

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号
特許第5113800号
(P5113800)

(45) 発行日 平成25年1月9日(2013.1.9)

(24) 登録日 平成24年10月19日(2012.10.19)

(51) Int.Cl. F I

C 1 2 N 1/19 (2006.01) C 1 2 N 1/19 Z N A

C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 1/15 (2006.01) C 1 2 N 1/15

C 1 2 P 7/06 (2006.01) C 1 2 P 7/06

C 1 2 P 7/56 (2006.01) C 1 2 P 7/56

請求項の数 17 (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2009-112827 (P2009-112827)	(73) 特許権者	511122374
(22) 出願日	平成21年5月7日 (2009.5.7)		シー5 イースト カンパニー ビー. ブ
(62) 分割の表示	特願2003-562297 (P2003-562297)		イ.
原出願日	平成15年1月23日 (2003.1.23)		オランダ国 4 6 1 2 ビーエス ベルヘ
(65) 公開番号	特開2009-213481 (P2009-213481A)	(74) 代理人	100066692
(43) 公開日	平成21年9月24日 (2009.9.24)		弁理士 浅村 皓
審査請求日	平成21年6月1日 (2009.6.1)	(74) 代理人	100072040
(31) 優先権主張番号	02075266.3		弁理士 浅村 肇
(32) 優先日	平成14年1月23日 (2002.1.23)	(74) 代理人	100114719
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 金森 久司
前置審査		(74) 代理人	100124969
			弁理士 井上 洋一
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ペントース糖の発酵

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

SEQ ID NO. 1 のアミノ酸配列と少なくとも 80% の配列同一性 (sequence identity) を有し (配列同一性は、Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443-453 (1970) に記載のアルゴリズムを使用し、Hentikoff and Hentikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919 (1992) に記載の BLOSSUM62 Comparison matrix を使用し、Gap Penalty: 12 及び Gap Length Penalty: 4 で同定した)、更に

(i) SEQ ID NO. 1 のアミノ酸配列の 185-194 の位置のアミノ酸配列、
(ii) SEQ ID NO. 1 のアミノ酸配列の 230-237 の位置のアミノ酸配列、
(iii) SEQ ID NO. 1 のアミノ酸配列の 102 の位置のヒスチジン、105 の位置のアスパラギン酸、340 の位置のアスパラギン酸、及び 235 の位置のリジン、並びに

(iv) SEQ ID NO. 1 のアミノ酸配列の 233 の位置のグルタミンを有するアミノ酸配列を含むキシロース異性化酵素をコードするヌクレオチド配列を含む核酸構築物で形質転換した真菌宿主細胞であって、

該形質転換で、該核酸構築物により、キシロースを炭素源として利用する能力を付与された、真菌宿主細胞。

【請求項 2】

前記宿主細胞が、Saccharomyces, Kluyveromyces, Can

didia, *Pichia*, *Schizosaccharmyces*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Schwanniomyces*, 及び *Yarrowia* 属の何れか一つに属する酵母である、請求項 1 に記載の形質転換宿主細胞。

【請求項 3】

前記酵母が、*S. cerevisiae*, *S. bulderi*, *S. barnettii*, *S. exiguus*, *S. uvarum*, *S. diastaticus*, *K. lactis*, *K. marxianus*, 及び *K. fragilis* 種の何れか一つに属する、請求項 2 に記載の形質転換宿主細胞。

【請求項 4】

前記宿主細胞が、*Aspergillus*, *Trichoderma*, *Humicola*, *Acremonium*, *Fusarium*, 及び *Penicillium* 属の何れか一つに属する糸状菌である、請求項 1 に記載の形質転換宿主細胞。

10

【請求項 5】

キシロースをキシルロースに異性化する能力を宿主細胞に付与するために、キシロース異性化酵素をコードする前記ヌクレオチド配列を、前記宿主細胞中で該キシロース異性化酵素を十分に発現させるプロモーターに作動的に連結している、請求項 1 から 4 の何れか 1 項に記載の形質転換宿主細胞。

【請求項 6】

前記宿主細胞中で、該プロモーターがカタボライト抑制に非感受性である、請求項 5 に記載の形質転換宿主細胞。

20

【請求項 7】

前記宿主細胞が

- (a) 該宿主細胞中へのキシロース輸送の増加；
- (b) キシルロースキナーゼ活性の増加；
- (c) ペントースリン酸経路の流量の増加；
- (d) カタボライト抑制に対する感受性の減少；
- (e) エタノール、浸透圧または有機酸に対する耐性の増加；及び
- (f) 副産物生産の減少、

からなる群から選択された特徴を生じる遺伝子修飾を含む、請求項 1 から 6 の何れか 1 項に記載の形質転換宿主細胞。

30

【請求項 8】

前記遺伝子修飾が、内在性遺伝子の過剰発現、異種遺伝子の発現、またはそれらの組合せからなり、それらによって、該遺伝子が；ヘキソースまたはペントーストランスポーター、キシルロースキナーゼ；ペントースリン酸経路系酵素、解糖系酵素、及びエタノール代謝酵素をコードする遺伝子からなる群から選択される、請求項 7 に記載の形質転換宿主細胞。

【請求項 9】

前記遺伝子修飾が内在性遺伝子の不活化からなり、それによって、該遺伝子がヘキソースキナーゼ遺伝子、*Saccharomyces* *MIG1* 及び *MIG2* 遺伝子、並びにそれらの遺伝子の塩基配列に対する相補配列を有するポリヌクレオチドとストリジェントな条件でハイブリダイズし、ヘキソキナーゼ、*MIG1* 又は *MIG2* 活性を有するタンパク質をコードする遺伝子ホモログからなる群から選択される、請求項 7 に記載の形質転換宿主細胞。

40

【請求項 10】

前記宿主細胞が、該宿主細胞に、乳酸、酢酸、コハク酸、アミノ酸、1, 3-プロパンジオール、エチレン、グリセロール、 β -ラクタム抗生物質及びセファロsporinを生産する能力を付与する一つまたはそれ以上の酵素を発現している、請求項 1 から 9 の何れか 1 項に記載の形質転換宿主細胞。

【請求項 11】

前記宿主細胞が、アルコール脱水素酵素活性を減少させる遺伝子修飾を含む、請求項 1

50

0に記載の形質転換宿主細胞。

【請求項 1 2】

(a) 請求項 1 から 9 の何れか一項に記載の形質転換真菌宿主細胞であって、アルコール発酵能力を有する細胞と共にキシロース資源を含有する培地を発酵することによって、該宿主細胞によってキシロースをエタノールに発酵させ、任意に

(b) エタノールを回収する、
ステップを含む、エタノールの生産プロセス。

【請求項 1 3】

前記培地がグルコース資源も含む、請求項 1 2 に記載のプロセス。

【請求項 1 4】

エタノールの容積生産性が、少なくとも $0.5 \text{ g} / \text{リットル} / \text{時間}$ である、請求項 1 2 又は 1 3 に記載のプロセス。

【請求項 1 5】

エタノール収率が少なくとも 50% である、請求項 1 2 から 1 4 の何れか 1 項に記載のプロセス。

【請求項 1 6】

(a) 請求項 1 0 又は 1 1 に記載の形質転換真菌宿主細胞と共にキシロース資源を含む培地を発酵することによって、該真菌宿主細胞によりキシロースを発酵産物に発酵させ、任意に

(b) 発酵産物を回収する、
ステップを含む、乳酸、酢酸、コハク酸、1, 3-プロパンジオール、エチレン、グリセロール、 β -ラクタム抗生物質及びセファロスポリンからなる群から選択される発酵産物を生産するプロセス。

【請求項 1 7】

該培地がグルコース資源も含む、請求項 1 6 に記載のプロセス。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、真核生物性キシロース異性化酵素をコードする核酸配列で形質転換した宿主細胞に関するものである。このキシロース異性化酵素は、宿主細胞で発現し、キシロースをキシロースに変換する能力を付与する。この宿主細胞は、ペントース含有培地の発酵によるエタノール及びその他の発酵産物の製造プロセスに使用される。さらに本発明は、真核生物性キシロース異性化酵素をコードする核酸配列に関するものである。

【背景技術】

【0002】

この数十年間における古典的化石燃料（石油燃料）の大量消費は、高レベルの汚染の原因となっている。さらに、世界中の石油埋蔵量は無限でないことが認識され、このような認識は、環境問題への関心の高まりと相俟って、 CO_2 排出の $60-90\%$ 減少を実現できるエタノールのような代替燃料の可能性を研究する新しい動きを生んだ。バイオマス由来のエタノールは、多数の種々の資源から得られるヘキソース糖の発酵により生産することができるが、にも拘らず工業的規模の生産または燃料アルコールに向けられる原料は、ショ糖及びトウモロコシデンプンである。これらの原料の欠点は高価なことである。

【0003】

燃料アルコールの生産拡大には、低コストの供給原料の使用を可能にすることが求められる。現在、植物バイオマスからは唯一リグノセルロース原料がかなり大量に使用可能であり、エタノール生産用の農産物を代替している。リグノセルロース原料の主な発酵可能な糖はグルコース及びキシロースであり、それぞれリグノセルロース中に約 40% 及び 25% 含有される。しかし、*Saccharomyces cerevisiae* のようなアルコール発酵ができる酵母のほとんどは、炭素源としてキシロースを使用できない。さらに、高収量及び高生産性でキシロースをエタノールに発酵できる微生物は知られていな

10

20

30

40

50

い。リグノセルロース加水分解産物からエタノールを商業的に生産することを可能にするには、これらの性質を持つ微生物が求められるであろう。従って本発明の一つの目的は、アルコール発酵ができ、炭素源としてキシロースを利用できる酵母を提供することである。

