*Porphyromonas gingivalis*）のスクシニルCoAレダクターゼであるSucDのタンパク質配列（配列番号10）に、または二機能性のスルホロブストコダイイのマロニルCoAおよびスクシニルCoAレダクターゼであるMcr（配列番号7）に、少なくとも30%の同一性を有する全てのポリペプチドを指定する。優先的に、これらは少なくとも50%、より優先的に70%の同一性を有する。

30

【0029】

マリルCoAレダクターゼ活性は、例2に記載する酵素試験により測定することができる（「酵素アッセイ」を参照されたい）。

【0030】

この酵素活性は、酵素の少なくとも1つの変異により改善することができ、前記変異は、変異した酵素のマリルCoAに対する活性および/もしくは基質親和性を改善し、または天然の基質に対する変異した酵素の活性を低減する。

40

【0031】

本発明は、改善した活性を有する修飾されたマリルCoAレダクターゼも包含する。

【0032】

本発明によるマリルCoAレダクターゼは、具体的な一側面において、野生型酵素に比べた場合、P111、L152、T154、L202、G203、D204、Y206、D207、K209、T210、T238、T239、D295、R318の少なくとも1つの位置に少なくとも1つの変異を含む、スルホロブストコダイイのマロニルCoAレダクターゼに相当し、前記位置における天然に生じるアミノ酸は、他の19種類の天然に

50

存在する、タンパク質構成 (proteinogenic) アミノ酸のいずれか 1 つによって、すなわち、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、またはバリンのいずれかによって置きかえられている。

【 0 0 3 3 】

別の一側面内で、本発明による 2, 4 - D H B を生成する方法の第 3 の工程は、D H B デヒドロゲナーゼがマレート - 4 - セミアルデヒドを 2, 4 - D H B に変換することを特徴とし、前記酵素が経路の生合成的意味においてマレート - 4 - セミアルデヒドレダクターゼ活性を担う、D H B デヒドロゲナーゼに關与する。

10

【 0 0 3 4 】

D H B デヒドロゲナーゼ活性を潜在的にすでに保有する、候補の D H B デヒドロゲナーゼ酵素は、C 3、C 4、または C 5 化合物に対して作用するベータヒドロキシ酸デヒドロゲナーゼのクラスから選択することができる。

【 0 0 3 5 】

本発明のなおさらなる一側面によると、前記 D H B デヒドロゲナーゼ酵素は、ヒドロキシ酸デヒドロゲナーゼ、例えば、タルトロネートセミアルデヒドレダクターゼ、スクシネートセミアルデヒドレダクターゼ、4 - ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼ、マロネートセミアルデヒドレダクターゼ、メチルブチルアルデヒドレダクターゼ、亜鉛型アルコールデヒドロゲナーゼ、L - スレオニン - 3 - デヒドロゲナーゼ、シンナミルアルコールデヒドロゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、またはホモセリンデヒドロゲナーゼと、構造的かつ機構的に關連し得る。

20

【 0 0 3 6 】

本発明は、マレート - 4 - セミアルデヒドを 2, 4 - D H B に変換するための、メチルブチルアルデヒドレダクターゼ、もしくはスクシニクセミアルデヒドレダクターゼ (4 - ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼと等しく命名される) の使用、またはアルコールデヒドロゲナーゼの使用も取り扱う。

【 0 0 3 7 】

本発明の別の具体的な一側面において、D H B デヒドロゲナーゼは、サッカロミセスレビスエ (*S. cerevisiae*) のメチルブチルアルデヒドレダクターゼ (Y p r 1)、メタ

30

ロスファエラセデュラ (*M. sedula*) のスクシニクセミアルデヒドレダクターゼ、ボルフ

ィロモナスジンジバリスの 4 - ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼ (4 h b d)、または大腸菌 (*Escherichia coli*) のアルコールデヒドロゲナーゼ (Y q h D) に相当する。

40

【 0 0 3 8 】

具体的な態様において、前記メチルブチルアルデヒドレダクターゼは配列番号 1 4 によって表され、前記スクシニクセミアルデヒドレダクターゼは配列番号 1 6 によって表され、前記 4 - ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼは配列番号 1 8 7 によって表され、前記アルコールデヒドロゲナーゼは配列番号 1 8 5 によって表される。D H B デヒドロゲナーゼ活性は、例 3 に記載する酵素試験によって測定することができる (「酵素アッセイ」を参照されたい) 。

【 0 0 3 9 】

D H B デヒドロゲナーゼのマレート - 4 - セミアルデヒドに対する親和性は、酵素の少なくとも 1 つの変異によって増大することができ、前記変異は、変異した酵素のマレート - 4 - セミアルデヒドに対する活性および / もしくは基質親和性を増大し、かつ / またはその天然の基質に対する活性もしくは親和性を少なくとも 2 ファクター低減する。

【 0 0 4 0 】

本発明による D H B デヒドロゲナーゼは、具体的な一側面において、野生型酵素に比べた場合、少なくとも 1 つの変異を、S 4 0、N 4 3、H 3 9、T 4 9、F 8 5、Q 1 0 8、L 2 8 1、および N 3 0 5 の少なくとも 1 つの位置に含むメタロスファエラセデュラの

50

スクシニクセミアルデヒドレダクターゼ（配列番号 16）に相当し、前記位置における天然に生じるアミノ酸は、他の 19 種類の天然に存在する、タンパク質アミノ酸のいずれか 1 つによって、すなわち、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、またはバリンのいずれかによって置きかえられている。

【0041】

非排他的な一例において実証する通り、メタロスファエラセデュラのスクシニクセミアルデヒドレダクターゼの（L）-マレート-4-セミアルデヒドに対する親和性は、配列番号 36 によって表す通り、H39R N43H の二重変異を、部位特異的突然変異誘発によって導入することにより増大した。H39R の単一の変異体（配列番号 32）および N43H の単一の変異体（配列番号 34）も、本発明により包含される（例 5）。

10

【0042】

DHB デヒドロゲナーゼを用いて、マレート-4-セミアルデヒドを 2,4-DHB に変換することができ、これは本発明のさらなる一側面を構成する。

【0043】

遺伝子の核酸配列を、宿主生物体のコドン使用頻度に適応させ、それにより異種性に発現されたタンパク質の生成を増大することができる。これは本発明のさらなる一側面を構成する。

【0044】

20

ヌクレオチド配列が、配列番号 38 によって表されるように大腸菌における発現に最適化された、メタロスファエラセデュラのスクシニクセミアルデヒドレダクターゼ H39R N43H をコードする合成遺伝子の合成は、本発明のさらなる一側面である。

【0045】

なおさらなる一側面において、本発明は、核酸、より特にマリル CoA シンテターゼをコードする単離された核酸配列も取り扱う。

【0046】

なおさらなる一側面において、本発明は、マリル CoA リアーゼをコードする単離された核酸配列、より具体的には配列番号 2 によってコードされる単離された核酸配列を取り扱う。

30

【0047】

なおさらなる一側面において、本発明は、マリル CoA レダクターゼをコードする単離された核酸配列、より具体的には配列番号 8、配列番号 11、または配列番号 190 によってコードされる単離された核酸配列を取り扱う。

【0048】

なおさらなる一側面において、本発明は、上記に記載した DHB デヒドロゲナーゼをコードする単離された核酸配列も取り扱う。

【0049】

別の一側面において、前記核酸は、配列番号 15、配列番号 17、配列番号 37、配列番号 186、または配列番号 188 によって表される。

40

【0050】

本発明によると、「核酸配列」は、一本鎖または二本鎖の形態の DNA または RNA 分子、好ましくは DNA 分子を意味する。ここで用いられる「単離された DNA」は、天然に生じず、またはそれがもともと存在していた天然の環境中に最早ない DNA、例えば、キメラ遺伝子における他の制御エレメントに関連する DNA コード配列、別の宿主細胞中に移された DNA、または任意の天然に生じる DNA 配列に比べて異なるヌクレオチド配列を有する人工の、合成で作られた DNA 配列を意味する。

【0051】

本発明は、相互に機能的に連結している、宿主生物体において機能的である少なくとも 1 つのプロモーター；本発明により規定するマリル CoA シンテターゼまたはマリル Co

50

A リアーゼ、マリルC o A レダクターゼ、マロニルC o A レダクターゼ、スクシニルC o A レダクターゼ、またはD H B デヒドロゲナーゼ活性のいずれか1つをコードするポリヌクレオチド；および同じ宿主生物体において機能的であるターミネーターエレメントを含んでいるキメラ遺伝子にも関する。キメラ遺伝子が含まれていてもよい様々なエレメントは、第1に、転写、翻訳、およびタンパク質の成熟を制御するエレメント、例えばプロモーター、シグナルペプチドもしくは輸送ペプチドをコードする配列、またはポリアデニル化シグナルを構成するターミネーターエレメント、第2に、タンパク質をコードするポリヌクレオチドである。「相互に機能的に連結している」の表現は、これらのエレメントの1つの機能が別のものによって影響を受けるようなやりかたで、キメラ遺伝子の前記エレメントが相互に連結していることを意味する。例によると、プロモーターは、プロモーターが前記コード配列の発現に影響を及ぼすことができる場合は、コード配列に機能的に連結している。本発明によるキメラ遺伝子の構築、およびその様々なエレメントの組立ては、当業者によく知られている技術を用いて行うことができる。キメラ遺伝子を構成する制御エレメントの選択は、これらが機能しなければならない宿主生物体に本質的に依存するものであり、当業者であれば、所与の宿主生物体において機能的である制御エレメントを選択することができる。「機能的な」との語は、所与の宿主生物体において機能を果たすことができることを意味するものとされる。

【0052】

本発明によるキメラ遺伝子が含まれていてもよいプロモーターは、構成的プロモーターまたは誘導プロモーターのいずれかである。例によると、細菌における発現に用いられるプロモーターを、以下に言及するプロモーターから選択してもよい。大腸菌における発現に対して、*lac*、*trp*、*lpp*、*phoA*、*recA*、*araBAD*、*prou*、*cst-1*、*tetA*、*cadA*、*nar*、*tac*、*trc*、*lpp-lac*、*Psyn*、*cspA*、*PL*、*PL-9G-50*、*PR-PL*、*T7*、[ラムダ]*PL-PT7*、*T3-lac*、*T5-lac*、*T4* 遺伝子32、*nprM-lac*、*VHb*、およびプロテインAプロモーター、または他に*Ptrp*プロモーターを言及してもよい(WO99/64607)。グラム陽性細菌、例えば、コリネバクテリウム(*Corynebacteria*)またはストレプトミセス(*Streptomyces*)における発現に対して、*PtipA*または*PS1*および*PS2*(FR91/09870)プロモーター、またはEP0629699 A2出願に記載されているものを言及してもよい。酵母および真菌における発現に対して、クルベイロミセスラクチス(*K.lactis*)の*PLAC4*プロモーター、またはクルベイロミセスラクチスの*Ppgk*プロモーター(特許出願FR91/05294)、トリコデルマ(*Trichoderma*)の*tef1*または*cbh1*プロモーター(WO94/04673)、ペニシリウム(*Penicillium*)の*his*、*cs1*、または*apf*プロモーター(WO00/68401)、およびアスペルギルス(*Aspergillus*)の*gl a*プロモーターを言及してもよい。

【0053】

本発明によると、キメラ遺伝子は、プロモーターとコード配列との間に位置する、他の制御配列、例えば、転写アクチベーター(エンハンサー)も含んでいてもよい。

【0054】

したがって、本発明のキメラ遺伝子は、少なくとも具体的な一態様において、転写の方向において機能的に連結している、宿主生物体において機能的であるプロモーター制御配列、マリルC o A シンテターゼをコードする核酸配列、および/または本発明の、スクシニルC o A : (L) - マレートC o A トランスフェラーゼ、および/またはマリルC o A リアーゼ、マリルC o A レダクターゼ、およびD H B デヒドロゲナーゼ、ならびに前記宿主生物体において機能的であるターミネーター制御配列を含んでいる。

【0055】

本発明はまた、本発明によるキメラ遺伝子、または本発明の核酸配列を含んでいる、クローニングベクターおよび/または発現ベクターに関する。本発明によるベクターは、宿主生物体を形質転換するのに、およびこの生物体においてマリルC o A シンテターゼ、および/またはスクシニルC o A : (L) - マレートC o A トランスフェラーゼ、および/

10

20

30

40

50

またはマリルC o Aリアーゼ、マリルC o Aレダクターゼ、および/またはD H Bデヒドロゲナーゼのいずれか1つを発現させるのに有用である。このベクターは、プラスミド、コスミド、バクテリオファージ、またはウイルスであってもよい。優先的に、本発明による形質転換ベクターはプラスミドである。一般的に、このベクターの主な品質は、それ自体を維持する能力、ならびに宿主生物体の細胞において、特に複製開始点の存在によって、自己複製する能力、ならびにマリルC o Aシンテターゼ、および/またはスクシニルC o A : (L) - マレートC o Aトランスフェラーゼ、および/またはマリルC o Aリアーゼ、マリルC o Aレダクターゼ、および/またはD H Bデヒドロゲナーゼのいずれか1つをその中で発現させる能力でなければならない。宿主生物体の安定な形質転換の目的で、ベクターをまた、ゲノム中に組み入れてもよい。このようなベクターの選択、および本発明によるキメラ遺伝子をこのベクター中に挿入する技術は、当業者の一般的知識の一部である。有利には、本発明において用いられるベクターはまた、本発明によるキメラ遺伝子に加えて、選択マーカーをコードするキメラ遺伝子も含んでいる。この選択マーカーにより、効果的に形質転換されている宿主生物体、すなわち、ベクターを組み入れたものを選択することが可能になる。本発明の特定の態様によると、形質転換しようとする宿主生物体は、細菌、酵母、真菌である。用いることができる選択マーカーの中で、抗生物質に対する耐性のための遺伝子、例えば、ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子を含んでいるマーカーを言及してもよい。他のマーカーは、栄養要求性を補完するための遺伝子、例えば、p y r A、p y r B、p y r G、p y r 4、a r g 4、a r g B、およびt r p C遺伝子、モリブドプテリンシンターゼ遺伝子、またはアセタミダーゼ (acetamidase) の遺伝子であってもよい。容易に同定できる酵素、例えば、G U S酵素をコードする遺伝子、または形質転換された細胞において色素もしくは色素の生成を制御する酵素をコードする遺伝子も言及してもよい。このような選択マーカーの遺伝子は特に、特許出願W O 9 1 / 0 2 0 7 1、W O 9 5 / 0 6 1 2 8、W O 9 6 / 3 8 5 6 7、およびW O 9 7 / 0 4 1 0 3 に特に記載されている。

【 0 0 5 6 】

本発明は、これらのゲノム中に組み入れられる、または染色体外遺伝エレメント、例えば、プラスミド上に保有されるいずれかの、本発明によるキメラ遺伝子を少なくとも1つ含んでいる形質転換された宿主生物体にも関する。本発明のより具体的な一側面において、形質転換された宿主生物体は、マリルC o Aシンテターゼ活性、および/もしくはスクシニルC o A : (L) - マレートC o Aトランスフェラーゼ、および/もしくはマリルC o Aリアーゼ活性を有するポリペプチドをコードする本発明の核酸；またはマリルC o Aシンテターゼ活性、および/もしくはスクシニルC o A : (L) - マレートC o Aトランスフェラーゼ、および/もしくはマリルC o Aリアーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を含んでいるキメラ遺伝子；またはマリルC o Aシンテターゼ活性、および/もしくはスクシニルC o A : (L) - マレートC o Aトランスフェラーゼおよび/もしくはマリルC o Aリアーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を含んでいる発現ベクター；ならびに/またはマリルC o Aレダクターゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸；またはマリルC o Aレダクターゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を含んでいるキメラ遺伝子；またはマリルC o Aレダクターゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を含んでいる発現ベクター；ならびに/またはD H Bデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸；D H Bデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を含んでいるキメラ遺伝子；またはD H Bデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸を含んでいる発現ベクターを含んでいる。