【0004】

D-キシロースは、腸内細菌、一部の酵母及び真菌のような種々の微生物によって代謝される。大部分のキシロース利用細菌において、キシロースはキシロース（グルコース）異性化酵素（XI）により直接D-キシロースに異性化される。しかし、糸状菌及び酵母は、この一ステップの異性化を行うことができず、まずキシロース還元酵素（XR）の作用によりキシロースをキシリトールに還元し、次いでキシリトール脱水素酵素（XDH）によりキシリトールをキシロースに変換する。最初のステップは補因子としてNAD（P）Hを必要とし、第二ステップはNAD⁺を必要とする。生成したキシロースは、その後、キシロースキナーゼ（XK）によりリン酸化された後にペントースリン酸経路（PPP）に入る。厳密なNADPH依存性のキシロース還元酵素（XR）を持つ微生物では、キシロースからエタノールへの嫌気性発酵は不可能である。キシリトール脱水素酵素（XDH）は厳密にNAD⁺に依存しているので、酸化還元不均衡（すなわち、NAD⁺欠乏）を生じるからである。嫌気性条件においてこの酸化還元不均衡を解決するために、微生物はグリセロール及びキシリトールのような副産物を生産する。同様に、キシロースに対するβ-ラクタムの嫌気的な生産も、グルコースに対するβ-ラクタム生産に比較すると生じにくい。これらの低収量の原因は、グルコースを利用する場合に比較して、この経路においてはNADPHの形の還元体を比較的高度に必要とすることにあるように思われる（W.M.van Gulik et al., Biotechnol Bioeng. Vol.68, No.6, June 20, 2000）。

【0005】

Zaldivar et al. (2001, Appl. Microbiol. Biotechnol. 56; 17-34) に総説されているように、S. cerevisiae及び類似の酵母にキシロース代謝を導入する多くの試みが行われてきた。一つの方法は、少なくとも、キシロース（アルドース）還元酵素及びキシリトール脱水素酵素、すなわちPichia stipitisのXYL1及びXYL2、をコードする遺伝子をS. cerevisiaeに発現させることに関する（US 5, 866, 382; WO 95/13362; 及びWO 97/42307）。この方法は、キシロースに対してS. cerevisiaeの増殖を可能にしたが、主にXR及びXDHの間の酸化還元不均衡の結果として、一般的にエタノール生産性及び／または収量が低く、キシリトールの生産が多いという欠点がある。

【0006】

S. cerevisiae若しくは関連酵母または糸状菌にXIを発現させることにより、酸化還元不均衡及びその結果としてのキシリトール生産と分泌を回避することができるであろう。数種の細菌のキシロース異性化酵素遺伝子がS. cerevisiaeに挿入されたが、S. cerevisiaeにおいて中等温度好性原核生物のXIを発現させても、活性のあるXIを生じなかった（Amore and Hollenverg, 1989, Nucleic Acids Res. 17:7515; Amore et al., 1989, Appl. Microbiol. Biotechnol. 30:351-357; Chan et al., 1986, Biotechnol. Lett 8:231-234; Chan et al., 1989, Appl. Microbiol. Biotechnol. 31:524-528; Ho et al., 1983, Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 42: 2167; Hollenberg, 1987, EBC Symposium on Brewer's Yeast, Helsinki (Finland), 24-25 Nov 1986; Sarthy et al., 1987, Appl. Environ. Microbiol. 53:1996-2000; Ueng et al., 1985, Biotechnol. Lett. 7: 153-158)。しかし、S. cerevisiaeに発現させた好熱性細菌の二種のXIは85℃において1 μmol/min/mgの比活性を示した（Bao et al., 1999, Weishengwu-Xuebao 39:49-54; Walfridson et al., 1996, Appl. Environ. Microbiol. 61:4184-4190）。しかし、S. cerevisiaeの生理的温度（20-35℃）では、この活性のわずか数%しか維持できず、キシロースから有効にアルコールを発酵するには不十分であった。従って、生理的条件下において十分なXI活性を提供して、炭素源としてキシロースを利用することを可能とするように、酵母で発現すること

ができる X I をコードする核酸に対する要求は依然として存在する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

[発明の説明]

(定義)

キシロース異性化酵素

本明細書において、酵素「キシロース異性化酵素」(EC 5. 3. 1. 5)は、D-キシロースのD-キシロースへの直接の異性化、及びその逆の直接の異性化を触媒する酵素として定義される。この酵素はまた、D-キシロースケト異性化酵素としても知られている。一部のキシロース異性化酵素は、D-グルコース及びD-フルクトースの間の変換を触媒することもできるので、時にはグルコース異性化酵素とも呼ばれる。キシロース異性化酵素は補因子としてマグネシウムを必要とする。本発明のキシロース異性化酵素はさらに後述するアミノ酸配列によって定義される。同様に、キシロース異性化酵素はこの酵素をコードするヌクレオチド配列並びに後述されるキシロース異性化酵素をコードする対照ヌクレオチド配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列によって定義することができる。

【0008】

本明細書において、キシロース異性化酵素活性の単位(U)は、50 mMリン酸緩衝液(pH 7. 0)、10 mMキシロース及び10 mM MgCl₂を含む反応混合物中、37°Cで、1分間に1 nmolのキシロースを生産する酵素の量として定義される。生成したキシロースは、Dische and Borenfreund (1951, J. Biol. Chem. 192:583-587)の方法または実施例に記述したHPLCにより測定した。

【0009】

配列の同一性及び類似性

本明細書において配列同一性(sequence identity)とは、配列比較により決定される、二以上のアミノ酸(ポリペプチドまたはタンパク)配列または二以上の核酸(ポリヌクレオチド)配列の関係として定義される。この分野で、「同一性」は、場合によって、アミノ酸配列又は核酸配列の配列間の一致により決定される、アミノ酸または核酸配列間の配列関連性(sequence relatedness)の程度も意味している。二つのアミノ酸配列の「類似性(similarity)」は、あるポリペプチドの他のポリペプチドに対する、アミノ酸配列及び保守的置換アミノ酸を比較して決定される。「同一性」及び「類似性」は、限定はしないが以下に記述されている方法を含む既知方法により容易に計算することができる(Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heine, g., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; and Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073(1988)。

【0010】

同一性を決める望ましい方法は、試験する配列間に最大の一致が得られるように設計される。同一性及び類似性を決定する方法は、一般に使用可能なコンピュータプログラムとして作成される。二つの配列間の同一性及び類似性を決定するための望ましいコンピュータプログラム方法には、GCGプログラムパッケージ(Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12(1):387(1984))、BestFit, BLASTP, BLASTN, 及びFASTA(Altschul, S. F. et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990))が含まれる。BLAST XプログラムはNCBI及びその他のサイトから誰でも入手できる(BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990))。よく知られたSmith-Watermanアルゴリズムも同一性決

定に使用することができる。

【0011】

ポリペプチド配列比較のための望ましいパラメーターには以下のアルゴリズムが含まれる：Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443-453 (1970); Comparison matrix: BLOSSUM62 from Hentikoff and Hentikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919 (1992); Gap Penalty: 12; 及び Gap Length Penalty: 4。これらのパラメーターを使用する有用なプログラムは Madison, WI にある Genetics Computer Group の「Ogap」プログラムとして一般に入手することができる。既述のパラメーターはアミノ酸比較（エンドギャップに対するペナルティーなし）のためのデフォルトパラメーターである。

10

【0012】

核酸比較のための望ましいパラメーターは以下のアルゴリズムを含む：アルゴリズム：Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443-453 (1970); Comparison matrix: 一致 = +10、不一致 = 0; Gap Penalty: 50; Gap Length Penalty: 3。Genetics Computer Group, Madison, WI の Gap プログラムとして入手できる。上記に示したものは核酸比較のためのデフォルトパラメーターである。任意に、アミノ酸類似性の程度を決定する際に、いわゆる「保存的」アミノ酸置換を考慮に入れることもでき、このことは、当業者には明らかである。保存的アミノ酸置換とは類似の側鎖を持つ残基の互換性のことである。例えば、脂肪族側鎖をもつアミノ酸の群はグリシン、アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシン；ヒドロキシ脂肪族側鎖を持つアミノ酸の群はセリン及びトレオニン；アミノ基を含む側鎖を持つアミノ酸の群はアスパラギン及びグルタミン；芳香族側鎖を持つアミノ酸の群はフェニルアラニン、チロシン、及びトリプトファン；塩基性側鎖を持つアミノ酸の群はリシン、アルギニン、及びヒスチジン；硫黄を含む側鎖を持つアミノ酸の群はシステイン及びメチオニンである。望ましい保存的アミノ酸置換群は：バリンーロイシンーイソロイシン、フェニルアラニンーチロシン、リシンーアルギニン、アラニンーバリン、及びアスパラギンーグルタミンである。本明細書において開示したアミノ酸配列の置換変異体は、開示配列中の少なくとも一つの残基が除去され、その場所に異なる残基が挿入されたものである。望ましくはアミノ酸の変換は保存的である。天然に存在するアミノ酸の望ましい保存置換は以下のようなものである：アラニンからセリンへ；アルギニンからリシンへ；アスパラギンからグルタミンまたはヒスチジン；アスパラギン酸からグルタミン酸へ；システインからセリンまたはアラニンへ；グルタミンからアスパラギンへ；グルタミン酸からアスパラギン酸へ；ヒスチジンからアスパラギンまたはグルタミンへ；イソロイシンからロイシンまたはバリンへ；ロイシンからイソロイシンまたはバリンへ；リシンからアルギニン；グルタミンまたはグルタミン酸；メチオニンからロイシンまたはイソロイシン；フェニルアラニンからメチオニン、ロイシンまたはチロシンへ；セリンからトレオニンへ；トレオニンからセリンへ；トリプトファンからチロシンへ；チロシンからトリプトファンまたはフェニルアラニンへ；及びバリンからイソロイシンまたはロイシン。

20

30

【0013】

核酸配列のハイブリッド形成

40

本発明のキシロース異性化酵素またはキシロースキナーゼをコードする核酸配列は、中等度のまたは望ましくは厳密なハイブリッド形成条件下に、SEQ ID NO. 2 または SEQ ID NO. 4 のヌクレオチド配列それぞれとハイブリッド形成する能力によって規定することもできる。厳密なハイブリッド形成条件とは、少なくとも約 25、望ましくは約 50 ヌクレオチド、75 または 100 及び最も望ましくは約 200 またはそれ以上のヌクレオチドの核酸配列を、約 65℃ の温度において、1 M の塩、望ましくは 6 x SSC または同等のイオン強度を持つその他の溶液中でハイブリッド形成させることができ、そして 0.1 M の塩、またはそれ以下、望ましくは 0.2 x SSC または同等のイオン強度を持つその他の溶液中で 65℃ において洗浄する条件とここでは定義する。望ましくは、ハイブリッド形成は終夜、すなわち少なくとも 10 時間行い、望ましくは、洗浄は

50

洗浄液を少なくとも2回交換して少なくとも1時間行う。この条件により、通常約90%またはそれ以上の配列同一性を持つ配列との特異的ハイブリッド形成が可能であろう。

【0014】

中等度の条件とは、少なくとも50ヌクレオチド、望ましくは約200またはそれ以上のヌクレオチドの配列を、約1M塩を含む溶液、望ましくは6xSSCまたは同等のイオン強度のその他の溶液の中で約45℃の温度においてハイブリッド形成させ、そして約1M塩を含む溶液、望ましくは6xSSCまたは相当するイオン強度のその他の溶液の中で室温において洗浄する条件とここでは定義する。望ましくは、ハイブリッド形成は終夜、すなわち少なくとも10時間行い、望ましくは、洗浄は洗浄液を少なくとも2回交換して少なくとも1時間行う。この条件により、通常約50%までの配列同一性を持つ配列との特異的ハイブリッド形成が可能であろう。当業者は、50%及び90%の間の同一性をもつ配列を特異的に同定するためにこれらのハイブリッド形成条件を変更できるであろう。

10

【0015】

作動的連結

本明細書で使用される「作動的に連結した」とは、機能的に関連するポリヌクレオチド配列の連結のことである。他の核酸配列との機能的な関連を持って配置されている場合に、核酸は「作動的に連結している」。例えば、プロモーターまたはエンハンサーは、それがコード配列の転写に影響するならば、コード配列と作動的に連結している。作動的に連結したとは、典型的には、連結したDNA配列同士が隣接しており、二個のタンパクコード領域を結合する必要がある場合には、連続し、読み枠内にあることを意味する。

20

【0016】

プロモーター

本明細書で使用される「プロモーター」とは、転写の方向の点で遺伝子の転写開始部位の上流に存在する1またはそれ以上の遺伝子の転写を調節する機能を持つ核酸フラグメントであって、DNA依存RNAポリメラーゼ、転写開始部位、及び限定はしないが、転写因子結合部位、リプレッサー及び活性化タンパク結合部位を含むその他のDNA配列、並びにプロモーターの転写の量を直接的若しくは間接的に調節することが当業者には既知のその他のヌクレオチドの配列によって構造的に同定される。「構成的」プロモーターはほとんどの環境及び発生条件において活性であるプロモーターである。「誘導的」プロモーターは環境及び発生が調節されたときに活性となるプロモーターである。

30

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】炭素源として25mMガラクトース及び100mMキシロースを含む培地で増殖した形質転換*S. cerevisiae*の増殖曲線。形質転換体pY_{es}は挿入のない酵母発現ベクターを含む。形質転換体14.3, 16.2.1及び16.2.2は*Pirromyces* sp. E2キシロース異性化酵素コード配列を含むpY_{ES}ベクターで形質転換されている。

【発明を実施するための形態】

【0018】

[発明の詳細な説明]

40

本発明の最初の態様は、キシロースからキシロースへ異性化する能力を持つ形質転換宿主細胞に関するものである。キシロースからキシロースへ異性化する能力は、キシロース異性化酵素をコードする核酸配列を含む核酸構築物で宿主細胞を形質転換することにより付与される。キシロースからキシロースへ異性化する形質転換宿主細胞の能力は、キシロースからキシロースへの直接の異性化である。これは、それぞれキシロース還元酵素およびキシリトール脱水素酵素に触媒されてキシリトール中間体を経由してキシロースからキシロースへ変換する2ステップ反応に対して、キシロース異性化酵素により触媒される1ステップ反応によりキシロースがキシロースへ異性化したことを意味すると理解される。

【0019】

50

核酸配列は、形質転換宿主細胞中で活性形態で発現するキシロース異性化酵素をコードすることが望ましい。従って、宿主細胞中で核酸配列が発現することにより、25℃でタンパクmg当たり少なくとも10Uのキシロース異性化酵素比活性、望ましくは25℃で少なくとも20, 25, 30, 50, 100, 200または300U/mg、の比活性を持つキシロース異性化酵素が生産される。本明細書において、形質転換宿主細胞中で発現したキシロース異性化酵素の比活性は、宿主細胞の細胞分解物、例えば、酵母細胞分解物のタンパクmg当りのキシロース異性化酵素活性の量と定義される。キシロース異性化酵素活性の測定、タンパク量、及び細胞分解物の調製については実施例1に記述されている。また、比活性は、実施例4に示すように測定することもできる。従って、宿主細胞中にヌクレオチド配列を発現させることにより、30℃で少なくとも50U/mgタンパクのキシロース異性化酵素活性、望ましくは30℃で少なくとも100, 200, 500または750U/mgの比活性を持つキシロース異性化酵素が生成される。

10

【0020】

望ましくは、宿主細胞中にヌクレオチド配列を発現することにより、キシロースに対する K_m が50, 40, 30または25未満のキシロース異性化酵素が得られ、より望ましくは、キシロースに対する K_m が約20mMまたはそれ未満である。

【0021】

キシロース異性化酵素をコードするヌクレオチド配列は、

(a) SEQ ID NO. 1のアミノ酸配列と少なくとも40, 45, 49, 50, 53, 55, 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98, または99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；

20

(b) SEQ ID NO. 2のヌクレオチド配列と少なくとも40, 50, 55, 56, 57, 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98, または99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列；

(c) その相補鎖が、(a)または(b)の核酸分子配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列；

(d) 遺伝子コードの縮重による、(c)の核酸分子の配列と異なる配列からなるヌクレオチド配列；

からなる群から選択することができる。

【0022】

30

ヌクレオチド配列は、真核生物性キシロース異性化酵素、すなわち真核生物中に天然に存在するキシロース異性化酵素と同じアミノ酸配列を持つキシロース異性化酵素をコードしていることが望ましい。中等温度好性原核性キシロース異性化酵素に比べ、真核生物性キシロース異性化酵素の発現は、酵母のような真核性宿主細胞においてキシロース異性化酵素が活性形態で発現する可能性を高める。ヌクレオチド配列が植物キシロース異性化酵素（例えば、*Hordeum vulgare*由来）または菌（fungal）キシロース異性化酵素（例えば、*Basidiomycetes*由来）をコードするのがより望ましい。但し、真核生物性宿主細胞、特に酵母において酵素的に活性形態で発現する可能性をさらに増加させるためには、ヌクレオチド配列が嫌気性菌のキシロース異性化酵素をコードすることが最も望ましい。*Neocallimastix*, *Caecomyces*, *Piromyces*, *Orpinomyces*, または*Ruminomyces*科に属する嫌気性菌のキシロース異性化酵素をコードするヌクレオチド配列が最も望ましい。

40

【0023】

キシロース異性化酵素をコードするヌクレオチド配列で形質転換するための宿主細胞は、細胞の中へ能動的にまたは受動的にキシロースを輸送できる宿主であることが望ましい。宿主細胞は、活性な解糖経路、ペントースリン酸経路を含有していることが望ましく、キシロースから異性化されたキシロースがピルビン酸に代謝されるようにキシロースキナーゼを含有していることが望ましい。さらに宿主はピルビン酸を目的とする発酵産物、例えばエタノール、エチレンまたは乳酸に変換するための酵素を含有することが望ましい。望ましい宿主細胞は、天然においてアルコール発酵、望ましくは嫌気性アルコール発

50

酵ができる宿主細胞である。さらに宿主細胞はエタノール及び乳酸、酢酸、ギ酸のような有機酸、及びフルフラール及びヒドロキシメチルフルフラールのような糖分解産物に対して高度な耐性を持っていることが望ましい。宿主細胞のこれらの特性または活性は天然に宿主細胞中に存在することもあるが、遺伝子操作により導入または修飾することができる。適する宿主細胞は細菌または真菌のような微生物であるが、宿主として最も適当なのは酵母または糸状菌である。

【0024】

本明細書において酵母は、真核性微生物として定義され、主として単細胞の形で増殖する *Eumycotina* 亜門の全種 (Alexopoulos, C.J., 1962, In: Introductory Mycology, John Wiley & Sons, Inc., New York) を含む。酵母は単細胞葉状体の発芽によっても、また生物体の分裂によっても増殖することができる。宿主細胞として望ましい酵母は、*Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Schwanniomyces*, 及び *Yarrowia* 種に属する。酵母は、嫌気性発酵、より望ましくは嫌気性アルコール発酵ができるものが望ましい。

【0025】

本明細書において糸状菌は、*Eumycotina* 亜門の全ての糸状形態を含む真核性微生物として定義される。これらの菌は、キチン、セルロース、及びその他の複合多糖からなる栄養菌糸体によって特徴付けられる。本発明の糸状菌は、形態的、生理的、及び遺伝的に、酵母とは区別される。糸状菌による栄養増殖は菌糸の延長によるものであり、ほとんどの糸状菌の炭素異化は、絶対的好気性による。宿主細胞として望ましい糸状菌は *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Humicola*, *Acremonium*, *Fusarium*, 及び *Penicillium* 種に属するものである。

【0026】

数年にわたって、農産糖からバイオエタノールを生産するために、種々の生物体の導入が提案されてきた。しかしながら、実用的な主なバイオエタノール生産プロセスの全てにおいて、エタノール生産体として *Saccharomyces* 種の酵母を使用し続けてきた。これは工業的プロセスに対する *Saccharomyces* 種の多くの魅力的な特徴、すなわち、高濃度の酸、エタノール及び浸透圧に対する耐性、嫌氣的増殖能力、及び当然ではあるが高いアルコール発酵能力に基づくものである。宿主細胞として望ましい酵母の種は、*S. cerevisiae*, *S. bulderi*, *S. barnettii*, *S. exiguus*, *S. uvarum*, *S. diastaticus*, *K. lactis*, *K. marxianus*, *K. fragilis* を含む。