【 0 0 5 7 】

異種性の酵素の宿主生物体における活性はしばしば、これら酵素の溶解性が劣り、封入体を形成することによって制限される。したがって、本発明はまた、機能的な酵素が宿主生物体において発現される時にその活性を増大させるために、別のタンパク質またはペプチドに物理的に融合しているという点で、キメラタンパク質 (融合タンパク質と等しく命名される) に関する。このような融合タンパク質は当技術分野において知られており、以

10

20

30

40

50

下の非排他的な例の中から一般的に選択される：マルトース結合性タンパク質 M b p、チオレドキシン T h r X、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ G s t、転写終結因子 N u s A。

【 0 0 5 8 】

「宿主生物体」との語は、2, 4 - D H B を生成するために、その中に本発明によるキメラ遺伝子、核酸、またはベクターが導入されてもよい、任意の下等な単細胞生物体を意味するものとされる。好ましくは、宿主生物体は、微生物、特に、真菌、例えば、ペニシリウム、アスペルギルス、より特に黄色コウジ菌 (*Aspergillus flavus*)、クリソスポリウム (*Chrysosporium*)、またはトリコデルマ (*Trichoderma*) 属、酵母、特にサッカロミセス科 (*Saccharomycetaceae*)、ピキア科 (*Pichiaceae*)、またはシゾサッカロミセス科 (*Schizosaccharomycetaceae*)、最も優先的にサッカロミセスセレピシエ、シゾサッカロミセスポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、クルイベロミセスラクチス、クルイベロミセスマルキシアヌス (*Kluyveromyces marxianus*)、またはピキアジャディニ (*Pichia jadinii*)、ピキアスティピティス (*Pichia stipitis*)、またはピキアパストリス (*Pichia pastoris*)；腸内細菌科 (*Enterobacteriaceae*)、クロストリジウム科 (*Clostridiaceae*)、バシラス科 (*Bacillaceae*)、ストレプトミセス科 (*Streptomycetaceae*)、ストレプトコッカス科 (*Streptococcaceae*)、メチロバクテリウム科 (*Methylobacteriaceae*)、およびコリネバクテリウム科 (*Corynebacteriaceae*)、最も優先的に、大腸菌、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、コリネバクテリウムグルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*)、クロストリジウムアセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*)、メチロバクテリウムエキストロクエンズ (*Methylobacterium extorquens*)、または乳酸菌 (*Lactococcus lactis*) の中から優先的に選択される細菌である。

【 0 0 5 9 】

宿主生物体は、糖、例えば、グルコースからマレートもしくはスクシネートを天然に過剰生成する宿主生物体、または糖、例えば、グルコースからマレートもしくはスクシネートを過剰生成するように操作され、かつ有機酸、例えば、マレート、ピルベート、スクシネート、およびフマレートの搬出を促進する潜在的な膜輸送体が全て欠失している宿主生物体であってもよい。宿主生物体は、D H B を過剰生成するように操作され、かつ有機酸、例えば、マレート、ピルベート、スクシネート、およびフマレートの搬出を促進する膜輸送体が欠失している生物体であってもよい。マレートおよび他の有機酸の搬出を促進するパーミアーゼの例として、シゾサッカロミセスポンベからの M a e 1 (C a m a r a s a ら、2 0 0 1) (G r o b l e r ら、1 9 9 5)、枯草菌からの D c t A (G r o e n e v e l d ら、2 0 1 0)、大腸菌からの D c t 1 - 4、サッカロミセスセレピシエからの J e n 1 (A k i t a ら、2 0 0 0) がある。一専門家にとって、配列同一性に基づいて、大腸菌における候補のパーミアーゼを同定することは可能である。これらの構築はマレートおよび他の有機酸を細胞内に維持して、これらを D H B 生成に利用可能にするように働く。

【 0 0 6 0 】

「形質転換された宿主生物体」の表現は、そのゲノム中に、または染色体外の遺伝エレメント、例えば、プラスミドに、本発明による少なくとも 1 つのキメラ遺伝子を組み入れ、したがって細胞の内部に、または培養培地中に、マリル C o A シンターゼ、マリル C o A リアーゼ、マリル C o A レダクターゼ、および / または D H B デヒドロゲナーゼのいずれか 1 つを生成する宿主生物体を意味するものとされる。本発明による宿主生物体を得るために、当業者であれば、多くの既知の形質転換方法の 1 つを用いてもよい。

【 0 0 6 1 】

これらの方法の 1 つは、形質転換させようとする宿主生物体の細胞を、ポリエチレングリコール (P E G) および本発明によるベクターと接触させることにある。電気穿孔法は、形質転換させようとする細胞および本発明のベクターを電界に暴露することにある、別の方法である。別の方法は、ベクターを細胞または組織中にマイクロインジェクションにより直接注射することにある。「微粒子銃」方法を用いてもよい。これは細胞または

組織に、その上に本発明のベクターを吸着させた粒子で衝撃を与えることにある（米国特許第4,945,050）。

【0062】

細菌を形質転換するためのいくつかの方法が、大腸菌および他のグラム陰性細菌に関する文献に記載されている。コンジュゲーションをまた、用いてもよい。グラム陽性細菌に対して、特にストレプトミセス属の細菌に対して、電気穿孔法を用いてもよく、プロトプラスト形質転換をまた用いてもよい。

【0063】

真菌を形質転換するための方法もいくつか、文献に記載されている。PEGでのプロトプラスト形質転換はアスペルギルスについてEP0260762に記載されており、ペニシリウムフニコロスム（*Penicillium funiculosum*）種へのこの方法の適応についてはWO00/36120に記載されている。制限酵素媒介組入れ、すなわちREMIによる形質転換も、アグロバクテリウム（*Agrobacterium*）属の細菌を用いたプロトプラスト形質転換として知られている。酵母を形質転換するための技術も文献に記載されている。

【0064】

さらなる一側面において、本発明は、本発明の形質転換された微生物を培養する工程を含む、2,4-DHBを生成するプロセスを取り扱う。

【0065】

DHBを生成するために、様々な炭水化物を、個々に、またはグルコース、フルクトース、ショ糖、糖蜜、マルトース、廃糖蜜、デンプン加水分解物（グルコース、オリゴ糖）、ラクトース、マルトース、デンプンおよびデンプン加水分解物、セルロース、セルロース加水分解物、グリセロール、アセテートおよびある種の炭化水素、油および脂肪、例えば、ダイズ油、ヒマワリ油、ラッカセイ油、およびココナツ油、ならびに脂肪酸、例えば、パルミチン酸、ステアリン酸、およびリノール酸などの混合物として利用してもよい。これらの物質を、個々にまたは混合物として用いてもよい。

【0066】

無機化合物、例えば、気体および水性のアンモニア、無機酸または有機酸のアンモニウム塩、例えば、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、塩化アンモニウム、酢酸アンモニウム、および炭酸アンモニウムを含めた、様々な窒素源を、営業生産およびパイロット規模の生成用に、個々にまたは混合物として利用してもよい。あるいは、ダイズ加水分解物、ダイズタンパク質HCl加水分解物（全窒素約7%）、ダイズミール（soy bean meal）、ダイズかす加水分解物、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、イースト抽出物、肉エキス、麦芽エキス、尿素、ペプトン、およびアミノ酸などの天然の窒素含有有機材料も利用してもよい。

【0067】

生成プロセスは、好氣的な、嫌氣的な、および酸素制限した条件下で行うことができる。これは、流加培養プロセスまたはバッチプロセスとして行うことができる。

【0068】

2,4-DHBの前記の生成は、マレート（または別の有機酸、例えば、ピルベート、スクシネート、もしくはフマレート）を単独で、または増殖を確実にする別の炭素源と一緒に加えた培地中で宿主生物体を培養することにより行うことができる。マレート（および他の有機酸）を、直接、または2段階発酵プロセスを指定することのいずれかにより加えることができ、マレート（または他の有機酸）は第1のプロセス段階においてマレートを過剰に生成する微生物によって生成され、2,4-DHB生成は次の段階において本発明による宿主生物体によって実現される。

【0069】

生成物の分離および精製は、全体のプロセス効率および製品原価に莫大な影響を及ぼす、極めて重要なファクターである。生成物を回収するための方法は、一般的に、細胞の分離、ならびに生成物の精製、濃縮、および乾燥のそれぞれの工程を含んでいる。

【0070】

細胞の分離

限外濾過および遠心分離を用いて、細胞を発酵媒体から分離することができる。発酵媒体からの細胞の分離は、培地の粘度が高いことにより、しばしば複雑化する。そこで、添加剤、例えば、鉍酸もしくはアルカリ塩を加え、または培養ブロスを加熱して細胞分離を最適化することができる。

【0071】

生成物の回収

バイオマスを除去する前または後のいずれかにDHBを分離するために、様々なイオン交換クロマトグラフィー法を適用することができる。これには、その等電点に従って生成物の分離を促進する、一次の(primary)陽イオン交換樹脂の使用が含まれる。典型的には、樹脂を溶液で荷電し、保持した生成物は、溶離液におけるpHの増大(例えば、水酸化アンモニウムを加えることによる)に従って別々に溶出される。別の可能性は、固定または疑似移動床式の樹脂を用いた、イオン交換クロマトグラフィーの使用である。生成物の十分な純度を達成するために、様々なクロマトグラフィー工程を組み合わせる必要があり得る。これらの精製方法は、高価な結晶化工程に比べてより経済的であり、最終生成物の形態に関してさらなる利点および柔軟性も提供する。

【0072】

生成物の濃縮および乾燥

精製プロセスは、任意の適切な乾燥手段、例えば、噴霧造粒機、噴霧乾燥器、ドラム乾燥機、回転乾燥機、トンネル乾燥機を伴ってもよい乾燥工程も含むことができる。濃縮されたDHB溶液は、多目的コンセンレータまたは薄層エバポレーターを用いて130の蒸気により、減圧下で発酵ブロスを加熱することにより得ることができる。

【0073】

DHBの効果的な生成は、宿主生物体の代謝ネットワークにおける炭素流入再分配を最適化することにより、およびDHB経路の3つの酵素にNADPHおよびATPの十分な供給を確実にすることにより、確実にすることができる。所望の代謝経路への炭素流入のチャネリング、およびNAD(P)H補助因子の供給は、通常、天然の発酵経路の競合を除去または軽減することにより促進される。非排他的な例として、

- エタノールの形成を妨害することによる、サッカロミセスセレビシエにおけるマレート生成の最適化(ピルベートデカルボキシラーゼの欠失による)(Zellera、2008)(Zellera、2010)

- ラクテートの形成(例えば、IdhAの欠失)、アセテートの形成(例えば、pta、ackAの欠失)、エタノールの形成(例えば、adhEの欠失)、ホルメートの形成(例えば、pflB、focAの欠失)、ピルベートの酸化(例えば、poxBの欠失)、マレートの分解(maeBおよびscfAの欠失)、スクシネートの形成(例えば、frdBCの欠失)、メチルグリオキサルの形成(mgsAの欠失)による大腸菌におけるスクシネートまたはマレート生成の最適化(Jantamaら、2008a)(Jantamaら、2008b)(Linら、2005)(Zhangら、2011)(Sanchezら、2005)

- ペントースリン酸経路全体にわたって炭素流入をチャネリングし、それにより生合成反応に対するNADPH利用能を増大するためのホスホグルコースイソメラーゼpgiの欠失(Auriolら、2011)

がある。

【0074】

有機酸を生成するために炭素流入およびATP供給を増大する別の可能性は、ホスホエノールピルベート(PEP)/ピルベート/オキサロアセテートのブランチノード(branch node)の操作である((Sauer & Eikmanns、2005)において論評されている)。ホスホエノールピルベートからオキサロアセレートへの炭素流入の増大を確実にする代謝操作の戦略に対する非排他的な例として、

- ピルベートキナーゼの機能を妨害し、PEPカルボキシキナーゼの活性を増大すること

による、サッカロミセスセレビシエにおけるマレート生成の最適化 (Zellera, 2010)

- 天然の、または異種性に発現された、PEPカルボキシラーゼ、PEPカルボキシキナーゼ、またはピルベートカルボキシラーゼの活性を増大することによる、大腸菌におけるスクシネート生成の最適化 (Millardら、1996) (Sanchezら、2005) (Zhangら、2011)

がある。

【0075】

グルコースの初期のリン酸化工程にPEP消費性のホスホトランスフェラーゼ系 (PTS) を用いる大腸菌および他の細菌において有機酸を生成させるために炭素流入およびATP供給を増大する別の可能性は、PTS系の不可欠な成分 (例えば、ptsIまたはptsG) の欠失である (Linら、2005) (Zhangら、2009)。PTS系の有害な変異を保有する変異体においてさらなるグルコース取込みを確実にするために、代替のグルコース取込み系 (例えば、GalP) の活性を確実にする必要がある。

【0076】

有機酸を生成するのに所望の経路への炭素流入を増大する別の可能性は、クエン酸サイクルおよびグリオキシレートサイクルの操作である。非排他的な例として、

- イソシトレートリアーゼの活性を増大することによる、大腸菌におけるコハク酸生成の最適化 (転写リプレッサーiclRの欠失) (Linら、2005) (Sanchezら、2005) (Linら、2005; Sanchezら、2005a)

- イソシトレートデヒドロゲナーゼおよび/またはスクシネートデヒドロゲナーゼの欠失による、コハク酸生成の最適化 (Linら、2005)

がある。

【0077】

DHB生成経路に入る反応の基質である、マレート、グリオキシレート、およびアセチルCoAの利用能を増大する別の可能性は、アスパルテートトランスアミナーゼ (aspC、tyrB)、フマラーゼ (fumABC)、フマレートレダクターゼ (frdB)、マレートシンターゼ (aceB)、およびグリオキシレートレダクターゼ (ghrAB) 酵素の減弱である。

【0078】

別の代謝の一設定において、2, 4-DHBの前駆物質であるマレートを、クレブスサイクルおよびグリオキシル酸短絡回路によって排他的に生成することが可能である。この設定には、サイトゾルの、および膜結合したマレートデヒドロゲナーゼであるそれぞれmdhおよびmqoの欠失が必要とされる。この取組みは、アスパルテートおよびその誘導体への炭素流入の潜在的な漏出を殆ど回避する。

【0079】

2, 4-DHBを生成するために所望の経路への炭素流入を増大する別の可能性は、生成生物体における、適切なピルベートデヒドロゲナーゼおよびシトレートシンターゼの発現である。大腸菌の天然のピルベートデヒドロゲナーゼおよびシトレートシンターゼは、嫌気性条件下でこれら酵素の活性を低くする細胞内NADHが高濃度であることにより阻害される。大腸菌において、NADHに非感受性であるピルベートデヒドロゲナーゼ変異体の発現は、嫌気性条件下でアセチルCoAの過剰生成をもたらす、修飾された炭素流入の、発酵の最終産物 (アセテート、ラクテート、エタノール、ホルメート、およびピルベート) 間での再分配をもたらす (Wangら、2010)。NADHに非感受性である、枯草菌のシトレートシンターゼの異種性の発現は、操作した大腸菌系統におけるコハク酸の生成を増大した (Sachezら、2005)。上記の変異と組み合わせ、適切なピルベートデヒドロゲナーゼおよびシトレートシンターゼ (NADH感受性または非感受性) を使用すると、嫌気性および好気性の条件下で、グリオキシレートおよびクエン酸サイクル反応と発酵経路との間の炭素流入再分配の調整が可能になる。

【0080】

DHB経路による炭素流入を増大する別の可能性は、経路の中間体であるマリルCoA、または4-マレートセミアルデヒドを分解し得る酵素反応の欠失である。マレートセミアルデヒドを分解し得る候補酵素は、スクシニクセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(sad, gabD)、および末端にアルデヒド基のある短いおよび中間の炭素鎖分子を酸化することができる他のデヒドロゲナーゼである。さらに、マリルCoAは、シトレートシンターゼによって分解され得ることが知られている。