【0027】

宿主細胞は後に定義する核酸構築物で形質転換され、核酸構築物の一つのコピーを含むものでもよいが、複数のコピーを含むものが望ましい。この核酸構築物はエピソームとして維持され、ARS 配列のような自律的複製のための配列を含む。適するエピソーム性核酸構築物は、例えば、酵母 2 μ または pKD1 (Fleer et al., 1991, Biotechnology 9: 968-975) プラスミドに基づくことができる。しかし、核酸構築物は、宿主細胞のゲノム中に1以上のコピーが組み込まれていることが望ましい。宿主細胞ゲノムへの組み込みは、変則的な組換えによりランダムに生じることがありうるが、菌分子遺伝学の分野でよく知られている相同組換えにより核酸構築物を宿主細胞ゲノムへ組み込むことが望ましい (例えば、WO 90/14423, EP-A-0 481 008, EP-A-0 635 574 及び US 6, 265, 186 参照)。

【0028】

本発明による望ましい形質転換宿主細胞において、核酸構築物は、宿主細胞に、炭素源として、望ましくは唯一の炭素源としてのキシロースに対して、望ましくは嫌氣的条件下で増殖する能力を付与する。それにより形質転換宿主は、好ましくはキシリトールを本質的に生産せず、例えば、当該宿主によって生産されるキシリトールは、検出限界以下、またはモルベースで消費した炭素の5, 2, 1%未満である。その形質転換宿主細胞は、唯

一の炭素源としてのキシロースに対して少なくとも0.01, 0.02, 0.05, 0.1または0.2 h⁻¹の速度で増殖する能力を有する。このように本発明の形質転換宿主細胞は、既に定義した比活性レベルでキシロース異性化酵素を発現する。

【0029】

宿主細胞は、(a) 宿主細胞中へのキシロース輸送の増加；(b) キシルロースキナーゼ活性の増加；(c) ペントースリン酸経路の流量の増加；(d) カタボライト抑制に対する感受性の減少；(e) エタノール、浸透圧または有機酸に対する耐性の増加；及び(f) 副生物生産の減少、からなる群から選択された特徴の一つまたはそれ以上を生じる遺伝子修飾をさらに含むことができる。副生物は目的とする発酵産物以外の炭素含有分子を意味すると理解され、例えば、キシリトール、グリセロール及び／または酢酸が含まれる。そのような遺伝子修飾は、古典的突然変異誘起及びスクリーニング及び／または目的変異体の選別により導入することができる。その他に、遺伝子修飾は、外来性遺伝子の過剰発現及び／または異種遺伝子の発現及び／または内在性遺伝子の不活化を含むことができる。これらの遺伝子は、ヘキソースまたはペントーストランスポーター；*S. cerevisiae* (XKSI Deng and Ho, 1990, Appl. Biochem. Biotechnol. 24-25: 193-199) または *Piromyces* (xylB, すなわち SEQ ID NO. 4) のキシルロースキナーゼのようなキシルロースキナーゼ；トランスアルドラーゼ (TAL1) またはトランスケトラーゼ (TKL1) のようなペントースリン酸経路の酵素（例えば、Meinander et al., 1995, Pharmacol. Toxicol. Suppl. 2: 45 参照）、解糖酵素、アルコール脱水素酵素のようなアルコール代謝酵素、をコードする遺伝子から選択されることが望ましい。不活化される望ましい内在性遺伝子としては、例えば、*S. cerevisiae* HXK2 遺伝子 (Diderich et al., 2001, Appl. Environ. Microbiol. 67: 1587-1593参照) のようなヘキソースキナーゼ；*S. cerevisiae* MIG1 または MIG2 遺伝子；*S. cerevisiae* GRE3 遺伝子 (Traff et al., 2001, Appl. Environ. Microbiol. 67: 5668-5674) のような（非特異的）アルドース還元酵素遺伝子；*S. cerevisiae* グリセロールリン酸脱水素酵素1 及び／または2 遺伝子のようなグリセロール代謝に関係する酵素の遺伝子；またはその他の宿主の種の遺伝子の（ハイブリッド形成）相同体、が含まれる。宿主細胞のキシロース代謝に関するその他の望ましい修飾については Zaldivar et al. (2001, 前出) に総説されている。

【0030】

その他の態様において、本発明は、エタノール以外の発酵産物を生産するための形質転換宿主細胞に関係している。その非エタノール発酵産物は原則として酵母または糸状菌のような真核性微生物によって生産することができる大量のまたは精製した化学品である。そのような発酵産物としては、例えば、乳酸、酢酸、コハク酸、アミノ酸、1, 3-プロパンジオール、エチレン、グリセロール、β-ラクタム抗生物質及びセファロスポリンがある。

【0031】

本発明の核酸構築物による宿主細胞の形質転換及び宿主細胞、望ましくは酵母の前記のようなその他の遺伝子修飾は当業者によく知られている方法により行われる。その方法は例えば標準的教科書から知ることができる、例えば、Sambrook and Russel (2001) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd edition)", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, または F. Ausubel et al, eds., "Current protocols in molecular biology", Green Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)。菌宿主細胞の形質転換及び遺伝子修飾の方法は、例えば、EP-A-0 635 574, WO 98/46772, WO 99/60102 及び WO 00/37671 から知ることができる。

【0032】

その他の態様において、本発明は、前記で定義したキシロース異性化酵素をコードし、前記の宿主細胞の形質転換に使用されるヌクレオチド配列からなる核酸構築物に関する。

核酸構築物において、キシロース異性化酵素をコードするヌクレオチド配列は、後述するように宿主細胞中でヌクレオチド配列の転写を調節し開始するためのプロモーターに作動的に連結していることが望ましい。このプロモーターは、宿主細胞にキシロースをキシロースに異性化する能力を付与するために、宿主細胞中でキシロース異性化酵素を十分に発現できることが望ましい。プロモーターは、前記のような宿主細胞中で、特異的キシロース異性化酵素を生じさせるものが望ましい。本発明の核酸構築物中において有用なプロモーターは、構成的及び誘導的な天然プロモーター並びに人工的プロモーターである。さらに本発明に使用するための望ましいプロモーターは、カタボライト（グルコース）抑制に感受性がなくそして／または誘導のためのキシロースを必要としないものが望ましいであろう。このような特徴を持つプロモーターは、広く入手可能であり、同業者には知られている。そのようなプロモーターの適当な例は、例えば、酵母のリン酸フルクトキナーゼ（P P K）、トリオースリン酸異性化酵素（T P I）、グリセロアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素（G P D, T D H 3またはG A P D H）、ピルビン酸キナーゼ（P Y K）、ホスホグリンセリン酸キナーゼ（P G K）プロモーターのような解糖遺伝子の酵母プロモーターである。そのようなプロモーターに関する詳細は（W O 9 3 / 0 3 1 5 9）に見ることができる。その他の有用なプロモーターは、リボソームタンパクコード遺伝子プロモーター、ラクターゼ遺伝子プロモーター（L A C 4）、アルコール脱水素酵素プロモーター（A D H 1, A D H 4, など）、及びエノラーゼプロモーター（E N O）である。その他の、構成的及び誘導的プロモーター及びエンハンサーまたは上流活性化配列は当業者に知られているであろう。本発明の核酸構築物に使用されるプロモーターは、必要に応じて、修飾して、その調節特徴を変更することができる。キシロース異性化酵素を発現させるために核酸構築物に使用されるプロモーターは、キシロース異性化酵素を発現させる宿主細胞と同種であることが望ましい。

【0033】

核酸構築物において、キシロース異性化酵素をコードするヌクレオチド配列の3'-末端は、転写ターミネーター配列に作動的に連結していることが望ましい。このターミネーター配列は、選択した宿主細胞、例えば選択した酵母種において作動し得ることが望ましい。いずれの場合にも、ターミネーターの選択は重要ではなく、ターミネーターは酵母ではない真核生物の遺伝子の場合にしばしば作動するが、酵母遺伝子由来のものを用いることができる。転写終結配列はさらにポリアデニル化シグナルを含むことが望ましい。

【0034】

任意に、核酸構築物中に選択マーカーを入れることができる。本明細書で使用する用語「マーカー」とは、マーカーを含有する宿主細胞を、選別、またはスクリーニングすることができる特徴または表現型をコードする遺伝子のことである。マーカー遺伝子は、抗生物質耐性遺伝子とすることができ、それによって形質転換されていない細胞の中から形質転換された細胞を選別するために適当な抗生物質を使用することができる。適当な抗生物質耐性マーカーの例としては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素、ヒグロマイシン-B-ホスホトランスフェラーゼ、3'-O-ホスホトランスフェラーゼ I I（カナマイシン、ネオマイシン及びG 4 1 8耐性）が含まれる。抗生物質耐性マーカーは、倍数体宿主細胞の形質転換には最も便利であるが、しかし栄養要求性マーカー（U R A 3, T R P 1, L E U 2）またはS. p o m b e T P I 遺伝子（R u s s e l l P R, 1 9 8 5, G e n e 4 0 : 1 2 5 - 1 3 0に記載）のような非抗生物質耐性マーカーが使用されることが望ましい。望ましい態様において、核酸構築物により形質転換された宿主細胞はマーカー遺伝子を含まない。マーカー遺伝子を含まない組換え微生物宿主細胞を作る方法はE P - A - 0 6 3 5 5 7 4に開示されており、A. n i d u l a n s a m d S（アセトアミダーゼ）遺伝子または酵母U R A 3及びL Y S 2遺伝子のような二方向性マーカーの使用に基づいている。そのほかには、形質転換細胞をスクリーニングできるように、緑色蛍光タンパク、l a c Z, ルシフェラーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、ベクターグルクロニダーゼのようなスクリーニングに役立つマーカーを本発明の核酸構築物の中に組み込むことができる。

【0035】

さらに任意に本発明の核酸構築物中に存在することができる配列としては、これらに限定はしないが、一つまたはそれ以上のリーダー配列、エンハンサー、組み込み因子、並びに／或いはレポーター遺伝子、イントロン配列、セントロメア、テロメア及び／またはマトリックス接着（MAR）配列がある。本発明の核酸構築物はさらに、ARS配列のような自己複製のための配列を含むことができる。適するエピソーム核酸構築物は、例えば、酵母2μまたはpKD1（Fleer et al., 1991, Biotechnology 9: 968-975）プラスミドを基にすることができる。その他に核酸構築物は、望ましくは相同組換えによる、組み込みのための配列を含むことができる。従ってその配列は、宿主細胞のゲノム中の組み込みの標的部位に対して相同的な配列である。本発明の核酸構築物は、本来既知方法により提供することができ、その方法には核酸／核酸配列を制限及び連結するような技術を含み、その参考文献は例えば、Sambrook and Russel (2001) “Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, またはF. Ausubel et al., eds., “Current protocols in molecular biology”, Green Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)のような標準的教科書に示されている。

10

【0036】

そのほかの態様において、本発明はキシロース異性化酵素をコードするヌクレオチドを含む核酸分子に関する。この核酸分子は、

(a) SEQ ID NO. 1のアミノ酸配列と少なくとも50, 53, 54, 55, 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98, または99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子；

20

(b) SEQ ID NO. 2のヌクレオチド配列と少なくとも50, 56, 57, 58, 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98, または99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む核酸分子；

(c) その相補鎖が、(a) または (b) の核酸分子配列にハイブリダイズする核酸分子；及び

(d) 遺伝子コードの縮重により (c) の核酸分子配列と異なる配列からなる核酸分子；からなる群から選択されることが望ましい。

【0037】

30

また、(a) の核酸分子は、SEQ ID NO. 1のアミノ酸配列と少なくとも67, 68, 69, 70, 80, 90, 95, 97, 98, または99%の配列類似性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードすることができる。(c) の核酸分子は望ましくは前記に定義した中等度の条件、より望ましくは厳密な条件の下にハイブリッド形成する。核酸分子は真核生物由来であることが望ましく、菌のような真核微生物由来であることがより望ましく、前記の嫌気性菌のような嫌気性菌由来であることが最も望ましい。

【0038】

本発明の更に他の態様は、キシロースキナーゼ、望ましくはD-キシロースキナーゼをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子に関するものである。本明細書において、D-キシロースキナーゼ（EC 2. 7. 1. 17；D-キシロキナーゼとも呼ばれる）は、D-キシロースのキシロース-5-リン酸への変換を触媒する酵素である。この核酸分子は、

40

(a) SEQ ID NO. 3のアミノ酸配列と少なくとも45, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98, または99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子；

(b) SEQ ID NO. 4のヌクレオチド配列と少なくとも30, 37, 38, 39, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98, または99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列からなる核酸分子；

(c) その相補鎖が、(a) または (b) の核酸分子配列にハイブリダイズする核酸分子；及び

50

(d) 遺伝子コードの縮重による、(c)の核酸分子配列と異なる配列からなる核酸分子：
からなる群から選択されることが望ましい。

【0039】

また、(a)の核酸分子は、SEQ ID NO. 3のアミノ酸配列と少なくとも64, 65, 66, 70, 80, 90, 95, 97, 98, または99%の配列類似性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードすることができる。(c)の核酸分子は望ましくは前記で定義した中等度の条件、より望ましくは厳密な条件の下にハイブリッド形成する。核酸分子は、真核生物由来であることが望ましく、菌のような真核微生物由来であることがより望ましく、前記の嫌気性菌のような嫌気性菌由来であることが最も望ましい。

10

【0040】

そのほかの態様において、本発明は、本発明の形質転換宿主細胞がキシロースのようなキシロース資源を含む炭素源の発酵のために使用される、発酵プロセスに関するものである。発酵培地中の炭素源は、キシロース資源に加えてグルコース資源も含むことができる。キシロースまたはグルコースの資源としては、キシロースまたはグルコースそのものでもよく、例えば、リグノセルロース、キシラン、セルロース、デンプンなどのようなキシロースまたはグルコース単位からなる炭水化物のオリゴマーまたはポリマーでもよい。そのような炭水化物からキシロースまたはグルコース単位を遊離させるために(キシラーゼ、グルカナーゼ、アミラーゼなどのような)、適当な炭水化物分解酵素を、発酵培地に加えてもよく、形質転換宿主細胞に生産させてもよい。後者の場合には、形質転換宿主細胞に遺伝子操作を施し、その炭水化物分解酵素を生産させ、分泌させることができる。望ましいプロセスにおいて、形質転換宿主細胞は、キシロース及びグルコースを共に、望ましくは同時に発酵し、その場合にはグルコース抑制に非感受性の形質転換宿主細胞を使用してジオキシ増殖を阻害することが望ましい。炭素源としてのキシロース(及びグルコース)に加えて、発酵培地はさらに形質転換宿主細胞の増殖に必要な適当な成分を含むであろう。酵母などの微生物を増殖するための発酵培地の組成は、当業者にはよく知られている。

20

【0041】

発酵プロセスは、エタノール、乳酸、酢酸、コハク酸、アミノ酸、1, 3-プロパンジオール、エチレン、グリセロール、ペニシリンG若しくはペニシリンV及びそれらの発酵誘導体のようなβ-ラクタム並びにセファロsporinなどの発酵産物を生産するためのプロセスである。発酵プロセスは、好氣的または嫌氣的な発酵プロセスとすることができる。本明細書において嫌氣的発酵プロセスとは、発酵プロセスが無酸素の状態または実質的に酸素が消費されないで(例えば、5 mmol/L/h未満)で行われ、有機分子が、電子供与体及び電子受容体のいずれとしても働く発酵プロセスと定義される。酸素が存在しないところでは、糖分解及びバイオマス形成において生成したNADHは、酸化リン酸化により酸化することはできない。この問題を解決するために多くの微生物は電子及び水素受容体としてピルビン酸またはその誘導体の一つを利用することによって、NAD⁺を再生する。従って、望ましい嫌氣的発酵プロセスにおいて、ピルビン酸は、電子(及び水素)受容体として使用され、エタノール、乳酸、1, 3-プロパンジオール、エチレン、酢酸またはコハク酸のような発酵産物へと還元される。

30

40

【0042】

発酵プロセスは、形質転換宿主細胞にとって最適の温度で行うことが望ましい。従って、ほとんどの酵母または菌の宿主細胞に対して、発酵プロセスは38℃未満の温度で実施される。酵母または糸状菌の宿主細胞に対して、発酵プロセスは35, 33, 30または28℃未満、且つ20, 22, または25℃を超える温度で実施されることが望ましい。

【0043】

望ましいプロセスは、(a)前記に定義した形質転換宿主細胞と共にキシロース資源を含む培地を発酵することによって、宿主細胞にキシロースをエタノールに発酵させ；任意

50

に、(b) エタノールを回収するステップを含むエタノールの生産プロセスである。発酵培地は、グルコース資源を含むことができ、それもエタノールに発酵される。このプロセスにおいて、エタノールの容積生産性は、少なくとも0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 5.0または10.0 g エタノール/リットル/時間であることが望ましい。このプロセスにおけるキシロース及び/またはグルコースに対するエタノール収率は、少なくとも50, 60, 70, 90, 95または98%であることが望ましい。本明細書においてエタノール収率は、理論的収量(グルコース及びキシロースについて0.51 g エタノール/g グルコースまたはキシロース)のパーセンテージとして定義する。

【0044】

その他の態様において、本発明は、乳酸、酢酸、コハク酸、アミノ酸、1, 3-プロパンジオール、エチレン、 β -ラクタム抗生物質およびセファロsporinからなる群から選択される発酵産物の生産プロセスに関する。このプロセスは、(a) 前記に定義した形質転換宿主細胞と共にキシロース資源を含む培地を発酵することにより、宿主細胞に、キシロールを発酵産物に発酵させ、任意に、(b) 発酵産物を回収する、ステップを含むことが望ましい。望ましいプロセスにおいて、培地はグルコース資源も含む。

【実施例】

【0045】

【実施例1】 P i r o m y c e s キシラナーゼ異性化酵素及びキシロースキナーゼ c D N A のクローニング

(生物及び増殖条件)

インド象の糞から単離した嫌気性菌 *P i r o m y c e s* sp. E2 (ATCC 76762) を、 N_2 / CO_2 (80%/20%) 中、39℃で、種々の炭素源を添加したM2培地で嫌気的に増殖した(24)。使用した炭素源は、アビセル(微結晶セルロース、タイプPH105、Serva, ドイツ)、フルクトースまたはキシロース(全て0.5%、w/v)であった。増殖が止まった後(水素の発生により判断した)、細胞を遠心分離(15,000 x g, 4℃, 15分間)またはナイロンガーゼ(30 μ m孔径)による濾過により回収した。

【0046】

(無細胞抽出物の調製)

菌細胞を脱イオン水で洗い、培地成分を除去した。細胞を液体窒素中で凍結し、次いで、乳鉢中で、硝子ビーズ(0.10-0.11mm径)ですりつぶして、無細胞抽出物を調製した。T r i s / H C l 緩衝液(100mM, pH7.0)を粉末に加え(1:1, w/v)そして15分間解凍した後、懸濁液を遠心分離した(18,000 x g, 4℃, 15分間)。透明な上清を細胞内酵素の原料として使用した。

【0047】

(酵素検定)