【0081】

宿主生物体の2, 4-DHBの生産性を増大する別の可能性は、2, 4-DHBを分解する代謝反応の欠失である。2, 4-DHBはマリック酵素の競合的阻害物質であり、ゆえにこの酵素の活性部位に対して比較的高い親和性を有する(Rognstad & Katz, 1979)。したがって、2, 4-DHBは他の酵素によって認識され、潜在的に分解され得る。これらの酵素は、同定し、宿主生物体から除去することができる。

【0082】

2, 4-DHB生成がマレートまたは他の有機酸の添加に基づく場合、2, 4-DHB生成性の微生物は、マレート(または他の有機酸、例えば、ピルベート、スクシネートなど)の取込みを促進する膜輸送タンパク質を機能的に発現しなければならない。

【0083】

本発明の形質転換された宿主生物体は、2, 4-DHBを合成するさらなる経路をさらに含んでもよく、前記宿主生物体は、宿主生物体のゲノム中に組み入れられるか、または染色体外遺伝子エレメント(例えば、マレートキナーゼをコードするプラスミド、もしくはマレートキナーゼをコードする核酸を含んでいるキメラ遺伝子、もしくはマレートキナーゼをコードする核酸を含んでいる発現ベクター、および/もしくはマレートセミアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする核酸、もしくはマレートセミアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする核酸を含んでいるキメラ遺伝子、もしくはマレートセミアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする核酸を含んでいる発現ベクター、および/もしくはDHBデヒドロゲナーゼをコードする核酸、DHBデヒドロゲナーゼをコードする核酸を含んでいるキメラ遺伝子、もしくはDHBデヒドロゲナーゼをコードする核酸)上で輸送される、キメラ遺伝子を少なくとも1つ含んでいる。前記の酵素は、国際特許出願WO 2012/056318に記載されている。

【0084】

以下の例は本発明を説明するものである。これらの例は説明を目的とするにすぎず、本発明の範囲をいかなる方法でも制限するものと解釈してはならない。

【図面の簡単な説明】

【0085】

【図1】(i)(L)-マレート、スクシニルCoA、またはグリオキシレートの(L)-2, 4-ジヒドロキシブチレート(2, 4-DHB)への変換を記載する反応図。

【図2】図は、マレートセミアルデヒドに対する活性(上のグラフ)、スクシニクセミアルデヒドに対する活性(中央のグラフ)、マレートセミアルデヒドおよびスクシニクセミアルデヒドに対する変異体の活性の、マレートセミアルデヒドおよびスクシニクセミアルデヒドに対する野生型の活性の比率に対する、対数として表現した、野生型酵素に比した酵素特異性の変化(下のグラフ)を示す。(正の値は特異性の変化がマレートセミアルデヒドに有利であることを示す。)

【図3】2 mM アセチルCoA、2 mM グリオキシレート、および2 mM NADPHを様々な組合せのDHB経路酵素とインキュベートした後の2, 4-DHBの存在を示すクロマトグラム(反応1: マリルCoAリアーゼ(150 μg/mL Me-Mc1)、マリルCoAレダクターゼ(100 μg/mL St-Mcr)、およびマレートセミアルデヒドレダクターゼ(100 μg/mL Ms-SSA red H39R N43H); 反応2: 反応1と同じであるがマリルCoAレダクターゼとして100 μg/mL Pg-SucDを用いた; 対照1: 反応1と同じであるがマリルCoAレダクターゼなし; 対照2: 反応1と同じであるがマレートセミアルデヒドレダクターゼなし)。

【 0 0 8 6 】

【 実施例 】

例 1：マリル CoA リアーゼ活性の実証

マリル CoA リアーゼをコードする野生型遺伝子を含むプラスミドの構築：メチロバクターエクストロケンス (Arps ら、1993) およびロドバクターカプスラツス (Meister ら、2005) においてマリル CoA リアーゼをコードする mcl 遺伝子の DNA 配列を、GENEius ソフトウェア (Eurofins) を用いて大腸菌における発現に最適化した。最適化した配列を、Eurofins MWG OPERON (登録商標) により、mcl の開始コドンの上流および終止コドンの下流にそれぞれ NheI および EcoRI 制限部位を加えることによって合成し、このため、合成した DNA フラグメントの、T4 DNA リガーゼ (BioLabs) を用いた、pET28a+ ベクター (Novagen) への直接的なクローニングが可能になった。ライゲーション生成物を大腸菌 DH5 細胞に形質転換し、増幅し、プラスミド pET28-Mex-mcl (メチロバクターエクストロケンスからマリル CoA リアーゼを発現する) および pET28-Rca-mcl (ロドバクターカプスラツスからマリル CoA リアーゼを発現する) を、標準の遺伝学的プロトコルを用いて単離した (Sambrook ら、1989)。利用した mcl タンパク質配列の NCBI および Integrated Genomics のリファレンス、ならびに対応する天然および合成の DNA 配列に対するリファレンスを表 1 に列挙する。

【 表 1 】

生物体	タンパク質	NCBI/Integrated Genomics 受諾番号	天然の DNA 配 列	最適化した DNA 配列
メチロバクターエク ストロケンス	Mcl 配列番 号 1	<u>YP_002962854</u>	配列番号 2	配列番号 3

表 1: 注釈をつけたマリル CoA リアーゼ活性を有する様々な生物体からのタンパク質のリファレンス、ならびに天然のおよび最適化した DNA 配列に対するリファレンス

【 0 0 8 7 】

酵素の発現：大腸菌 BL21 (DE3) 細胞を、適切なプラスミドで、標準の遺伝学的プロトコルを用いて形質転換した (Sambrook ら、1989)。N 末端ヘキサヒスタグを有する酵素を LB 培養液 250 mL 中で発現させたが、LB 培養液は OD₆₀₀ 0.1 の一夜培養液から接種し、OD₆₀₀ 0.6 に増殖させた後、培養培地に 1 mM イソプロピル - D - 1 - チオガラクトピラノシド (IPTG) を加えることにより、タンパク質発現を誘導したものであった。タンパク質を発現させて 3 時間後、13000 g で 10 分間遠心分離することにより細胞を回収し、上清を廃棄した。細胞ペレットを、さらなる分析まで -20℃ で貯蔵した。増殖およびタンパク質の発現を 37℃ で行った。培養培地は 50 μg/mL カナマイシンを含んでいた。

【 0 0 8 8 】

酵素の精製：発現培養物の凍結した細胞ペレットを、切断バッファー (breakage buffer) (50 mM Hepes、300 mM NaCl、pH 7.5) 0.5 mL 中に再懸濁し、連続 4 ラウンドの超音波によりこじ開けた (超音波の間隔：20 秒、パワー出力：30%、超音波処理器：BioBlock Scientific、VibraCell

(商標)72437)。粗製抽出物を4、13000gで15分間遠心分離し、澄明な上清を保持することにより、細胞デブリを除去した。15mg/mLストレプトマイシン(Sigma)を加え、4、13000gで10分間試料を遠心分離し、上清を保持することにより、RNAおよびDNAを抽出物から除去した。澄明なタンパク質抽出物を室温で20分間(4で1時間)、Talon(商標)Cobalt親和性樹脂(Clontech)0.3(総容積)(0.75mL)でインキュベートした。懸濁液を卓上型遠心機において700gで遠心分離し、上清を除去した。樹脂を、総容積10の洗浄バッファー(50mM HEPES、300mM NaCl、15mMイミダゾール、pH7,5)で洗浄した後、タンパク質を溶出バッファー(50mM HEPES、300mM NaCl、200mMイミダゾール、pH7,5)0.5mLで溶出した。溶出した酵素の純度をSDS-PAGE分析により検証した。タンパク質濃度をブラッドフォード法で推定した。

10

【0089】

酵素学的アッセイ：マリルCoAリアーゼ活性を、(Meisterら、2005)から適応した方法を用いてアッセイした。マリルCoAリアーゼによるマリルCoA合成を、シトレートシンターゼ触媒性のコエンザイムAの放出に結びつけ、コエンザイムAの放出をDTNBとの自発的反応によりモニタリングした。

【0090】

反応スキーム

マリルCoAリアーゼ：

アセチルCoA + グリオキシレート (L) - マリルCoA

シトレートシンターゼ：

(L) - マリルCoA (L) - マレート + コエンザイムA

自発的：

コエンザイムA + DTNB CoA - DTNBジスルフィド

アッセイ1による反応混合物は、50mM MOPS/KOH(pH7.5)、0.25mM DTNB、5mM MgCl₂、1mMアセチルCoA、20U/mLシトレートシンターゼ(生成物は全てSigmaより)、および適切な量の精製したマリルCoAリアーゼまたは細胞抽出物を含んでいた。10mMグリオキシレートを加えることにより、反応を開始させた。酵素学的アッセイを、最終体積250μLの96ウエル平底マイクロタイタープレート中37で行った。反応の後、マイクロプレートリーダー(BioRad 680XR)において、412nmにDTNB($\epsilon_{\text{DTNB+CoA}} = 13.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)の特徴的な吸収があった。

20

30

【0091】

特徴付けを行ったメチロバクターエクストロケンスからの精製したマリルCoAリアーゼは、 $V_{\text{max}} 36 \mu\text{mol} / (\text{min mg prot})$ 、およびグリオキシレートに対して $K_{\text{m}} 0.5 \text{ mM}$ を有していた。

【0092】

例2：マリルCoAレダクターゼ活性の実証

マロニルCoAレダクターゼおよびスクシニルCoAレダクターゼをコードする野生型遺伝子を含んでいるプラスミドの構築：スルホロブストコダイイstr7においてマリルCoAレダクターゼをコードするmcr遺伝子のDNA配列を(Alberら、2006)、GENEiusソフトウェア(Eurofins)を用いて大腸菌における発現に最適化した。最適化したmcr配列、およびポルフィロモナスジンジバリスW83においてスクシニルCoAレダクターゼをコードするsucD遺伝子の天然のDNA配列を、Eurofins MWG OPERON(登録商標)により、mcrの開始コドンの上流および終止コドンの下流にそれぞれNheIおよびEcoRI制限部位を加えることによって合成し、このため、合成したDNAフラグメントの、T4 DNAリガーゼ(BioLabs)を用いた、pET28a+ベクター(Novagen)中への直接的なクローニングが可能になった。ライゲーション生成物を大腸菌DH5細胞に形質転換し、増幅し

40

50

、プラスミド pET28-St-mcr (スルホロブストコダイイからマロニル CoA レダクターゼを発現する) および pET28-Pgi-sucD (ポルフィロモナスジンジバリスからスクシニル CoA レダクターゼを発現する) を、標準の遺伝学的プロトコルを用いて単離した (Sambrook ら、1989)。利用した mcr および sucD タンパク質配列の NCBI リファレンス、ならびに対応する天然および合成の DNA 配列に対するリファレンスを表 2 に列挙する。

【表 2】

生物体	タンパク質	NCBI/Integrated Genomics 受諾番号	天然の DNA 配列	最適化した DNA 配列
スルホロブストコダイイ	St-Mcr 配列番号 7	<u>NP_378167</u>	配列番号 8	配列番号 9
ポルフィロモナスジンジバリス	Pg-SucD 配列番号 10	<u>AAQ65862</u>	配列番号 11	

表 2: 注釈をつけたマリル CoA レダクターゼ活性またはスクシニル CoA レダクターゼ活性を有する様々な生物体からのタンパク質のリファレンス、ならびに天然のおよび最適化した DNA 配列に対するリファレンス

【0093】

Pg-SucD の発現および精製を、例 1 に記載した通りに、プラスミド pET28-Pgi-sucD を用いて行った。

【0094】

St-mcr 遺伝子を、プラスミド pET28-St-mcr から、開始コドンの上流および終止コドンの下流にそれぞれ SacI および BamHI 制限部位を加えた、プライマー 5'-TATAATGAGCTCGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGATTCTGATGCGCCGT-3' (配列番号 12) および 5'-TATAATGGATCCCTCGAATTCTTACTTCTC-3' (配列番号 13) を用いて増幅した。PCR フラグメントを pACT3 発現ベクター中に、SacI および BamHI 制限部位を用いてライゲートした。得られたプラスミド pACT3-St-Mcr を、大腸菌 MG1655 系統に形質転換した。得られた発現系統を、無機培地上 37 で培養した。無機培地 1 リットルは、グルコース 20 g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 18 g、 KH_2PO_4 3 g、 NaCl 0.5 g、 NH_4Cl 2 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.015、濃 HCl を 100 倍希釈して調製した 0.06 mol/L FeCl_3 保存液 1 mL、10 mM チアミン HCl 保存液 2 mL、MOPS 20 g、カナマイシン硫酸塩 50 μg (および、必要に応じてクロラムフェニコール 25 μg)、ならびに微量元素溶液 1 mL (1 リットルあたり: $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.04 g、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.18 g、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.04 g、 H_3BO_3 0.01 g、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.12 g、 $\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.12 g を含んでいる) を含んでいた。培地の pH を 7 に調節し、培地を濾過滅菌した。

【0095】

指数関数的に増殖していた培養液が OD (600 nm) 0.6 に到達したら、1 mM IPTG を加え、培養液を 14 時間 20 でインキュベートし、その後、遠心分離 (13

0 0 0 × g、1 0 分間) により細胞を回収した。上清を廃棄した後、細胞ペレットを - 2 0 で貯蔵した。

【 0 0 9 6 】

S t - M c r を精製するため、凍結した発現培養物の細胞ペレットを、切断バッファー (5 0 m M H e p e s、3 0 0 m M N a C l、p H 7 . 5) 0 . 5 m L 中に再懸濁し、連続 4 ラウンドの超音波によりこじ開けた (超音波の間隔: 2 0 秒、パワー出力: 3 0 %、超音波処理器: B i o b l o c k S c i e n t i f i c、V i b r a C e l l (商標) 7 2 4 3 7)。粗製抽出物を 4、1 3 0 0 0 × g で 1 5 分間遠心分離し、澄明な上清を保持することにより、細胞デブリを除去した。大腸菌の天然タンパク質を、3 0 分間 8 5 で加熱沈殿し、その後 1 3 0 0 0 × g で遠心分離することにより除去した。タンパク質調製物の純度を S D S - P A G E によって分析し、予想したサイズの S t - M c r タンパク質に相当する 1 本のバンドのみが示された。

10

【 0 0 9 7 】

酵素学的アッセイ: マリル C o A レダクターゼ活性を、アッセイ 1 またはアッセイ 2 を用いた反応の、還元のおよび酸化的方向のそれぞれにおいてアッセイした。

【 0 0 9 8 】

アッセイ 1 (反応スキーム):

マリル C o A リアーゼ:

グリオキシレート + アセチル C o A マリル C o A + アセテート

マリル C o A レダクターゼ:

(L) - マリル C o A + N A D P H (L) - マレートセミアルデヒド + コエンザイム A + N A D P

20

アッセイ 2 (反応スキーム):

(L) - マレートセミアルデヒド + コエンザイム A + N A D P (L) - マリル C o A + N A D P H

アッセイ 1 による反応混合物は、5 0 m M M O P S / K O H (p H 7 . 5)、1 0 m M グリオキシレート、4 m M アセチル C o A、5 m M M g C l₂、0 . 2 5 m M N A D P H (生成物は全て S i g m a より)、5 U / m L マリル C o A リアーゼ、および適切な量の精製したマリル C o A レダクターゼまたは細胞抽出物を含んでいた。グリオキシレートを加えることにより、反応を開始させた。酵素学的アッセイを、最終体積 2 5 0 μ L の 9 6 ウェル平底マイクロタイタープレート中 3 7で行った。反応の後、マイクロプレートリーダー (B i o R a d 6 8 0 X R) 中、3 4 0 n m に N A D P H ($\epsilon_{NADPH} = 6 . 2 2 \text{ m M}^{-1} \text{ c m}^{-1}$) の特徴的な吸収があった。