キシロース異性化酵素活性は、50mMリン酸緩衝液(pH7.0), 10mMキシロース, 10mM $MgCl_2$ 及び適当量の無細胞抽出物を含む反応混合物中37℃で検定した。生成したキシロースの量は、システイン-カルバゾール法(9)により測定した。キシロースキナーゼ及びキシロース還元酵素活性はW i t t e v e e n et al. (28) による記述にしたがって検定した。活性の1単位は、検定条件の下に、毎分1nmolのキシロースを生産する酵素量と定義される。生成したキシロースは、D i s c h e and B o r e n f r e u n d (Dische and Borenfreund, 1951, J. Biol. Chem. 192: 583-587)の方法によるか、または80℃のB i o r a d H P X - 87 Nカラムを使用し、溶出液として0.01M Na_2HPO_4 を使用して0.6ml/minで溶出するHPLCにより測定した。キシロース及びキシロースは、内部温度60℃で屈折計により測定した。

【0048】

比活性は、タンパク1mg当りの単位として示す。タンパクは、ウシ γ -グロブリンを標準としてB i o - R a d タンパク試薬(Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, 米国)で

10

20

30

40

50

測定した。

【0049】

(*Piromyces* sp. E2 cDNAライブラリーのランダム配列)

既に記述されている(2)ベクターラムダZAPII中に構築したcDNAライブラリーを使用した。このライブラリーの一部をExAssistヘルパーファージ(Stratagene, La Jolla, CA, 米国)による大量切除(mass excision)によりpBluescript SK-クローンに変換した。無作為に取り出したクローンをM13逆プライマーを使用して配列解析し、5'部分の配列を得た。不完全cDNAを使用してプローブを合成し、ライブラリーを再スクリーニングするために使用した。全長配列を得るためにpUC18にサブクローニングを生成させた。配列分析は、dRhodamineターミネーターサイクルシーケンス即時反応DNAシーケンスキット(Perkin-Elmer Applied Biosystems)を使用してABIプリズム310自動化シーケンサーで実施した。

10

【0050】

(結果)

嫌気性菌*Piromyces* sp. E2のcDNAライブラリーから無作為に選択したクローンを配列解析し、その結果キシロース異性化酵素及びD-キシロロキナーゼ遺伝子にそれぞれ高い相同性を示す二つのクローン(pH97及びpAK44)を得た。これらのクローンを詳細に解析した。

【0051】

クローンpH97は完全なORFを含有していなかったもので、クローンpH97の配列データに基づいて設計したプローブを使用してcDNAライブラリーを再度スクリーニングした。この結果1669bpの挿入配列を有するクローンpR3を得た。キシロース異性化酵素に高い類似性のある437アミノ酸のタンパクをコードするORFを同定することができた。5'非翻訳領域はわずか4bpを含むのみであったが、推定開始メチオニン残基は、既知キシロース異性化酵素配列の整列によく一致した。3'非翻訳領域は351bpの長さであり、嫌気性菌で典型的である、高いAT含有率を有していた。ORFは、基質との相互作用(触媒トリアド(catalytic triad)His102, Asp105, Asp340及びLys235)及びマグネシウムとの結合(Glu232)に重要であることが示されているアミノ酸を含有していた(14, 26)。さらに、キシロース異性化酵素のために開発した(20)2個の符号パターン(残基185-194、及び230-237)が存在した。この*Piromyces* sp. E2キシロース異性化酵素(XylA)は*Haemophilus influenza*の酵素(52%同一性、68%類似性)及び*Hordeum vulgare*(49%同一性、67%類似性)と高い相同性を示す。cDNA配列から推定されるポリペプチドは49,395Daの分子量に相当し、5.2の計算値pIを有す。

20

30

【0052】

二番目のクローンpAK44は、2041bpの挿入を有し、53,158Daの分子量及び5.0のpIを持つ494アミノ酸のタンパクをコードする完全ORFを含有した。最初のメチオニンに先行して111bpの5'非翻訳領域が存在したが、3'非翻訳領域は445bpからなっていた。両領域はATが多い。BLAST及びFASTA調査によりキシロロキナーゼとの高い類似性が明らかにされた。Rodriguez-Pefia et al. (22)により定義された2個のリン酸共通領域が部分整列に示されるように位置6-23及び254-270に認められた。さらにPrositeデータベースに記述されているこの糖キナーゼファミリーの記号が同定された(131-145及び351-372)。Piromyces sp. E2キシロロキナーゼ(XylB)は*Haemophilus influenza*のXylBと高い相同性を示した(46%同一性、64%類似性)。

40

【0053】

[実施例2] 酵母発現ベクターの構築

Piromyces sp. E2のキシロース異性化酵素の*Saccharomyces*

50

c e r e v i s i a e 中の発現

P i r o m y c e s s p. E 2 の c D N A を p f u ポリメラーゼ (Stratgene) を使用する P C R 反応に使用した。プライマーはキシロース異性化酵素の 5' 及び 3' 末端の配列を使用して設計し、S f i I 及び X b a I 制限部位を含めた。P C R 産物を p P I C Z α ベクター (Invitrogen, Carlsbad, CA, 米国) 中にクローニングした。キシロース異性化酵素を取り出すために、p P I C Z α ベクターを E c o R I 及び X b a I で消化した。消化産物を p Y e s 2 ベクター (Invitrogen) に連結した。キシロース異性化酵素を含む p Y e s 2 プラスミドを *S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e* (株 B J 1 9 9 1, B e t h J o h n s, U v A から供与) に導入した。この株の遺伝型は: m a t α, l e u 2, t r p 1, u r a 3-2 5 1, p r b 1-1 1 2 2 及び p e p 4-3、
10
である。形質転換細胞を S C プレート (0. 6 7 % Y N B 培地 + 0. 0 5 % L - L e u + 0. 0 5 % L - T r p + 2 % グルコース + 2 % アガロース) に接種した。

【0054】

形質転換 *S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e* 細胞をグルコース培地で 2 5 ° C で 7 2 時間増殖した (グルコースの代わりにラフィノースを使用することができる)。細胞を回収し、グルコースの代わりにガラクトースを加えた S C 培地中に再懸濁した。8 時間の誘導後、細胞を回収し、硝子ビーズ (0. 1 0 - 0. 1 1 m m 径) 及び「破壊緩衝液」 (5 0 m M リン酸緩衝液 + 5 % グリセロール + プロテアーゼ阻害剤) を使用して分解した。分解の後混合物を遠心分離 (1 8, 0 0 0 x g, 4 ° C, 1 5 分間) した。透明上清を使用して前記方法 (実施例 1) によりキシロース異性化酵素活性を測定した。1 0
20
U / m g タンパクの活性が 3 7 ° C において測定された。

【0055】

[実施例 3] キシロース上での形質転換酵母株の増殖

(培地組成)

S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e 株を下記組成の S C - 培地上で増殖した: 0. 6 7 % (w / v) 酵母窒素塩基; 0. 0 1 % (w / v) L - トリプトファン; 0. 0 1 % (w / v) L - ロイシン及びグルコース、ガラクトースまたはキシロースまたはこれら基質の組合せのいずれか (下記参照)。寒天培地用に培地に 2 % (w / v) 細菌用寒天を加えた。

【0056】

(増殖実験)

挿入のない p Y e s 2 で形質転換された *S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e* 株 B J 1 9 9 1 (遺伝型: m a t α, l e u 2, t r p 1, u r a 3-2 5 1, p r b 1-1 1 2 2, p e p 4-3) 及び *P i r o m y c e s* s p. E 2 キシロース異性化酵素遺伝子を持つ p Y e s 2 を含む形質転換細胞 (1 6. 2. 1; 1 6. 2. 2 及び 1 4. 3) を、炭素源として 1 0 m M グルコースを含む S C - 寒天プレート上で増殖した。コロニーが見えるようになったとき、一つのコロニーを使用して、炭素源として 1 0 0 m M キシロース及び 2 5 m M ガラクトースを含む S V C 液体培地に接種した。L K B U l t r o s p e c K 分光光度計を使用して 6 0 0 n m の光学密度の増加を測定することにより増殖を監視した。
30
40

【0057】

(結果)

増殖実験の結果を図 1 にまとめた。挿入のない p Y e s 2 で形質転換した B J 1 9 9 1 株の培養は 8 0 時間まで O D _{6 0 0} の増加を示した。その後徐々に減少が観察された。これは増殖の末期にしばしば観察される酵母細胞の凝集によるものである。3 種の形質転換細胞は、8 0 時間後も増殖を止めず、少なくとも 1 5 0 時間までさらに増加を示した。

【0058】

[実施例 4] *S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e* において *P i r o m y c e s* s p. E 2 キシロース異性化酵素を構成的に発現するための新規で改良された酵母発現ベクターの構築

キシロース異性化酵素をコードする *P i r o m y c e s* sp. E 2 遺伝子を含む p P I C Z α ベクターを、V e n t _R DNAポリメラーゼ (New England Biolabs) による P C R の鋳型として使用した。プライマーはキシロース異性化酵素をコードする遺伝子の 5' 及び 3' 配列を使用して設計し、E c o R I 及び S p e I 部位を含めた。さらに、プライマーは p P I C Z α 構築中に認められる X b a I 部位を除去し、その代わりに終結コドン (T A A) を入れて設計した。最終産物は、p P I C Z α 構築に認められる追加のアミノ酸 (h i s 及び c - M y c タグ) のない、元のオープンリードフレームを復元するように設計した。P C R 産物を E c o R I 及び S p e I で切り出した。最終産物を p Y E S 2 (Invitrogen) 由来のベクター中にクローニングした。このベクター中において、キシロース異性化酵素の構成的発現を確実にし、それにより培地にガラクトースを加える必要をなくするために、p Y E S 2 中にある G A L 1 プロモーターを T P I 1 プロモーターに置換した。T P I 1 プロモーターはプラスミド p Y X 0 1 2 (R&D systems) の修飾型からクローニングした。このプロモーターを N h e I - E c o R I フラグメントとして切り出した。

10

【0059】

この T P I 1 プロモーター及びキシロース異性化酵素をコードする遺伝子の P C R 産物を共に、S p e I 及び X b a I で切り出した p Y E S 2 に連結した。このプラスミドを使用して *S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e* 株 C E N . P K 1 1 3 - 5 D (P e t e r K o t t e r , F r a n k f u r t より供与) を形質転換した。この株の遺伝型は: M a t A u r a 3 - 5 2 である。形質転換細胞は、炭素源として 2 % グルコースを加えたミネラル培地プレート上で選別した (Verduyn et al.: Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts; a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. (1992) Yeast 8(7): 501-17)。形質転換していない細胞は、このプレート上では増殖できない。

20

【0060】

形質転換細胞を、炭素限定恒成分培養において、グルコース/キシロース混合物に対して増殖した。この条件下で増殖した形質転換細胞は、D e r s t e r s - H i l d e r s s o n e t a l . (Kinetic characterization of D-xylose isomerases by enzymatic assays using D-sorbitol dehydrogenase. Enz. Microb. Techol. 9 (1987) 145-148) により開発された特異的酵素検定により、高いキシロース異性化活性 (30℃において 800 単位/mg) を示す。形質転換 *S . c e r e v i s i a e* 株の無細胞抽出物中のキシロース異性化酵素のインビトロ活性は、2 価カチオン (M g 2 + または C o 2 +) に依存し、キシロースに対して約 20 mM の比較的低い K m 値が認められた。

30

【0061】

SEQUENCE LISTING

<110> Royal Nedalco B.V.

<120> Fermentation of pentose sugars

<130> piromyces xylose isomerase

<140> BO 44829

<141> 2001-12-31

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 437

<212> PRT

<213> Piromyces sp.

<400> 1

Met	Ala	Lys	Glu	Tyr	Phe	Pro	Gln	Ile	Gln	Lys	Ile	Lys	Phe	Glu	Gly	
1					5				10					15		
Lys	Asp	Ser	Lys	Asn	Pro	Leu	Ala	Phe	His	Tyr	Tyr	Asp	Ala	Glu	Lys	
			20					25					30			20
Glu	Val	Met	Gly	Lys	Lys	Met	Lys	Asp	Trp	Leu	Arg	Phe	Ala	Met	Ala	
		35					40					45				
Trp	Trp	His	Thr	Leu	Cys	Ala	Glu	Gly	Ala	Asp	Gln	Phe	Gly	Gly	Gly	
	50					55					60					
Thr	Lys	Ser	Phe	Pro	Trp	Asn	Glu	Gly	Thr	Asp	Ala	Ile	Glu	Ile	Ala	
	65				70					75					80	
Lys	Gln	Lys	Val	Asp	Ala	Gly	Phe	Glu	Ile	Met	Gln	Lys	Leu	Gly	Ile	
				85					90					95		30
Pro	Tyr	Tyr	Cys	Phe	His	Asp	Val	Asp	Leu	Val	Ser	Glu	Gly	Asn	Ser	
			100					105					110			
Ile	Glu	Glu	Tyr	Glu	Ser	Asn	Leu	Lys	Ala	Val	Val	Ala	Tyr	Leu	Lys	
		115					120					125				
Glu	Lys	Gln	Lys	Glu	Thr	Gly	Ile	Lys	Leu	Leu	Trp	Ser	Thr	Ala	Asn	
	130					135					140					
Val	Phe	Gly	His	Lys	Arg	Tyr	Met	Asn	Gly	Ala	Ser	Thr	Asn	Pro	Asp	
	145				150					155					160	
Phe	Asp	Val	Val	Ala	Arg	Ala	Ile	Val	Gln	Ile	Lys	Asn	Ala	Ile	Asp	
				165				170						175		40
Ala	Gly	Ile	Glu	Leu	Gly	Ala	Glu	Asn	Tyr	Val	Phe	Trp	Gly	Gly	Arg	
			180					185					190			
Glu	Gly	Tyr	Met	Ser	Leu	Leu	Asn	Thr	Asp	Gln	Lys	Arg	Glu	Lys	Glu	
			195				200					205				

10

20

30

40

His Met Ala Thr Met Leu Thr Met Ala Arg Asp Tyr Ala Arg Ser Lys
 210 215 220
 Gly Phe Lys Gly Thr Phe Leu Ile Glu Pro Lys Pro Met Glu Pro Thr
 225 230 235 240
 Lys His Gln Tyr Asp Val Asp Thr Glu Thr Ala Ile Gly Phe Leu Lys
 245 250 255
 Ala His Asn Leu Asp Lys Asp Phe Lys Val Asn Ile Glu Val Asn His
 260 265 270
 Ala Thr Leu Ala Gly His Thr Phe Glu His Glu Leu Ala Cys Ala Val
 275 280 285
 Asp Ala Gly Met Leu Gly Ser Ile Asp Ala Asn Arg Gly Asp Tyr Gln
 290 295 300
 Asn Gly Trp Asp Thr Asp Gln Phe Pro Ile Asp Gln Tyr Glu Leu Val
 305 310 315 320
 Gln Ala Trp Met Glu Ile Ile Arg Gly Gly Gly Phe Val Thr Gly Gly
 325 330 335
 Thr Asn Phe Asp Ala Lys Thr Arg Arg Asn Ser Thr Asp Leu Glu Asp
 340 345 350
 Ile Ile Ile Ala His Val Ser Gly Met Asp Ala Met Ala Arg Ala Leu
 355 360 365
 Glu Asn Ala Ala Lys Leu Leu Gln Glu Ser Pro Tyr Thr Lys Met Lys
 370 375 380
 Lys Glu Arg Tyr Ala Ser Phe Asp Ser Gly Ile Gly Lys Asp Phe Glu
 385 390 395 400
 Asp Gly Lys Leu Thr Leu Glu Gln Val Tyr Glu Tyr Gly Lys Lys Asn
 405 410 415
 Gly Glu Pro Lys Gln Thr Ser Gly Lys Gln Glu Leu Tyr Glu Ala Ile
 420 425 430
 Val Ala Met Tyr Gln
 435

<210> 2
 <211> 1669
 <212> DNA
 <213> *Piromyces* sp.

<400> 2
 gtaaattggct aaggaatatt tcccacaaat tcaaaagatt aagttcgaag gtaaggattc 60
 taagaatcca ttagccttcc actactacga tgctgaaaag gaagtcattg gtaagaaaat 120
 gaaggattgg ttacgtttcg ccatggcctg gtggcacact ctttgccgag aaggtgctga 180
 ccaattcggg ggaggtacaa agtctttccc atggaacgaa ggtactgatg ctattgaaat 240
 tgccaagcaa aaggttgatg ctggtttcga aatcatgcaa aagcttggtg ttccatacta 300
 ctggtttccac gatgttgatc ttgtttccga aggttaactct attgaagaat acgaatccaa 360
 ccttaaggct gtcgttgctt acctcaagga aaagcaaaag gaaaccggta ttaagcttct 420
 ctggagtact gctaacgtct tcggtcacia gcgttacatg aacgggtgct ccaactaacc 480
 agactttgat gttgtcgccc gtgctattgt tcaaatgaag aacgccatag acgcgggtat 540

10

20

30

40

```

tgaacttggg gctgaaaact acgtcttctg ggggtggctgt gaagggttaca tgagtctcct 600
taacactgac caaaagcgtg aaaaggaaca catggccact atgcttacca tggctcgtga 660
ctacgctcgt tccaagggat tcaagggtag tttcctcatt gaaccaaagc caatggaacc 720
aaccaagcac caatacgatg ttgacactga aaccgctatt ggtttcctta aggcccacaa 780
cttagacaag gacttcaagg tcaacattga agttaaccac gctactcttg ctgggtcacac 840
tttcgaacac gaacttgcc tggctgttga tgctggtag ctcggttcca ttgatgctaa 900
ccgtgggtgac taacaaaacg gttgggatac tgatcaattc ccaattgatc aatacgaact 960
cgtccaagct tggatggaaa tcatccgtgg tgggtggtttc gttactgggtg gtaccaactt 1020
cgatgccaaag actcgtcgta actctactga cctcgaagac atcatcattg cccacgtttc 1080
tggtatggat gctatggctc gtgctcttga aaacgctgcc aagctcctcc aagaatctcc 1140
atacaccaag atgaagaagg aacgttacgc ttccctcgac agtgggtattg gtaaggactt 1200
tgaagatggg aagctcacc tccaacaagt ttacgaatac ggtaagaaga acggtgaacc 1260
aaagcaaaact tctggtaagc aagaactcta cgaagctatt gttgccatgt accaataagt 1320
taatcgtagt taaattggta aaataattgt aaaatcaata aacttgtcaa tcctccaatc 1380
aagtttaaaa gatcctatct ctgtactaat taaatatagt acaaaaaaaaa atgtataaac 1440
aaaaaaaaag ctaaaagacg gaagaattta atttagggaa aaaataaaaa taataataaa 1500
caatagataa atcctttata ttaggaaaaa gtcccattgt attattttca tttctactaa 1560
aaaagaaagt aaataaaaaca caagaggaata ttttccttt tttttttttt tgtaataaat 1620
tttatgcaaa tataaatata aataaaaataa taaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1669

```

10

<210> 3

<211> 494

<212> PRT

<213> *Piromyces* sp.