30

【 0 0 9 9 】

アッセイ 2 による反応混合物は、2 0 0 m M H E P E S (p H 9)、5 m M M g C l₂、1 m M N A D P、0 . 5 m M コエンザイム A (生成物は全て S i g m a より)、および適切な量の精製したマリル C o A レダクターゼを含んでいた。5 m M (L) - マレートセミアルデヒドを加えることにより、反応を開始させた。酵素学的アッセイを、最終体積 2 5 0 μ L の 9 6 ウェル平底マイクロタイタープレート中 3 7で行った。反応の後、マイクロプレートリーダー (B i o R a d 6 8 0 X R) 中、3 4 0 n m に N A D P H ($\epsilon_{NADPH} = 6 . 2 2 \text{ m M}^{-1} \text{ c m}^{-1}$) の特徴的な吸収があった。不安定なマレートセミアルデヒドが新たに生成された後、安定なマレートセミアルデヒド誘導体である 2 - [(4 S) - 2 , 2 - ジメチル - 5 - オキソ - 1 , 3 - ジオキソラン - 4 - イル] アセトアルデヒド (D M O D A) (A c t i v a t i o n (登録商標) により供給) を脱保護することにより酵素学的試験を行った。適切な量の D M O D A を 2 M 塩酸中に溶解し、懸濁液を沸点まで短時間加熱し、熱懸濁液を室温に 1 5 分間放置することにより、マレートセミアルデヒドを得た。放出されたアセトンを、ロータリーエバポレーター中 3 5、5 0 m b a r で蒸発させた。マレートセミアルデヒド溶液の p H を、炭酸水素ナトリウムを用いて 3 . 5 に固定した。

40

【 0 1 0 0 】

50

表 3 および 4 に列挙する結果は、スルホロブストコダイイのマロニル CoA レダクターゼ M c r、およびポルフィロモナスジンジバリスのスクシニル CoA レダクターゼ S u c D に対するマリル CoA レダクターゼ活性を実証するものである。

【表 3】

基質	マロニル CoA		スクシニル CoA		マリル CoA	
酵素	Vmax [μ mol/(min mg)]	Km [mM]	Vmax [μ mol/(min mg)]	Km [mM]	Vmax [μ mol/(min mg)]	Km [mM]
St-Mcr	0.67 \pm 0.15	nd	0.98 \pm 0.17	0.2	0.24 \pm 0.045	nd
Pg-SucD	nd	nd	1	1	0.025	nd

表 3: 反応の還元的方向に対する動力学的パラメータ(マロニル CoA レダクターゼおよびスクシニル CoA レダクターゼ活性を、基質であるマロニル CoA またはスクシニル CoA を反応混合物に直接加えることにより推定した)。

【表 4】

基質	スクシニクセミアルデヒド		マレートセミアルデヒド	
酵素	Vmax [μ mol/(min mg)]	Km [mM]	Vmax [μ mol/(min mg)]	Km [mM]
St-Mcr	1.7	1.15	0.1	0.25
Pg-SucD	4	nd	0.007	nd

表 4: 反応の酸化的方向に対する動力学的パラメータ

【 0 1 0 1 】

例 3 : D H B デヒドロゲナーゼ活性の実証

適切な 2 , 4 D H B デヒドロゲナーゼを同定するために、様々な生物学的源からのベータヒドロキシ酸デヒドロゲナーゼを、マレートセミアルデヒドを還元する能力について試験した。試験した酵素の中には、サッカロミセスセレビシエからのメチルブチルアルデヒドレダクターゼである Y p r 1 (F o r d & E l l i s , 2 0 0 2) (配列番号 1 4)、

ポルフィロモナスジンジバリスの4-ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼである4hbdh（配列番号187）、大腸菌のアルコールデヒドロゲナーゼであるYqhD（配列番号185）、およびメタロスファエラセデュラからのスクシニクセミアルデヒドレダクターゼであるMs-SSR（Kockelkorn & Fuchs, 2009）（配列番号16）があった。遺伝子YPR1、4hbdh、yqhD、およびMs-SSRを、表5に記載するプライマーを用いて増幅し、ベクターpET28中にクローニングし（制限酵素は表5を参照されたい）、それぞれプラスミドpET28-ScE-YPR1、pET28-Pgi-4hbdh、pET28-Eco-yqhD、およびpET28-MsSe-SSRを得た。タンパク質を、例1に記載した通りに発現させ、精製した。

【表5】

酵素	受諾番号	プライマー5'-3'	制限酵素
YPR1	GI:6320576	TATAATGCTAGCATGCCTGCTACGTTAAAGAA (配列番号 18) TATAATGAGCTCTCATTGGAAAATTGGGAAGG (配列番号 18)	NheI SacI
YqhD	GI:16130909	TATAATGAATTCTTAGCGGGCGGCTTCGTATATACGGC GGCTGACA (配列番号 20) TATCGTGCTAGCATGAACAACCTTTAATCTGCACA (配列番号 21)	EcoRI NheI
4hbdh	GI:188994588	TATAATGGATCCTTAGTAGAGTCTTCTGTAG (配列番号 22) TATAATCATATGCAACTTTTCAAACCTC (配列番号 23)	BamHI NdeI
Ms-SSR	GI:146304190	TATAATGCTAGCATGAAAGCTGCAGTACTTCA (配列番号 24) TATAATGAATTCTTACGGGATTATGAGACTTC (配列番号 25)	NheI EcoRI

表5 候補のベータヒドロキシ酸デヒドロゲナーゼをクローニングするのに用いたプライマーおよび制限酵素

【0102】

マレートセミアルデヒドレダクターゼ活性に対する試験：

反応スキーム：

(L)-マレートセミアルデヒド + NAD(P)H (L)-2,4-ジヒドロキシ酪酸 + NAD(P)

アッセイ混合物は、200mM HEPES (pH 7.5)、50mM KCl、5m

10

20

30

40

50

MgCl₂、0.24 mM NADHまたはNADPH、および適切な量の精製した酵素または細胞抽出物を含んでいた。10 mM (L) - マレートセミアルデヒドを加えることにより反応を開始させた(マレートセミアルデヒドは試験毎に新たに調製した、例3を参照されたい)。酵素学的アッセイを、最終体積250 μLの96ウェル平底マイクロタイタープレート中30で行った。反応の後、マイクロプレートリーダー(BioRad 680XR)中、340 nmにNAD(P)H($\epsilon_{\text{NADPH}} = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)の特徴的な吸収があった。結果を表6に列挙する。

【表6】

酵素	起源	報告されている機能	マレートセミアルデヒドに対する活性 (補助因子 NADH) [μmol/(min*mg_prot)]	マレートセミアルデヒドに対する活性 (補助因子 NADPH) [μmol/(min*mg_prot)]
Ms-SSR (配列番号 16)	メタロスファ エラセデュラ	スクシニクセミアル デヒドレダクターゼ	4.9	4.9
YqhD (配 列番号 185)	大腸菌	アルコールデヒドロゲ ナーゼ	nd	1.2
4hbdh (配列番号 187)	ポルフィロモ4-ヒドロキシブチレー ナスジンジ バリス	トデヒドロゲナーゼ	33	nd
YPR1 (配列番号 14)	サッカロミセ スセレビシエ	メチルブチルアルデ ヒドレダクターゼ	nd	0.19

表 6: 選択されたベータヒドロキシ酸デヒドロゲナーゼのマレートセミアルデヒドに対する還元活性(結果は、少なくとも2つの独立した実験の平均を表す)。

【0103】

メタロスファエラセデュラからのスクシニクセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、およびサッカロミセスセレビシエからのメチルブチルアルデヒドレダクターゼは、マレートセミアルデヒドレダクターゼ活性を有する。マレートセミアルデヒドに対するMs-SSRのK_mは4 mMであった。

【0104】

例4：改善されたマリルCoAレダクターゼ酵素の合理的な構築

部位特異的突然変異誘発を、表7に列挙したオリゴヌクレオチド対、およびテンプレートとしてpET28-Sto-mcrプラスミドを用いて行った。アミノ酸配列を変更するための点変異をPCRにより導入した(Phusion 1U、HFバッファー20% (v/v)、dNTP 2.5 mM、直接およびリバースプライマー各1 μM、テンプレートプラスミド200 ng、水)。可能であれば、PCRにより作り出されたプラスミドは、変異したクローンの同定を促進するための機能的変異に加えて、新たな制限部位を含んでいた(サイレント変異を用いて導入された)。PCR生成物をDpnIにより37で2×2時間消化してテンプレートDNAを除去し、NEB DH5-コンピテント大腸

菌細胞（NEB）に形質転換した。変異したプラスミドを制限部位の分析により同定し、DNAシーケンシングにより所望の変異を伴うことを確認した。

【表 7】

変異	プライマー5'-3'
Tyr206	フォワード
	CATTCTGCCTTTAGGGGACGGCNNKGACGCCAAAACG
	(配列番号 26)
	リバース
	CGTTTTGGCGTCMNNGCCGTCCCCTAAAGGCAGAATG
	(配列番号 27)

表 7: スルホロブストコダイの mcr 遺伝子を変異させるのに用いたプライマー対

【 0 1 0 5 】

S t - M c r 遺伝子修飾の影響を、例 2 に記載したアッセイ 3 を用いた反応の酸化的方向において試験した。図 3 は、天然の T y r 2 0 6 を他のアミノ酸によって置きかえると、天然の基質であるスクシニックセミアルデヒドに対する活性が低減し、同時に、マレートセミアルデヒドに対して増大した、または少なくとも一定の活性がもたらされることを示す。このように、T y r 2 0 6 を適切なアミノ酸残基により置きかえると、D H B 経路の中間体に対する M c r の特異性に関して選択的な利点がもたらされる。

【 0 1 0 6 】

2 0 6 位における好ましいアミノ酸残基は、したがって、フェニルアラニン、ヒスチジン、イソロイシン、リジン、メチオニン、グリシン、アスパラギン、プロリン、アルギニン、グルタミン、ロイシン、セリン、トリプトファン、およびスレオニンである。

【 0 1 0 7 】

チロシン 2 0 6 がプロリン残基によって置きかえられているタンパク質を配列番号 2 0 2 によって示す。

【 0 1 0 8 】

例 5：改善された D H B デヒドロゲナーゼの合理的な構築

部位特異的突然変異誘発を、表 6 に列挙したオリゴヌクレオチド対、およびテンプレートとして p E T 2 8 - M s e - S S R プラスミドを用いて行った。アミノ酸配列を変更するための点変異を P C R により導入した（P h u s i o n 1 U、H F バッファー 2 0 %（v/v）、d N T P 2 . 5 m M、直接およびリバースプライマー各 1 μ M、テンプレートプラスミド 2 0 0 n g、水）。可能であれば、P C R により作り出されたプラスミドは、変異したクローンの同定を促進するための機能的変異に加えて、新たな制限部位を含んでいた（サイレント変異を用いて導入された）。P C R 生成物を D p n I により 3 7 で 2 × 2 時間消化してテンプレート DNA を除去し、N E B D H 5 - コンピテント大腸菌細胞（NEB）に形質転換した。変異したプラスミドを制限部位の分析により同定し、DNAシーケンシングにより所望の変異を伴うことを確認した。表 8 は、変異体の動力学的パラメータを概要するものである。結果は、M s - S S R H 3 9 R N 4 3 H（配列番号 3 8）は、野生型酵素に比べた場合、マレートセミアルデヒドに対する親和性を改善

したことを実証している。

【表 8】

変異	プライマー5'-3'	制限酵素
H39R	gtcaaggcaaccggtctctgtcgtccgacgtcaatg (配列番号 28) cattgacgtcggagcgacagagaccggttccttgac (配列番号 29)	<i>NheI</i>
N43H	ggctctgtcactccgacgtacatgtctttgaggggaaaac (配列番号 30) gttttcccctcaaagacatgtacgtcggagtgacagagcc (配列番号 31)	<i>NheI</i>

表 8: メタロスファエラセデュラのスクシニクセミアルデヒドレダクターゼ(Ms-SSR)を変異させるのに用いたプライマー対

【表 9】

変異体	最大活性 [$\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg}_{\text{prot}})$]	Km [mmol/L]
野生型 (配列番号 16)	4.9	4
H39R (配列番号 32)	1.7	1
N43H (配列番号 34)	4.3	5
H39R N43H (配列番号 36)	4.7	1

表 9: メタロスファエラセデュラのスクシニクセミアルデヒドレダクターゼ(Ms-SSR)変異体の動力学的パラメータの概要(結果は、少なくとも 2 つの独立した実験の平均を表す)。

【 0 1 0 9 】

対応する核酸の配列は、配列番号 17、配列番号 33、配列番号 35、および配列番号 37によって表される。

【 0 1 1 0 】

変異 H39R および N43H を含む、メタロスファエラセデュラのスクシニクセミアルデヒドレダクターゼのコード配列を、Gene Optimizer (登録商標) ソフトウェアを用いて、大腸菌における最大の発現に最適化した。合成の遺伝子を、Gene Art (登録商標) Gene Synthesis (Invitrogen Life T

10

20

30

40

50

e c h n o l o g i e) により生成した。N h e I および E c o R I 制限部位をそれぞれ、開始コドンの上流および終止コドンの下流に導入し、p E T 2 8 a + (N o v a g e n) への直接的なクローニングが可能になった。

【 0 1 1 1 】

得られた p E T 2 8 - M s e - D H B - D h - H 3 9 R _ N 4 3 H - o p t プラスミドを単離し、DNAシーケンシングにより、正確な配列を有する全長のメタロスファエラセデュラの S S R H 3 9 R N 4 3 H 遺伝子を含んでいることが示された (配列番号 3 8) 。

【 0 1 1 2 】

例 6 : 合成マリル C o A 経路による D H B の i n v i t r o 生成の実証

10

酵素マリル C o A リアーゼ (M e - M c l)、マリル C o A レダクターゼ (S t - M c r または P g - S u c D)、および D H B デヒドロゲナーゼ (M s - S S A - r e d H 3 9 N N 4 3 H) を、例 1、2、および 3 に記載した通りに発現させ、精製した。

【 0 1 1 3 】

マリル C o A リアーゼ、マリル C o A レダクターゼ、および D H B デヒドロゲナーゼを含んでいる経路による D H B の生成を、2 m M グリオキシレート、5 0 m M H e p e s (p H 7 . 5)、2 m M アセチル C o A、2 m M N A D P H、1 0 0 μ g / m L D H B デヒドロゲナーゼ、1 5 0 μ g / m L マリル C o A リアーゼ、および 1 0 0 μ g / m L マリル C o A レダクターゼ (S t - M c r (反応 1)、または P g - S u c D (反応 2) のいずれかであった) を含んでいる反応混合物に加えることにより、i n v i t r o

20

で実証した。

【 0 1 1 4 】

対照の反応は全ての成分を含んでいたが、D H B デヒドロゲナーゼ (対照 1) またはマリル C o A レダクターゼ (対照 2) のいずれかを欠いていた。3 7 ° で 1 2 0 分インキュベートした後、反応混合物中の D H B 含量をガスクロマトグラフィーにより分析した [G C M S - Q P 2 0 1 0 U l t r a S h i m a d z u ; F I D 検出器 (F I D - 2 0 1 0 P l u s S h i m a d z u) ; オートサンプラー A O C 2 0 s (S h i m a d z u) ; スプリットレスインジェクター A O C 2 0 i (S h i m a d z u) (2 3 0 °) ; カラム : Z e b r o n Z B - F F A P、3 0 m × 0 . 2 5 m m、d_f 0 . 2 5 μ m ; およびライナー : T a p e r e d f o c u s L i n e r 5 × 9 5 × 3 . 4 m m (S G E) を装備]。キャリアガスは合計流速 2 5 m L / 分の水素であった。空気 - 水素混合ガスを用いて (流速はそれぞれ 3 0 0 m L / 分および 3 0 m L / 分であった)、水素炎イオン化を行った。検出器温度は 2 4 0 ° であった。注入した試料体積は 1 μ L であった。温度プログラムを表 1 0 に示す。

30

【 0 1 1 5 】

経路の全ての酵素を含んでいる反応における D H B の存在、および 3 つの経路酵素のうち 2 つだけを含む試料における D H B の非存在を示すクロマトグラムを、図 2 に示す。

【表 10】

カラム温度 [°C]	保持時間 [分]	勾配 [°C/分]	作動時間 [分]
90	0	0	0
115	1.8	30	2.63
170	1	4	17.38
230	3	50	21.58

10

表 10: 反応混合物の GC 分析のための温度プログラム

【0116】

例 7: 最適化した DHB 生成システムの構築

マリル CoA シンテターゼ、マリル CoA レダクターゼ、および DHB デヒドロゲナーゼを同時発現するためのプラスミドの構築: メチロバクターエクストロケンスからのマリル CoA リアーゼである Me - mcl のコード配列を、高忠実度ポリメラーゼ Phusion (Fermentas)、ならびに開始コドンの上流に SacI に対する制限部位 (下線付) を含んでいるフォワードプライマーおよびリバースプライマー 5' - TCACACAGGAAACAGAAATTC GAGCTCGGTAATGTCGTTTACCCCTGATTCAGCAAGCGACT - 3' (配列番号 39) および 5' - GGTAATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACTTTATTTGCGCGCCCATTTGCATCCGCTTTCTG - 3' (配列番号 40) を用いて、プラスミド pET28 - Mex - mcl から増幅した。スルホロブストコダイイからのマロニル CoA レダクターゼである St - mcr のコード配列を、終止コドンの下流に BamHI に対する制限部位を含んでいるフォワードおよびリバースプライマー 5' - GTTTTAACTTTTAAAGAAAGGAGATATACCATGAAAGCAGCAGTTCTGCAATACCTATAAAGAAACCGCTGAGCAT - 3' (配列番号 41) および 5' - GGTAATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACTTTACTTCTCGATGTAGCCTTTCTCCACGAG - 3' (配列番号 42) を用いて、プラスミド pET28 - St - mcr から増幅した。プラスミド pET28 - Mse - DHB - Dh - H39R_N43H - opt (例 5) を、終止コドンの下流に BamHI 制限部位 (下線付) を導入するフォワードおよびリバースプライマー 5' - GTTTTAACTTTTAAAGAAAGGAGATATACCATGAAAGCAGCAGTTCTGCAATACCTATAAAGAAACCGCTGAGCAT - 3' (配列番号 43) および 5' - ATGCCCTGCAGGTCGACTCTAGAG GGATCCCTTACGGAAATAATCAGGCTACGAATTGCTTTC - 3' (配列番号 44) を用いて、メタロスファエラセデュラのスクシニクセミアルデヒドレダクターゼ H39R_N43H の最適化されたコード配列を増幅するためのテンプレートとして用いた。

20

30

40

【0117】

St - mcr およびメタロスファエラセデュラのスクシニクセミアルデヒドレダクターゼ H39R_N43H に対するフォワードプライマーは rbs モチーフを含んでいた。3つの遺伝子を同時に、In - Fusion クローニングキット (Clontech) を用いた、相対的組換えにより pACT3 発現ベクター中にクローニングした。

【0118】

得られた pACT3 - MCL - DHB (配列番号 45) プラスミドを単離し、DNA シーケンシングにより、正確な配列を有することが示された。

【0119】

マリル CoA シンテターゼ、マリル CoA レダクターゼ、および DHB デヒドロゲナー

50

ゼの同時発現のためのプラスミドの構築：メチロバクターエクストロケンスAM1からの、マリンC o Aシンターゼの2つのタンパク質サブユニットであるmtkA (YP__00296285) およびmtkB (YP__002962852) をコードするDNA配列を、GENEiusソフトウェア(Eurofins)を用いて大腸菌における発現に対して最適化した。最適化したサブユニットのDNA配列を、メチロバクターエクストロケンスゲノムにおけるmtkAおよびmtkB遺伝子間に天然に生じるDNA配列(CGAAACGGGGGAGGAATCACGCC、配列番号46)により物理的に連結させた。得られたDNAフラグメントである、「mtkA遺伝子-リンカーDNA-mtkB遺伝子」を、Eurofins MWG OPERON(登録商標)により合成し、NheIおよびEcoRI制限酵素を用いてpET28b発現ベクター中にサブクローニングした。得られたDNAプラスミドpET28-Mex-mtkAB(配列番号47)を用いて、メチロバクターエクストロケンスからのマリンC o Aシンターゼをコードする最適化された遺伝子の2つのコドンであるMe-mtkAおよびMe-mtkBを、高忠実度ポリメラーゼPhusion(Fermentas)、ならびに開始コドンの上流にSacIに対する制限部位(下線付)を含んでいる、フォワードプライマーおよびリバースプライマー5'-CAGGAACAGAAATTCGAGCTCGGTAATGGATGTGCACGAATATCAGGCGAAAGAACTGCT-3'(配列番号48)および5'-TACGGCGCATCAGAAATCATtaccgccacgtgctaaccacatcggaac-3'(配列番号49)を用いて同時に増幅した。スルホロブストコダイイからのマロニルC o AレダクターゼであるSt-mcrのコード配列を、終止コドンの下流にBamHIに対する制限部位を含んでいるフォワードプライマーおよびリバースプライマー5'-GGCGTAATGATTTCTGATGCGCCCGTACCCCTGAAAGCG-3'(配列番号50)および5'-CTGCTGCTTTTCAATTACTTCTTCGATGTAGCCTTTCTCCACGAG-3'(配列番号51)を用いてプラスミドpET28-Sto-mcrから増幅した。プラスミドpET28-Mse-DHB-Dh-H39R_N43H-opt(例5)をテンプレートとして用いて、メタロスファエラセデュラからのスクシニクセミアルデヒドレダクターゼH39R_N43Hの最適化されたコード配列を、終止コドンの下流にBamHI制限部位(下線付)を導入するフォワードプライマーおよびリバースプライマー5'-TACATCGAGAAAGTAATGAAAGCAGCAGTTCTGCAATACCTATAAAGAAC-3'(配列番号52)および5'-CCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCTTACGGAATAATCAGGCTACGAATTTGCTTTCAC-3'(配列番号53)を用いて増幅した。

【0120】

3つの遺伝子を、In-Fusionクローニングキット(Clonetech)を用いた相同的組換えにより、pEXT20発現ベクター中に同時にクローニングした。

【0121】

得られたpEXT20-MCS-DHB(配列番号54)プラスミドを単離し、DNAシーケンシングにより、正確な配列を有することが示された。

【0122】

ホスホエノールピルベート(PEP)カルボキシキナーゼ、PEPカルボキシラーゼ、ピルベートキナーゼ、ピルベートカルボキシラーゼ、イソシトレートリアーゼ酵素、およびガラクトース共輸送体パーミアーゼの過剰発現のためのプラスミドの構築：

大腸菌のpck遺伝子をコードするPEPカルボキシキナーゼを抱え持つプラスミドpACT3-pckを、テンプレートとして大腸菌MG1655からのゲノムDNA、ならびにフォワードプライマーおよびリバースプライマーそれぞれ^{5'}TATAATCCCGGGATGCGCGTTAAACAATGGTTTGAACC^{3'}(配列番号56)および^{5'}TATAATTCTAGATTACAGTTTTCGGACCAAGCCG^{3'}(配列番号57)を用いて、pckコード配列を増幅することにより構築した。DNAフラグメントをXmaIおよびXbaIで消化し、T4 DNAリガーゼ(Biolabs)を用いてp

10

20

30

40

50

A C T 3 発現ベクター (D y k x h o o r n ら、 1 9 9 6) の対応する部位中にライゲートし、大腸菌 D H 5 細胞に形質転換した。形質転換体を、クロラムフェニコール (2 5 μ g / m L) を含む固体 L B 培地上で選択した。得られたプラスミドを単離し、p c k 遺伝子の正確な挿入をシーケンシングにより検証した。a c e A、p p c、g a l P、または p y k A (全て大腸菌) または乳酸菌からの p c k をそれぞれ抱え持つ、プラスミド p A C T 3 - a c e A、p A C T 3 - p p c、p A C T 3 - g a l P、p A C T 3 - p c k、および p A C T 3 - p y c を、表 1 1 に列挙したプライマーを用いて同様に構築した。

【表 1 1】

遺伝子	プライマー	リンカー	配列
<i>Ec_pck</i>	<i>Ec_pck_clon_for</i>	<i>Xma</i> I	tataat <u>cccg</u> gatgcgcttaacaatggttgacc (配列番号 57)
	<i>Ec_pck_clon_rev</i>	<i>Xba</i> I	tataattctagattacagtttcggaccagccg (配列番号 58)
<i>Ec_ppc</i>	<i>Ec_ppc_clon_for</i>	<i>Xma</i> I	tataat <u>cccg</u> gatgaacgaacaatatcc (配列番号 59)
	<i>Ec_ppc_clon_rev</i>	<i>Xba</i> I	tataattctagattagccggtattacgcat (配列番号 60)
<i>Ec_pykA</i>	<i>Ec_pykA_clon_for</i>	<i>Xma</i> I	tataat <u>cccg</u> gatgtccagaaggcttcgcagaaca (配列番号 61)
	<i>Ec_pykA_clon_rev</i>	<i>Xba</i> I	tataattctagattactctaccgttaaaatc (配列番号 62)
<i>Ec_aceA</i>	<i>Ec_aceA_clon_for</i>	<i>Xma</i> I	tataat <u>cccg</u> gatgaaaaccgtacacaacaaatt (配列番号 63)
	<i>Ec_aceA_clon_rev</i>	<i>Xba</i> I	tataattctagattagaactgcgattcttcag (配列番号 64)
<i>Ll_pycA</i>	<i>Ll_pycA_clon_for</i>	<i>Xma</i> I	tataat <u>cccg</u> gatgaaaaaactactcgtcgccaat (配列番号 65)
	<i>Ll_pycA_clon_rev</i>	<i>Xba</i> I	tataattctagattaattaatttcgattaaca (配列番号 66)
<i>Ec_galP</i>	<i>Ec_galP_clon_for</i>	<i>Xma</i> I	tataat <u>cccg</u> gatgcctgacgctaaaaacagggcggt (配列番号 67)
	<i>Ec_galP_clon_rev</i>	<i>Xba</i> I	tataattctagattaatcgtgagcgcctatttc (配列番号 68)

表 11: 遺伝子の過剰発現用プラスミドの構築に用いたプライマー。pACT3 への

クローニングに用いた制限部位に下線を付す。

【 0 1 2 3 】

宿主系統における l a c I のゲノム欠失と一緒に、上記のプラスミドのバックボーンから l a c I 遺伝子を除去すると、上記のプラスミドからのタンパク質発現を構成的にし得ることが理解される。

【 0 1 2 4 】

D H B 生成のために最適化した炭素流入の再分配を有する系統の構築

D H B 生成のために炭素流入の再分配および補助因子の供給を最適化するために、大腸菌 M G 1 6 5 5 系統におけるいくつかの遺伝子を破壊した。遺伝子の欠失を、D a t s e n k o らによるラムダレッドリコンビナーゼ法 (D a t s e n k o & W a n n e r , 2 0 0 0)、または M i l l e r から適応されたファージ形質導入法 (M i l l e r , 1 9 9 2) のいずれかを用いて行った。

【 0 1 2 5 】

ラムダレッドリコンビナーゼ法を用いた遺伝子欠失の導入のためのプロトコール：欠失カセットを、高忠実度ポリメラーゼ P h u s i o n (商 標) (F i n n z y m e s)、およびテンプレートとしてプラスミド p K D 4 の F R T 隣接カナマイシン耐性遺伝子 (k a n) を用いて P C R により調製した (D a t s e n k o & W a n n e r , 2 0 0 0)。センスプライマーは、後に p K D 4 の F R T - k a n - F R T カセットに対応する 2 0 b p が続く、各標的化遺伝子 (下線付) の 5 ' 末端に対応する配列を含んでいた。アンチセンスプライマーは、後にカセットに対応する 2 0 b p が続く、各標的化遺伝子 (下線付) の 3 ' 末端領域に対応する配列を含んでいた。プライマーを表 1 2 に記載する。P C R 生成物を D p n I で消化し、精製した後、形質転換した。

【 0 1 2 6 】

大腸菌 M G 1 6 5 5 系統を、L B 液体培地中 3 7 で O D₆₀₀ が 0 . 6 になるまで細胞を増殖させ、細胞を 1 0 0 倍濃縮し、これらを氷冷した 1 0 % グリセロールで 2 回洗浄することにより、エレクトロコンピテントにした。細胞を、電気穿孔 (2 m m ギャップキュベット (g a p c u v e t t e s) 中 2 . 5 k V、2 0 0 、2 5 μ F) により、プラスミド p K D 4 6 (D a t s e n k o & W a n n e r , 2 0 0 0) で形質転換した。形質転換体を、アンピリシン (1 0 0 μ g / m L) L B 固体培地上 3 0 で選択した。

【 0 1 2 7 】

破壊カセットを、ラムダレッドリコンビナーゼ発現性プラスミド p K D 4 6 を抱え持つ、エレクトロコンピテント大腸菌系統に形質転換した。細胞を、アンピシリン (1 0 0 μ g / m L) を含んでいる液体 S O B 培地中 3 0 で増殖させた。培養物の O D₆₀₀ が 0 . 1 に到達したら、1 0 m M アラビノースを加えることによりラムダレッドリコンビナーゼ系を、誘発した。細胞を、O D₆₀₀ 0 . 6 までさらに増殖させた後、細胞を遠心分離により回収し、氷冷した 1 0 % グリセロールで 2 回洗浄し、電気穿孔により破壊カセットで形質転換した。L B 液体培地中 3 0 で一夜、表現型を発現させた後、細胞を、2 5 μ g / m L カナマイシンを含む固体 L B 培地上に塗抹した。3 0 で培養した後、形質転換体を選択した。

【 0 1 2 8 】

遺伝子の置換を、C r i m s o n T a q ポリメラーゼ (N E B) を用いてコロニー P C R により検証した。第 1 の反応を、隣接する遺伝子座特異的プライマーで行って (表 1 2 を参照されたい)、親のフラグメントの同時の喪失および新たな変異体特異的フラグメントの獲得を検証した。遺伝子座特異的プライマーの 1 つを、F R T カナマイシン耐性カセット内でアラインする対応するプライマー k 1 r e v または k 2 f o r (表 1 2 を参照されたい) (センス遺伝子座プライマー / k 1 r e v および k 2 f o r / リバース遺伝子座プライマー) の 1 つと一緒に用いることにより、さらなる 2 つの反応を行った。

【 0 1 2 9 】

F L P リコンビナーゼを抱え持つ (F L P reombinase-harbouring) プラスミド p C P 2 0 (C h e r e p a n o v & W a c k e r n a g e l , 1 9 9 5) を用いて、耐性遺伝子 (F R T - k a n - F R T) を引き続き染色体から切り取り、F R T 部位 1 つを含んでいる痕跡領域 (s c a r r e g i o n) が残された。p C P 2 0 は、温度感受性複製および F L P リコンビナーゼ合成の熱誘導を示すアンピシリンおよび C m R プラスミドである。カナマイシン耐性変異体を p C P 2 0 で形質転換し、アンピシリン耐性形質転換体を 3 0 で選択した。次いで、形質転換体を 3 7 の固体 L B 培地上で増殖させ、全ての抗生物質耐性の喪失について試験した。F R T カナマイシンカセットの切除を、コロニー P C R により、

10

20

30

40

50

Crimson Taq ポリメラーゼおよび隣接する遺伝子座特異的プライマーを用いて分析した(表12)。上記の工程を繰り返すことにより、複数の欠失を得た。

【表12-1】

遺伝子	プライマー	配列
<i>ldhA</i>	Δ_{ldhA_for}	<u>gaaggttgccctacactaagcatagttgtgatgagtaggctggagctgcttc</u> (配列番号 69)
	Δ_{ldhA_rev}	<u>ttaaacagttcgttcgggcaggtttcgcccttttcatgggaattagccatggtcc</u> 配列番号 70)
<i>adhE</i>	Δ_{adhE_for}	<u>atggctgttactaatgtcgtgaacttaacgcactcgtagagcgtgtgtaggctggagctgcttc</u> (配列番号 71)
	Δ_{adhE_rev}	<u>ttaagcggatttttctgctttttctcagcttttagccggagcagccatatgaatatcctccttag</u> (配列番号 72)
<i>ackA</i>	Δ_{ackA_for}	<u>atgtcagtaagtagtactggttctgaactcggtagttcttcagttaggctggagctgcttc</u> (配列番号 73)
	Δ_{ackA_rev}	<u>tcaggcagtcaggcggctcgcgtcttgcgcgataaccagttcttccatatgaatatcctccttag</u> (配列番号 74)
<i>focA-pflB</i>	$\Delta_{focA-pflB_for}$	<u>ttactccgtatttgcataaaaaccatgcgagttacgggcctataagttaggctggagctgcttc</u> (配列番号 75)
	$\Delta_{focA-pflB_rev}$	<u>atagattgagtgaaggtagcagtaataacgtcctgctgctgttctcatatgaatatcctccttag</u> (配列番号 76)
<i>pta</i>	Δ_{pta_for}	<u>gtgtcccgtattattatgctgatccctaccggaaccagcgtcgggtgtaggctggagctgcttc</u> (配列番号 77)
	Δ_{pta_rev}	<u>ttactgctgctgtgcagactgaatcgcagtcagcgcgatggtgtacatatgaatatcctccttag</u> (配列番号 78)
<i>poxB</i>	Δ_{poxB_for}	<u>atgaaacaaacggttgagcttatatcgccaaaacactcgaatcggtaggctggagctgcttc</u> (配列番号 79)
	Δ_{poxB_rev}	<u>ttaccttagccagtttgttttcgccagttcgatcaacttcacccatatgaatatcctccttag</u> (配列番号 80)
<i>sad</i>	Δ_{sad_for}	<u>atgaccattactccggcaactcatgcaatttcgataaatcctgccgtgtaggctggagctgcttc</u> (配列番号 81)
	Δ_{sad_rev}	<u>tcagatccggtctttccacaccgtctggatattacagaattcgtgcatatgaatatcctccttag</u> (配列番号 82)
<i>gabD</i>	Δ_{gabD_for}	<u>atgaaacttaacgacagtaacttattccgccagcagcgttgattgtgtaggctggagctgcttc</u> (配列番号 83)

10

20

30

40

【表 1 2 - 2】

<i>gadA</i>	Δ_{gabD_re} v	<u>ttaaagaccgatgcacatatatttgatttctaagtaatttcgatcatatgaatatcctccttag</u> (配列番号 847)	10
	Δ_{gadA_for}	<u>atggaccagaagctgttaacggatttcgctcagaactactcgaatgttaggctggagctgcttc</u> (配列番号 85)	
<i>gadB</i>	Δ_{gadA_re} v	<u>tcagggtgttttaaagctgttctgctggcaataccctgcagtttcatatgaatatcctccttag</u> (配列番号 86)	
	Δ_{gadB_for}	<u>atggataagaagcaagtaacggatttaaggtcggaaactactcgaatgttaggctggagctgcttc</u> (配列番号 87)	
<i>gadC</i>	Δ_{gadB_re} v	<u>tcagggtatgtttaaagctgttctgctggcaataccctgcagtttcatatgaatatcctccttag</u> (配列番号 88)	20
	Δ_{gadC_for}	<u>atggctacatcagtagacagagtaagctaagcagctcacattagttaggctggagctgcttc</u> (配列番号 89)	
<i>sfcA</i>	Δ_{gadC_re} v	<u>ttagtgtttctgtcattcatcacatatagtggtgaacgtgccatatgaatatcctccttag</u> (配列番号 90)	
	Δ_{sfcA_for}	<u>atggaacccaaaaacaaaaaacagcgttcgctttatatcccttacgtgtaggctggagctgcttc</u> (配列番号 91)	
<i>maeB</i>	Δ_{sfcA_rev}	<u>ttagatggaggtacggcggtagtcgcggtattcggcttgccagaacatatgaatatcctccttag</u> (配列番号 92)	30
	Δ_{maeB_fo} r	<u>atggatgaccagttaaaacaaagtgcacttgatttccatgaattgttaggctggagctgcttc</u> (配列番号 93)	
<i>ppc</i>	Δ_{maeB_re} v	<u>ttacagcggttgggttgcgcttctaccacggccagcgcaccatcatatgaatatcctccttag</u> (配列番号 94)	
	Δ_{ppc_for}	<u>atgaacgaacaatattccgcattgcgtagtaatgtcagtagctcgtgtaggctggagctgcttc</u> (配列番号 95)	
<i>pykA</i>	Δ_{ppc_rev}	<u>ttagccggtattacgcatacctgccgaatcccggaatagtgaccatgaatatcctccttag</u> (配列番号 96)	40
	Δ_{pykA_for}	<u>atgtccagaaggcttcgcagaacaaaaatcgttaccacgttaggcgtgtaggctggagctgcttc</u> (配列番号 97)	
<i>pykF</i>	Δ_{pykA_re} v	<u>ttactctaccgttaaaatacgcgtggtattagtagaaccacggctcatatgaatatcctccttag</u> (配列番号 98)	
	Δ_{pykF_for}	<u>atgaaaaagacccaaattgtttgcaccatcggaccgaaaaccgaagttaggctggagctgcttc</u> (配列番号 99)	

【表 1 2 - 3】

<i>mgsA</i>	Δ_{pykF_rev}	<u>ttacaggacgtgaacagatgcggtgttagtagtgcgctcggtaccatgatgaatcctccttag</u> (配列番号 100)	10
	Δ_{mgsA_for}	<u>atggaactgacgactcgactttacctgcgcggaacatattgcggtgtaggctggagctgcttc</u> (配列番号 101)	
	Δ_{mgsA_rev}	<u>ttacttcagacggtccgcgagataacgctgataatcgggatcagcatatgaatcctccttag</u> (配列番号 102)	
<i>iclR</i>	Δ_{iclR_for}	<u>atggctgcacccattcccgcgaaacgcgcagaaaacccgccgtgttaggctggagctgcttc</u> (配列番号 103)	
	Δ_{iclR_rev}	<u>tcagcgcattccaccgtacgccagcgtcacttccttcgccgctttcatatgaatcctccttag</u> (配列番号 104)	
<i>icd</i>	Δ_{icd_for}	<u>atggaaagtaaagtagttgttcggcacaaggcaagaagatcaccgtgtaggctggagctgcttc</u> (配列番号 105)	20
	Δ_{icd_rev}	<u>ttacatgttttcgatgatcgctcaccaaactctgaacatttcagcatatgaatcctccttag</u> (配列番号 106)	
<i>sucA</i>	Δ_{sucA_for}	<u>atgcagaacagcgctttgaaagcctggttgactctttacctcgtgtaggctggagctgcttc</u> (配列番号 107)	
	Δ_{sucA_rev}	<u>ttattcgacgttcagcgcgtcattaaccagatcttgttgcgtttcatatgaatcctccttag</u> (配列番号 108)	
<i>sucB</i>	Δ_{sucB_for}	<u>atgagtagcgtagatattctgtccctgacctgcctgaatccgtagttaggctggagctgcttc</u> (配列番号 109)	30
	Δ_{sucB_rev}	<u>ctacacgtccagcagcagacgcgtcgatcttcagcaactctttcatatgaatcctccttag</u> (配列番号 110)	
<i>frdA</i>	Δ_{frdA_for}	<u>gtgcaaaccttcaagccgatcttgccattgtaggcgcggtggcgtgtaggctggagctgcttc</u> (配列番号 111)	
	Δ_{frdA_rev}	<u>tcagccattcgccttctccttatttggtgcttcgcccttatccatgatgaatcctccttag</u> (配列番号 112)	
<i>frdB</i>	Δ_{frdB_for}	<u>atggctgagatgaaaaacctgaaaattgagtggtgcgtataacgtgtaggctggagctgcttc</u> (配列番号 113)	40
	Δ_{frdB_rev}	<u>ttagcgtgtttcagggtcgcgataagaaagtctttcgaactttccatgatgaatcctccttag</u> (配列番号 114)	
<i>frdC</i>	Δ_{frdC_for}	<u>atgacgactaaacgtaaacctgatgtacggccaatgacgtccaccgtgtaggctggagctgcttc</u> (配列番号 115)	

【表 12 - 4】

<i>frdD</i>	Δ_{frdC_rev}	<u>ttaccagtacagggcaacaaacaggattacgatgggtggcaaccaccatagaatatcctccttag</u> (配列番号 116)
	Δ_{frdD_for}	<u>atgattaatccaaatccaaagcgttctgacgaaccggtattctgggtgtaggctggagctgcttc</u> (配列番号 117)
<i>ptsI</i>	Δ_{frdD_rev}	<u>ttagattgtaacgacaccaatcagcgtgacaactgtcaggatagccatagaatatcctccttag</u> (配列番号 118)
	Δ_{ptsI_for}	<u>atgatttcaggcatttttagcatccccgggtatcgctttcggtaaagttaggctggagctgcttc</u> (配列番号 119)
<i>ptsG</i>	Δ_{ptsI_rev}	<u>ttagcagattgtttttcttcaatgaactgttaaccagcgtcatcatagaatatcctccttag</u> (配列番号 120)
	Δ_{ptsG_for}	<u>atgtttaagaatgcatttgctaacctgcaaaagtcggtaaatcggtgtaggctggagctgcttc</u> (配列番号 121)
<i>lacI</i>	Δ_{ptsG_rev}	<u>ttagtggttacggatgtactcatccatctcggttttcaggtatccatagaatatcctccttag</u> (配列番号 122)
	Δ_{lacI_for}	<u>gtgaaaccagtaacgttatagatgtcgagagtatccggtgtcgtgtaggctggagctgcttc</u> (配列番号 123)
<i>lldD</i>	Δ_{lacI_rev}	<u>tcactgcccgtttccagtcgggaacctgtcgtgccagctgcatcatagaatatcctccttag</u> (配列番号 124)
	Δ_{lldD_for}	<u>atgattatttcgcgcagccagcgattatcgccgcgagcgcaacgcgtgtaggctggagctgcttc</u> (配列番号 125)
<i>pgi</i>	Δ_{lldD_rev}	<u>ctatgccgcattccctttgccatgggagccagtgccgcaggaacatagaatatcctccttag</u> (配列番号 126)
	Δ_{pgi_for}	<u>atgaaaaacatcaatccaacgcagaccgctgcctggcaggcactagttaggctggagctgcttc</u> (配列番号 127)
	Δ_{pgi_rev}	<u>ttaaccgcgccacgctttatagcggtaatcagaccattggtcgacatagaatatcctccttag</u> (配列番号 128)

10

20

30

表 12: 遺伝子の破壊に用いたプライマー。標的遺伝子に相同の配列に下線を付す。

【表 13 - 1】

欠失 遺伝子	配列 (5' - 3')	
	フォワードプライマー	リバースプライマー
<i>K2 for / k1 rev</i>	cggtgccctgaatgaactgc (配列番号 129)	cagtcatagccgaatagcct (配列番号 130)
<i>ldhA</i>	atacgtgtcccgagcggtag (配列番号 131)	tacacatcccgccatcagca (配列番号 132)
<i>adhE</i>	gaagtaaacgggaaatcaa (配列番号 133)	agaagtggcataagaaaacg (配列番号 134)
<i>ackA</i>	ccattggctgaaaattacgc (配列番号 135)	gttcattgcacggatcacg (配列番号 136)
<i>focA_pflB</i>	atgccgtagaagccgccagt (配列番号 137)	tggttggtgcgcagctcgaag (配列番号 138)
<i>pta</i>	gcaaatctggtttcatcaac (配列番号 139)	tcccttgacaaaaacaaagt (配列番号 140)
<i>poxB</i>	ggatttggttctcgcataat (配列番号 141)	agcattaacggtagggtcgt (配列番号 142)
<i>sad</i>	gctgattctcgcaataaac (配列番号 143)	aaaaacgttcttgccgctct (配列番号 144)
<i>gabD</i>	tctgtttgtcaccacccgc (配列番号 145)	aagccagcacctggaagcag (配列番号 146)
<i>gadA</i>	aagagctgccgcaggaggat (配列番号 147)	gccgccctcttaagtcaaat (配列番号 148)
<i>gadB</i>	ggattttagcaatattcgct (配列番号 149)	cctaatagcaggaagaagac (配列番号 150)
<i>gadC</i>	gctgaactgttgctggaaga (配列番号 151)	ggcgtgcttttacaactaca (配列番号 152)
<i>sfcA</i>	tagtaaataaccaaccgac (配列番号 153)	tcagtgcgcagtggttta (配列番号 154)
<i>maeB</i>	attaatggtgagagtttga (配列番号 155)	tgctttttttattattcg (配列番号 156)
<i>ppc</i>	gctttataaaagacgacgaa (配列番号 157)	gtaacgacaattcctaagg (配列番号 158)

10

20

30

40

【表 13 - 2】

<i>pykA</i>	tttatatgccatggtttct (配列番号 159)	atctgtagaggcggatgat (配列番号 160)	10
<i>pykF</i>	ctggaacgttaaactttga (配列番号 161)	ccagtttagtagctttcatt (配列番号 162)	
<i>iclR</i>	gatttgtcaacattaactcatcgg (配列番号 163)	tgcgattaacagacaccctt (配列番号 164)	
<i>mgsA</i>	tctcaggtgctcacagaaca (配列番号 165)	tatggaagaggcgtactgc (配列番号 166)	
<i>icd</i>	cgacctgctgcataaacacc (配列番号 167)	tgaacgctaagtgattgca (配列番号 168)	
<i>sucA</i>	acgtagacaagactcgcaa (配列番号 169)	catcacgtacgactgcgtcg (配列番号 170)	20
<i>sucB</i>	tgcaactttgtgctgagcaa (配列番号 171)	tatcgcttccgggcattgtc (配列番号 172)	
<i>frdA</i>	aaatcgatctcgtcaaatttcagac (配列番号 173)	aggaaccacaaatcgccata (配列番号 174)	
<i>frdB</i>	gacgtgaagattactacgct (配列番号 175)	agttcaatgctgaaccacac (配列番号 176)	
<i>frdC</i>	tagccgcgaccaggtgaagaaggag (配 列番号 177)	cagcgcatcaccggaaaca 配列番号 178)	
<i>frdD</i>	atcgtgatcattaacctgat (配列番号 179)	ttaccctgataaattaccgc (配列番号 180)	30
<i>lacI</i>	gaatctggtgtatatggcga (配列番号 181)	tcttcgctattacgccagct (配列番号 182)	
<i>lldD</i>	cgtcagcggatgtatctggt (配列番号 183)	gcggaatttctggttcgtaa (配列番号 184)	
<i>pgi</i>	ttgtcaacgatggggtcatg (配列番号 195)	aaaaatgccgacataacgtc (配列番号 196)	
<i>ptsG</i>	ccatccgttgaatgagttt (配列番号 197)	tggtgttaactggcaaaatc (配列番号 198)	
<i>ptsI</i>	gtgacttccaacggcaaaag (配列番号 199)	ccgttggttgatagcaata (配列番号 200)	40

表 13: 遺伝子の破壊の検証に用いたプライマー対

【 0 1 3 0 】

ファージ形質導入法を用いた遺伝子欠失の導入のためのプロトコール：所望の単一の欠失を保有する株を、Keioコレクションから入手した(Babaら、2006)。一夜

前培養物 $100\ \mu\text{L}$ を $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$ カナマイシン、 $2\ \text{g}/\text{L}$ グルコース、および $5\ \text{mM}$ CaCl_2 を含んでいる LB 培地 $10\ \text{mL}$ に接種することにより、単一の欠失変異体からのファージ溶解物を調製した。37 で1時間インキュベートした後、野生型 MG1655 系統から調製したファージ溶解物 $200\ \mu\text{L}$ を加え、培養物を、細胞の溶解が完了するまでさらに2～3時間インキュベートした。クロロホルム $200\ \mu\text{L}$ を加えた後、細胞調合液を最初に激しくボルテックスにかけ、次いで $4500\times g$ で10分間遠心分離した。澄明な溶解物を回収し、4 で貯蔵した。

【0131】

レセプター系統を、LB 培地中37 で一夜培養することにより、ファージ形質導入用に調製した。前培養物 $1.5\ \text{mL}$ 体積を、 $1500\times g$ で10分間遠心分離した。上清を廃棄し、細胞ペレットを、 $10\ \text{mM}$ MgSO_4 および $5\ \text{mM}$ CaCl_2 を含んでいる溶液 $600\ \mu\text{L}$ 中に再懸濁した。レセプター系統を含んでいる溶液 $100\ \mu\text{L}$ を溶解物 $100\ \mu\text{L}$ と混合し、この混合液を30 で30分間インキュベートすることにより形質導入を行った。その後、 $1\ \text{M}$ クエン酸ナトリウム溶液 $100\ \mu\text{L}$ を加え、その後激しくボルテックスにかけた。LB 培地 $1\ \text{mL}$ を加えた後、細胞懸濁液を37 で1時間インキュベートし、その後細胞を、 $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$ カナマイシンを含んでいる LB 寒天平板上に塗抹した。抗生物質の存在下で増殖することができるクローンが、表13に列挙するプライマーを用いて、所望の欠失を含んでいることを、コロニーPCRにより確認した。各遺伝子の欠失を導入した後、上記の通り、(Cherepanov & Wackernagel、1995)の方法に従って、抗生物質マーカーを除去した。

【0132】

マリルCoAシンターゼ、マリルCoAレダクターゼ、およびDHBデヒドロゲナーゼを同時発現するプラスミド(pEXT20-MCS-DHBもしくはpACT3-MCS-DHB)；またはマリルCoAリアーゼ、マリルCoAレダクターゼ、およびDHBデヒドロゲナーゼを同時発現するプラスミド(pEXT20-MCL-DHBもしくはpACT3-MCL-DHB)；または空の対照のプラスミド(pEXT20もしくはpACT3)を、単独で、またはpACT3-aceA、pACT3-ppc、pACT3-galP、pACT3-pck、またはpACT3-pycのプラスミドの1つと一緒に最適化した宿主系統に形質転換した。DHB経路の酵素を発現するプラスミド、およびアナプレロティック酵素(anaplerotic enzyme)を発現するプラスミドの両方を含む形質転換体を、クロラムフェニコール($25\ \mu\text{g}/\text{mL}$)およびカナマイシン($50\ \mu\text{g}/\text{mL}$)を含んでいる固体LB培地上で選択した。構築された系統の非排他的な例を表14に列挙する。

【表 1 4 - 1】

系統	関連の遺伝子型
MG1655	野生型
ECE50	pEXT20-MCS-DHB
ECE51	pACT3-MCS-DHB
ECE52	pEXT20-MCL-DHB
ECE53	pACT3-MCL-DHB
ECE54	Δ ldhA Δ adhE Δ pta-ack Δ pflB pEXT20-MCS-DHB
ECE55	Δ ldhA Δ adhE Δ pta-ack Δ pflB pACT3-MCS-DHB
ECE56	Δ ldhA Δ adhE Δ pta-ack Δ pflB pACT3-MCS-DHB, pACT3-ppc
ECE57	Δ ldhA Δ adhE Δ pta-ack Δ pflB Δ poxB pEXT20-MCS-DHB
ECE58	Δ ldhA Δ adhE Δ pta-ack Δ pflB Δ poxB pACT3-MCS-DHB
ECE59	Δ ldhA Δ adhE Δ pta-ack Δ pflB Δ poxB pEXT20-MCS-DHB, pACT3-ppc
ECE60	Δ ldhA Δ adhE Δ pta-ack Δ pflB Δ poxB Δ maeB Δ sfcA pEXT20-MCS-DHB
ECE61	Δ ldhA Δ adhE Δ pta-ack Δ pflB Δ poxB Δ maeB Δ sfcA pACT3-MCS-DHB
ECE62	Δ ldhA Δ adhE Δ pta-ack Δ pflB Δ poxB Δ maeB Δ sfcA pEXT20-MCS-DHB, pACT3-ppc
ECE63	Δ ldhA Δ adhE Δ pta-ack Δ pflB Δ poxB Δ maeB Δ sfcA Δ pts pEXT20-MCS-DHB
ECE64	Δ ldhA Δ adhE Δ pta-ack Δ pflB Δ poxB Δ maeB Δ sfcA Δ pts pACT3-MCS-DHB
ECE65	Δ ldhA Δ adhE Δ pta-ack Δ pflB Δ poxB Δ maeB Δ sfcA Δ pts pEXT20-MCS-DHB, pACT3-ppc
ECE66	Δ ldhA Δ adhE Δ pta-ack Δ pflB Δ poxB Δ maeB Δ sfcA Δ pts Δ frdBC pEXT20-MCS-DHB

10

20

30

40

【表 14 - 2】

ECE67	Δ ldhA Δ adhE Δ pta-ack Δ pflB Δ poxB Δ maeB Δ sfcA Δ pts Δ frdBC pACT3-MCS-DHB
ECE68	Δ ldhA Δ adhE Δ pta-ack Δ pflB Δ poxB Δ maeB Δ sfcA Δ pts Δ frdBC pEXT20-MCS-DHB, pACT3-ppc
ECE69	Δ pta Δ iclR Δ aceB pACT3-MCL-DHB
ECE70	Δ pta Δ iclR Δ aceB
ECE71	Δ pta Δ iclR Δ aceB Δ adhE pACT3-MCL-DHB
ECE72	Δ pta Δ iclR Δ aceB Δ adhE
ECE73	Δ ldhA Δ adhE Δ pta-ack Δ poxB Δ maeB Δ sfcA Δ mdh Δ mgo Δ iclR Δ aceB pEXT20-MCS-DHB, pACT3- MCL-DHB
ECE74	Δ ldhA Δ adhE Δ pta-ack Δ poxB Δ maeB Δ sfcA Δ mdh Δ mgo Δ iclR Δ aceB Δ pts pEXT20-MCS-DHB, pACT3- MCL-DHB
ECE75	Δ ldhA Δ adhE Δ pta-ack Δ poxB Δ maeB Δ sfcA Δ mdh Δ mgo Δ iclR Δ aceB Δ pts Δ pgi pEXT20-MCS-DHB, pACT3- MCL-DHB
ECE76	Δ ldhA Δ adhE Δ pta-ack Δ poxB Δ maeB Δ sfcA Δ mdh Δ mgo Δ iclR Δ aceB Δ pgi pEXT20-MCS-DHB, pACT3- MCL-DHB
ECE77	Δ ldhA Δ adhE Δ pta-ack Δ poxB Δ maeB Δ sfcA Δ mdh Δ mgo Δ iclR Δ aceB Δ ghrAB pEXT20-MCS-DHB, pACT3- MCL-DHB
ECE79	Δ ldhA Δ adhE Δ pta-ack Δ pflB Δ poxB Δ maeB Δ sfcA aspC pEXT20-MCS-DHB, pACT3-ppc
ECE80	Δ ldhA Δ adhE Δ pta-ack Δ pflB Δ poxB Δ maeB Δ sfcA Δ aspC Δ iclR Δ aceB pEXT20-MCS-DHB, pACT3-ppc
ECE81	Δ ldhA Δ adhE Δ pta-ack Δ pflB Δ poxB Δ maeB Δ sfcA Δ aspC Δ iclR Δ aceB Δ ghrAB pEXT20-MCS-DHB, pACT3-ppc

表 14: DHB 生成用に構築した系統の例

【 0 1 3 3 】

例 8 : 合成のマリル C o A 経路による D H B の発酵性の生成の実証

系統および培養条件 : 配列番号 2 0 3 によって示されるプラスミド p A C T 3 - M C L

10

20

30

40

50

- D H B から D H B 経路を発現する E C E 6 9 系統 (この実験では、野生型 M c r 酵素が M c r T y r 2 0 6 P r o 変異体により置換されている)、および空のプラスミド p A C T 3 を含んでいる同質遺伝子の対照 E C E 7 0 系統を用いて実験を行った。培養は全て、1 7 0 r p m で作動する I n f o r s 回転式振盪培養機上、3 7 °C で行った。一夜培養物 (試験管中培地 3 m L) を、グリセロール貯蔵物から接種し、5 0 0 m L 振盪フラスコ中で培養した増殖培養物 1 0 0 m L 中、最初の O D₆₀₀ を 0 . 0 5 に調節するのに用いた。増殖培養物の O D₆₀₀ が 1 に到達したら、1 m m o l / L 濃度の I P T G を加えた。無機増殖培地の組成を例 2 に示す。

【 0 1 3 4 】

L C - M S / M S 分析による D H B 濃度の推定: D H B を、L C - M S を用いて定量した。液体陰イオン交換クロマトグラフィーを、自動式の溶離液 (K O H) ジェネレーターシステム (R F I C、D i o n e x)、および試料を 4 °C に保持するオートサンプラー (A S 5 0、D i o n e x) を装備した D i o n e x (S u n n y v a l e、U S A) の I C S - 3 0 0 0 システム上で行った。分析物を、A G 1 1 H C (5 0 x 2 m m、D i o n e x) プレカラムによって保護した I o n P a c A S 1 1 H C (2 5 0 x 2 m m、D i o n e x) カラム上で分離した。カラム温度を 2 5 °C に保持し、流速を 0 . 2 5 m L / 分に固定し、先に記載した K O H 勾配を適用して分析物を溶出した (G r o u s s a c E、O r t i z M & F r a n c o i s J (2 0 0 0) 伝導度測定による検出およびパルスアンペロメトリック検出を有する高速イオン交換クロマトグラフィーを用いた生物学的試料から代謝産物を定量するための改善されたプロトコル (Improved protocols for quantitative determination of metabolites from biological samples using high performance ionic-exchange chromatography with conductimetric and pulsed amperometric detection.)、E n z y m e . M i c r o b . T e c h n o l .、2 6、7 1 5 ~ 7 2 3)。注入した試料体積は 1 5 μ L であった。バックグラウンドを低減するために、A S R S u l t r a I I (2 m m、外部注水モード (external water mode)、7 5 m A) 陰イオンサプレッサー (anion suppressor) を用いた。分析物を、E S I モード (分離は 1 / 3 であり、窒素圧力は 9 0 p s i であり、キャピラリー電圧は 3 . 5 k V であり、プローブ温度は 4 5 0 °C であった) において運転する質量感受性検出器 (mass-sensitive detector) (M S Q P l u s、T h e r m o) で定量した。

【 0 1 3 5 】

結果: 培養 2 4 時間後、E C E 6 9 および E C E 7 0 系統の上清はそれぞれ、0 . 0 5 m M D H B および 0 m M D H B を含んでおり、合成経路による D H B 生成が実証された。

以下に、出願当初の特許請求の範囲の記載を発明の態様として付記する。

[1] 連続する、

a) マレートおよび / またはスクシニル C o A および / またはグリオキシレートをマリル C o A に変換する第 1 の工程と、

b) 予め得たマリル C o A をマレート - 4 - セミアルデヒドに変換する第 2 の工程と、

c) マレート - 4 - セミアルデヒドを、D H B デヒドロゲナーゼを用いて 2 , 4 - D H B に変換する第 3 の工程と、

を含む、2 , 4 - ジヒドロキシ酪酸 (2 , 4 - D H B) を調製するための方法。

[2] 工程 a) を、マリル C o A シンターゼ、スクシニル C o A : (L) - マレート C o A トランスフェラーゼ、および / またはマリル C o A リアーゼの活性を有する酵素によってそれぞれ触媒する、[1] に記載の方法。

[3] 前記酵素を、配列番号 1、配列番号 1 9 3、および配列番号 1 9 5 のいずれか 1 つ、またはその任意のバリエーションもしくはフラグメントによって表す、[2] に記載の方法。

[4] 前記酵素を、配列番号 2、配列番号 1 9 4、および配列番号 1 9 6 において規定される核酸のいずれか 1 つ、またはその任意のバリエーションもしくはフラグメントによってコードする、[2] または [3] に記載の方法。

[5] 工程 b) を、マリル C o A レダクターゼ活性を有する酵素によって触媒する、[

1] または [2] に記載の方法。

[6] 前記マレートセミアルデヒドデヒドロゲナーゼは、酵素の少なくとも1つの変異によって取得可能であり、前記変異が、前記変異した酵素のマリルC o Aに対する活性および/または基質親和性を改善する、[5] に記載の方法。

[7] 前記マリルC o Aレダクターゼが、野生型酵素に比した場合、P 1 1 1、L 1 5 2、T 1 5 4、L 2 0 2、G 2 0 3、D 2 0 4、Y 2 0 6、D 2 0 7、K 2 0 9、T 2 1 0、T 2 3 8、T 2 3 9、D 2 9 5、R 3 1 8の少なくとも1つの位置において少なくとも1つの変異を含み、前記位置における天然に生じるアミノ酸が、他の19種類の天然に存在するタンパク質構成アミノ酸のいずれか1つによって、すなわち、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、またはバリンのいずれかによって置きかえられている、[6] に記載の方法。

[8] 前記マリルC o Aレダクターゼを配列番号202によって表す、[7] に記載の方法。

[9] 前記酵素を配列番号201の核酸によってコードする、[8] に記載の方法。

[10] 前記酵素が、マロニルC o Aレダクターゼ、またはスクシニルC o Aレダクターゼである、[5] に記載の方法。

[11] 前記酵素を、マロニルC o AレダクターゼまたはスクシニルC o Aレダクターゼの活性を有する酵素の修飾によって得る、[10] に記載の方法。

[12] 前記酵素を、配列番号7、配列番号8、もしくは配列番号191のいずれか1つ、またはその任意のバリエーションもしくはフラグメントによって表す、[10] または[11] に記載の方法。

[13] 前記酵素を、配列番号8、配列番号10、もしくは配列番号192において規定される核酸のいずれか1つ、またはその任意のバリエーションもしくはフラグメントによってコードする、[12] に記載の方法。

[14] 工程c)を、DHBデヒドロゲナーゼ活性を有する酵素によって触媒する、[1] から[13] のいずれかーに記載の方法。

[15] 前記酵素が、メチルブチルアルデヒドレダクターゼ、スクシニクセミアルデヒドレダクターゼ、4 - ヒドロキシブチレートデヒドロゲナーゼ、またはアルコールデヒドロゲナーゼである、[14] に記載の方法。

[16] 前記酵素を、配列番号14、配列番号16、配列番号32、配列番号34、配列番号36、配列番号187、もしくは配列番号189、またはこれらの任意のバリエーションによって表す、[15] に記載の方法。

[17] 前記酵素を、配列番号15、配列番号17、配列番号33、配列番号35、配列番号37、配列番号188、配列番号190において規定される核酸のいずれか1つ、またはその任意のバリエーションもしくはフラグメントによってコードする、[16] に記載の方法。

[18] 工程a)、b)、およびc)を、工程a)、b)、またはc)に記載する酵素活性を行う酵素の少なくとも1つを異種性に発現する修飾された微生物によって行う、[1] から[17] のいずれかーに記載の方法。

[19] 工程a)、b)、およびc)を同じ微生物内で行う、[1] から[17] のいずれかーに記載の方法。

[20] [1] から[17] のいずれかーにおいて規定した、工程a)、b)、およびc)の触媒作用に必要な酵素活性を有する酵素をコードする遺伝子を発現する、2、4 - DHBの改善された生成のための修飾された微生物。

[21] 優先的に、腸内細菌科、クロストリジウム科、バシラス科、ストレプトミセス科、ストレプトコッカス科、メチロバクテリウム科 (Methylobacteriaceae)、およびコリネバクテリウム科、最も優先的に、大腸菌、枯草菌、コリネバクテリウムグルタミカム、クロストリジウムアセトブチリカム、メチロバクテリウムエキストロクエンス、もしくは

10

20

30

40

50

乳酸菌の中から選択される細菌、または、優先的に、サッカロミセス科、ピキア科、およびシゾサッカロミセス科、最も優先的に、サッカロミセスセレビシエ、シゾサッカロミセスポンベ、クルイベロミセスラクチス、クルイベロミセスマルキシアヌス、ピキアジャディニ、ピキアスティピティス、もしくはピキアパストリの中から選択される酵母である、[2 0] に記載の微生物。

[2 2] ホスホエノールピルベートカルボキシラーゼ、ホスホエノールピルベートカルボキシキナーゼ、ピルベートカルボキシラーゼ、イソシトレートリアーゼ、ピルベートカルボキシラーゼ、およびヘキソース共輸送体パーミアーゼの中から選択される酵素活性の少なくとも1つの発現が増大し、かつ/またはラクテートデヒドロゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、アセテートキナーゼ、ホスフェートアセチルトランスフェラーゼ、ピルベートオキシダーゼ、イソシトレートリアーゼ、フマレートレダクターゼ、フマラーゼ、2 - オキソグルタレートデヒドロゲナーゼ、ピルベートキナーゼ、マリック酵素、ホスホグルコースイソメラーゼ、ホスホエノールピルベートカルボキシラーゼ、ホスホエノールピルベートカルボキシキナーゼ、ピルベートホルメートリアーゼ、スクシニクセミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、糖輸送 (sugar-transporting) ホスホトランスフェラーゼ、アスパルテートアミノトランスフェラーゼ、グリオキシレートレダクターゼ、マレートシンターゼ、またはメチルグリオキサルシンターゼの中から選択される酵素活性の少なくとも1つが低減している、[2 0] または [2 1] に記載の微生物。

[2 3] 全ての大腸菌の p p c、p c k、a c e A、g a l P ; 乳酸菌からの p y c A のの中から選択される遺伝子の少なくとも1つを過剰発現し、かつ/または l d h A、a d h E、a c k A、p t a、p o x B、f o c A、p f l B、s a d、g a b A B C、s f c A、m a e B、p p c、p y k A、p y k F、m g s A、f r d A B C D、s u c A B、p t s I、p t s G、p g i、f u m A B C、a l d A、l l d D、i c l R、a c e B、a s p C、g h r A B のの中から選択される遺伝子の少なくとも1つを欠失した大腸菌である、[2 2] に記載の微生物。

[2 4] [1 5] から [1 8] のいずれかーに記載の修飾された微生物を、適切な培養培地中で培養する工程と、

前記培養培地から 2 , 4 - D H B を回収する工程と
を含む、2 , 4 - D H B を生成する方法。

[2 5] 前記 2 , 4 - D H B をさらに精製する、[2 4] に記載の方法。

【 0 1 3 6 】

参考文献

Akita, O., Nishimori, C., Shimamoto, T., Fujii, T. & Iefuji, H. (2000). Transport of pyruvate in *Saccharomyces cerevisiae* and cloning of the gene encoded pyruvate permease. *Biosci Biotechnol Biochem* 64, 980 984.

Alber, B., Olinger, M., Rieder, A., Kockelkorn, D., Jobst, B., Huegler, M. & Fuchs, G. (2006). Malonyl-coenzyme A reductase in the modified 3-hydroxypropionate cycle for autotrophic carbon fixation in archaeal *Metallosphaera* and *Sulfolobus* spp. *J Bacteriol* 188, 8551 8559.

Arps, P. J., Fulton, G. F., Minnich, E. C. & Lidstrom, M. E. (1993). Genetics of serine pathway enzymes in *Methylobacterium extorquens* AM1: phosphoenolpyruvate carboxylase and malyl coenzyme A lyase. *J Bacteriol* 175, 3776 3783.

Auriol, C., Bestel-Corre, G., Claude, J.-B., Soucaille, P. & Meynial-Salles, I. (2011). Stress-induced evolution of *Escherichia coli* points to original concepts in respiratory cofactor selectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 1278 1283.

Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L. & Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* 2, 2006.0008.

Bailey, J. E. (1991). Toward a science of metabolic engineering. *Science* 252, 16

10

20

30

40

50

68 1675.

Camarasa, C., Bidard, F., Bony, M., Barre, P. & Dequin, S. (2001). Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* malate permease by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 67, 4144–4151.

Cherepanov, P. P. & Wackernagel, W. (1995). Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of FLP-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* 158, 9–14.

Chistoserdova, L., Kalyuzhnaya, M. G. & Lidstrom, M. E. (2009). The expanding world of methylotrophic metabolism. *Annu Rev Microbiol* 63, 477–499.

Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6640–6645.

Ford, G. & Ellis, E. M. (2002). Characterization of Ypr1p from *Saccharomyces cerevisiae* as a 2-methylbutyraldehyde reductase. *Yeast* 19, 1087–1096.

Friedmann, S., Steindorf, A., Alber, B. E. & Fuchs, G. (2006). Properties of succinyl-coenzyme A:L-malate coenzyme A transferase and its role in the autotrophic 3-hydroxypropionate cycle of *Chloroflexus aurantiacus*. *J Bacteriol* 188, 2646–2655.

Grobler, J., Bauer, F., Subden, R. E. & Van Vuuren, H. J. (1995). The *mae1* gene of *Schizosaccharomyces pombe* encodes a permease for malate and other C4 dicarboxylic acids. *Yeast* 11, 1485–1491.

Groeneveld, M., Weme, R. G. J. D. O., Duurkens, R. H. & Slotboom, D. J. (2010). Biochemical characterization of the C4-dicarboxylate transporter DctA from *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 192, 2900–2907.

Jantama, K., Zhang, X., Moore, J. C., Shanmugam, K. T., Svoronos, S. A. & Ingram, L. O. (2008a). Eliminating side products and increasing succinate yields in engineered strains of *Escherichia coli* C. *Biotechnol Bioeng* 101, 881–893.

Jantama, K., Haupt, M. J., Svoronos, S. A., Zhang, X., Moore, J. C., Shanmugam, K. T. & Ingram, L. O. (2008b). Combining metabolic engineering and metabolic evolution to develop nonrecombinant strains of *Escherichia coli* C that produce succinate and malate. *Biotechnol Bioeng* 99, 1140–1153.

Kawasaki, T., Koita, H., Nakatsubo, T., Hasegawa, K., Wakabayashi, K., Takahashi, H., Umemura, K., Umezawa, T. & Shimamoto, K. (2006). Cinnamoyl-CoA reductase, a key enzyme in lignin biosynthesis, is an effector of small GTPase Rac in defense signaling in rice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 230–235.

Kockelkorn, D. & Fuchs, G. (2009). Malonic semialdehyde reductase, succinic semialdehyde reductase, and succinyl-coenzyme A reductase from *Metallosphaera sedula*: enzymes of the autotrophic 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate cycle in *Sulfolobales*. *J Bacteriol* 191, 6352–6362.

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A. & other authors. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinforma Oxf Engl* 23, 2947–2948.

Lin, H., Bennett, G. N. & San, K.-Y. (2005). Metabolic engineering of aerobic succinate production systems in *Escherichia coli* to improve process productivity and achieve the maximum theoretical succinate yield. *Metab Eng* 7, 116–127.

Meister, M., Saum, S., Alber, B. E. & Fuchs, G. (2005). L-malyl-coenzyme A/beta-methylmalyl-coenzyme A lyase is involved in acetate assimilation of the isocitrate lyase-negative bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol* 187, 1415–1425.

Millard, C. S., Chao, Y. P., Liao, J. C. & Donnelly, M. I. (1996). Enhanced prod

10

20

30

40

50

- uction of succinic acid by overexpression of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 62, 1808–1810.
- Miller, J. H. (1992). *A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria*. Plainview (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Rognstad, R. & Katz, J. (1979). Effects of 2,4-dihydroxybutyrate on lipogenesis in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 254, 11969–11972.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez, A. M., Bennett, G. N. & San, K.-Y. (2005). Novel pathway engineering design of the anaerobic central metabolic pathway in *Escherichia coli* to increase succinate yield and productivity. *Metab Eng* 7, 229–239.
- Sauer, U. & Eikmanns, B. J. (2005). The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria. *Fems Microbiol Rev* 29, 765–794.
- Seedorf, H., Fricke, W. F., Veith, B., Brueggemann, H., Liesegang, H., Strittmatter, A., Miethke, M., Buckel, W., Hinderberger, J. & other authors. (2008). The genome of *Clostridium kluyveri*, a strict anaerobe with unique metabolic features. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 2128–2133.
- Shinka, T., Inoue, Y., Ohse, M., Ito, A., Ohfu, M., Hirose, S. & Kuhara, T. (2002). Rapid and sensitive detection of urinary 4-hydroxybutyric acid and its related compounds by gas chromatography-mass spectrometry in a patient with succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 776, 57–63.
- Smejkalová, H., Erb, T. J. & Fuchs, G. (2010). Methanol assimilation in *Methylobacterium extorquens* AM1: demonstration of all enzymes and their regulation. *PloS One* 5.
- Soehling, B. & Gottschalk, G. (1993). Purification and characterization of a coenzyme-A-dependent succinate-semialdehyde dehydrogenase from *Clostridium kluyveri*. *Eur J Biochem Febs* 212, 121–127.
- Vuilleumier, S., Chistoserdova, L., Lee, M.-C., Bringel, F., Lajus, A., Zhou, Y., Gourion, B., Barbe, V., Chang, J. & other authors. (2009). *Methylobacterium* genome sequences: a reference blueprint to investigate microbial metabolism of C1 compounds from natural and industrial sources. *PloS One* 4, e5584.
- Wang, Q., Ou, M. S., Kim, Y., Ingram, L. O. & Shanmugam, K. T. (2010). Metabolic flux control at the pyruvate node in an anaerobic *Escherichia coli* strain with an active pyruvate dehydrogenase. *Appl Environ Microbiol* 76, 2107–2114.
- Werpy, T. & Petersen, G. (2004). *Top value added chemicals from biomass. Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas*. Washington DC.
- Zarzycki, J., Brecht, V., Mueller, M. & Fuchs, G. (2009). Identifying the missing steps of the autotrophic 3-hydroxypropionate CO₂ fixation cycle in *Chloroflexus aurantiacus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 21317–21322.
- Zelle, R. M., de Hulster, E., van Winden, W. A., de Waard, P., Dijkema, C., Winkler, A. A., Geertman, J.-M. A., van Dijken, J. P., Pronk, J. T. & van Maris, A. J. A. (2008). Malic acid production by *Saccharomyces cerevisiae*: engineering of pyruvate carboxylation, oxaloacetate reduction, and malate export. *Appl Environ Microbiol* 74, 2766–2777.
- Zelle, R. M., de Hulster, E., Kloezen, W., Pronk, J. T. & van Maris, A. J. A. (2010). Key process conditions for production of C(4) dicarboxylic acids in bioreactors.

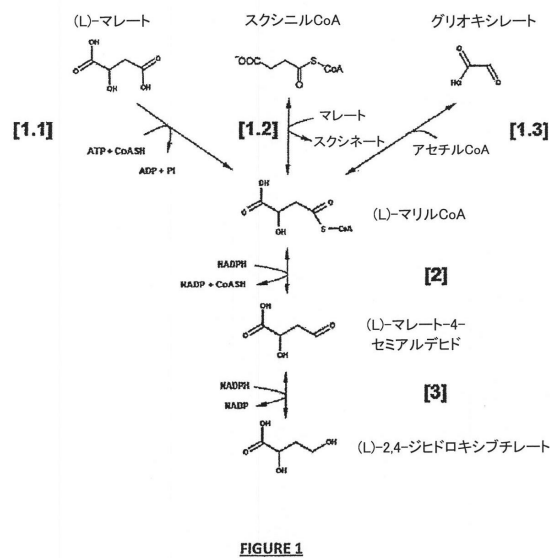
ctor batch cultures of an engineered *Saccharomyces cerevisiae* strain. Appl Environ Microbiol 76, 744–750.

Zhang, X., Jantama, K., Shanmugam, K. T. & Ingram, L. O. (2009). Reengineering *Escherichia coli* for Succinate Production in Mineral Salts Medium. Appl Environ Microbiol 75, 7807–7813.

Zhang, X., Wang, X., Shanmugam, K. T. & Ingram, L. O. (2011). L-malate production by metabolically engineered *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol 77, 427–434.

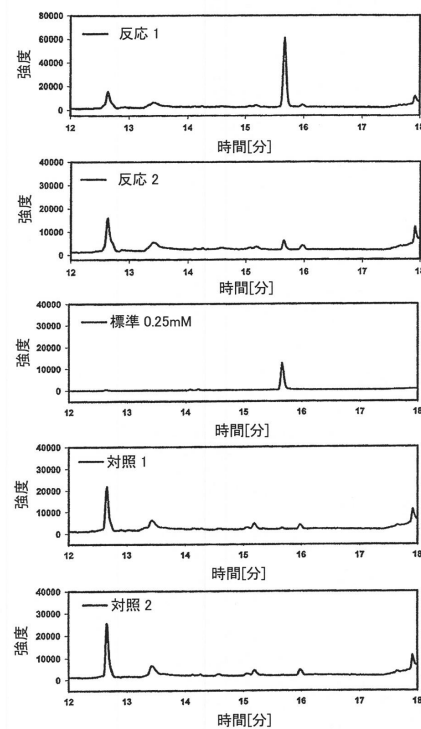
【図 1】

図1



【図 2】

図2



【図 3】

図3

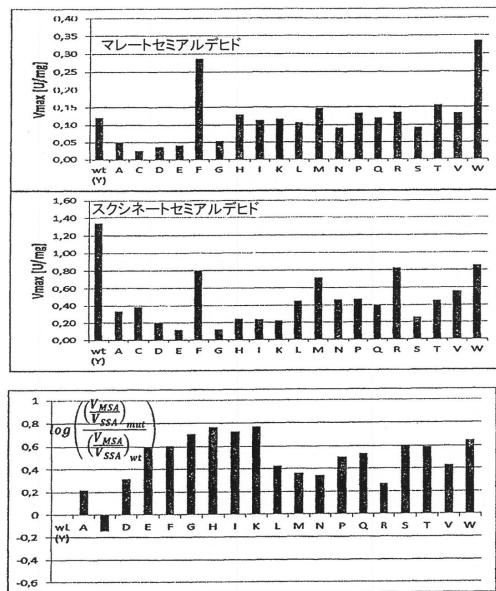


FIGURE 3

【配列表】

[0006342385000001.app](#)

 フロントページの続き

- (74)代理人 100075672
弁理士 峰 隆司
- (74)代理人 100153051
弁理士 河野 直樹
- (74)代理人 100140176
弁理士 砂川 克
- (74)代理人 100158805
弁理士 井関 守三
- (74)代理人 100124394
弁理士 佐藤 立志
- (74)代理人 100112807
弁理士 岡田 貴志
- (74)代理人 100111073
弁理士 堀内 美保子
- (72)発明者 バルラル、トマ
フランス国、3 1 1 2 0 ラクロワ・ファルガルド、アンパッセ・ジュリアン・ルーピアック 1
6
- (72)発明者 ドレッセール、クレモンティーヌ
フランス国、3 4 3 4 0 マルセイヤン、リュ・デオル 1 9
- (72)発明者 コーディエ、エレヌ
フランス国、3 1 5 0 0 トゥールーズ、リュ・クラディウス・ルジュネ 1 0、アパルトマン
1 1 5、バット シー
- (72)発明者 フランソワ、ジャン・マリ
フランス国、3 1 1 0 0 トゥールーズ、リュ・デスピオー 2 1

審査官 西村 亜希子

- (56)参考文献 特開2 0 0 2 - 0 0 0 2 9 2 (J P , A)
国際公開第2 0 0 8 / 0 4 6 3 2 8 (WO , A 1)
Yeast, 2002, 19(12), p.1087-1096
J. Bacteriol., 2009, 191(20), p.6352-6362

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 P 7 / 4 2
C 1 2 N 1 / 1 9
C 1 2 N 1 / 2 1
C 1 2 N 1 5 / 0 9
C A / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)