20

<400> 3

```

Met Lys Thr Val Ala Gly Ile Asp Leu Gly Thr Gln Ser Met Lys Val
  1             5             10             15

```

```

Val Ile Tyr Asp Tyr Glu Lys Lys Glu Ile Ile Glu Ser Ala Ser Cys
      20             25             30

```

```

Pro Met Glu Leu Ile Ser Glu Ser Asp Gly Thr Arg Glu Gln Thr Thr
      35             40             45

```

```

Glu Trp Phe Asp Lys Gly Leu Glu Val Cys Phe Gly Lys Leu Ser Ala
      50             55             60

```

30

```

Asp Asn Lys Lys Thr Ile Glu Ala Ile Gly Ile Ser Gly Gln Leu His
      65             70             75             80

```

```

Gly Phe Val Pro Leu Asp Ala Asn Gly Lys Ala Leu Tyr Asn Ile Lys
      85             90             95

```

```

Leu Trp Cys Asp Thr Ala Thr Val Glu Glu Cys Lys Ile Ile Thr Asp
     100            105            110

```

```

Ala Ala Gly Gly Asp Lys Ala Val Ile Asp Ala Leu Gly Asn Leu Met
     115            120            125

```

```

Leu Thr Gly Phe Thr Ala Pro Lys Ile Leu Trp Leu Lys Arg Asn Lys
     130            135            140

```

40

```

Pro Glu Ala Phe Ala Asn Leu Lys Tyr Ile Met Leu Pro His Asp Tyr
     145            150            155            160

```

```

Leu Asn Trp Lys Leu Thr Gly Asp Tyr Val Met Glu Tyr Gly Asp Ala
     165            170            175

```

```

Ser Gly Thr Ala Leu Phe Asp Ser Lys Asn Arg Cys Trp Ser Lys Lys

```

180					185					190					
Ile	Cys	Asp	Ile	Ile	Asp	Pro	Lys	Leu	Leu	Asp	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu
		195					200					205			
Ile	Glu	Pro	Ser	Ala	Pro	Ala	Gly	Lys	Val	Asn	Asp	Glu	Ala	Ala	Lys
	210					215					220				
Ala	Tyr	Gly	Ile	Pro	Ala	Gly	Ile	Pro	Val	Ser	Ala	Gly	Gly	Gly	Asp
225					230					235					240
Asn	Met	Met	Gly	Ala	Val	Gly	Thr	Gly	Thr	Val	Ala	Asp	Gly	Phe	Leu
				245					250					255	
Thr	Met	Ser	Met	Gly	Thr	Ser	Gly	Thr	Leu	Tyr	Gly	Tyr	Ser	Asp	Lys
			260					265						270	
Pro	Ile	Ser	Asp	Pro	Ala	Asn	Gly	Leu	Ser	Gly	Phe	Cys	Ser	Ser	Thr
		275					280					285			
Gly	Gly	Trp	Leu	Pro	Leu	Leu	Cys	Thr	Met	Asn	Cys	Thr	Val	Ala	Thr
	290					295					300				
Glu	Phe	Val	Arg	Asn	Leu	Phe	Gln	Met	Asp	Ile	Lys	Glu	Leu	Asn	Val
305					310					315					320
Glu	Ala	Ala	Lys	Ser	Pro	Cys	Gly	Ser	Glu	Gly	Val	Leu	Val	Ile	Pro
				325					330					335	
Phe	Phe	Asn	Gly	Glu	Arg	Thr	Pro	Asn	Leu	Pro	Asn	Gly	Arg	Ala	Ser
			340					345					350		
Ile	Thr	Gly	Leu	Thr	Ser	Ala	Asn	Thr	Ser	Arg	Ala	Asn	Ile	Ala	Arg
		355					360					365			
Ala	Ser	Phe	Glu	Ser	Ala	Val	Phe	Ala	Met	Arg	Gly	Gly	Leu	Asp	Ala
	370					375					380				
Phe	Arg	Lys	Leu	Gly	Phe	Gln	Pro	Lys	Glu	Ile	Arg	Leu	Ile	Gly	Gly
385					390				395						400
Gly	Ser	Lys	Ser	Asp	Leu	Trp	Arg	Gln	Ile	Ala	Ala	Asp	Ile	Met	Asn
				405					410					415	
Leu	Pro	Ile	Arg	Val	Pro	Leu	Leu	Glu	Glu	Ala	Ala	Ala	Leu	Gly	Gly
			420					425					430		
Ala	Val	Gln	Ala	Leu	Trp	Cys	Leu	Lys	Asn	Gln	Ser	Gly	Lys	Cys	Asp
		435					440					445			
Ile	Val	Glu	Leu	Cys	Lys	Glu	His	Ile	Lys	Ile	Asp	Glu	Ser	Lys	Asn
	450					455					460				
Ala	Asn	Pro	Ile	Ala	Glu	Asn	Val	Ala	Val	Tyr	Asp	Lys	Ala	Tyr	Asp
465					470					475					480
Glu	Tyr	Cys	Lys	Val	Val	Asn	Thr	Leu	Ser	Pro	Leu	Tyr	Ala		
				485					490						

<210> 4

10

20

30

40

<211> 2041

<212> DNA

<213> *Piromyces* sp.

<400> 4

```

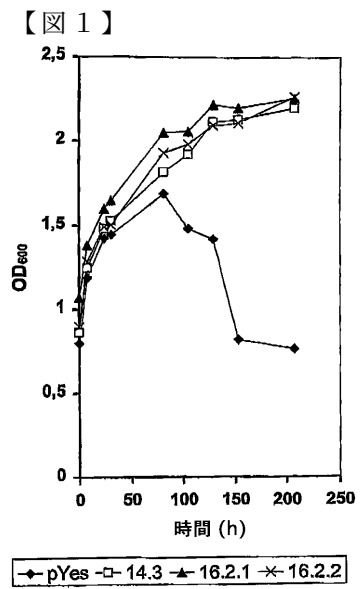
attatataaaa ataacttttaa ataaaaacaat ttttatttgt ttattttaatt attcaaaaaa 60
aattaaagta aaagaaaaat aatacagtag aacaatagta ataatatcaa aatgaagact 120
gttgctggta ttgatcttgg aactcaaagt atgaaagtcg ttattttacga ctatgaaaag 180
aaagaaatta ttgaaagtgc tagctgtcca atggaattga tttccgaaag tgacgggtacc 240
cgtgaacaaa ccactgaatg gtttgacaag ggtccttgaag tttgttttgg taagcttagt 300
gctgataaca aaaagactat tgaagctatt ggtatttctg gtcaattaca cgggttttgtt 360
cctcttgatg ctaacggtaa ggctttatac aacatcaaac tttgggtgtga tactgctacc 420
gttgaagaat gtaagattat cactgatgct gccgggtggtg acaaggctgt tattgatgcc 480
cttggttaacc ttatgctcac cggtttcacc gctccaaaga tccctctggct caagcgcaac 540
aagccagaag ctttcgctaa cttaaagtac attatgcttc cacacgatta cttaaactgg 600
aagcttactg gtgattacgt tatggaatac ggtgatgcct ctgggtaccg ctccttcgat 660
tctaagaacc gttgtgggtc taagaagatt tgcgatatca ttgacccaaa acttttagat 720
ttacttccaa agttaattga accaagcgct ccagctggta aggttaatga tgaagcgcgt 780
aaggcttacg gtattccagc cggatttcca gtttcogctg gtgggtggta taacatgatg 840
gggtgctgttg gtactggtac tgttgctgat ggtttcotta ccatgtctat ggggtacttct 900
gggtactcttt acgggttacg tgacaagcca attagtacc cagctaattg tttaaagtgg 960
ttctgttctt ctactggtgg atggcttcca ttactttgta ctatgaactg tactgttgcc 1020
actgaattcg ttcgtaacct cttccaaatg gatattaagg aacttaatgt tgaagctgcc 1080
aagctctccat gtggtagtga aggtgtttta gttattccat tottcaatgg tgaaagaact 1140
ccaaacttac caaacggtcg tgctagtatt actggtotta cttctgctaa caccagccgt 1200
gctaacattg ctgctgctag tttcgaatcc gccgttttcg ctatgcgtgg tggtttagat 1260
gctttccgta agttagggtt ccaaccaaaag gaaattcgct ttattgggtg tggttctaag 1320
tctgatctct ggagacaaat tgccgctgat atcatgaacc ttccaatcag agttccactt 1380
ttagaagaag ctgctgctct tgggtggtgt gttcaagctt tatgggtgtc taagaaccaa 1440
tctggtaagt gtgatattgt tgaactttgc aaagaadaca ttaagattga tgaatctaag 1500
aatgctaacc caattgcga aaatgttgct gtttacgaca aggtttacga tgaatactgc 1560
aagggttgtaa ataacttttc tccattatat gcttaaattg ccaatgtaaa aaaaaatata 1620
atgccatata attgccttgt caatacactg ttcattgttc tataatcata ggacattgaa 1680
tttacaaggt ttatacaatt aatatctatt atcatattat tatacagcat ttcattttct 1740
aagattagac gaaacaatto ttggttctct gcaatataca aaattttacat gaatttttag 1800
aatagtctcg tattttatgcc caataatcag gaaaattacc taatgctgga ttcttggttaa 1860
taaaaacaaa ataaataaat taaataaaca aataaaaaat ataagtaaat ataaatata 1920
aagtaataata aaaaaaaagt aaataaataa ataaataaat aaaaattttt tgcaaatata 1980
taaataaata aataaaatat aaaaataatt tagcaataa attaaaaaaa aaaaaaaaaa 2040
a
2041

```

10

20

30



【配列表】

0005113800000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
C 1 2 P	7/54	(2006.01)	C 1 2 P	7/54	
C 1 2 P	7/46	(2006.01)	C 1 2 P	7/46	
C 1 2 P	7/18	(2006.01)	C 1 2 P	7/18	
C 1 2 P	5/02	(2006.01)	C 1 2 P	5/02	
C 1 2 P	7/20	(2006.01)	C 1 2 P	7/20	
C 1 2 P	1/02	(2006.01)	C 1 2 P	1/02	A
			C 1 2 P	1/02	D

(72)発明者 オブ デン カンプ、ヒューバーテュス、ヨハネス、マーレ
オランダ国、オーストロム、ランデンラデ 6 0

(72)発明者 ハルハンギ、ハリー、ラマノエデュ
オランダ国、アルンヘム、モーイーヴェク 8 4

(72)発明者 ファン デル ドリフト、クリスティアーン
オランダ国、マルデン、ヴィントフロイゲル 3 6

(72)発明者 プロンク、ヤコブス、トマス
オランダ国、シュルブルイデン、バルク 5

審査官 渡邊 潤也

(56)参考文献 国際公開第96/024667 (WO, A1)
米国特許第5935837 (US, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 N 1 5/00-1 5/90
PubMed
BIOSIS/WPIDS (STN)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq