(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2017-18093
(P2017-18093A)
(43)公開日　平成29年1月26日(2017.1.26)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21	ZNA	4B050
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19		4B064
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/10		4B065
C12P 19/00	(2006.01)	C12P	19/00		
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		

審査請求 有　請求項の数 20　ＯＬ　（全 66 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2016-131930 (P2016-131930)
(22)出願日　平成28年7月1日 (2016.7.1)
(62)分割の表示　特願2013-519081 (P2013-519081)の分割
原出願日　平成23年7月12日 (2011.7.12)
(31)優先権主張番号　10169304.2
(32)優先日　平成22年7月12日 (2010.7.12)
(33)優先権主張国　欧州特許庁 (EP)

(71)出願人　513008731
ユニヴェルシテイト　ヘント
ＵＮＩＶＥＲＳＩＴＥＩＴ　ＧＥＮＴ
ベルギー、ビー－９０００　ヘント、シント－ピーテルスニーウストラート　２５
Ｓｉｎｔ－Ｐｉｅｔｅｒｓｎｉｅｕｗｓｔｒａａｔ　２５，　Ｂ－９０００　Ｇｅｎｔ，　Ｂｅｌｇｉｕｍ
(74)代理人　100065248
弁理士　野河　信太郎
(74)代理人　100159385
弁理士　甲斐　伸二
(74)代理人　100163407
弁理士　金子　裕輔

最終頁に続く

(54)【発明の名称】付加価値バイオ生成物の生成のための代謝操作された生物

(57)【要約】　（修正有）
【課題】付加価値バイオ生成物、例えば特別の糖類、活性化糖類、ヌクレオシド、グリコシド、糖脂質または糖タンパク質の生成のための遺伝子操作された生物、特に微生物、例えば細菌および酵母の提供。
【解決手段】炭水化物ホスホリラーゼ，炭水化物キナーゼと組み合わせた炭水化物加水分解酵素，又は炭水化物合成酵素をコードする遺伝子を導入することにより、二糖類，オリゴ糖類，多糖類又はそれらの混合物をフラクトースと活性化糖類とに分割し、さらに他の遺伝子機能を低下させることにより、フラクトースをバイオマスに変換が可能である、代謝改変された生物。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
単糖類、二糖類、三糖類、四糖類、五糖類、オリゴ糖類、多糖類および活性化炭水化物からなる群より選択される少なくとも１つの特別の生成物の生成のための代謝操作された生物であって、
a)前記生物が、少なくともi)炭水化物ホスホリラーゼをコードする遺伝子、ii)炭水化物キナーゼをコードする遺伝子と組み合わせた炭水化物加水分解酵素をコードする遺伝子、またはiii)炭水化物合成酵素をコードする遺伝子の導入により遺伝子改変されていることにより、前記生物が、前記生物内で二糖類、オリゴ糖類、多糖類またはそれらの混合物をフラクトースと活性化糖類とに分割でき、
b)前記生物が、前記生物のステップa)で導入される遺伝子のいずれでもない少なくとも１つの他の遺伝子の機能が低下するかまたは非機能的になるようにさらに遺伝子改変され、前記他の遺伝子が、前記フラクトースをバイオマスに変換する酵素をコードする
ことを特徴とし、
前記フラクトースが前記特別の生成物へ変換され、
前記生物が、細菌、酵母、真菌細胞からなる群より選択される微生物であるか、または植物細胞もしくは動物細胞である、
前記生物。
【請求項２】
前記生物が、炭水化物ホスホリラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子の導入により遺伝子改変されていることにより、前記生物が、前記生物内でスクロースをフラクトースとグルコース-1-ホスフェートとに分割できる請求項１に記載の代謝操作された生物。
【請求項３】
前記生物が、グルコキナーゼをコードする遺伝子と組み合わせたスクラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子の導入により遺伝子改変されていることにより、前記生物が、前記生物内でスクロースをフラクトースとグルコース-6-ホスフェートとに分割できる請求項１に記載の代謝操作された生物。
【請求項４】
前記生物が、グルコキナーゼをコードする遺伝子と組み合わせたベータ-ガラクトシダーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子の導入により遺伝子改変されていることにより、前記生物が、前記生物内でラクツロースをフラクトースとガラクトース-1-ホスフェートとに分割できる請求項１に記載の代謝操作された生物。
【請求項５】
前記生物が、スクロース合成酵素をコードする少なくとも１つの遺伝子の導入により遺伝子改変されていることにより、前記生物が、前記生物内でスクロースをフラクトースとUDP-グルコースとに分割できる請求項１に記載の代謝操作された生物。
【請求項６】
前記フラクトースをバイオマスに変換する酵素をコードする少なくとも１つの遺伝子が、ホスホグルコースイソメラーゼをコードする遺伝子および／またはホスホフルクトキナーゼをコードする遺伝子を含む請求項１～５のいずれか１項に記載の代謝操作された生物。
【請求項７】
前記フラクトースをバイオマスに変換する酵素をコードする少なくとも１つの遺伝子が、pgi、pfkAおよび／またはpfkBを含み、且つ、前記生物が大腸菌である請求項６に記載の代謝操作された生物。
【請求項８】
前記フラクトースをバイオマスに変換する酵素をコードする少なくとも１つの遺伝子が、PGI、PFK1、PFK2、PFK26および／またはPFK27を含み、且つ、前記生物がサッカロミセス・セレビシエである請求項６に記載の代謝操作された生物。
【請求項９】

前記生物が、フラクトースをフラクトース-6-ホスフェートに変換する酵素をコードする少なくとも１つの遺伝子の導入によりさらに遺伝子改変されているか、またはフラクトースをフラクトース-6-ホスフェートに変換する酵素をコードする前記生物の少なくとも１つの内因性遺伝子が過剰発現されている請求項１～８のいずれか１項に記載の代謝操作された生物。

【請求項１０】

前記フラクトースをフラクトース-6-ホスフェートに変換する酵素をコードする少なくとも１つの遺伝子が、フルクトキナーゼである請求項９に記載の代謝操作された生物。

【請求項１１】

前記特別の生成物が、フラクトース-6-ホスフェートを含む請求項９または10に記載の代謝操作された生物。

【請求項１２】

前記生物が、フラクトース-6-ホスフェートを三糖類に変換する酵素をコードする少なくとも１つの遺伝子の導入によりさらに遺伝子改変されているか、またはフラクトース-6-ホスフェートを三糖類に変換する酵素をコードする前記生物の少なくとも１つの内因性遺伝子が過剰発現されている請求項９または10に記載の代謝操作された生物。

【請求項１３】

前記特別の生成物が、三糖類を含む請求項12に記載の代謝操作された生物。

【請求項１４】

前記三糖類が、フコシルラクトースである請求項13に記載の代謝操作された生物。

【請求項１５】

前記フラクトース-6-ホスフェートを三糖類に変換する酵素をコードする少なくとも１つの遺伝子が、マンノース-6-ホスフェートイソメラーゼ(manA)、ホスホマンノムターゼ(cpsG)、マンノース-1-ホスフェートグアニリルトランスフェラーゼ(cpsB)、GDP-マンノース脱水酵素(gmd)、GDP-フコース合成酵素(fcl)および／またはフコシルトランスフェラーゼを含む請求項13または14に記載の代謝操作された生物。

【請求項１６】

三糖類の生成のための代謝操作された生物であって、

a)前記生物が、スクロースホスホリラーゼをコードする少なくとも１つの遺伝子の導入により遺伝子改変されていることにより、前記生物が、前記生物内でスクロースをグルコース-1-ホスフェートとフラクトースとに分割でき、

b)前記生物が、前記生物のステップa)で導入される遺伝子のいずれでもない少なくとも１つの他の遺伝子の機能が低下するかまたは非機能的になるようにさらに遺伝子改変され、前記他の遺伝子が、前記フラクトースをバイオマスに変換する酵素をコードする

ことを特徴とし、

前記フラクトースが前記三糖類へ変換され、

前記生物が、細菌、酵母、真菌細胞からなる群より選択される微生物であるか、または植物細胞もしくは動物細胞である、

前記生物。

【請求項１７】

前記三糖類が、フコシルラクトースである請求項16に記載の代謝操作された生物。

【請求項１８】

前記フラクトースをバイオマスに変換する酵素をコードする少なくとも１つの遺伝子が、ホスホグルコースイソメラーゼをコードする遺伝子および／またはホスホフルクトキナーゼをコードする遺伝子を含む請求項16または17に記載の代謝操作された生物。

【請求項１９】

前記生物が、フラクトースを三糖類に変換する酵素をコードする少なくとも１つの遺伝子の導入によりさらに遺伝子改変されているか、またはフラクトースを三糖類に変換する酵素をコードする前記生物の少なくとも１つの内因性遺伝子が過剰発現されている請求項16～18のいずれか１項に記載の代謝操作された生物。

【請求項２０】
前記フラクトースを三糖類に変換する酵素をコードする少なくとも１つの遺伝子が、フルクトキナーゼ(frk)、マンノース-6-ホスフェートイソメラーゼ(manA)、ホスホマンノムターゼ(cpsG)、マンノース-1-ホスフェートグアニリルトランスフェラーゼ(cpsB)、GDP-マンノース脱水酵素(gmd)、GDP-フコース合成酵素(fcl)および／またはフコシルトランスフェラーゼを含む請求項19に記載の代謝操作された生物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、付加価値バイオ生成物(added value bio-products)、例えば特別の(specialty)糖類、糖脂質および糖タンパク質の生成のための遺伝子操作された(engineered)生物、特に微生物、例えば細菌および酵母に関する。より具体的には、本発明は、生体触媒または発酵による生成プロセスにおいて出現する従来の技術的問題を回避することにより、上記の価値のある特別の生成物を大量にそして高い割合で生成できる、代謝操作された(metabolically engineered)宿主細胞に関する。
【背景技術】
【０００２】
石油資源のコストの上昇により、生物学的生成プロセスの可能性に対する意識が大きくなっている。このことにより、企業および研究センターは、ますます増加している数のバイオ生成物、例えばバイオ燃料、バイオ化学物質およびバイオポリマーの生成のための経済的に実行可能であり、環境に優しい技術の開発に対してより大きい研究努力を行っている。これらは、容易に分解でき、最小限のエネルギーの必要性および廃棄物の流れで生成される。工業的バイオテクノロジーに基づく生成プロセスについての好ましい状況にもかかわらず、既に確立された化学合成経路の代替の開発は、経済的に実行可能であるためには時間および費用がかかりすぎる。その結果、新しい生成株をより早く、より安価に開発することに対する明確な要求が存在する。
【０００３】
最近では、オリゴ糖は、バイオ変換プロセスにより典型的に合成されている。単離および精製された酵素(いわゆるインビトロバイオ変換)ならびに全細胞生体触媒が一般的に用いられる。本質において、これらは、１以上の前駆体を所望のバイオ生成物に変換する。
しかし、インビトロバイオ変換を用いることは、頻繁に阻害される。なぜなら、生成物の合成は、多重の酵素ステップを必要とするか、またはさらなる補因子が要求され(NADH、NADPH、UTPなど)、これらが高価であるからである。
【０００４】
インビトロ合成の別の問題点は、多くの酵素の発現および精製が面倒であり、それらの精製プロセスが、酵素活性の減少をもたらしうるということである。さらに、このような多重酵素バイオ変換プロセスにおける各酵素は、それぞれの最適プロセスパラメータを有し、非常に複雑な最適化スキームをもたらす。このようなプロセスにおいて、反応平衡も重要な役割を演じる。例えば、ホスホリラーゼを用いる場合、生成物収率を制限する、定められた基質／生成物比率が考慮される。このことは、生成物を基質から分離するための複雑な下流のプロセシングスキームを導く(33，35)。
【０００５】
代謝操作は、付加価値バイオ生成物、例えば特別の炭水化物の生成を最適化するための別のアプローチである。一般的に、全細胞を代謝操作して、供給する前駆体から開始して付加価値バイオ生成物を生成する。この状況において、細胞は、前駆体の分解に関与する全ての代謝経路が排除されるように操作される(3，45，70，77，100)。このようにすることにより、前駆体は、所望の生成物に効率的かつ直接的に変換される。
【０００６】
後者のアプローチの主な問題点は、バイオマス合成および構想されるバイオ生成物バイオ合成が、異なる開始代謝物を要求することである。例えば、大腸菌(E. coli)は、グル

コースから開始して２-デオキシ-シロ(scyllo)-イノソースを効率的に生成するために代謝操作された。この方策により、代謝操作された大腸菌はグルコース上で成長できなくなり、バイオマス合成を可能にするために他の基質、例えばグリセロールの添加を必要とする(45)。

【０００７】

全細胞生成系の第２の問題点は、バイオマスが形成される(またはバイオマス合成)成長段階と、構想する生成物のその後の生成段階との２段階を必要とすることである。このことは、成長段階と生成段階とが時間的に分かれている(逐次的段階)ことを意味する。このことにより、所望の生成物の全体的な生成速度は非常に低い。さらに、この型のプロセスは、最適化するのが非常に難しい。実際に、生成経路遺伝子を過剰発現する代謝操作された細胞を利用して発酵プロセスが開発されている。多量の基質がバイオマスに変換され、生成物に向かう基質のわずかな流れだけをもたらしている(13)。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００８】

本発明は、高い生産性および保証された高い収率で所望の生成物を生成できる代謝操作された生物を提供することにより、上記の欠点を克服する(図１)。このことは、生物の代謝を２つの部分、すなわち１)いわゆる「生成部分」または「生成経路」と２)「バイオマスおよび補因子補充」部分または「バイオマスおよび/または生体触媒酵素形成経路」とに明確に分割することにより達成される。上記の２つの部分は、糖(sugar)を、ａ)活性化糖類(saccharide)とｂ)(非活性化)糖類とに分割することにより創出される。上記の糖類ａ)またはｂ)のそれぞれは、生成経路ａ)またはバイオマスおよび/もしくは生体触媒酵素形成経路ｂ)のいずれかの最初の前駆体であるかまたは前駆体であることができ、細胞におけるプル/プッシュ機構を可能にする。

【０００９】

実際に、細胞の主なゴールであるバイオマス合成は、活性化糖類または糖類をバイオマスに変換し、糖を分割する反応の平衡を、活性化糖類および糖類に向かってシフトさせる。このようにして、細胞の生命維持駆動力は、生成物経路のための引張り機構として作用する。この引張り効果は、バイオマス合成により創出される。なぜなら、このことにより、生成経路の最初の基質分子の蓄積が確実になり、これが、そのままでそして次に生成経路を押すことにもなるからである。この方策は、従来技術に記載されるような２段階生成方策において出現する生成速度の問題を解決する。さらに、糖部分の一部分を異化することにより、細胞には、特別のバイオ生成物の生成のために必要な補因子および必要とされるエネルギーの要件が常に供給される。本発明の方策は、よって、従来技術に記載されるような生体触媒生成において必要とされる補因子補充の問題も解決する。さらに、生成経路において必要な酵素は、本発明の操作方策により常に効率的に合成され、容易に維持される

【００１０】

さらに、本発明は、キイロタマホコリカビ(Dictyostellium discoideum)を起源とする2-フコシルトランスフェラーゼの、本発明の代謝操作された生物により2-フコシルラクトースを生成するための使用を開示する。

【図面の簡単な説明】

【００１１】

【図１】(a)本発明の生成技術において出現する通常の平衡反応、(b)プル/プッシュ原理：平衡は、糖類および活性化糖類に向かってシフトする。細胞の主なゴールは成長することであるので、これは、糖類(例えば)を引っ張ってバイオマスを形成し(「バイオマスおよび/または生体触媒酵素形成経路」)、生命維持の次に生成経路に必要な補因子を補充する。この引張り効果により、活性化糖類は、細胞内に蓄積し、生成経路を押す。

【図２】スクロースホスホリラーゼをコードするプラスミドを有する、最少培地上の大腸菌形質転換体の成長速度(略称は表２に示す)。

【図３】野生型株における計画される炭素の流れ。小さい矢印：代謝における反応を示す。太い矢印：増進されたまたは新規に導入された反応を示す。バツ印は、遺伝子のノックアウトまたは機能をより低くした遺伝子を示す。
【図４】基本株１における計画される炭素の流れ。基本株１におけるαグルコース-1-ホスフェート(αG1P)プールは、増加する。なぜなら、αG1Pを細胞成分に変換する主な反応が排除されるからである。小さい矢印：代謝における反応を示す。太い矢印：増進されたまたは新規に導入された反応を示す。バツ印は、遺伝子のノックアウトまたは機能をより低くした遺伝子を示す。
【図５】グルコース上で成長した野生型大腸菌MG1655 (WT)、スクロース上で成長した大腸菌MG1655 P22-BaSPおよびスクロース上で成長したプラグ株(plug strain) MG1655ΔglgCΔpgmΔlacZ P22-BaSPにおけるαグルコース-1-ホスフェートプール：振とうフラスコ実験および1.5 Lバッチ実験。
【図６】緩衝LB培地上でのΔpgmΔlacZΔglgC (3KO) P22-BaSPの培養中のスクロース、アセテートおよびバイオマス濃度の進展。
【図７】緩衝LB培地上でのΔpgmΔlacZΔglgC (3KO) P22-BaSPの培養中のαグルコース-1-ホスフェート、フラクトース、グルコースおよびピルベート濃度の進展。
【図８】セロビオース生成株ΔpgmΔlacZΔglgC (3KO) P22-BaSP-CuCPの概略図。
【図９】ΔpgmΔlacZΔglgCΔagp (4KO) P22-BaSP-CuCPのセロビオース生成および収率。高ホスフェートは、0.2 Mホスフェートのホスフェート濃度を示し、低ホスフェートは、13 mM ホスフェートの濃度を示す。
【図１０】基本株５から開始して、フコシル化糖誘導体、例えばフコシルラクトースおよびより具体的には 1,2-フコシルラクトースを生成できる。株は、細胞がGDP-フコースの合成における中間体であるフルコース(frucose)-6-ホスフェートを生成するように改変されている。グルコースまたはグルコース-1-ホスフェート(開始酵素がスクラーゼまたはスクロースホスホリラーゼのいずれかであるならば)は、次いで、ペントースリン酸経路を介して中心的な炭素代謝に供給される。図10は、生成物およびバイオマスに向かう経路と、これを達成するために必要とされるノックアウトとを示し、左の経路は、スクロースホスホリラーゼを用いる最適経路を示し、右の経路は、グルコキナーゼと組み合わせてインベルターゼを用いる最適経路を示す。
【図１１】pgm遺伝子の位置での野生型染色体の部分ゲノム配列。pgm遺伝子配列に、太字/斜体で印を付ける。
【図１２】pgm遺伝子の位置にて痕跡だけが残る変異株の部分ゲノム配列。痕跡配列に、太字/斜体で印を付ける。
【図１３】pgm遺伝子がGFPタンパク質配列の一部で置き換えられたpgm変異株の部分ゲノム配列。新しく導入した配列に、太字/斜体で印を付ける。
【図１４】pgm遺伝子がカナマイシンカセットで置き換えられたpgm変異株の部分ゲノム配列。新しく導入した配列に、太字/斜体で印を付ける。
【図１５】ビフィドバクテリウム・アドレセンティス(Bifidobacterium adolescentis)を起源とする異種スクロースホスホリラーゼで形質転換した野生型株、およびビフィドバクテリウム・アドレセンティスを起源とする異種スクロースホスホリラーゼとストレプトコッカス・ニューモニエ(Streptococcus pneumoniae)を起源とする異種遺伝子ttsとを有する変異株ΔpgmΔagpΔglgCΔlacZΔglkΔptsGについての多糖類加水分解後に放出されたグルコースの量。
【図１６】遺伝子型ΔlacZΔglgCΔagpΔptsGΔmalPQΔycjU pCXp22MPp22KPを有するコウジビオース生成株の経時的なコウジビオース、マルトースおよび光学密度の進展。
【図１７】スクロースベースの培地におけるΔpgiΔpfkAΔpfkB変異株の成長プロフィールおよびF6P蓄積。
【図１８】異なるグリコシルトランスフェラーゼファミリーからのフコシルトランスフェラーゼの系統樹(系統樹は、MCoffeeを用いて構築した(58))。
【図１９】キイロタマホコリカビ(Dictyostelium discoideum)およびヘリコバクター・ピ

ロリ(Helicobacter pylori)のフコシルトランスフェラーゼのアラインメント、色で印を付けたアミノ酸は、GTファミリー11の2-フコシルトランスフェラーゼ中で見いだされる保存モチーフである。赤色はモチーフ１を、青色はモチーフ２を、そして緑色はモチーフ３を示す(67)。

【図２０】フェノールレッドを用いるフコシルトランスフェラーゼアッセイのLC-MSの結果。上のクロマトグラムは、GDP-フコースを含まないブランクであり、下のものは、キイロタマホコリカビのフコシルトランスフェラーゼアッセイの試料である。2FLの13.5分のピークが、クロマトグラム中に現れた。

【図２１】部分的フコシルトランスフェラーゼ酵素の2-フコシルラクトースLC MSMS分析。上のクロマトグラムは、2-フコシルラクトースの100mg/l標準物質を示し、下のクロマトグラムは、酵素アッセイの2-フコシルラクトースピークを示す。この分析において、2-フコシルラクトースの質量だけが、質量分析計を用いて走査された。

【発明を実施するための形態】

【００１２】

本発明は、付加価値バイオ生成物を高い生産性および保証された高い収率で生成できる代謝操作された生物、特に微生物を開示する。本発明の生物は、生成物と成長/バイオマスとに導く２つの異なる経路が構築されるように代謝的に操作されている。このことは、「バイオマスおよび/または生体触媒酵素および/または補因子補充部分」からの代謝物を、「生成物経路」部分からの代謝物に、そしてその逆に変換する反応を触媒する酵素の活性を低減または排除することにより、例えば生成物経路中間体をバイオマス前駆体に変換する反応を行う酵素をコードする少なくとも１つ、いくつかまたは全ての遺伝子を低減または排除/ノックアウトすることにより、かつ/あるいは生成物経路中間体を分解する反応を行う酵素をコードする少なくとも１つ、いくつかまたは全ての遺伝子を低減または排除/ノックアウトすることにより、達成される。さらに、これらの代謝的/遺伝子的変化は、操作された細胞の成長を損なわない。例えば、炭水化物加水分解酵素を、炭水化物キナーゼ、炭水化物合成酵素および炭水化物ホスホリラーゼと組み合わせて細胞に導入できる。後者の酵素は、糖部分および活性化糖部分(例えばリン酸化糖類部分、UDP、CMP、GDP、ADP、TDPまたはdTDPなどにより活性化された糖部分)中に糖類、オリゴ糖類、多糖類またはそれらの混合物を含む基質を変換する。細胞のさらなる代謝操作は、活性化糖部分から開始してバイオマス構成要素に向かう経路をブロックすることを含む。このようにして、(非活性化)糖部分が「燃料」(またはエネルギー源)ならびにバイオマス、所望の生成物(=例えば特別の炭水化物)への活性化糖部分の変換を行う多数の生体触媒酵素および必要な補因子(NADH、ATP、UTPなど)の合成のための基礎単位として用いられる。逆に、活性化糖部分は「燃料」として用いることもできるが、糖部分は炭水化物キナーゼにより活性化され、所望の特別の生成物の生成経路に向かって「押される」。

【００１３】

本発明の操作された生物を用いて、活性化糖の変換による生成物の形成は、他の糖部分により燃料補給される(またはその逆)成長と連結できる。このようにして、増殖のための細胞の自然な駆動は、所望のバイオ生成物の生成を押すための資産として用いられる。このことは、バイオ生成物の実際の生成が始まる前にバイオマスを生成しなければならない以前の問題点 が、本発明において利点に変わることを意味する。この方法論により、多重酵素系および２段階発酵系に伴う固有の問題点なしで高い生産速度が得られる。さらに、本発明の生物は、高い速度での成長またはバイオマス生成と、所望の生成物の生成との両方のために上記のような同じ基質を用いることができ、この代謝操作方策の背後にある全体的な原理は、よって、上でも説明するようなプル/プッシュ原理である。バイオマスおよび補因子に導く中心的炭素代謝は、糖部分の一部分を成長のために引張り、その他の部分は、細胞に蓄積し、生成物経路を押す。

【００１４】

後者のアプローチは、所望の特別の炭水化物または活性化炭水化物を生成するためだけに用いることはできないが、広い範囲のグリコシル化化合物、例えば糖類、ヌクレオシド

、グリコシルホスフェート、糖タンパク質および糖脂質の合成に用いることもできる。

【００１５】

複数の開始酵素を細胞に導入して、遺伝子ノックアウトと組み合わせて代謝を２つの部分に分割できる。糖を活性化糖類および糖類に分割するために用いることができる酵素の非限定的な例は、スクロースホスホリラーゼ、スクロース合成酵素、グルコキナーゼおよび/またはフルクトキナーゼと組み合わせたスクラーゼ(インベルターゼ)、グルコキナーゼと組み合わせたトレハラーゼ、グルコキナーゼと組み合わせたマルターゼ、フルクトキナーゼと組み合わせたスクロース-6-ホスフェート加水分解酵素、マルトースホスホリラーゼ、マルトース合成酵素、ホスホリラーゼもしくは合成酵素もしくは加水分解酵素と組み合わせたアミラーゼ、ラクトース合成酵素、ラクトースホスホリラーゼ、ガラクトキナーゼおよび/またはグルコキナーゼと組み合わせたラクターゼ(またはベータ-ガラトシダーゼ)である。

【００１６】

本発明は、

a) 生物が、少なくともi)炭水化物キナーゼをコードする遺伝子と組み合わせた炭水化物加水分解酵素をコードする遺伝子、ii)炭水化物合成酵素をコードする遺伝子、またはiii)炭水化物ホスホリラーゼをコードする遺伝子の導入により遺伝子改変されていることにより、前記生物が、二糖類、オリゴ糖類、多糖類またはそれらの混合物を活性化糖類と糖類とに分割でき、

b)生物が、前記生物のステップa)で導入される遺伝子のいずれでもない少なくとも１つの他の遺伝子の機能が低下するかまたは非機能的になるようにさらに遺伝子改変され、前記他の遺伝子が、活性化糖類をバイオマスおよび/または生体触媒酵素に変換する酵素をコードする

ことを特徴とする、糖類、活性化糖類、ヌクレオシド、グリコシド、糖脂質および糖タンパク質からなる群より選択される少なくとも１つの特別の生成物の生成のための代謝操作された生物に関する。

【００１７】

用語「糖類」は、単糖類、例えばそれらに限定されないが、カルボニル、カルボキシル、アミノ基のいずれかを有するかもしくは有さないか、またはヒドロキシル基が、それらに限定されないが水素、アミノ、チオール、ホスフェートおよび/もしくは同様の基またはこれらの基の誘導体で置き換えられているアルドース、ケトース、ペントース、メチルペントース、ヘキソース、ポリオールに関する。用語「糖類」は、互いにグリコシド結合で連結された上記のような１以上の単糖類で構成された二糖類、オリゴ糖類および多糖類にも関する。

【００１８】

用語「ヌクレオシド」は、例えばそれらに限定されないがUDP、GDP、ADP、TDP、CMPまたはdTDPであるヌクレオチドで置換された各単糖類に関する。

【００１９】

用語「グリコシド」は、他の化学的化合物、例えばそれらに限定されないが、ステロール、フェノール、脂肪酸、ホスファチジルイノシトール、ビタミンＣ、カロテノイド(carotenoides)およびアルテミシニン(artimisinine)とグリコシド結合を形成している糖類に関する。

【００２０】

用語「糖脂質」は、脂肪酸または脂質とグリコシド結合を形成している糖類に関する。

【００２１】

用語「糖タンパク質」は、タンパク質とグリコシド結合を形成している糖類に関する。

【００２２】

用語「グリコシルホスフェート」は、リン酸化糖類に関する。

【００２３】

本発明は、上記の生物が、上記の活性化糖類を特別の生成物に変換する少なくとも１つ

の他の遺伝子の導入によりさらに遺伝子改変されているか、または上記の活性化糖類を特別の生成物に変換する上記の生物の少なくとも１つの他の内因性遺伝子が、過剰発現されている、上記の生物にさらに関する。

【００２４】

さらに、本発明は、上記の生物が、主な炭素源として二糖類、オリゴ糖類、多糖類またはそれらの混合物上で成長できる、上記の生物に関する。用語「主な」は、バイオマス形成のために最も重要な炭素源を意味し、すなわち要求される全ての炭素の75、80、85、90、95、98、99%が、上記の炭素源に由来することを意味する。本発明の一実施形態において、上記の炭素源は、上記の生物にとって唯一の炭素源であり、すなわち、要求される全ての炭素の100%が、上記の炭素源に由来する。

【００２５】

用語「代謝操作される」は、ある所望の物質または生成物の生物による生成を増加させるように、上記の生物内での遺伝子および調節プロセスを最適化することをいう。後者の生成物は、これにより「特別の生成物」と呼ばれ、所望の糖類(活性化または非活性化)、ヌクレオシド、グリコシド、糖脂質または糖タンパク質に具体的に関する。このような生成物のいくつかの非限定的な例は、糖誘導体、例えば1,2-フコシルラクトース、1,3-フコシルラクトース、1,4-フコシルラクトース、1,6-フコシルラクトース、ガラクチノール、スタキオース、グロボトリオース、ガラクトース(ベータ1-4)ラムノース、ソホロース、セロビオース、UDP-グルコース、ソホロリピド、ミオ-イノシトール、L-アラビノース、シロ-イノソース、グリコシルホスファチジルイノシトール、ラクト-N-ビオース、ラクト-N-テトラオース、ラクトサミン、フコシル化ガラクトシルオリゴ糖類、L-フコース、N-Acグルコサミン、シアル酸、シアリルラクトース、キトサンおよびキチンである。

【００２６】

用語「操作される(する)」は、例えば(9，17，19，21，22，42)に記載されるような、生物を遺伝子改変するために用いることができる任意の公知の技術に関する。

【００２７】

用語「主な炭素源として二糖類、オリゴ糖類、多糖類またはそれらの混合物上で成長できる生物」は、本発明の生物が、成長(またはバイオマス生成)および所望の生成物の生成の両方のために同じ二糖類、オリゴ糖類、多糖類またはそれらの混合物を用いることができ、これらが、後者の糖類を、増殖するためおよび/または代謝的に活性になるための唯一の炭素源として用いることができることを意味する。簡単に言うと、本発明の生物は、上記の糖類を唯一の炭素源として含む培地中または培地上で増殖および代謝できる。

【００２８】

用語「活性化糖類および糖類に分割する(または変換)」は、炭素源として用いられる後者の糖類が、本発明の生物により、活性化糖部分(活性化糖部分のいくつかの非限定的な例は、ホスフェート、UDP、GDP、ADP、TDPまたはdTDP基を有する糖部分である)および非活性化糖部分(後者の基を有さないかまたは後者の基に結合していない)に分割される(または変換される)ことを意味する。

【００２９】

用語「生体触媒酵素」は、特別の炭水化物の生成に必要とされる全ての酵素のことを言う。

【００３０】

用語「バイオマス」は、全ての細胞成分のことをいう(すなわち改変された特別の炭水化物生成株において、特別の炭水化物(および他の付加価値生成物)生成経路に用いられない糖部分から合成できるタンパク質、DNA、RNA、ホスファチジルセリン，ホスファチジルエタノールアミン、カルジオリピン、ホスファチジルグリセロール、プトレシン、スペルミジン、ペプチドグリカン、グリコーゲンおよび/またはリポ多糖類(63))。

【００３１】

用語「機能が低下するかまたは非機能的にされた遺伝子」は、遺伝子が、機能的最終生成物を生成する能力がより低い(すなわち機能的野生型遺伝子と比較して統計学的に有意

に能力がより低い)かまたは完全に生成できない(例えばノックアウト遺伝子)ように遺伝子を変化させるために用いられる、当業者に公知の技術(例えばsiRNA、RNAi、miRNA、asRNA、変異遺伝子、ノックアウト遺伝子、トランスポゾン突然変異誘発など)のことをいう(2，4，5，7，8，14，19，37，40，47，73，79，80，85，93，98)。

用語「(遺伝子)ノックアウト」は、よって、非機能的にされた遺伝子のことをいう。

【００３２】

用語「多糖類」は、６以上の単糖類サブユニットを含有する糖類のことをいう。

【００３３】

本発明は、ステップa)の遺伝子改変が任意選択であるか、または少なくともi)炭水化物キナーゼをコードする内因性もしくは異種遺伝子と組み合わせた炭水化物加水分解酵素をコードする内因性遺伝子、ii)炭水化物合成酵素をコードする内因性遺伝子もしくはiii)炭水化物ホスホリラーゼをコードする内因性遺伝子を過剰発現することで置き換えられ、上記の生物が、二糖類、オリゴ糖類、多糖類またはそれらの混合物を活性化糖類と糖類とに分割できる、上記の代謝操作された生物にさらに関する。

【００３４】

本発明の好ましい炭水化物加水分解酵素は、ラクターゼ、インベルターゼ、スクロース、トレハラーゼ、スクロース-6-ホスフェート加水分解酵素、マルターゼまたはアミラーゼである。本発明の好ましい炭水化物キナーゼは、ガラクトキナーゼ、フルクトキナーゼ、グルコキナーゼまたはマンノキナーゼである。

【００３５】

本発明は、ステップb)の上記の活性化糖類が、上記の糖類で置き換えられた、上記の代謝操作された生物にさらに関する。よって、本実施形態における「活性化糖部分」は、「燃料」として用いられるが、「糖部分」は、キナーゼにより活性化され、所望の特別の生成物の生成経路に向かって押される。

【００３６】

本発明は、ステップa)の上記の遺伝子が、二糖類、オリゴ糖類または多糖類を、２つの同様もしくは異なる活性化糖類または２つの同様もしくは異なる糖類に分割する、上記の代謝操作された生物にも関する。

【００３７】

上記の用語「生物」は、細菌、酵母もしくは真菌細胞からなるリストから選択される微生物のことをいうか、または植物もしくは動物細胞のことをいう。後者の細菌は、好ましくは、大腸菌の種に属する。後者の酵母は、好ましくは、サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cereviseae)の種に属する。

【００３８】

より具体的には、本発明は、上記の活性化糖類が、アルファグルコース-1-ホスフェート、アルファガラクトース-1-ホスフェート、ベータグルコース-1-ホスフェート、ベータガラクトース-1-ホスフェート、フラクトース-6-ホスフェート、グルコース-6-ホスフェート、UDP-グルコースおよびUDP-ガラクトースからなる群より選択され、上記の糖類が、フラクトース、グルコースおよび/またはガラクトースからなる群より選択される、上記の代謝操作された生物に関する。

【００３９】

本発明は、上記のように、上記の炭水化物加水分解酵素が、ラクターゼ、インベルターゼ、スクラーゼ、マルターゼ、トレハラーゼ、スクロース-6-ホスフェート加水分解酵素および/またはアミラーゼであり、上記の炭水化物キナーゼが、ガラクトキナーゼ、フルクトキナーゼ、グルコキナーゼおよび/またはマンノキナーゼである、上記の代謝操作された生物にさらに関する。

【００４０】

さらにより具体的には、本発明は、

- ステップa)の上記の遺伝子が、スクロースホスホリラーゼをコードし、かつ/または
- ステップb)の以下の遺伝子：ベータ-ガラクトシダーゼをコードする遺伝子および/もし

くはホスホグルコムターゼをコードする遺伝子および/もしくはグルコース-1-ホスフェートアデニリルトランスフェラーゼをコードする遺伝子および/もしくはホスファターゼ(例えば、限定されないが、グルコース-1-ホスファターゼ)をコードする遺伝子および/もしくはグルコース-1-ホスフェートウリジルトランスフェラーゼをコードする遺伝子および/もしくはUDP-グルコース-4-エピメラーゼをコードする遺伝子および/もしくはUDP-グルコース:ガラクトース-1-ホスフェートウリジルトランスフェラーゼをコードする遺伝子および/もしくはUDP-ガラクトピラノースムターゼをコードする遺伝子および/もしくはUDP-ガラクトース:(グルコシル)リポ多糖-1,6-ガラクトシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子および/もしくはUDP-ガラクトシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子および/もしくはUDP-グルコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子および/もしくはUDP-グルクロネートトランスフェラーゼをコードする遺伝子および/もしくはUDP-グルコースリピドキャリアトランスフェラーゼをコードする遺伝子および/もしくはUDP-糖加水分解酵素をコードする遺伝子および/もしくはインベルターゼをコードする遺伝子および/もしくはマルターゼをコードする遺伝子および/もしくはトレハラーゼをコードする遺伝子および/もしくは糖輸送ホスホトランスフェラーゼをコードする遺伝子および/もしくはヘキソキナーゼをコードする遺伝子が非機能的にされる、
上記の代謝操作された生物に関する。

【００４１】

後者の代謝操作された生物の例は、
- ステップa)の上記の遺伝子が、乳酸菌、例えばビフィドバクテリウム・アドレセンティス、ロイコノストック・メセンテロイデス(Leuconostoc mesenteroides)、ラクトバチルス・アシドフィラス(Lactobacillus acidophilus)および/もしくはストレプトコッカス・ミュータンス(Streptococcus mutans)を起源とする可能性がある(しかしそれだけでない)スクロースホスホリラーゼをコードする遺伝子であり、かつ/または
- ステップb)の上記の遺伝子が、遺伝子lacZ、遺伝子pgm、遺伝子ycjU、遺伝子glgC、遺伝子agp、遺伝子ptsG、遺伝子glk、遺伝子glf、遺伝子waaB、遺伝子ushA、遺伝子wcaA、遺伝子wcaC、遺伝子wcaE、遺伝子wcaI、遺伝子wcaL、遺伝子wcaJ、遺伝子galU、遺伝子galF、遺伝子galE、遺伝子malP、遺伝子malQおよび/もしくは遺伝子galTである(20, 25, 27, 28, 32, 46, 48, 49, 52, 54, 62, 82, 86, 87, 96, 97)
生物である。

【００４２】

上記の代謝操作された生物の別の例は、
- ステップa)の上記の遺伝子が、乳酸菌、例えばビフィドバクテリウム・アドレセンティス、ロイコノストック・メセンテロイデス、ラクトバチルス・アシドフィラスおよび/もしくはストレプトコッカス・ミュータンスを起源とする可能性がある(しかしそれだけでない)スクロースホスホリラーゼをコードし、かつ/または
- ステップb)の上記の遺伝子が、遺伝子PGM1、遺伝子PGM2、遺伝子GLG1、遺伝子GLG2、遺伝子INM1、遺伝子INM2、遺伝子GLK1、遺伝子HXK1、遺伝子HXK2、遺伝子GAL10、遺伝子GAL7、遺伝子YHL012W、遺伝子UGP1、遺伝子GSY1、遺伝子GSY2、遺伝子DIE2、遺伝子ALG8、遺伝子ATG26、遺伝子SUC2、遺伝子MAL32、遺伝子MAL12、遺伝子YJL216Cおよび/もしくは遺伝子YGR287Cおよび/もしくはFEN1および/もしくはFKS1および/もしくはGSC2および/もしくはTPS1である(10, 12, 15, 16, 18, 24, 30, 31, 36, 41, 51, 56, 57, 59, 61, 66, 76, 81, 84, 89-91, 99)
生物である。

【００４３】

後者の操作された生物は、例えば、それらに限定されないが、セロビオース、コウジビオース、トレハロース(threhalose)、L-アラビノース、ミオ-イノシトール、ラフィノース、スタキオース、L-ラムノースまたはL-リボースを特別の生成物として生成するために用いることができる。

【００４４】

本発明のさらなる態様は、ステップa)の上記のスクロースホスホリラーゼが、スクロース合成酵素、マルトースホスホリラーゼもしくはマルトース合成酵素で置き換えられるか、またはステップa)の上記のスクロースホスホリラーゼが、ラクトースホスホリラーゼもしくはラクトース合成酵素で置き換えられる、上記の代謝操作された生物に関する。

後者の生物は、例えば、それらに限定されないが、ソホロース、UPD-グルコース、糖脂質、フラボン3-O-β-D-グルコシド(ステップaにおいてスクロース合成酵素)、ガラクトース(ベータ1-4)ラムノース(ステップaにおいてラクトースホスホリラーゼ)または UDP-ガラクトース、ガラクチノール、スタキオースまたはグロボトリオース、サイコシン(ステップaにおいてラクトース合成酵素)を特別の生成物として生成するために用いることができる。

【００４５】

本発明は、ステップb)の上記の活性化糖類が、上記の糖類で置き換えられ、

- ステップa)の上記の遺伝子が、スクロースホスホリラーゼをコードし、かつ/または
- ステップb)の以下の遺伝子：ベータ-ガラクトシダーゼをコードする遺伝子および/もしくはグルコース-6-ホスフェートイソメラーゼをコードする遺伝子および/もしくはグルコース-1-ホスフェートアデニリルトランスフェラーゼをコードする遺伝子および/もしくはホスファターゼ(例えばグルコース-1-ホスファターゼ)をコードする遺伝子および/もしくはホスホフルクトキナーゼAをコードする遺伝子および/もしくはホスホフルクトキナーゼBをコードする遺伝子および/もしくはホスホグルコネート脱水酵素をコードする遺伝子および/もしくは2-ケト-3-デオキシグルコネート-6-ホスフェート アルドラーゼをコードする遺伝子および/もしくはグルコース-1-ホスフェートウリジルトランスフェラーゼをコードする遺伝子および/もしくはUDP-グルコース-4-エピメラーゼをコードする遺伝子および/もしくはUDP-グルコース:ガラクトース-1-ホスフェートウリジルトランスフェラーゼをコードする遺伝子および/もしくはUDP-ガラクトピラノースムターゼをコードする遺伝子および/もしくはUDP-ガラクトース:(グルコシル)リポ多糖-1,6-ガラクトシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子および/もしくはUDP-ガラクトシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子および/もしくはUDP-グリコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子および/もしくはUDP-グルクロネートトランスフェラーゼをコードする遺伝子および/もしくはUDP-グルコースリピドキャリアトランスフェラーゼをコードする遺伝子および/もしくはGDP-マンノース加水分解酵素をコードする遺伝子および/もしくはUDP-糖加水分解酵素をコードする遺伝子および/もしくはマンノース-6-ホスフェートイソメラーゼをコードする遺伝子および/もしくはUDP-N-アセチルグルコサミンエノイルピルボイルトランスフェラーゼをコードする遺伝子および/もしくはUDP-Nアセチルグルコサミンアセチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子および/もしくはUDP-N-アセチルグルコサミン-2-エピメラーゼをコードする遺伝子および/もしくはウンデカプレニル-ホスフェート-アルファ-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼをコードする遺伝子および/もしくはグルコース-6-ホスフェート-1-脱水素酵素をコードする遺伝子および/もしくはL-グルタミン:D-フラクトース-6-ホスフェートアミノトランスフェラーゼをコードする遺伝子および/もしくはマンノース-6-ホスフェートイソメラーゼをコードする遺伝子および/もしくはソルビトール-6-ホスフェート脱水素酵素をコードする遺伝子および/もしくはマンニトール-1-ホスフェート5-脱水素酵素をコードする遺伝子および/もしくはアルロース-6-ホスフェート3-エピメラーゼをコードする遺伝子および/もしくはインベルターゼをコードする遺伝子および/もしくはマルターゼをコードする遺伝子および/もしくはトレハラーゼをコードする遺伝子および/もしくは糖輸送ホスホトランスフェラーゼをコードする遺伝子および/もしくはヘキソキナーゼをコードする遺伝子が非機能的にされる、

上記の代謝操作された生物にさらに関する。

【００４６】

より具体的には、本発明は、

-ステップa)の上記の遺伝子が、乳酸菌、例えばビフィドバクテリウム・アドレセンティス、ロイコノストック・メセンテロイデス、ラクトバチルス・アシドフィラスもしくはス

トレプトコッカス・ミュータンスを起源とするスクロースホスホリラーゼであり、かつ/または
- ステップb)の上記の遺伝子が、遺伝子lacZ、遺伝子pgi、遺伝子glgC、遺伝子agp、遺伝子pfkA、遺伝子pfkB、遺伝子waaB、遺伝子ushA、遺伝子eda、遺伝子edd、遺伝子wcaA、遺伝子wcaC、遺伝子wcaE、遺伝子wcaI、遺伝子wcaL、遺伝子wcaJ、遺伝子wcaB、遺伝子wcaF、遺伝子wcaK、遺伝子wcaD、遺伝子galU、遺伝子galF、遺伝子galE、遺伝子gmm、遺伝子galT、遺伝子manA、遺伝子murA、遺伝子lpxA、遺伝子rffEおよび/もしくは遺伝子rfe、遺伝子glmS、遺伝子 srlD、遺伝子mtlD、遺伝子alsEおよび/もしくはzwfである(6, 20, 25, 28, 29, 32, 43, 44, 46, 49, 52-55, 62, 65, 75, 78, 82, 86, 87, 96, 97, 101)、
上記の代謝操作された生物に関する。

【００４７】

本発明による別の代謝操作された生物は、
-ステップa)の上記の遺伝子が、乳酸菌、例えばビフィドバクテリウム・アドレセンティス、ロイコノストック・メセンテロイデス、ラクトバチルス・アシドフィラスもしくはストレプトコッカス・ミュータンスを起源とするスクロースホスホリラーゼをコードする遺伝子であり、かつ/または
- ステップb)の上記の遺伝子が、遺伝子PGI1、遺伝子PFK1、遺伝子PFK2、遺伝子PFK26、遺伝子PFK26、遺伝子PFK27、遺伝子GND1、遺伝子GND2、遺伝子PMI40、遺伝子ZWF1、遺伝子GFA1、遺伝子GLG1、遺伝子GLG2、遺伝子INM1、遺伝子INM2、遺伝子GLK1、遺伝子HXK1、遺伝子HXK2、遺伝子GAL10、遺伝子GAL7、遺伝子YHL012W、遺伝子UGP1、遺伝子GSY1、遺伝子GSY2、遺伝子DIE2、遺伝子ALG8、遺伝子ATG26、遺伝子SUC2、遺伝子MAL32、遺伝子MAL12、遺伝子YJL216Cおよび/もしくは遺伝子YGR287Cおよび/もしくはFEN1および/もしくはFKS1および/もしくはGSC2および/もしくはTPS1である(12, 15, 16, 24, 26, 30, 31, 34, 36, 38, 39, 41, 51, 56, 57, 59-61, 64, 66, 74, 76, 83, 84, 89, 90, 95, 99)
生物である。

【００４８】

後者の操作された生物は、例えば、フコシル化糖誘導体、例えばフコシルラクトース、より具体的にはα-1,2-フコシルラクトース、α-1,3-フコシルラクトース、α-1,4-フコシルラクトース、α-1,6-フコシルラクトースを、特別の生成物として、例えば、それらに限定されないが、ヘリコバクター・ピロリ、バクテロイデス種(Bacteroides sp.)、ヒト(Homo sapiens)、マウス(Mus musculus)、ウシ(Bos taurus)およびキイロタマホコリカビを起源とする特定のフコシルトランスフェラーゼを用いて生成するために用いることができる。さらに、上記の操作された生物は、キトサンを、キチン合成酵素およびキチン脱アセチル化酵素により生成するか、またはミオ-イノシトールを、イノシトール-1-ホスフェート合成酵素をイノシトールモノホスファターゼと組み合わせて導入することにより生成するために用いることができる。

【００４９】

上記の活性化糖類を特別の生成物に変換する遺伝子の具体例は、エピメラーゼ、トランスフェラーゼ、還元酵素、(ピロ)ホスホリラーゼ、(デ)カルボキシラーゼ、脱水酵素、パーミアーゼ、合成酵素および/またはイソメラーゼをコードする遺伝子である。よって、本発明は、上記の活性化糖類を特別の生成物に変換する遺伝子が、エピメラーゼ、トランスフェラーゼ、還元酵素、脱水素酵素、酸化酵素、ピロホスホリラーゼ、(デ)カルボキシラーゼ、脱水酵素、パーミアーゼ、合成酵素および/またはイソメラーゼをコードする、上記の代謝操作された生物に関する。本発明は、さらにより具体的に、上記のエピメラーゼが、UDP-ガラクトース-4-エピメラーゼもしくはUDP-N-アセチルグルコサミンエピメラーゼであり、かつ/または上記のトランスフェラーゼが、グリコシルトランスフェラーゼ、シアリルトランスフェラーゼもしくはスルホトランスフェラーゼである、後者の代謝操作された生物に関する。

【００５０】

本発明は、さらに、上記の特別の生成物が、単糖類、二糖類、三糖類、四糖類、五糖類

、オリゴ糖類、多糖類、ヌクレオシド、O-グリコシド、S-グリコシド、N-グリコシド、C-グリコシド、糖タンパク質、糖脂質または活性化炭水化物、例えば、それらに限定されないが、ミオ-イノシトール、L-アラビノース、シロ-イノソース、グリコシルホスファチジルイノシトール、ラクト-N-ビオース、ラクト-N-テトラオース、ラクトサミン、フコシル化ガラクトシルオリゴ糖類(GOS) 、L-フコース、N-Acグルコサミン、シアル酸、シアリルラクトース、キトサン、キチン、1,2-フコシルラクトース、1,3-フコシルラクトース、1,4-フコシルラクトース、1,6-フコシルラクトース、ガラクチノール、スタキオース、グロボトリオース、ガラクトース(ベータ1-4)ラムノース、ソホロース、セロビオース、UDP-グルコースおよびソホロリピドである、上記の代謝操作された生物に関する。

【００５１】

本発明は、さらに、

i)微生物を上記のようにして代謝的に操作することと、

ii)上記の代謝操作された微生物を培養することと、

iii)特別の生成物を抽出して精製することと

を含む、上記の特別の生成物を生成する方法に関する。

微生物を培養するため、および上記の培養物から特別の生成物を抽出および精製するために、当該技術において知られる任意の方法を本発明において用いることができることが明確である。

【００５２】

さらに、本発明は、キイロタマホコリカビを起源とし、配列番号１に示すアミノ酸配列を有する2-フコシルトランスフェラーゼ、または2-フコシルトランスフェラーゼ活性を有するその断片、または少なくとも75%の配列同一性を有し、2-フコシルトランスフェラーゼ活性を有するそのバリアントの、2-フコシルラクトース(α1,2-フコシルラクトース)を生成するための使用に関する。上記の2-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する具体的な断片を、配列番号４に示す。

【００５３】

上記の2-フコシルトランスフェラーゼをコードする核酸、具体的には、配列番号２または配列番号３(これらはともに配列番号１をコードする)に示す核酸の、フコシルラクトースを生成するための使用は、本発明の一部である。配列番号４をコードする核酸を、配列番号５および配列番号６に示し、これらも本発明の一部である。

用語「断片」は、配列番号１に示すアミノ酸配列よりも少ないアミノ酸を含有し、上記の2-フコシルトランスフェラーゼ活性を保持するタンパク質(またはペプチドまたはポリペプチド)のことをいう。このような断片は、例えば、Ｃおよび/もしくはＮ末端にてアミノ酸の総数の10%以下の欠失を有するタンパク質であり得るか、配列番号４に相当し得る。用語「バリアント」は、配列番号１またはその断片と少なくとも75%の配列同一性、好ましくは少なくとも76～85%の配列同一性、より好ましくは少なくとも86～90%の配列同一性、最も好ましくは少なくとも91、92、93、94、95、96、97、98もしくは99%の配列同一性を有するタンパク質、および上記の2-フコシルトランスフェラーゼ活性を保持するタンパク質をコードするもののことをいう。

【００５４】

よって、少なくとも75%の同一性をアミノ酸レベルで有し、記載される機能を有するオルソログまたは(配列番号１が由来するキイロタマホコリカビ以外の)他の属および種における遺伝子は、本発明の一部である。アミノ酸配列同一性のパーセンテージは、２つの配列のアラインメント、および配列が短いほうのアミノ酸の数で除した同一アミノ酸の位置の数×100の同定により決定される。後者の「バリアント」は、配列番号１に示すタンパク質から保存置換および/または改変だけが異なって、2-フコシルトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質の能力は保持されることもできる。「保存置換」は、アミノ酸が、同様の特性を有する別のアミノ酸で置換されて、タンパク質化学における当業者が、タンパク質の性質が実質的に変化しないと予期できるものである。一般的に、以下のアミノ酸の群は、保存変化を表す：(1) ala、pro、gly、glu、asp、gln、asn、ser、thr; (2) cys

、ser、tyr、thr; (3) val、ile、leu、met、ala、phe; (4) lys、arg、his;および(5) phe、tyr、trp、his。

【００５５】

バリアントは、例えば、上記の2-フコシルトランスフェラーゼ活性、２次構造および酵素の水治療(hydropathic)の性質に対して最小限の影響を有するアミノ酸の欠失または付加により改変された本明細書に記載するタンパク質でもあり得る(または代わりに該タンパク質であり得る)。

【００５６】

以下の具体的な配列は、上記のように、本発明の一部である。

配列番号１：キイロタマホコリカビの2-フコシルトランスフェラーゼの完全アミノ酸配列：

【化１】

MNDSPIISVVLPFLIKDNDDKSLNYQGINNLIISIDSIIEQTFKEWELILVDDGSNNEILEQLLS
KRYSTDNRIKFIINKENKGIVKSLNDAILNHCSPTSKYIARMDSDDISHPTRLQSQLKYLQS
NETIDILGCPIKMFNNNKLIEILNNNNNNNNNINNNVKELINIINNEESFKFIQHPDKDILMWSM
FFNCCIVHPSVIFKRSIFTIEHCYEENNQFPFIEDYLFWLKSLIMKGLNISNIQSSTPLLYLRK
HNNSISFKNIEKQKDSTANASCYYLNILFKRFNIDSEIIQNSSLSMKEIIQFFQLSPSSLSKIN
NISIELFEFAFKYLELIEKSCTKQQPNYSNSIKDAANEKMGELVSLCLSNYPNNQKSSLLW
EKWLSRNPTSQLLSLLSNLNVKSSTTIINNNINNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NSILNFISGINSNKINTPKSNNNKFKENGIRIICFSKDRAFQLKEYLRTFFKYLKNDDNGNDK
FEIIVDVLFTYSNEKFKNSYQLVIESFPQVNFIKEENFTDQLINLVQKTNKLEYVMFSVDDIL
YYNEFNLKEYCLSLNSEPLALGFYMKLNKNITYCHTCNQDITIPLNSNTISRTENNFKYLK
WNRNDNDCKKDWNYPWDLCSTIYRCNDIDSIINGIVKYYGIRNGINHPNRFEFNGNRPIIQ
KQIYQNKPYCLCLSDHYSPMSVVTINRVQDVYDNPIYDQTLSLDDLDQLLYSNKSLNDEK
YKENSLSLNFKSVHIGELFIS

【００５７】

配列番号２：大腸菌における発現のための配列番号１をコードするコドン最適化ヌクレオチド配列：

【化２】

ATGAACGATAGCCCGATTATTAGCGTTGTTCTGCCGTTTCTGATCAAAGATAACGATG
ATAAAAGCCTGAACTACCAGGGCATTAACAACCTGATTATTAGCATCGATAGCATCAT
CGAGCAGACCTTTAAAGAATGGGAACTGATTCTGGTTGATGATGGCAGCAATAACGA
AATTCTGGAACAGCTGCTGAGCAAACGTTATAGCACCGATAACCGCATCAAATTTATT
ATTAATAAAGAAAATAAAGGCATTGTGAAAAGCCTGAATGATGCCATTCTGAATCATT
GTAGCCCGACCAGCAAATATATTGCACGTATGGATAGCGACGATATTAGCCATCCGA
CCCGTCTGCAGAGCCAGCTGAAATATCTGCAGAGCAATGAAACCATTGATATTCTGG
GTTGCCCGATCAAAATGTTTAATAATAATAAACTGATTGAAATTCTGAATAATAATAAC
AATAACAACAATATTAATAATAATGTGAAAGAACTGATTAATATTATTAATAATGAAGAA
AGCTTTAAATTTATTCAGCATCCGGATAAAGATATTCTGATGTGGTCCATGTTCTTCAA
TTGCTGTATTGTTCATCCGAGCGTGATTTTTAAACGCAGCATTTTTACCATCGAGCAC
TGCTATGAAGAGAATAATCAGTTTCCGTTCATCGAGGATTACCTGTTTTGGCTGAAAT
CCCTGATTATGAAAGGCCTGAACATTAGCAATATCCAGAGCAGCACACCGCTGCTGT
ATCTGCGTAAACATAATAACAGCATTAGCTTTAAAAATATTGAAAAACAGAAAGATAGC
ACCGCCAATGCCAGCTGTTATTATCTGAACATTCTGTTCAAACGCTTTAACATCGACA
GCGAAATTATTCAGAATAGCAGCCTGAGCATGAAAGAAATCATCCAGTTTTTTCAGCT
GAGCCCGAGCAGCCTGTCCAAAATTAATAACATTAGCATCGAACTGTTTGAATTTGCC
TTTAAATATCTGGAACTGATCGAGAAAAGCTGTACCAAACAGCAGCCGAATTATAGCA
ACAGCATTAAAGATGCAGCCAACGAAAAAATGGGTGAACTGGTTAGCCTGTGTCTGA
GCAATTATCCGAATAATCAGAAAAGCAGTCTGCTGTGGGAAAAATGGCTGAGCCGTA
ATCCGACCAGCCAGCTGCTGAGTCTGCTGAGCAATCTGAATGTTAAAAGCAGCACCA
CCATTATTAATAACAATATTAACAACAACAATAATAATAACAACAATAATAACAATAACA
ATAACAATAATAACAACAACAACAATAATAATAATAACAACAACAGCATTCTGAATTTT
ATTAGCGGCATTAATAGCAATAAAATTAATACCCCGAAAAGCAACAATAACAAATTTAA
AGAGAATGGCATTCGCATTATTTGCTTCAGCAAAGATCGTGCATTCCAGCTGAAAGAA
TATCTGCGCACCTTCTTCAAATATCTGAAAAATGATGATAATGGCAATGATAAATTTGA
AATTATTGTGGATGTGCTGTTTACCTATAGCAATGAAAAATTCAAAAATAGCTATCAGC
TGGTGATCGAAAGCTTTCCGCAGGTTAACTTTATTAAAGAAGAAAACTTTACCGATCA
GCTGATTAACCTGGTGCAGAAAACCAACAAACTGGAATATGTGATGTTCAGCGTGGA
TGATATCCTGTATTACAACGAGTTCAATCTGAAAGAGTATTGCCTGAGCCTGAATAGC
GAACCGCTGGCACTGGGTTTTTATATGAAACTGAATAAAAATATTACCTATTGCCATA
CCTGCAACCAGGATATTACCATTCCGCTGAATAGCAATACCATTAGCCGCACCGAAA
ATAACTTTAAATACCTGAAATGGAATCGCAACGATAATGATTGCAAAAAAGACTGGAA
CTATCCGTGGGATCTGTGTAGCACCATTTATCGTTGCAACGACATTGACAGCATCATT
AATGGTATTGTGAAATATTATGGTATTCGCAACGGCATTAATCATCCGAATCGCTTTG
AATTTAATGGCAACCGTCCGATTATTCAGAAACAAATCTACCAGAACAAACCGTATTG
TCTGTGCCTGAGCGATCATTATTCACCGATGAGCGTTGTTACCATTAATCGTGTTCAG
GATGTGTATGATAACCCGATTTATGATCAGACCCTGAGCCTGGATGATCTGGATCAA
CTGCTGTATAGCAATAAATCCCTGAACGATGAAAAATATAAAGAAAACAGCCTGAGTC
TGAACTTCAAAAGCGTTCATATTGGCGAACTGTTCATCAGCTAA

【００５８】

配列番号３：配列番号１：キイロタマホコリカビの2-フコシルトランスフェラーゼをコードする天然ヌクレオチド配列：

【化３】

ATGAATGATTCACCAATAATAAGTGTAGTTTTACCTTTTTTAATAAAGGACAATGACGATAAATCATTA
AATTACCAAGGAATAAATAATTTAATAATATCAATAGATAGCATTATTGAACAAACTTTTAAAGAATGG
GAATTAATTTTAGTTGATGATGGATCAAATAATGAAATTTTGGAGCAATTACTTTCAAAAAGATATAGT
ACAGATAATAGAATTAAATTCATAATAAATAAAGAGAATAAAGGTATTGTTAAAAGTTTAAATGATGCA
ATTTTAAATCATTGTTCACCAACTTCAAAATATATTGCTCGTATGGATTCAGATGATATTTCTCATCCA
ACAAGATTACAATCTCAACTTAAATATCTTCAATCAAATGAAACAATTGATATATTAGGTTGTCCAATT
AAAATGTTTAATAATAATAAATTAATTGAAATTTTAAATAATAATAATAATAATAATAATATTAATAAT
AATGTGAAAGAGTTAATTAATATAATTAATAATGAAGAATCTTTTAAATTTATTCAACATCCTGATAAA
GATATTTTAATGTGGTCAATGTTTTTCAATTGTTGTATTGTTCACCCTTCTGTAATATTTAAAAGATCG
ATATTCACTATTGAACATTGTTATGAAGAAAACAACCAATTTCCATTCATTGAAGATTACTTATTTTGG
TTAAAATCCTTAATAATGAAAGGTTTAAATATTTCAAATATCCAATCATCAACACCATTACTATATTTA
AGAAAACATAATAACTCTATATCTTTTAAAAATATTGAAAAACAAAAAGATTCCACTGCTAATGCATCT
TGTTATTATCTAAATATACTTTTTAAAAGATTTAATATTGATTCTGAAATTATTCAAAATTCTTCACTC
TCAATGAAAGAAATTATTCAGTTCTTTCAACTTTCACCATCATCTTTATCAAAAATCAATAATATTTCA
ATTGAATTATTTGAATTTGCATTTAAATATCTAGAATTAATTGAAAAATCATGTACAAAACAACAACCA
AACTATTCAAACAGTATAAAAGATGCAGCAAATGAAAAAATGGGTGAATTAGTATCTTTATGTTTATCA
AATTATCCAAATAATCAAAAATCATCATTACTTTGGGAAAAATGGTTATCAAGAAATCCAACCTCACAA
TTACTATCACTTTTATCAAATTTAAATGTAAAATCTTCAACTACTATAATTAATAATAATATTAATAAT
AATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAAT
AATAATAATTCAATTTTAAATTTTATATCTGGCATTAATAGTAATAAAATAAATACTCCAAAATCTAAT
AATAATAAATTTAAAGAAAATGGAATTAGAATAATTTGTTTCTCAAAAGATAGAGCATTTCAATTAAAA
GAATATCTTAGAACATTTTTTAAATATTTAAAAAATGATGATAATGGAAATGATAAATTTGAAATTATT
GTTGATGTATTATTTACATATTCAAATGAGAAATTCAAAAACTCTTATCAATTAGTTATTGAAAGTTTT
CCACAAGTTAATTTTATTAAAGAAGAGAATTTCACTGATCAATTAATTAATTTAGTTCAAAAAACAAAT
AAACTTGAATATGTCATGTTTTCAGTTGATGATATTCTTTATTATAATGAATTCAATCTCAAAGAATAT
TGTTTATCTTTGAATAGTGAGCCATTGGCATTAGGTTTCTATATGAAGTTAAATAAAAATATTACCTAT
TGTCATACTTGTAATCAAGATATAACAATACCATTAAATTCAAATACTATTAGTAGAACAGAGAATAAT
TTTAAATATTTAAAATGGAATAGAAATGATAATGATTGTAAAAAGGATTGGAATTATCCATGGGATTTA
TGTTCAACCATTTATAGATGTAATGATATTGATTCAATCATTAATGGTATAGTTAAATATTATGGAATT
AGAAATGGTATTAATCATCCAAATAGATTCGAATTCAATGGTAATAGACCAATCATTCAAAAGCAAATC
TATCAAAATAAACCCTACTGTTTATGTTTATCAGATCACTATTCTCCAATGTCTGTTGTAACTATTAAT
AGAGTTCAAGATGTCTATGATAATCCAATTTATGACCAAACCCTATCTTTAGATGATTTAGATCAATTA
CTTTATTCAAACAAATCATTAAATGATGAAAAATATAAAGAAAATAGTTTATCTTTAAATTTTAAAAGT
GTTCATATTGGTGAACTTTTTATTTCTTAA

【００５９】

配列番号４：フコシルトランスフェラーゼ活性を有する配列番号１の断片のアミノ酸配列：

【化４】

MSILNFISGINSNKINTPKSNNNKFKENGIRIICFSKDRAFQLKEYLRTFFKYLKNDDNGND
KFEIIVDVLFTYSNEKFKNSYQLVIESFPQVNFIKEENFTDQLINLVQKTNKLEYVMFS
VDDILYYNEFNLKEYCLSLNSEPLALGFYMKLNKNITYCHTCNQDITIPLNSNTISRTE
NNFKYLKWNRNDNDCKKDWNYPWDLCSTIYRCNDIDSIINGIVKYYGIRNGINHPNR
FEFNGNRPIIQKQIYQNKPYCLCLSDHYSPMSVVTINRVQDVYDNPIYDQTLSLDDLD
QLLYSNKSLNDEKYKENSLSLNFKSVHIGELFIS

【００６０】

配列番号５：ATGを付加した配列番号４をコードするコドン最適化核酸配列

【化５】

ATGAGCATTCTGAATTTTATTAGCGGCATTAATAGCAATAAAATTAATACCCCGAAAAG
CAACAATAACAAATTTAAAGAGAATGGCATTCGCATTATTTGCTTCAGCAAAGATC
GTGCATTCCAGCTGAAAGAATATCTGCGCACCTTCTTCAAATATCTGAAAAATGA
TGATAATGGCAATGATAAATTTGAAATTATTGTGGATGTGCTGTTTACCTATAGCA
ATGAAAAATTCAAAAATAGCTATCAGCTGGTGATCGAAAGCTTTCCGCAGGTTAA
CTTTATTAAAGAAGAAAACTTTACCGATCAGCTGATTAACCTGGTGCAGAAAACC
AACAAACTGGAATATGTGATGTTCAGCGTGGATGATATCCTGTATTACAACGAGT
TCAATCTGAAAGAGTATTGCCTGAGCCTGAATAGCGAACCGCTGGCACTGGGTT
TTTATATGAAACTGAATAAAAATATTACCTATTGCCATACCTGCAACCAGGATATT
ACCATTCCGCTGAATAGCAATACCATTAGCCGCACCGAAAATAACTTTAAATACC
TGAAATGGAATCGCAACGATAATGATTGCAAAAAAGACTGGAACTATCCGTGGG
ATCTGTGTAGCACCATTTATCGTTGCAACGACATTGACAGCATCATTAATGGTAT
TGTGAAATATTATGGTATTCGCAACGGCATTAATCATCCGAATCGCTTTGAATTTA
ATGGCAACCGTCCGATTATTCAGAAACAAATCTACCAGAACAAACCGTATTGTCT
GTGCCTGAGCGATCATTATTCACCGATGAGCGTTGTTACCATTAATCGTGTTCAG
GATGTGTATGATAACCCGATTTATGATCAGACCCTGAGCCTGGATGATCTGGATC
AACTGCTGTATAGCAATAAATCCCTGAACGATGAAAAATATAAAGAAAACAGCCT
GAGTCTGAACTTCAAAAGCGTTCATATTGGCGAACTGTTCATCAGCTAA

【００６１】

配列番号６：配列番号４をコードする天然核酸配列

【化６】

TCAATTTTAAATTTTATATCTGGCATTAATAGTAATAAAATAAATACTCCAAAATCTAAT
AATAATAAATTTAAAGAAAATGGAATTAGAATAATTTGTTTCTCAAAAGATAGAGCATTT
CAATTAAAAGAATATCTTAGAACATTTTTTAAATATTTAAAAAATGATGATAATGGAAAT
GATAAATTTGAAATTATTGTTGATGTATTATTTACATATTCAAATGAGAAATTCAAAAAC
TCTTATCAATTAGTTATTGAAAGTTTTCCACAAGTTAATTTTATTAAAGAAGAGAATTTC
ACTGATCAATTAATTAATTTAGTTCAAAAAACAAATAAACTTGAATATGTCATGTTTTCA
GTTGATGATATTCTTTATTATAATGAATTCAATCTCAAAGAATATTGTTTATCTTTGAAT
AGTGAGCCATTGGCATTAGGTTTCTATATGAAGTTAAATAAAAATATTACCTATTGTCA
TACTTGTAATCAAGATATAACAATACCATTAAATTCAAATACTATTAGTAGAACAGAGA
ATAATTTTAAATATTTAAAATGGAATAGAAATGATAATGATTGTAAAAAGGATTGGAATT
ATCCATGGGATTTATGTTCAACCATTTATAGATGTAATGATATTGATTCAATCATTAAT
GGTATAGTTAAATATTATGGAATTAGAAATGGTATTAATCATCCAAATAGATTCGAATT
CAATGGTAATAGACCAATCATTCAAAAGCAAATCTATCAAAATAAACCCTACTGTTTAT
GTTTATCAGATCACTATTCTCCAATGTCTGTTGTAACTATTAATAGAGTTCAAGATGTC
TATGATAATCCAATTTATGACCAAACCCTATCTTTAGATGATTTAGATCAATTACTTTAT
TCAAACAAATCATTAAATGATGAAAAATATAAAGAAAATAGTTTATCTTTAAATTTTAAA
AGTGTTCATATTGGTGAACTTTTTATTTCTTAA

【００６２】

本発明を、具体的な実施例により以下に説明する。

【実施例】

【００６３】
実施例１．材料および方法
培地
１％トリプトンペプトン(Difco, Erembodegem, Belgium)、0.5%酵母エキス(Difco)および0.5%塩化ナトリウム(VWR, Leuven, Belgium)からなるLuria Broth (LB)培地。振とうフラスコ実験用の培地は、2.00 g/l NH4Cl、5.00 g/l (NH4)2SO4、2.993 g/l KH2PO4、7.315 g/l K2HPO4、8.372 g/l MOPS、0.5 g/l NaCl、0.5 g/l MgSO4・7H2O、14.26 g/l スクロースまたは実施例に明記する場合に別の炭素源、１ml/lビタミン溶液、100μl/lモリブデン酸塩溶液および１ml/lセレン溶液を含有した。培地は、1M KOHを用いてpHを７に設定した。
ビタミン溶液は、3.6 g/l FeCl2・4H2O、５g/l CaCl2・2H2O、1.3 g/l MnCl2・2H2O、0.38 g/l CuCl2・2H2O、0.5 g/l CoCl2・6H2O、0.94 g/l ZnCl2、0.0311 g/l H3BO4、0.4 g/l Na2EDTA・2H2Oおよび1.01 g/lチアミンHClからなった。モリブデン酸塩溶液は、0.967 g/l Na2MoO4・2H2Oを含有した。セレン溶液は、42 g/l SeO2を含有した。
【００６４】
発酵用の最少培地は、6.75 g/l NH4Cl、1.25 g/l (NH4)2SO4、1.15 g/l KH2PO4 (低ホスフェート培地)または2.93 g/l KH2PO4および7.31 g/l KH2PO4 (高ホスフェート培地)、0.5 g/l NaCl、0.5 g/l MgSO4・7H2O、14.26 g/lスクロース１ml/lビタミン溶液、100μl/lモリブデン酸塩溶液および１ml/lセレン溶液(上記と同じ組成)を含有した。
【００６５】
複合培地は、オートクレーブ(121℃、21分)により滅菌し、最少培地はろ過(0.22μm Sartorius)により滅菌した。必要であれば、培地は、抗生物質(アンピシリン、クロラムフェニコール、カナマイシン)を加えることにより選択的にした。
【００６６】
培養条件
LBプレート上の単一コロニーからの５ml LB培地中での前培養物を、オービタルシェーカー上で200 rpmにて37℃で８時間インキュベートした。この培養物から、２mlを500 ml振とうフラスコ中の 100 mlの最少培地に移し、オービタルシェーカー上で200 rpmにて37℃で16時間インキュベートした。４%の接種材料を、1.5 lの作業容量を有する ２lのBiostat B Plus培養容器(Sartorius Stedim Biotech, Melsungen, Germany)で用いた。培養条件は、37℃、800 rpmでの攪拌、1.5 l/分の気流速度であった。空気を散布することにより、好気条件を維持した。PHは、0.5 M H_2SO_4および４M KOHを用いて７に維持した。排気は、排気冷却機(Frigomix 1000, Sartorius Stedim Biotech, Melsungen, Germany)により４℃に冷却した。シリコーン消泡剤の10%溶液(BDH 331512K, VWR Int Ltd., Poole, England)を、発酵中に泡形成が上昇した場合に加えた(およそ10μl)。発生気体を、EL3020発生気体分析器(ABB Automation GmbH, 60488 Frankfurt am Main, Germany)を用いて測定した。全てのデータを、Sartorius MFCS/win v3.0システム(Sartorius Stedim Biotech, Melsungen, Germany)に入力した。
全ての株は、少なくとも２回培養し、収率および速度について示す標準偏差は、反復実験中に採取した少なくとも10のデータ点に基づく。
【００６７】
サンプリング
バイオリアクタは、その内部に、採集パイプ(BD Spinal Needle, 1.2×152 mm (BDMedical Systems, Franklin Lakes, NJ - USA) (外部でMasterflex-14配管(Cole-Parmer, Antwerpen, Belgium)に連結しているリアクタ口とつながっている)と、その後に、サンプリングのための隔壁を有する採集口とを含有する。この採集口の反対側は、Masterflex-16配管を用いてリアクタ容器とつながって戻る。このシステムは、迅速サンプリングループとよばれる。サンプリング中に、リアクタブロスは、サンプリングループ中を回ってポンピングされる。150 ml/分の流速にて、リアクタブロスは、採集口に到達するために0.04秒、リアクタに再浸入するために3.2秒必要であると見積もられた。50%のpO2レベルにて

、37℃にて液体中に約３mg/lの酸素が存在する。pO2レベルは、微好気条件を回避するために、20%未満には決してなるべきでない。よって、1.8 mg/lの酸素が、採集ループを通して運搬される間に消費され得る。酸素取り込み速度が0.4 g酸素/gバイオマス/時間(μ_{max}にて見出された最大酸素取り込み速度)であると仮定すると、これは、５g/l バイオマスについて２g/l/hまたは0.56 mg/l/sの酸素取り込み速度を与え、これに3.2秒(ループ中の滞留時間)を乗じると、1.8 mg/lの酸素消費が得られる。

【００６８】

サンプリング中の細胞の代謝を消すために、-20℃に予め冷却した62 gのステンレス鋼ビーズを充填したシリンジ中に採集口を通してリアクタブロスを吸引して、５mlのブロスを直ちに４℃に冷却した。サンプリングの直後に冷却遠心分離を行った(15000 g、５分、４℃)。バッチ実験中に、OD_{600nm}、CDWおよび細胞外代謝物についての試料を、毎時間、迅速サンプリングループおよび冷却ステンレスビーズサンプリング法を用いて採取した。指数増殖に到達した場合に、サンプリング頻度を20～30分毎に増やした。

【００６９】

ブロスサンプリング

発酵槽とつながった迅速サンプリングを用いて、１mlブロスの試料を0.5秒以内に発酵槽から抜き出した。試料は、-40℃に予め冷却した冷却溶液５mlを含有する試験管中に直接抜き出し、サンプリング後にボルテックスにより直ちに混合した。正確な試料サイズを、サンプリングの前後に試験管を秤量することにより、重量測定により定量した。

【００７０】

ろ過物サンプリング

細胞外培養流体の試料は、ビーズを用いずに室温にてシリンジろ過(ポアサイズ0.45μm、酢酸セルロース)を用いて得た(ブロス試料の直接ろ過)。細胞を除去した後に、得られたろ過物または上清を５mlの冷却溶液と直ちに混合して、これらの試料をブロス試料と同じ方法で処理した。この場合でも、得られた試料の正確な量を、重量測定により定量した。

【００７１】

冷却手順

用いた冷却溶液は、60% (v/v)メタノール水溶液であった。-40℃に予め冷却した冷却溶液中でブロス試料を冷却した後に、試料/冷却溶液混合物を、冷却遠心分離機(-20℃)中で、-40℃に予め冷却したローターを用いて8000gにて５分間遠心分離した。デカントした後に、上清(QS)を抽出まで-40℃にて貯蔵した。その後、細胞ペレットを、５mlの-40℃冷却溶液に再懸濁し、再び遠心分離した。この２回目の上清(WS)も、抽出まで-40℃にて貯蔵した。全ブロスおよび培養ろ過物中の代謝物の測定のために、同じ冷却手順を用いた。しかし、冷却した全ブロス混合物(B)または冷却した培養ろ過物(F)は遠心分離しなかったが、十分にボルテックスした後に、500μlのこれらの混合物を、代謝物抽出のために抜き出した。

【００７２】

代謝物抽出手順

細胞ペレットからおよび冷却した全ブロスからの500μl試料からの代謝物の抽出は、熱エタノール法を用いて行った[34]。代謝物を、75%沸騰エタノール中で抽出した(３分、90℃)。冷却した後に、そのようにして得られた抽出物を、RapidVap (Labconco Corporation, Kansas, Missouri, USA)中で、真空下に110分間、乾燥蒸発させた。各残渣を500μLのH2Oに再懸濁した後に、細胞破片を、5000gにて５分間の遠心分離により除去した。デカントの後に、上清を、さらなる分析まで-80℃にて貯蔵した。

【００７３】

分析方法

培養物の細胞密度を、600 nmにて光学密度を測定することにより(Uvikom 922分光光度計、BRS、Brussel、Belgium)頻繁にモニタリングした。細胞乾燥重量を、予め乾燥させ、秤量したファルコン中の20 gのリアクタブロスの遠心分離(15分、5000 g、GSAローター、

Sorvall RC-5B, Goffin Meyvis, Kapellen, Belgium)により得た。ペレットを、その後、20 mlの生理的溶液(９g/l NaCl)を用いて１回洗浄し、一定重量まで70℃にて乾燥させた。OD_{600nm}測定をバイオマス濃度に変換できるようにするために、バイオマス濃度に対するOD_{600nm}の相関曲線を作成した。グルコースおよび有機酸の濃度を、Varian Prostar HPLCシステム(Varian, Sint-Katelijne-Waver, Belgium)上で、65℃に加熱し、１cmのプレカラムを備えるAminex HPX-87Hカラム(Bio-Rad, Eke, Belgium)を用い、５mM H2SO4 (0.6 ml/分)を移動相として用いて決定した。２重波長UV-VIS (210 nmおよび265 nm)検出器(Varian Prostar 325)および示差屈折計(Merck LaChrom L-7490, Merck, Leuven, Belgium)を、ピーク検出のために用いた。265および210 nmの両方でのピークの吸収を分割することにより、ピークを同定できた。分割は、ある種の化合物について典型的な一定の値をもたらす(Beer-Lambertの公式)。

【００７４】

炭水化物測定

グルコース、フラクトース、スクロースおよびグルコース-1-ホスフェートを、Hypercarbカラム(100×4.6 mm; ５μm粒子サイズ)を用いるHPLCにより測定し、ELSD検出器または質量分析計を用いて検出した(Antonioら, 2007; Nielsenら, 2006)。スクロースおよびG1PのLOQは、それぞれ30および20 mg/lであった。全ての試料を、検出器の直線の範囲内で希釈し、これは、LOQとおよそ100mg/lの代謝物との間であった。複数のリン酸化およびヌクレオチド糖がブロス中に存在する場合、Bucholzらの方法を用いた(11)。この場合、milliQ水(A)と20mM酢酸アンモニウム(B)との勾配を用いて分析物を分離した。勾配は、100%Aにて１ml/分の流速で開始し、10分間で100%Bに１ml/分にて変化させた。100%Bの溶離液組成を、次いで、１ml/分にて４分間保持し、１分間で100%Aに１ml/分にて変化させ、その後、流速を1.2 ml/分に増やし、３分間保持して、カラムの平衡化時間を低減させた。この３分間の後に、流速を２分間で１ml/分に再び低減した。全ての分析物は、ELSD検出器または質量分析計のいずれかで検出した。

【００７５】

単糖類、二糖類およびオリゴ糖類の分析のために、Prevail炭水化物 ES(５μ; 250×4.6 mm)カラムを、100%アセトン(A)、100%アセトニトリル(B)および100%水(C)の勾配とともに用いた。勾配を、20%A、60%Bおよび20%Cにて開始する。これを、15分間で15%A、45%Bおよび40%Cに変化させ、１分以内で20%A、60%Bおよび20%Cに変えて戻した。カラムを、次いで、その初期条件にて６分間平衡化する。全ての分析物は、ELSDまたは質量分析計のいずれかを用いて測定した。

【００７６】

細胞乾燥重量の測定

ブロス試料について、４×10 gを遠心管に移し、細胞をスピンダウンし(5000g、４℃、５分)、細胞を0.9% NaCl溶液で２回洗浄した。細胞ペレットを含有する遠心管をオーブン中で70℃にて48時間、一定重量まで乾燥させた。細胞乾燥重量を、重量測定により得た。遠心管は、秤量前にデシケータ中で冷却した。

【００７７】

ソホロース多糖類測定

異種tts遺伝子(50)を発現する変異株により生成されたソホロース多糖類の量を決定するために、この変異体および野生型株のおよそOD６での100mlの培養物を遠心分離した(5500 rpm、４℃、５分、Heraus Biofuge stratos)。80mlの上清を、次いで、２容量の冷エタノール(100%、-20℃)を用いて沈殿させ、６℃にて一晩貯蔵した。沈殿物を、遠心分離(5500 rpm、４℃、５分、Hereaus Biofuge stratos)により上清から分け、25mlの蒸留水に再懸濁した(88)。２mlのこの多糖類溶液を、次いで、pyrexのケイ酸ボリウム(boriumsilicate)試験管(26×100 mm)中で105℃にて2.25 M HCl (最終濃度)を４時間用いて加水分解した。グルコース測定のために溶液を中和するために、等モル量のNaOHを、インキュベーションおよび冷却の後に溶液に加えた。溶液中のグルコースの量を、YSI生化学分析器(YSI (UK) Ltd.)を用いて決定した。

【００７８】
キイロタマホコリカビα1,2-フコシルトランスフェラーゼ特徴決定のために用いた株およびプラスミド
キイロタマホコリカビを起源とするコドン最適化α1,2-フコシルトランスフェラーゼを、Aertsら(1)に記載されるようにして構築したプラスミド上に遺伝子型ΔlacZΔglgCΔmanAΔCAを有する大腸菌において異種的に発現させた。CAは、Stevensonら(86)に記載されるコラン酸生合成経路をコードする遺伝子クラスタ中の全ての遺伝子を示す。
【００７９】
酵素単離方法
株を、LB (10 g/lトリプトン、5g/l酵母エキスおよび10 g/l NaCL)中で一晩培養(500ml振とうフラスコ中の 100ml)にて37℃および200 rpmで成長させた。細胞を、遠心分離(7500 rpmおよび４℃にて15分間)により採集した。このペレットを、５ml PBSバッファーに再懸濁し、氷水上で４分間にわたって３回音波処理した(サイクル50%、強度３)。細胞破片を15分間、7500 rpmおよび４℃にて再び遠心分離した。上清を、粗細胞抽出物として用いた。
【００８０】
タンパク質の測定
酵素抽出物のタンパク質含量を、Pierce BCAタンパク質アッセイキット(Thermo)を、製品マニュアルに記載されるようにして用いて測定した。
【００８１】
異種および相同遺伝子の発現のためのプラスミド構築
構築したプラスミドは、Aertsら(1)に記載されたとおりであった。
【００８２】
遺伝子的方法
プラスミドを、宿主大腸菌DH5α(F-, φ80dlacZΔM15, Δ(lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk^-, mk^+), phoA, supE44, λ^-, thi-1, gyrA96, relA1)で維持した。
プラスミド。pKD46 (Redヘルパープラスミド、アンピシリン耐性)、pKD3 (FRTに挟まれたクロラムフェニコール耐性(cat)遺伝子を含有する)、pKD4 (FRTに挟まれたカナマイシン耐性(kan)遺伝子を含有する)およびpCP20 (FLPリコンビナーゼ活性を発現する)プラスミドを、教授であるJ-P Hernalsteens博士(Vrije Universiteit Brussel, Belgium)から得た。プラスミドpBluescript (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany)を用いて、プロモーターライブラリーまたは点突然変異を有する遺伝子座を有する誘導体pKD3およびpKD4を構築した。
【００８３】
変異。変異は、それぞれ遺伝子破壊(ノックアウト、KO)、人工プロモーターによる内因性プロモーターの置き換え(ノックイン、KI)からなった。これらを、DatsenkoおよびWanner (19)の概念を用いて導入した。
Redヘルパープラスミドを有する形質転換体を、アンピシリン(100 mg/l)およびL-アラビノース (10 mM)を含有する10 ml LB培地中で30℃にて0.6のOD_{600nm}まで成長させた。細胞を１回目は50 mlの氷水で、そして２回目は１mlの氷水で洗浄することによりエレクトロコンピテントにした。次いで、細胞を、50μlの氷水に再懸濁した。エレクトロポレーションを、50μlの細胞および10～100 ngの直鎖上２本鎖DNA生成物を用いて、GenePulser(商標) (BioRad) (600Ω、25μFDおよび250ボルト)を用いることにより行った。
エレクトロポレーションの後に、細胞に１ml LB培地を加え、37℃にて１時間インキュベートし、最後に、25 mg/lのクロラムフェニコールまたは50 mg/lのカナマイシンを含有するLB寒天上に広げて、抗生物質耐性形質転換体を選択した。選択した変異体を、改変領域の上流および下流のプライマーを用いるPCRにより確認し、ヘルパープラスミドの喪失について42℃にてLB寒天で成長させた。変異体は、アンピシリン感受性について試験した。

【００８４】
抗生物質耐性遺伝子の排除
選択した変異体(クロラムフェニコールまたはカナマイシン耐性)に、温度感受性複製およびFLP合成の熱誘導を示すアンピシリンおよびクロラムフェニコール耐性プラスミドである pCP20プラスミドを形質転換した。アンピシリン耐性形質転換体を30℃にて選択し、その後、いくつかをLB中で42℃にてコロニー精製し、次いで、全ての抗生物質耐性およびFLPヘルパープラスミドの喪失について試験した。遺伝子ノックアウトおよびノックインを、対照プライマーを用いて確認し、配列決定した。
【００８５】
様々なノックアウトおよびノックイン変異体を構築するために用いたプライマーを、表１に列挙する。
【００８６】

【表１－１】

表 1: 遺伝子ノックアウトの構築のために用いたプライマー

遺伝子	Fw-P1-H1	Rv-P2-H2
lacZ	CATAATGGATTTCCTTACGCGAAATACGG GCAGACATGGCCTGCCCGGTTATTAgtgt aggctggagctgcttc	GTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAA CAATTTCACACAGGAAACAGCTcatatga atatcctccttag
glgC	agaccgccggttttaagcagcgggaacat ctctgaacatacatgtaaaacctgcagtg taggctggagctgcttc	gtctggcagggacctgcacacggattgtg tgtgttccagagatgataaaaaaggagtt agtccatatgaatatcctccttag
agp	CATATTTCTGTCACACTCTTTAGTGATTG ATAACAAAAGAGGTGCCAGGAgtgtaggc tggagctgcttc	TAAAAACGTTTAACCAGCGACTCCCCCGC TTCTCGCGGGGGAGTTTTCTGcatatgaa tatcctccttag
pgi	GGCGCTACAATCTTCCAAAGTCACAATTC TCAAAATCAGAAGAGTATTGCgtgtaggc tggagctgcttc	GGTTGCCGGATGCGGCGTGAACGCCTTAT CCGGCCTACATATCGACGATGcatatgaa tatcctccttag
pfkA	GACTTCCGGCAACAGATTTCATTTTGCAT TCCAAAGTTCAGAGGTAGTCgtgtaggct ggagctgcttc	GCTTCTGTCATCGGTTTCAGGGTAAAGGA ATCTGCCTTTTTCCGAAATCcatatgaat atcctccttag
pfkB	CACTTTCCGCTGATTCGGTGCCAGACTGA AATCAGCCTATAGGAGGAAATGgtgtagg ctggagctgcttc	GTTGCCGACAGGTTGGTGATGATTCCCCC AATGCTGGGGGAATGTTTTTGcatatgaa tatcctccttag
D&W からの *pgm*	TGAGAAGGTTTGCGGAACTATCTAAAACG TTGCAGACAAAGGACAAAGCAgtgtaggc tggagctgcttc	CATACGTAAAAAAGGGCGATCTTGCGACC GCCCTTTTTTTATTAAATGTGTcatatga atatcctccttag
pgm::kan	TGAGAAGGTTTGCGGAACTATCTAAAACG TTGCAGACAAAGGACAAAGCAACGAAAGG CTCAGTCGAAAG	CATACGTAAAAAAGGGCGATCTTGCGACC GCCCTTTTTTTATTAAATGTGTAGAACTC CAGCATGAGATCC
pgm::GFP	TGAGAAGGTTTGCGGAACTATCTAAAACG TTGCAGACAAAGGACAAAGCAgtgtaggc tggagctgcttc	CATACGTAAAAAAGGGCGATCTTGCGACC GCCCTTTTTTTATTAAATGTGTCATCCGT CAGGATGGCCTTC
ptsG	gccacgcgtgagaacgtaaaaaaagcacc catactcaggagcactctcaattgtgtag gctggagctgcttc	Cacctgtaaaaaaggcagccatctggctg ccttagtctccccaacgtcttacggacat atgaatatcctccttag

【００８７】

【表１－２】

glk	CGAGAAGGCCCGGATTGTCATGGACGATG AGATACACCGGAATATCATGGgtgtaggc tggagctgcttc	CCAGGTATTTACAGTGTGAGAAAGAATTA TTTTGACTTTAGCGGAGCAGTTGAAGAca tatgaatatcctccttag
malPQ	ATATCCAGCCAGTCTTCCGGCTGTAGTCC TAACAGAGCACTGTTACTGTCagcattac acgtcttgagcg	GCTTTAAGTGGTTGAGATCACATTTCCTT GCTCATCCCCGCAACTCCTCCcatatgaa tatcctccttag
MP KI	ATATCCAGCCAGTCTTCCGGCTGTAGTCC TAACAGAGCACTGTTACTGTC *GTAAAACGACGGCCAGTG*	CAACGGCCATTTTTTGCACTTAGATACAG ATTTTCTGCGCTGTATTGCATTG*CCGGGA TCCGATGCATATGG*
ycjU	TTTTATTTTGCCCTTCAATGGGACCGCTA CCAAACATCAGGAGGATGAATGAAACagc attacacgtcttgagcg	TTCCGTTGAAGGCAACAGTAATTGCGCCC CGGTTAAGCCCGCGCCGATCCcatatgaa tatcctccttag
D&W からの CA	GTAGCATTGTTCCTAAGTATGACTCCATT TTTCCAGGAATGGTCGCAAATCgtgtagg ctggagctgcttc	TTCACGCCGCATCCGGCAAGCAAACCAGC TCATAAGCCGGGAGAACAACCcatatgaa tatcctccttag
sacB からの CA	TTCACGCCGCATCCGGCAAGCAAACCAGC TCATAAGCCGGGAGAACAACCccgcttac agacaagctgtg	GTAGCATTGTTCCTAAGTATGACTCCATT TTTCCAGGAATGGTCGCAAATCagccatg acccgggaattac
sacB から の *wcaJ*	ATCGCCGACCACTTCGCGCCGCTGATGGT TTTTTCACGTAAGCTCATATCccgcttac agacaagctgtg	GGATCTTCCCTTACCCCACTGCGGGTAAG GGGCTAATAACAGGAACAACGagccatga cccgggaattac
sacB および融合 PCR から の *wcaJ*	GGGGGCCCCCGGGGGTATGAGCTTACGTG AAAAAACCATCAG	GGGCCCGGGCCCGGGCGTTGTTCCTGTTA TTAGCCCCTTACCC
D&W から の *wcaJ*	ATCGCCGACCACTTCGCGCCGCTGATGGT TTTTTCACGTAAGCTCATATCgtgtaggc tggagctgcttc	GGATCTTCCCTTACCCCACTGCGGGTAAG GGGCTAATAACAGGAACAACGcatatgaa tatcctccttag
D&W_2 から の *wcaJ*	TTTTGATATCGAACCAGACGCTCCATTCG CGGATGTACTCAAGGTCGAACgtgtaggc tggagctgcttc	TCTATGGTGCAACGCTTTTCAGATATCAC CATCATGTTTGCCGGACTATGcatatgaa tatcctccttag

【００８８】

【表１－３】

galET-H1-P22-RBS	TAGCCAAATGCGTTGGCAAACAGAGATTG TGTTTTTTCTTTCAGACTCATCTTTGTTT CCTCCGAATTCG	CGGTTCGACGCATGCAGGCATGAAACCGC GTCTTTTTTCAGATAAAAAGCcatatgaa tatcctccttag
galET 伸長相同性	ACCAATCAAATTCACGCGGCCAGGCGCCT GAATGGTGTGAGTGGCAGGGTAGCCAAAT GCGTTGGCAAAC	GTCGGTAGTGCTGACCTTGCCGGAGGCGG CCTTAGCACCCTCTCCGGCCAACGGTTCG ACGCATGCAGGC

【００８９】

実施例２．基本株１の操作および使用(炭素源：スクロース；スクロースホスホリラーゼによりグルコース-1-ホスフェートおよびフラクトースに変換) - 異なるスクロースホスホリラーゼのスクリーニング

「基本株１」の成功のための重要な要件は、効力のあるスクロースホスホリラーゼの存在である。しかし、大腸菌は推定上のスクロースホスホリラーゼ(SP)を有するものの、これは、スクロースを唯一の炭素源として含有する最少培地上で成長しない。よって、様々な微生物供給源からの６つのスクロースホスホリラーゼをスクリーニングした(表２)。

【００９０】

このために、表２に列挙するスクロースホスホリラーゼ (SP)のうちの１つをコードするプラスミド[pCX-プロモーター-SP]をそれぞれ有する野生型大腸菌の６つの形質転換体を構築した。これらの株の性能を、振とうフラスコにおいて、スクロースを唯一の炭素源として用いて評価した。野生型株(WT)を、対照として実験設計に組み込んだ(μ_{WT} =０)。

【００９１】

【表２】

表2: スクリーニングしたスクロースホスホリラーゼ

スクロースホスホリラーゼの供給源	略称
ビフィドバクテリウム・アドレセンティス	BA
ラクトバチルス・アシドフィラス	LA
ストレプトコッカス・ミュータンス	SM
ロイコノストック・メセンテロイデス B742	LM B742
ロイコノストック・メセンテロイデス B1149	LM B1149
ロイコノストック・メセンテロイデス B1355	LM B1355

このスクリーニング実験において、様々な形質転換体の成長速度をモニタリングし、スクロースホスホリラーゼの性能と関連付けた。この理由により、最もよく成長する株が、最良の性能のスクロースホスホリラーゼを有する。

様々な形質転換体の成長速度を図２に示し、特別の炭水化物の生成のために用いた原理を図１に示す。(a)本発明の生成技術において出現する通常の平衡反応、(b)プル/プッシュ原理：平衡は、糖類および活性化糖類に向かってシフトする。細胞の主なゴールは、成

長することであるので、これは、この図において糖類を、バイオマスを形成するように引っ張る。この引張り効果により、活性化糖類は、細胞内に蓄積し、生成経路を押す。

【００９２】

実施例３．ビフィドバクテリウム・アドレセンティスのスクロースホスホリラーゼの特徴決定

様々な人工の構成性プロモーターを挿入して、成長速度に対するプロモーターの影響を評価した。このために、The Centre of Expertise - Industrial Biotechnology and Biocatalysis (Ghent University)にて入手可能なプロモーターライブラリーからの弱い、中程度および強いプロモーターを導入した。最高の成長速度を示した中程度の強度のプロモーターを最終的に保持した。

ビフィドバクテリウム・アドレセンティスのスクロースホスホリラーゼをコードするプラスミドを有する大腸菌株の親和性定数および最大成長速度を決定した。このために、バッチおよびケモスタット実験を行った。これらのパラメータに対するホスフェート濃度の影響も確認した(表３)。

【００９３】

操作された株の動態特性を表３に列挙する。操作された株の動態特性が、将来の工業的な応用の観点で適当であることが明らかである。

【００９４】

【表３】

表3: ビフィドバクテリウム・アドレセンティススクロースホスホリラーゼを有する大腸菌の成長の特徴。高 PO_4^{3-} = 64 mM; 低 PO_4^{3-} = 8.5 mM。

	高 PO_4^{3-}	低 PO_4^{3-}
μ_{max} (h^{-1})	0.5	0.46
K_S (mg/L)	<10	+/- 10

【００９５】

実施例４．αグルコース-1-ホスフェートの供給の増加のための操作方策

操作方策の合理性を確認するために、変異株においてαグルコース-1-ホスフェートのプールが(図３)、野生型におけるαグルコース-1-ホスフェートプールと比較して(図４)増加することを証明することが重要である。「基本株１」において、微生物代謝は、２つの不連続部分に分割される。なぜなら、αグルコース-1-ホスフェートをバイオマス生成に変換できる主な反応が排除されたからである。代謝の一部分は、フラクトース部分をバイオマスおよび多数の生体触媒酵素に変換する(従来の中心的な代謝)。他の部分は、スクロースのαグルコース-1-ホスフェート部分を変換する。

αグルコース-1-ホスフェート濃度を、野生型およびいくつかの操作された株の両方について決定した。このために、バッチ実験を、スクロースを唯一の炭素源として用いて行った。

【００９６】

αグルコース-1-ホスフェートプール：野生型とプラグ株との比較

構想される代謝操作方策の可能性を評価するために、αグルコース-1-ホスフェートプールを：

・　グルコース上で成長した野生型大腸菌MG1655、
・　スクロース上で成長した大腸菌MG1655 p22BaSP、
・　スクロース上で成長した大腸菌MG1655ΔglgCΔpgmΔlacZ　p22BaSP

において決定した。

【００９７】

このプールのサイズは、大きく重要である。なぜなら、生成される様々な特別の炭水化物の代謝操作された経路は、全て、αグルコース-1-ホスフェートを第１の前駆体として用いるからである。よって、αグルコース-1-ホスフェートプールが大きいほど、様々な特別の炭水化物の生成のためにより多くの前駆体が利用可能である。

【００９８】

振とうフラスコの結果を図５に示す。細胞内グルコース-1-ホスフェート濃度は、それぞれ4.03 10^{-3} mmol/gcDW、0.26 mmol/gcDWおよび1.27 mmol/gcDWである。よって、G1Pプールの＞20000%の増加が既に達成される。この増加したプールは、様々な特別の炭水化物の効率的な生成を可能にする。

野生型大腸菌MG1655株において、グルコース-1-ホスフェートは、細胞壁関連成分、グリコーゲンなどの前駆体である。αグルコース-6-ホスフェートに典型的に由来する炭素の限定的な流れは、これらのマイナーなバイオマス画分を生成するために十分なαグルコース-1-ホスフェートを細胞に供給するために十分である。よって、αグルコース-1-ホスフェートプールは、サイズが限定されている(4.03 10^{-3} mmol/gcDW)。

【００９９】

これは、スクロースを炭素源として用いる提案する方策とは対照的である。野生型大腸菌MG1655株と比較して、グルコース-1-ホスフェートプールの増加が、安価な糖であるスクロースをフラクトースとαグルコース-1-ホスフェートとに効率的に分割する、効力のあるスクロースホスホリラーゼを含有する変異株において示されている。

1.5Lバッチリアクタで得られた結果を図６に示す。細胞内αグルコース-1-ホスフェート濃度は、それぞれ4.03 10^{-3} mmol/gcDW、0.65 mmol/gcDWおよび0.89 mmol/gcDWである。

【０１００】

リアクタスケールにて緩衝LB培地上でのΔpgmΔlacZΔglgC（3KO）P22-BaSPによるαグルコース-1-ホスフェートの生成

ΔpgmΔlacZΔglgC P22-BaSPがαグルコース-1-ホスフェートを生成する能力を確認した。このために、約15 g/Lスクロースを含有する緩衝LB培地を用いる培養を行った。約15時間にて、ホスフェートを含有する濃縮スクロース溶液を加えた。図６および図７において、最も重要な(副)生成物の濃度を示す。バッチ段階の間の最大成長速度は、約0.552 h^{-1}である。

【０１０１】

バッチ段階の間に、分解されたスクロース１モルあたり、0.74モルのグルコース-1-ホスフェートが生じる。理想的には、１モルのαグルコース-1-ホスフェートが生じることができる。しかし、研究した3KOは、その生成物がαグルコース-1-ホスフェートを変換できる遺伝子、例えばagpをまだ含有する。

全てのスクロースが消費された瞬間から、グルコース-1-ホスフェートの濃度は減少し、グルコースの濃度は増加し、これは、Agpの活性による。

約15時間後に、さらなるスクロースを加え、これは、グルコース-1-ホスフェートに再び変換されて培地中に蓄積する。フラクトースも培地中に蓄積し、このことは、細胞が、この化合物をさらに代謝するための限定された手段を有することを示す(スクロース１モルあたり0.64モルのフラクトース)。

その後の実験において、スクロースおよびホスフェートを、発酵の経過中に一定の時間間隔で加えた。約57 g/の最大αグルコース-1-ホスフェート濃度が達成された。

【０１０２】

実施例５．ホスホグルコムターゼをコードする遺伝子の不活性化

実施例１～４による代謝を分割するために、ホスホグルコムターゼをコードする遺伝子をノックアウトしなければならない。DatsenkoおよびWanner (19)により記載される従来の方法により、ノックアウトは、およそ84塩基対の染色体痕跡をもたらす。この遺伝子をこの様式で欠失した株は、複合培地で成長するように観察されたが、驚くべきことに、材料および方法の項に記載した最少培地上で成長しなかった。しかし、この株は、カナマイ

シンカセットを残した場合に最少培地上で成長した。明らかに、この染色体位置での元の配列の除去は、最少培地上での成長に干渉することがわかったが、ホスホグルコムターゼをコードするこの特定の配列(pgm遺伝子)を同様の長さの配列で置き換えると、干渉しなかった。この事実は、pgm遺伝子を、pgm遺伝子と全く同じサイズを有するGFP遺伝子の一部分で置き換えることにより確認した。このことも、最少培地上で成長できる変異株をもたらした。pgmの染色体位置でのこれらの株の配列を、図11、図12、図13および図14に示す。

【０１０３】

実施例６．大腸菌におけるセロビオース生成

セロビオース生成株を、「基本株１」から開始して構築した(図８)。このために、スクロースホスホリラーゼ(ビフィドバクテリウム・アドレセンティス)およびセロビオースホスホリラーゼ(セルロモナス・ウダ(Cellulomonas uda))の両方を含有するプラスミドを野生型、大腸菌MG1655ΔΔglgCΔpgmΔlacZ (3KO)および大腸菌MG1655ΔagpΔglgCΔpgmΔlacZ (4KO)に挿入した(表４)。ノックアウトするさらなる遺伝子は、glkおよびptsGである。なぜなら、これらはともにグルコースをグルコース-6-ホスフェートに変換するからである。

【０１０４】

【表４】

表4 セロビオース生成株

ノックアウト	反応
lacZ	Glu +Gal ↔ ラクトース
pgm	G1P ↔ G6P
glgC	G1P + ATP + H <-> ADP-グルコース + PPi
agp	G1P + H_2O → Glu + Pi
ycjM	Suc → G1P + Fruc
ptsG	Glu + PEP → G6P + Pyr
glk	Glu + ATP → G6P + ADP
ノックイン	**反応**
スクロースホスホリラーゼ	スクロース + Pi→ G1P + Fruc
セロビオースホスホリラーゼ	G1P + Glu → セロビオース + Pi

【０１０５】

野生型とプラグ株との比較

特別の炭水化物を生成するための構想される代謝操作方策の可能性を評価するために、セロビオースの生成を、様々な操作された株において調べた：

・ 大腸菌MG1655 (WT) P22-BaSP P22-CuCP

・　大腸菌MG1655ΔglgCΔpgmΔlacZ （3KO）P2- BaSP P22-CuCP
・　大腸菌MG1655ΔglgCΔpgmΔlacZΔagp（4KO）P22-BaSP P22-CuCP

【０１０６】

このために、振とうフラスコ実験を行った。培地は緩衝LB培地を含有し、スクロースおよびグルコースを振とうフラスコに等量加えて、1.978 gのセロビオース/Lの最終濃度を振とうフラスコ中で達成した(表５)。振とうフラスコの結果を図５に示す。所望の生成物セロビオースの(細胞外)濃度は、導入された変異の数とともに増加する。

【０１０７】

【表５】

表5 様々な操作された株のセロビオース生成

株	略称	セロビオース(g/L)
大腸菌 MG1655 P22-BaSP P22-CuCP	WT P22-BaSP P22-CuCP	0
大腸菌 MG1655 Δ*glgC* Δ*pgm* Δ*lacZ* P22-BaSP P22-CuCP	3KO P22-BaSP P22-CuCP	0.539
大腸菌 MG1655 Δ*glgC* Δ*pgm* Δ*lacZ* Δ*agp* P22-BaSP P22-CuCP	4KO P22-BaSP P22-CuCP	1.978

【０１０８】

リアクタスケールにて緩衝LB培地上でのΔpgmΔlacZΔglgCΔagp（4KO）P22-BaSP P22-CuCPによるセロビオースの生成

ΔpgmΔlacZΔglgCΔagp P22-BaSP P22-CuCPがセロビオースを生成する能力を、予備的実験においてリアクタスケールで確認した。このために、緩衝LB培地を用いる培養を行った。約９時間および特定の時点にて、500 g/Lスクロースおよび250 g/Lグルコースを含有する溶液を培養に加えた。

【０１０９】

約30%の変換効率(mol生成されたセロビオース/mol消費されたスクロース)が達成され、スクロースの約40%のグルコース部分が、セロビオースまたはグルコース-1-ホスフェートになった。約15 g/Lのセロビオースの力価が、培養の最後に達成された。

次に、セロビオースの生成を、高濃度のホスフェートおよび低濃度のホスフェートを用いて70 g/l スクロースから開始するバッチ培養において確認した。高ホスフェートは、0.2 Mホスフェートのホスフェート濃度を表し、低ホスフェートは、13 mMホスフェートの濃度を表す。これは、生成に著しく影響した。高濃度のホスフェートは、およそ20 g/lの最終力価と0.33 g/gの収率をもたらしたが、低ホスフェート濃度は、42 g/lの最終力価と、0.84 g/gの消費されたスクロースに対する収率をもたらした(図９)。

【０１１０】

実施例７．基本株２(スクロース-スクロース合成酵素)の操作およびその使用

大腸菌を代謝的に操作することにより、特別の炭水化物およびそれらの誘導体(それらの経路は、UDP-グルコースから開始する)の効率的な生産株である基本株を構築する。

スクロース合成酵素(例えばジャガイモ(Solanum tuberosum)由来)を導入することにより、スクロースをフラクトースとUDP-グルコースとに分割する。UDP-グルコース4エピメラーゼ(galE)、UDP-グルコースガラクトース-1-Pウリジリルトランスフェラーゼ(galT)、グルコース-1-Pウリジリルトランスフェラーゼ(galU、galF)、5'-ヌクレオチダーゼ/UDP-

糖加水分解酵素(ushA)、コラン酸オペロン(ca)に属するUDP-グルコース6-脱水素酵素(ugd)をコードする遺伝子をさらにノックアウトすることにより、UDP-グルコースを蓄積する変異体を構築する(表６)。

【０１１１】

【表６】

表6 基本株 UDP-グルコース

ノックアウト	反応
ca	→ コラン酸
galU	G1P +UTP <-->UDP-Glc + PPi
galF	G1P +UTP <-->UDP-Glc + PPi
galE	UDP-Glc <--> UDP-Gal
galT	UDP-Glc + Gal1P <--> UDP-Gal + G1P
ushA	UDP-糖 + H_2O <--> ウリジン-5'-ホスフェート + $2H^+$+ アルドース-1-ホスフェート
ugd	2 NAD +UDP-糖 + H_2O <--> 2 NADH + UDP-グルクロネート + $3H^+$
ノックイン	反応
スクロース合成酵素	Suc + UDP→ UDP Glu + Fruc

【０１１２】

実施例８．大腸菌におけるスクロース合成酵素の発現

スクロース合成酵素の活性を、インビトロアッセイを用いて決定した。ジャガイモからのスクロース合成酵素を、大腸菌BL21において異種発現させた。この培養物から酵素抽出物を調製し、これを500mMスクロースおよび２mM UDPとインキュベートした。生成されたUDP-グルコースの量の進展を、表７に示す。

【０１１３】

【表７】

表 7 スクロース合成酵素の切断反応の活性を証明するスクロース合成酵素アッセイ(500mM スクロースおよび 2mM UDP を含有する混合物)

サンプリング時間	形成された UDP-グルコース
0時間 10分	5mg/L
1時間 40分	64mg/L
24時間	300mg/L

【０１１４】
実施例９．ソホロース生成
基本株２(UDP-グルコース)から開始して、ソホロース単位のポリマーとして大量のソホロースを生成する株を構築する。このことは、ストレプトコッカス・ニューモニエからの遺伝子ttsをさらに導入することにより達成される(50)。ソホロース単位は、２つの方法、すなわち酸加水分解または酵素変換によりソホロースポリマーから分解して作製できる。このような酵素は、生産株において(過剰)発現させることもできる。
代謝操作方策の可能性を評価するために、ソホロースポリマーを、 大腸菌MG1655 P22-BaSP P22-ttsおよび6KO P22-BaSP P22-tts株(大腸菌MG1655ΔglgCΔpgmΔlacZΔagpΔptsGΔglk)について、これらの株を、単一炭素源としてラクトースを含有する最少培地上で成長させることにより決定した。この結果を図15に示す。これらの結果は、変異株が、野生型株と比較して、著しくより多くのソホロースポリマーを生成することを示す。
【０１１５】
実施例10．基本株３(ラクトース-ラクトースホスホリラーゼ)の操作およびその使用
ラクトースホスホリラーゼを導入することにより(20)、ラクトースをグルコースとガラクトース-１-Ｐとに分割する。agp、galE、galT、lacZをコードする遺伝子をさらにノックアウトすることにより、代謝は、２つの不連続の部分に分割される。しかし、これらの遺伝子の全ての可能な組み合わせは、ガラクトース-１-ホスフェートの蓄積の増加をもたらす。これらの遺伝子をノックアウトする代わりに、このゴールは、それらを機能不全にするかまたはそれらの発現を低減することによっても達成できる(表８)。
【０１１６】
【表８】
表８基本株３ガラクトース-1-ホスフェート(ラクトース-ラクトースホスホリラーゼ)

ノックアウト	反応
lacZ	Glu +Gal ↔ ラクトース
galE	UDP-Glc <--> UDP-Gal
agp	G1P + H2O →Glu + Pi
galT	UDP-Glc + Gal1P <--> UDP-Gal + G1P
ノックイン	反応
ラクトースホスホリラーゼ	ラクトース + Pi→ Gal1P + グルコース

【０１１７】
実施例11．ガラクトース(β1-4)L-ラムノース生成：
基本株３から開始して、Gal(β1-4)L-Rha生産株を、(ガ)ラクト-N-ビオース D-ガラクトシル-(β1-4)-L-ラムノースホスホリラーゼ(これは、ガラクトース-１-ホスフェートおよびラムノースをGal(β1-4)L-Rhaおよびホスフェートに変換する)をコードする遺伝子をさらに導入することにより構築する。
発酵は、多量のGal(β1-4)L-Rhaを生産する主な炭素源としてラクトースを用いて行う。L-ラムノースを培地に加える。ラムノースの望ましくない分解は、ラムノースの分解に関与する遺伝子(rhaA、rhaB、rhaC、rhaD)をノックアウトすることにより妨げる。
【０１１８】
実施例12．基本株4(ラクトース-ラクトース合成酵素)の操作およびその使用

ラクトース合成酵素を導入することにより(71、72)、ラクトースをグルコースとUDP-ガラクトースとに分割する。コラン酸オペロン(ca)に属するベータ-ガラクトシダーゼ(lacZ)、UDP-グルコース、ガラクトース-1-Pウリジリルトランスフェラーゼ(galT) UDP-グルコース４エピメラーゼ(galE)、５'-ヌクレオチダーゼ/UDP-糖加水分解酵素(ushA)、UDP-グルコース６-脱水素酵素(ugd)をコードする遺伝子をさらにノックアウトすることにより、UDP-ガラクトースを蓄積する変異体を構築する(表9)。

【０１１９】

【表９】

表9: 基本株4 UDP-ガラクトース(ラクトース合成酵素)

ノックアウト	反応
lacZ	Glu +Gal ↔ ラクトース
galE	UDP-Glc <--> UDP-Gal
galT	UDP-Glc + Gal1P <--> UDP-Gal + G1P
ca	→ コラン酸
ushA	UDP-糖 + H_2O <--> ウリジン-5'-ホスフェート + $2H^+$ + アルドース-1-ホスフェート
ugd	2 NAD +UDP-糖 + H_2O <--> 2 NADH + UDP-グルクロネート + $3H^+$
ノックイン	**反応**
ラクトース 合成酵素	ラクトース → UDP-Gal + Glu

【０１２０】

実施例13．ガラクチノール生成：

基本株４から開始して、ガラクチノール生産株を、イノシトール 3-アルファ-ガラクトシルトランスフェラーゼ(以下の変換：

UDP-ガラクトース+ミオ-イノシトール = UDP + O-α-D-ガラクトシル-(1→3)-1D-ミオ-イノシトール

を触媒する)をコードする遺伝子をさらに導入することにより構築する。

発酵は、多量のガラクチノールを生産する主な炭素源としてラクトースを用い、ミオ-イノシトールを培地に加えて行う。

【０１２１】

実施例14．グロボトリオース生成：

基本株４から開始して、グロボトリオース生産株を、α-1,4-Galトランスフェラーゼ(これは、UDP-Gal+ラクトース→UDP+グロボトリオースの変換を触媒する)をコードする髄膜炎菌(Neisseria meningitidis)からの遺伝子lgtC (3)をさらに導入することにより構築する。発酵は、多量のグロボトリオースを生産する主な炭素源としてラクトースを用いて行う。

【０１２２】

実施例15．基本株５の操作およびフコシル化糖の生成

フラクトース-6-ホスフェートを蓄積する基本株５(実施例20および実施例28に記載する)から開始して、フコシルラクトースおよびより具体的には1,2-フコシルラクトースのようなフコシル化糖誘導体を生成できる。このために、GDP-フコースの前駆体であるフラクトース-6-ホスフェートを細胞に強制的に生成させるように株を改変する。グルコースまたはグルコース-1-ホスフェート(開始酵素がスクラーゼまたはスクロースホスホリラーゼのいずれかであるならば)を、次いで、ペントースリン酸経路を介する中心的炭素代謝に供給する。図10は、生成物およびバイオマスに向かう経路およびこれを達成するために必要なノックアウトを示す。解糖によるフラクトース-6-ホスフェートの喪失を回避するために、pfkA、pfkBおよびpgiをノックアウトする。ピルベートの蓄積を回避するために、Entner Douderoff経路をノックアウトする(eddおよびeda)。

【０１２３】

GDP-フコースは、コラン酸生合成経路の中間体であるので、この経路を改変する必要がある。生成物収率を低減させる可能性があるコラン酸オペロンからの遺伝子をノックアウトする。これらの遺伝子は、gmm、wcaA、wcaBi、wcaC、wcaD、wcaE、wcaF、wcaI、wcaJ、wcaK、wcaLおよび/またはwcaMである。遺伝子manA、cpsG、cpsB、gmdおよびfcl (それぞれマンノース-6-ホスフェートイソメラーゼ、ホスホマンノムターゼ、マンノース-1-ホスフェートグアニリルトランスフェラーゼ、GDP-マンノース4,6-脱水酵素およびGDP-フコース合成酵素をコードする)の発現を増進させて、GDP-フコースに向かう流れを増加させる。プロモーターライブラリーからの人工的プロモーターを用いて過剰発現させる必要な遺伝子の再導入によりコラン酸オペロンを完全にノックアウトするか、または上記の遺伝子が１つずつノックアウトされ、オペロン中の残りの遺伝子の発現が、オペロンのプロモーターを人工的構成性プロモーター(23)に変更することにより増進されるようにオペロンを改変するかのいずれかである。最終的に、α-1,2-フコシルトランスフェラーゼにより、GDP-フコースをラクトースにつなげてα-1,2-フコシルラクトースにする。試験したフコシルトランスフェラーゼは、ヘリコバクター・ピロリ、バクテロイデス種、ヒト、マウス、ウシおよびキイロタマホコリカビを起源とする。

【０１２４】

実施例16. 大腸菌基本株３(ガラクトース-１-Ｐ)の操作およびその使用

ホスファターゼ(agp)、UDP-グルコース、ガラクトース-1-P ウリジリルトランスフェラーゼ(galT)、UDP-グルコース-4-エピメラーゼ(galE)をコードする遺伝子をノックアウトすることにより、ガラクトース-1-Pを蓄積する変異体を構築する。ガラクトキナーゼ(galK)および/またはガラクトース-1-エピメラーゼ(galM)をコードする遺伝子をさらに過剰発現させることにより、ガラクトース-1-Pの形成を増進する(表10)。

【０１２５】

【表１０】

表10基本株ガラクトース-1-ホスフェート

ノックアウト	反応
galT	Gal1P + UDP-グルコース ↔ UDP-ガラクトース + G1P
galE	UDP-グルコース ↔ UDP-ガラクトース
agp	グルコース-1-ホスフェート + H_2O →Pi + グルコース
ノックイン	反応
galK	α-ガラクトース + ATP → Gal1P + ADP
galM	β-ガラクトース ↔ α-ガラクトース

【０１２６】

実施例17．基本株３(ガラクトース-1P)の操作およびその使用

ホスファターゼ(agp)、UDP-グルコース、ガラクトース-1-P ウリジリルトランスフェラーゼ(galT)、UDP-グルコース-4-エピメラーゼ(galE)をコードする遺伝子をノックアウトし、ガラクトキナーゼ(galK)をコードする遺伝子をさらに過剰発現させることにより、ガラクトース-1-Pを蓄積する変異体を構築する(表11)。

【０１２７】

【表１１】

表11大腸菌基本株ガラクトース-1-ホスフェート

ノックアウト	反応
galT	Gal1P + UDP-グルコース ↔ UDP-ガラクトース + G1P
galE	UDP-グルコース ↔ UDP-ガラクトース
galK	α-ガラクトース + ATP → Gal1P + ADP
galM	β-ガラクトース ↔ α-ガラクトース
agp	グルコース-1-ホスフェート + H_2O →Pi + グルコース
ノックイン	反応
galK	α-ガラクトース + ATP → Gal1P + ADP

【０１２８】

代謝操作方策の可能性を評価するために、ガラクトース-1-ホスフェート濃度を、野生型、大腸菌MG1655ΔgalET P22 galK、大腸菌MG1655ΔgalETKMΔagp P22 galK、大腸菌MG1655ΔgalET P22 galKおよび大腸菌MG1655ΔgalETKMΔagp P22 galK + オロチン酸塩(2g/L)について、これらの株を、ラクトース(15 g/L)を主な炭素源として含有する最少培地上で成長させることにより決定した。結果を表12に示す。

【０１２９】

【表１２】

表12 様々な大腸菌変異体のガラクトース-1-P濃度

株	ガラクトース-1-P (mg/L)
大腸菌 MG1655	検出できず
大腸菌 MG1655 Δ*galET* P22 *galK*	15,73
大腸菌 MG1655 Δ*galETKM* Δagp P22 *galK*	69,08
大腸菌 MG1655 Δ*galET* P22 *galK*	12,48
大腸菌 MG1655 Δ*galETKM* Δ*agp* P22 *galK* + オロチン酸塩 (2 g/L)	64,90

【０１３０】

実施例18．大腸菌においてスクロースホスホリラーゼを用いるグルコース-6-ホスフェートの生成

スクロースホスホリラーゼを導入することにより、スクロースは、グルコース-1-Pとフラクトースとに分割される。ホスファターゼ(agp)、グルコース 6-ホスフェート-1-脱水素酵素(zwf)、ホスホグルコースイソメラーゼ(pgi)、グルコース-1-ホスフェートアデニリルトランスフェラーゼ(glgC)をコードする遺伝子をさらにノックアウトすることにより、グルコース-6-Pを蓄積する変異体を構築する。

【０１３１】

KO変異体は、代謝が２つの不連続の部分に分割されるような様式で選択する。しかし、これらの遺伝子の全ての可能な組み合わせは、供給の増加をもたらす。これらの遺伝子をノックアウトする代わりに、ゴールは、これらの機能不全にするかまたはこれらの発現を低減することによっても達成される。

大腸菌を代謝的に操作することにより、特別の炭水化物およびそれらの誘導体（その経路がグルコース-6-Pから開始する）の効率的な生産株である基本株が構築される(表13)。

【０１３２】

【表１３】

表13 スクロースホスホリラーゼを用いる基本株グルコース-6-ホスフェート

ノックアウト	反応
zwf	G6P + NADP → 6PG + NADPH
agp	G1P + H_2O → Glc + Pi
glgC	G1P + ATP + H <-> ADP-グルコース + PPi
pgi	G6P↔F6P
ノックイン	**反応**
スクロースホスホリラーゼ	Suc + Pi→ G1P + Fru
pgm	G6P↔G1P

【０１３３】

実施例19．大腸菌においてインベルターゼを用いるグルコース-6-ホスフェートの生成

スクロース加水分解酵素/インベルターゼを導入することにより、スクロースは、グルコースとフラクトースとに分割される。ホスファターゼ(agp)、グルコース6-ホスフェート-1-脱水素酵素(zwf)、ホスホグルコースイソメラーゼ(pgi)、グルコース-1-ホスフェートアデニリルトランスフェラーゼ(glgC)、ホスホグルコムターゼ(pgm)をコードする遺伝子をさらにノックアウトすることにより、グルコース-6-Pを蓄積する変異体を構築する(表14)。

【０１３４】

【表１４】

表14: 大腸菌においてインベルターゼを用いる基本株グルコース-6-ホスフェート

ノックアウト	反応
zwf	G6P + NADP → 6PG + NADPH
agp	G1P + H_2O → Glu + Pi
pgi	G6P↔F6P
pgm	G6P↔G1P
ノックイン	**反応**
インベルターゼ	Suc + H_2O→ Glc + Fru

【０１３５】

実施例20．大腸菌においてインベルターゼを用いるフラクトース-6-ホスフェートの生成

スクロース加水分解酵素/インベルターゼを導入することにより、スクロースをグルコースとフラクトースとに分割する。ホスファターゼ(agp)、ホスホフルクトキナーゼ(pfkA

およびpfkB)、ホスホグルコースイソメラーゼ(pgi)、グルコース-1-ホスフェートアデニリルトランスフェラーゼ(glgC)、ホスホグルコムターゼ(pgm)をコードする遺伝子をさらにノックアウトすることにより、フラクトース-6-ホスフェートを蓄積する変異体を構築する(表15)。

【０１３６】

【表１５】

表15 基本株フラクトース-6-ホスフェート

ノックアウト	反応
pfkA	F6P+ATP→ FBP+ADP
pfkB	F6P+ATP→ FBP+ADP
agp	G1P + H_2O → Glc + Pi
pgi	G6P↔F6P
pgm	G6P↔G1P
ノックイン	反応
インベルターゼ	Suc + H_2O → Glc + Fru

【０１３７】

実施例21. 大腸菌においてマルトースホスホリラーゼを用いるβ-グルコース-1-ホスフェートの生成

マルトースホスホリラーゼを導入することにより、マルトースをβ-D-グルコース1-ホスフェートとグルコースとに分割する。ホスファターゼ(agp、yfbT)、ホスホグルコムターゼ(ycjU)、マルトース加水分解酵素(malPQ)をコードする遺伝子をさらにノックアウトすることにより、β-グルコース-1-Pを蓄積する変異体を構築する。KO変異体は、代謝が２つの不連続の部分に分割されるような様式で選択する。しかし、これらの遺伝子の全ての可能な組み合わせは、供給の増加をもたらす。これらの遺伝子をノックアウトする代わりに、このゴールは、これらを機能不全にするかまたはこれらの発現を低減させることによっても達成される(表16)。

【０１３８】

【表１６】

表16: 大腸菌においてマルトースホスホリラーゼを用いる基本株 β-D-グルコース-1-ホスフェート

ノックアウト	反応
malPQ	マルトース → グルコース
yfbT	β-D-グルコース 1-ホスフェート +H_2O → グルコース+ Pi
agp	グルコース-1-ホスフェート +H_2O → グルコース+ Pi
ycjU	β-D-グルコース 1-ホスフェート <=> β-D-グルコース-6-ホスフェート
ノックイン	**反応**
マルトースホスホリラーゼ (MP)	マルトース + Pi→ グルコース-1P + グルコース

【０１３９】

実施例22．大腸菌においてトレハロースホスホリラーゼを用いるβ-グルコース-1-ホスフェートの生成

トレハロースホスホリラーゼを導入することにより、トレハロースをβ-D-グルコース1-ホスフェートとグルコースとに分割する。ホスファターゼ(agp、yfbT)、ホスホグルコムターゼ(ycjU)、望ましくない本来のトレハロース分解酵素(treABC、treC、treE、treF)をコードする遺伝子をさらにノックアウトすることにより、β-グルコース-1-ホスフェートを蓄積する変異体を構築する(表17)。

KO変異体は、代謝が２つの不連続の部分に分割されるような様式で選択する。しかし、これらの遺伝子の全ての可能な組み合わせは、生産性の増加をもたらす。これらの遺伝子をノックアウトする代わりに、このゴールは、これらを機能不全にするかまたはこれらの発現を低減させることによって達成される。

【０１４０】

【表１７】

表 17 大腸菌においてトレハロースホスホリラーゼを用いる基本株 β-D-グルコース-1-ホスフェート

ノックアウト	反応
treA	トレハロース + H2O → 2 β-D-グルコース
treC	トレハロース 6-ホスフェート + H2O → β-D-グルコース-6-ホスフェート + β-D-グルコース
treE	トレハロース 6-ホスフェート + H_2O ↔ β-D-グルコース-6-ホスフェート + β-D-グルコース
treF	トレハロース + H2O ↔ 2 β-D-グルコース
yfbT	β-D-グルコース 1-ホスフェート +H_2O → グルコース + Pi
agp	グルコース 1-ホスフェート +H_2O → グルコース + Pi
ycjU	β-D-グルコース 1-ホスフェート ↔ β-D-グルコース-6-ホスフェート
ノックイン	反応
トレハロースホスホリラーゼ (TP)	トレハロース + Pi→ β-D-グルコース-1P + グルコース
otsB	トレハロース-6-ホスフェート + H_2O → トレハロース + Pi

【０１４１】

実施例23．コウジビオースの生成

β-D-グルコース1-ホスフェートを蓄積する株にコウジビオースホスホリラーゼをさらに導入し、グルコキナーゼ(glk)およびホスホトランスフェラーゼ系(ptsG)をコードする遺伝子をさらにノックアウトすることにより、コウジビオースを生成する変異体を構築する。

発酵は、大腸菌変異株(ΔlacZΔglgCΔagpΔptsGΔmalPQΔycjU pCXp22MPp22KP)を用い

て、コウジビオースを生産する主な炭素源としてマルトースおよびグルコースを用いて行う(図16)。

【０１４２】

実施例24．スクロースホスホリラーゼによるスクロースからのUDPグルコースの生成

スクロースホスホリラーゼ(例えばビフィドバクテリウム・アドレセンティスを起源とする)を導入することにより、スクロースをフラクトースとグルコース-1-Pとに分割する。グルコース-1-ホスフェート蓄積株(上の実施例を参照)から開始し、UDP-グルコース4エピメラーゼ(galE)、UDP-グルコースガラクトース-1-Pウリジリルトランスフェラーゼ(galT)、５'-ヌクレオチダーゼ/UDP-糖加水分解酵素(ushA)、UDP-グルコース6-脱水素酵素(ugd)をコードする遺伝子をさらにノックアウトすることにより、UDP-グルコースピロホスホリラーゼ(例えばビフィドバクテリウム・ビフィダム(Bifidobacterium bifidum)に由来する)をコードする遺伝子をさらに過剰発現させることによりUDP-グルコースを蓄積する変異体を構築する(表18)。

【０１４３】

【表１８】

表 18 大腸菌におけるスクロースホスホリラーゼによるスクロースからの基本株 UDP-グルコース

ノックアウト	反応
lacZ	Glu +Gal ↔ ラクトース
galE	UDP-グルコース↔UDP-ガラクトース
galT	Gal1P + UDP-グルコース ↔ UDP-ガラクトース + G1P
ca	→ コラン酸
ushA	UDP-糖 + H_2O ↔ ウリジン-5'-ホスフェート + α-D-アルドース-1-ホスフェート + 2 H+
ugd	2 NAD+ + UDP-D-グルコース + H_2O ↔ 2 NADH + UDP-D-グルクロネート + 3 H+
pgm	G1P ↔ G6P
glgC	G1P + ATP + H <-> ADP-グルコース + PPi
agp	G1P + H_2O → Glu + Pi
ptsG	Glc + PEP → G6P + Pyr
glk	Glc + ATP → G6P + ADP
ノックイン	**反応**
galU/F	G1P +UTP –UDP-グルコース + PPi
スクロースホスホリラーゼ	Suc → G1P + Fru

【０１４４】

実施例25．スクロース-6-ホスフェート合成酵素とスクロースPTSとを組み合わせて大腸菌において用いるUDP-グルコースの生成

スクロースPTS (94)およびスクロース-6-ホスフェート合成酵素(69)を導入することにより、スクロースは、フラクトース-6-ホスフェートおよびUDP-グルコースに変換される。実施例４に記載する株から開始して、スクロースホスホリラーゼを用いずに、そしてホスファターゼ(agp)、UDP-グルコース4エピメラーゼ(galE)、UDP-グルコースガラクトース-1-P ウリジリルトランスフェラーゼ(galT)、５'-ヌクレオチダーゼ/UDP-糖加水分解酵素

(ushA)、UDP-グルコース6-脱水素酵素(ugd)をコードする遺伝子をさらにノックアウトすることにより、UDP-グルコースを蓄積する変異体を、UDP-グルコースピロホスホリラーゼ(ビフィドバクテリウム・ビフィダム)をコードする遺伝子をさらに過剰発現させることにより、構築する(表19)。

【０１４５】

【表１９】

表 19 スクロース PTS と組み合わせたスクロース-6-ホスフェート合成酵素を用いる基本株 UDP-グルコース

ノックアウト	反応
galE	UDP-グルコース↔UDP-ガラクトース
galU/galF	UTP + G1P ↔ UDP-グルコース + PPi
galT	Gal1P + UDP-グルコース ↔ UDP-ガラクトース + G1P
ca	→ コラン酸
ushA	UDP-糖 + H_2O ↔ ウリジン-5'-ホスフェート + α-D-アルドース-1-ホスフェート + 2 H+
ugd	2 NAD+ + UDP-D-グルコース + H_2O ↔ 2 NADH + UDP-D-グルクロネート + 3 H+
ノックイン	**反応**
スクロース 6P 合成酵素	UDP-グルコース + D-フラクトース 6-ホスフェート → UDP + スクロース 6-ホスフェート
スクロース PTS	スクロース + PEP→ スクロース-6-ホスフェート + ピルベート

【０１４６】

実施例26．ガラクトキナーゼによるUDPガラクトースの生成

ガラクトキナーゼ(galK)およびガラクトース-1-ホスフェートウリジリルトランスフェラーゼ(例えばビフィドバクテリウム・ビフィダムを起源とする)をコードする遺伝子を過剰発現させることにより、UDP-ガラクトースの形成を増進する。ホスファターゼ(agp)、UDP-グルコース、ガラクトース-1-Pウリジリルトランスフェラーゼ(galT)、UDP-グルコース-4-エピメラーゼ(galE)をコードする遺伝子をさらにノックアウトすることにより、ガラクトース-1-Pを蓄積する変異体を構築する(表20)。

【０１４７】

【表２０】

表20 ガラクトキナーゼを介する基本株 UDP-ガラクトース

ノックアウト	反応
galT	Gal1P + UDP-グルコース ↔ UDP-ガラクトース + G1P
galE	UDP-グルコース ↔ UDP-ガラクトース
galK	α-ガラクトース + ATP → Gal1P + ADP
galM	β-ガラクトース ↔ α-ガラクトース
agp	グルコース 1-ホスフェート + H2O →Pi + グルコース
ノックイン	反応
galK	α-ガラクトース + ATP → Gal1P + ADP
ガラクトース-1-ホスフェートウリジリルトランスフェラーゼ	Gal1P + UTP→UDP-ガラクトース +PPi

【０１４８】

実施例27．ラクトースホスホリラーゼによるUDPガラクトースの生成

ラクトースホスホリラーゼ(20)を導入することにより、ラクトースをグルコースとガラクトース-1-Pとに分割する。ホスファターゼ(agp)、UDP-グルコース、ガラクトース-1-Pウリジリルトランスフェラーゼ(galT)、UDP-グルコース-4-エピメラーゼ(galE)をコードする遺伝子をノックアウトすることにより、ガラクトース-1-Pを蓄積する変異体を構築する。ガラクトース-1-ホスフェートウリジリルトランスフェラーゼをコードする遺伝子(例えばビフィドバクテリウム・ビフィダムに由来する)をさらに過剰発現させることにより、UDP-ガラクトースの形成を増進する(表21)。

KO変異体は、代謝が２つの不連続の部分に分割されるような様式で選択する。しかし、これらの遺伝子の全ての可能な組み合わせは、生産性の増加をもたらす。これらの遺伝子をノックアウトする代わりに、このゴールは、これらの機能不全にするかまたはこれらの発現を低減することにより達成される。

【０１４９】

【表２１】

表21 ラクトースホスホリラーゼを介する基本株UDP-ガラクトース

ノックアウト	反応
lacZ	Glu +Gal ↔ ラクトース
galE	UDP-Glc <--> UDP-Gal
agp	G1P + H_2O →Glu + Pi
galT	UDP-Glc + Gal1P <--> UDP-Gal + G1P
ノックイン	**反応**
ラクトースホスホリラーゼ	ラクトース + Pi→ Gal1P + グルコース
ガラクトース-1-ホスフェート ウリジリルトランスフェラーゼ	Gal1P + UTP→UDP-ガラクトース +PPi

【０１５０】

実施例28．大腸菌におけるフラクトース-6-ホスフェートの蓄積

代謝を、フラクトース-6-ホスフェートを蓄積させるために分割する。このことは、ホスホグルコースイソメラーゼおよびホスホフルクトキナーゼ活性をコードする遺伝子をノックアウトすることにより達成される。大腸菌では、これらの活性は、遺伝子pgi、pfkAおよびpfkBによりコードされる。これらの活性を有さない株の成長速度を、グルコースおよびスクロース上での成長について表22に記載する。野生型株の成長速度は、スクロースホスホリラーゼの導入後にスクロース上で成長させた場合に、グルコース上での成長と比較していくらか影響されたが、pgiノックアウトならびにpfkAおよびpfkB二重変異の導入は、成長速度の著しい低下を導き、後者は、グルコース上では著しく低い(0.02 h-1)。驚くべきことに、変異株ΔpgiΔpfkAΔpfkBは、Δpgi単一変異体のものと同様の成長速度を有する。

【０１５１】

【表２２】

表 22: グルコースおよびスクロースを含む最少培地上での解糖ノックアウト株の比成長速度。スクロース上で成長した株において、スクロースホスホリラーゼをコードするプラスミドを導入した。

株	グルコース上での成長(h-1)	スクロース上での成長(h-1)
野生型	0.64	0.41
Δ*pgi*	0.18	0.23
Δ*pfkA*Δ*pfkB*	0.02	n.d.
Δ*pgi*Δ*pfkA*Δ*pfkB*	0.23	0.24

【０１５２】

ΔpgiΔpfkAΔpfkB変異株だけが、スクロース上で成長させた場合に培地中にフラクトース-6-ホスフェートを蓄積し、他の株は、いずれのF6P蓄積も示さなかった。この株による成長プロフィールおよびF6P蓄積を図17に示す。

【０１５３】

実施例29．サッカロミセス・セレビシエにおけるαグルコース-1-ホスフェートの蓄積

サッカロミセス・セレビシエは天然でスクロースを分割するので、遺伝子SUC2、MAL32、MAL12、YJL216C、YGR287cによりコードされる全ての代替スクロース分解反応(インベルターゼ)をノックアウトする。α-グルコース-1-ホスフェートの資化を回避するために、この活性化炭水化物を変換する酵素の機能を低下させるかまたは非機能的にする。これらの酵素は、PGM1およびPGM2によりコードされるホスホグルコムターゼと、INM1およびINM2によりコードされるグルコース-1-ホスファターゼである。スクロースホスホリラーゼ(例えばビフィドバクテリウム・アドレセンティスを起源とする)を導入することにより、大腸菌の分割代謝と同様(上記の実施例を参照)。サッカロミセス・セレビシエ代謝を２つの部分に分割して、αグルコース-1-ホスフェートの蓄積をもたらす。

【０１５４】

実施例30．サッカロミセス・セレビシエを用いるセロビオース生成

サッカロミセス・セレビシエは天然でスクロースを分割するので、遺伝子SUC2、MAL32、MAL12、YJL216C、YGR287cによりコードされる全ての代替スクロース分解反応(インベルターゼ)をノックアウトする。α-グルコース-1-ホスフェートの資化を回避するために、この活性化炭水化物を変換する酵素の機能を低下させるかまたは非機能的にする。これらの酵素は、PGM1およびPGM2によりコードされるホスホグルコムターゼと、INM1およびINM2によりコードされるグルコース-1-ホスファターゼである。スクロースホスホリラーゼ(例えばビフィドバクテリウム・アドレセンティスを起源とする)を導入することにより、大腸菌の分割代謝と同様(上記の実施例を参照)。サッカロミセス・セレビシエ代謝を２つの部分に分割して、αグルコース-1-ホスフェートの蓄積をもたらす。セルロモナス・ウダを起源とするセロビオースホスホリラーゼ遺伝子を導入することにより、サッカロミセス・セレビシエは、セロビオースを生成できる。

グルコースの分解を回避するために、GLK1によりコードされるグルコキナーゼ活性もノックアウトする。サッカロミセス・セレビシエにおけるヘキソキナーゼは特異的でないので、これらを、特定の異種基質特異的ヘキソキナーゼに置きかえる。大腸菌またはビフィドバクテリウム・アドレセンティスを起源とするフルクトキナーゼは、グルコースについてより低い活性を示し、HXK1およびHXK2によりコードされる天然ヘキソキナーゼをコードする遺伝子を置き換えることができる。

【０１５５】
実施例31．スクロースホスホリラーゼの導入によるサッカロミセス・セレビシエにおけるフラクトース-6-ホスフェートの蓄積
サッカロミセス・セレビシエは天然でスクロースを分割するので、遺伝子SUC2、MAL32、MAL12、YJL216C、YGR287cによりコードされる全ての代替スクロース分解反応(インベルターゼ)をノックアウトする。ビフィドバクテリウム・アドレセンティスからのスクロースホスホリラーゼを導入することにより、スクロースをフラクトースとグルコース-1-ホスフェートとに分割する。フラクトース-6-ホスフェートがバイオマスに変換されることを回避するために、酵素ホスホグルコースイソメラーゼおよびホスホフルクトキナーゼの活性を、遺伝子PGM1、PFK1およびPFK2の機能を低下させるかまたは非機能的にすることにより、それぞれ低減または排除する。
【０１５６】
実施例32．サッカロミセス・セレビシエにおけるガラクトース-1-ホスフェートの蓄積
ガラクトース-1-ホスフェートは、二糖類ラクトースに由来する。サッカロミセス・セレビシエは天然でラクトースを分割しないので、異種β-ガラクトシダーゼ(例えば大腸菌から)を導入する。このことにより、ラクトースがガラクトースおよびグルコースに分解される。ゴールは、特別の炭水化物の生合成経路へのガラクトース-1-ホスフェートの供給を増やすことである。よって、ガラクトース-1-ホスフェートはバイオマスにもはや変換されない可能性がある(このことは、UDP-グルコース-ヘキソース-1-ホスフェートウリジリルトランスフェラーゼ、アルドース還元酵素により触媒される)。このことは、UDP-グルコース-ヘキソース-1-ホスフェートウリジリルトランスフェラーゼならびにアルドース還元酵素、GAL7およびGRE3をそれぞれコードする遺伝子をノックアウトすることにより達成される。上記のガラクトース-1-ホスフェートの分解を回避するために、ガラクトース-1-ホスファターゼをコードする遺伝子をノックアウトする。これらは、INM1およびINM2である。ガラクトキナーゼは、ガラクトースからのガラクトース-1-ホスフェートの形成を増進するために過剰発現させる。
【０１５７】
実施例33．その天然のインベルターゼによるサッカロミセス・セレビシエでのグルコース-6-ホスフェート蓄積
サッカロミセス・セレビシエの代謝を２つの部分に分割するために(グルコース-6-ホスフェートの供給を増進させて、特別の炭水化物のために基本単位として用いることができるようにする)、それぞれ遺伝子ZWF1、PGM1およびPGM2、ならびにPGI1によりコードされるグルコース-6-ホスフェート脱水素酵素、ホスホグルコムターゼおよびホスホグルコースイソメラーゼをノックアウトする。このような株において、スクロースは、天然のインベルターゼによりフラクトースとグルコースとに分割され、天然のヘキソキナーゼによりフラクトース-6-ホスフェートとグルコース-6-ホスフェートとにリン酸化される。グルコース-6-ホスフェートは、次いで、特別の炭水化物生合成経路に供給され、フラクトース-6-ホスフェートがバイオマスに変換される。
【０１５８】
実施例34．スクロースホスホリラーゼによるサッカロミセス・セレビシエでのグルコース-6-ホスフェートの蓄積
サッカロミセス・セレビシエを改変して、ビフィドバクテリウム・アドレセンティスを起源とするスクロースホスホリラーゼを用いてスクロースからグルコース-6-ホスフェートを生成する。スクロースホスホリラーゼは、インベルターゼとスクロースについて競合するので、インベルターゼ活性をコードする遺伝子をノックアウトする。これらの遺伝子は、SUC2、MAL32、MAL12、YJL216CおよびYGR287cである。グルコース-1-ホスフェートは、次いで、PGM1およびPGM2によりコードされるホスホグルコムターゼを用いてグルコース-6-ホスフェートへさらに変換される。グルコース-1-ホスフェートがグルコースに分解されることを回避するために、INM1およびINM2によりコードされるグルコース-1-ホファターゼをコードする遺伝子をノックアウトする。この活性化糖類の資化を、遺伝子YHL012W

およびUGP1の機能を低下させるかまたは非機能的にすることにより細胞におけるUTPグルコース-1-ホスフェートウリジリルトランスフェラーゼ活性を排除することによりさらに低減する。フラクトース部分は、HXK1およびHXK2によりコードされる天然のヘキソキナーゼによりリン酸化され、バイオマスに変換される。

【０１５９】

実施例35．スクロース合成酵素によるサッカロミセス・セレビシエでのUDP-グルコース形成の増進

サッカロミセス・セレビシエは天然でスクロースを分割するので、遺伝子SUC2、MAL32、MAL12、YJL216C、YGR287cによりコードされる全ての代替スクロース分解反応(インベルターゼ)をノックアウトする。例えばジャガイモを起源とするスクロース合成酵素を導入して、スクロースをUDP-グルコースとフラクトースとに分割する。UDP-グルコースがバイオマスに変換されることを回避するために、酵素UDP-グルコースジホスホリラーゼ、UDP-グルコース4-エピメラーゼ、UDP-グルコース-ヘキソース-1-ホスフェートウリジリルトランスフェラーゼ、UDP-グルコース-グリコーゲングルコシルトランスフェラーゼ、UDP-グルコース-1,3-ベータ-D-グルカングルコシルトランスフェラーゼ、UDP-グルコース-グルコースホスフェートグルコシルトランスフェラーゼの活性を、機能を低下させるかまたは非機能的にし、これらの酵素は、それぞれ遺伝子UGP1およびYHL012W、GAL10、GAL7、GSY1およびGSY2、FEN1およびFKS1およびGSC2ならびにTPS1によりコードされる。フラクトース部分は、HXK1およびHXK2によりコードされる天然ヘキソキナーゼによりリン酸化され、バイオマスに変換される。

【０１６０】

実施例36．スクローススクロースホスホリラーゼによるサッカロミセス・セレビシエでのUDP-グルコース形成の増進

サッカロミセス・セレビシエにおけるUDP-グルコース供給を増進するために、実施例29に記載する株を、UTP-グルコース-1-ホスフェートウリジリルトランスフェラーゼ(これは、UDP-グルコースへのα-グルコース-1-ホスフェートの変換を触媒する)をコードする遺伝子GAL7を過剰発現させることによりさらに改変する。

【０１６１】

実施例37．β-ガラクトシダーゼによるサッカロミセス・セレビシエでのUDP-ガラクトース形成の増進

サッカロミセス・セレビシエにおけるUDP-ガラクトース供給を増進するために、実施例32に記載する株を、UTP-ガラクトース-1-ホスフェートウリジリルトランスフェラーゼ(例えばビフィドバクテリウム・ビフィダムに由来する)(これは、UDP-ガラクトースへのα-ガラクトース-1-ホスフェートの変換を触媒する)をコードする遺伝子を過剰発現させることによりさらに改変する。

【０１６２】

実施例38．キイロタマホコリカビα1,2-フコシルトランスフェラーゼ活性導入

キイロタマホコリカビα1,2-フコシルトランスフェラーゼ(FT)は、比較的新しいグリコシルトランスフェラーゼクラスの一部分である。全ての既知のFTはクラスGT11に属するが、キイロタマホコリカビFTはクラスGT74に属する。このようなFTは、現在まで、２つの他の生物、すなわちデスルホコッカス・オレオボランス(Desulfococcus oleovorans)およびデスルホトマキュラム・レデュセンス(Desulfotomaculum reducens)だけで見出されていた。第３のクラスはGT37であり、これは、植物FTだけを含有する(図18)。clustalWおよびTcoffeeアラインメントは、エイチ・ピロリとの同一性が、それぞれ9.7%および15.5%だけであることを示した。GT11の保存モチーフを図19に示し、これらは、タマホコリカビタンパク質では全く生じない(67)。これらのドメインは、トランスフェラーゼのフコシル化活性について区別する。最初の２つのモチーフはα-1,2-フコシルトランスフェラーゼおよびα-6-フコシルトランスフェラーゼについて同じであるが、第３のモチーフにより、酵素は互いに区別される。α-1,3-フコシルトランスフェラーゼは、２つの完全に異なる保

存モチーフを含有する。

【０１６３】

キイロタマホコリカビFTは、しかし、ラクト-N-ビオース上でだけ活性であり、ガラクトースフェニル-β-ガラクトシド、Galβ1-6-GlcNac、ラクトース、Galβ1-6Gal、Xyl、Glc、GlcNAcおよびGalNac上では活性でないことが記載された(92)。

【０１６４】

図20において、キイロタマホコリカビフコシルトランスフェラーゼアッセイのLC MSMS分析を示す。このアッセイは、驚くべきことに、この異種発現されたフコシルトランスフェラーゼが、受容体としてのラクトースおよびフコース供与体としてのGDP-フコースを用いて活性であることを示した。この酵素の活性は0.19±0.01 U/mgタンパク質であり、PerssonおよびPalcicの方法(68)に従って決定された。

【０１６５】

キイロタマホコリカビの酵素の半分だけがそのα1,2-フコシルトランスフェラーゼ活性を担うので、この部分を、完全酵素と同じ様式で、しかしヌクレオチド配列の前に追加の開始コドン(ATGによりコードされる)を加えてクローニングした。この新しい酵素をΔlacZΔglgCΔmanAΔCA変異株で生成し、α1,2-フコシルトランスフェラーゼ活性についてLC MSMSを用いてアッセイした。図21は、この部分的酵素が、GDP-フコースおよびラクトースから2-フコシルラクトースをまだ生成できることを示す。

【０１６６】

実施例39．大腸菌におけるミオ-イノシトール生成

グルコース-6-ホスフェートを蓄積する基本株から開始して、ミオ-イノシトール-1-ホスフェート合成酵素(INO1、サッカロミセス・セレビシエを起源とする)およびミオ-イノシトール-1(または4)-モノホスファターゼ(INM1およびINM2、サッカロミセス・セレビシエを起源とする)をコードする遺伝子をさらに導入することにより、ミオ-イノシトール生産株を構築する。

【０１６７】

実施例40．大腸菌におけるラクト-N-ビオース生成

ガラクトース-1-ホスフェートを蓄積する基本株から開始して、ラクト-N-ビオースホスホリラーゼ(lnbp、ビフィドバクテリウム・ロンガム(Bifidobacterium longum))をコードする遺伝子をさらに導入することにより、ラクト-N-ビオース生産株を構築する。発酵は、炭素源としてラクトースおよびN-アセチルグルコサミンを用いて行う。N-アセチルグルコサミンの分解は、生産株において、N-アセチル-D-グルコサミンキナーゼ活性(nagK)およびN-アセチルグルコサミンPTS活性(nagE、ptsH、ptsI、manXYZ)を排除することにより阻害される。

【０１６８】

【表２３－１】

本文中で用いた略語のリスト

3KO	遺伝子 *pgm*、*lacZ* および *glgC* がノックアウトされた変異株
4KO	遺伝子 *pgm*、*lacZ*、*glgC* および *agp* がノックアウトされた変異株
6PG	6-ホスホグルコネート
BA	ビフィドバクテリウム・アドレセンティス
BaSP	ビフィドバクテリウム・アドレセンティスを起源とするスクロースホスホリラーゼ
CA	Stevenson ら(86)により定義されるコラン酸オペロン
CDW	細胞乾燥重量
CuCP	セルロモナス・ウダセロビオースホスホリラーゼ
F6P	フラクトース-6-ホスフェート
FBP	フラクトース-1,6-ビスホスフェート
Fru	フラクトース
FT	α1,2-フコシルトランスフェラーゼ
G1P	グルコース-1-ホスフェート
Gal1P	ガラクトース-1-ホスフェート
Glc	グルコース
Glu	グルコース
KI	ノックイン
KO	ノックアウト
KP	コウジビオースホスホリラーゼ
LA	ラクトバチルス・アシドフィラス
LB	Luria Bertani ブロス
LM	ロイコノストック・メセンテロイデス
MP	マルトースホスホリラーゼ

【０１６９】

【表２３－２】

P22	De Mey ら(2007)のプロモーターライブラリーのプロモーター22
pCXp22	Aerts ら(1)による P22 プロモーターを含有するプラスミド
PEP	ホスホエノールピルベート
Pi	無機ホスフェート
PPi	ピロホスフェート
Pyr	ピルベート
rpm	回転毎分
SM	ストレプトコッカス・ミュータンス
SP	スクロースホスホリラーゼ
Suc	スクロース
UDP-gal	UDP-ガラクトース
UDP-glc	UDP-グルコース
WT	野生型株

【０１７０】

【表２４－１】

参考文献

1. **Aerts, D., T. Verhaeghe, M. De Mey, T. Desmet** および **W. Soetaert.** 2010. A constitutive expression system for high throughput screening. Engineering in Life Sciences **10:**DOI: 10.1002/elsc.201000065.

2. **Agrawal, N., P. V. N. Dasaradhi, A. Mohmmed, P. Malhotra, R. K. Bhatnagar** および **S. K. Mukherjee.** 2003. RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. Microbiology and Molecular Biology Reviews **67:**657-685.

3. **Antoine, T., C. Bosso, A. Heyraud** および **E. Samain.** 2005. Large scale in vivo synthesis of globotriose and globotetraose by high cell density culture of metabolically engineered *Escherichia coli*. Biochimie **87:**197-203.

4. **Avihoo, A., I. Gabdank, M. Shapira** および **D. Barash.** 2007. *In silico* design of small RNA switches. IEEE Transactions on Nanobioscience **6:**4-11.

5. **Ayres, E. K., V. J. Thomson, G. Merino, D. Balderes** および **D. H. Figurski.** 1993. Precise deletions in large bacterial genomes by Vector-mediated Excision (VEX) : The trfA gene of promiscuous plasmid RK2 is essential for replication in several gram-negative hosts. Journal of Molecular Biology **230:**174-185.

6. **Badet, B., P. Vermoote, P. Y. Haumont, F. Lederer** および **F. Le Goffic.** 1987. Glucosamine synthetase from *Escherichia coli*: purification, properties, and glutamine-utilizing site location. Biochemistry **26:**1940-1948.

7. **Balbás, P., M. Alexeyev, I. Shokolenko, F. Bolivar** および **F. Valle.** 1996. A pBRINT family of plasmids for integration of cloned DNA into the *Escherichia coli* chromosome. Gene **172:**65-69.

8. **Balbas, P.** および **G. Gosset.** 2001. Chromosomal editing in *Escherichia coli.* Molecular Biotechnology **19:**1-12.

9. **Beauprez, J.** 2010. Metabolic modelling and engineering of *Escherichia coli* for succinate production. PhD. Ghent University, Ghent.

10. **Boles, E., W. Liebetrau, M. Hofmann** および **F. K. Zimmermann.** 1994. A family of hexosephosphate mutases in Saccharomyces cerevisiae. European Journal of Biochemistry **220:**83-96.

11. **Buchholz, A., R. Takors** および **C. Wandrey.** 2001. Quantification of Intracellular Metabolites in Escherichia coli K12 Using Liquid Chromatographic-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometric Techniques. Analytical Biochemistry **295:**129-137.

12. **Burda, P.** および **M. Aebi.** 1998. The ALG10 locus of Saccharomyces cerevisiae encodes the Î±-1,2 glucosyltransferase of the endoplasmic reticulum: the terminal glucose of the lipid-linked oligosaccharide is required for efficient N-linked glycosylation. Glycobiology **8:**455-462.

13. **Byun, S.-G., M.-D. Kim, W.-H. Lee, K.-J. Lee, N. Han** および **J.-H. Seo.** 2007. Production of GDP-l-fucose, l-fucose donor for fucosyloligosaccharide synthesis, in recombinant *Escherichia coli*. Applied Microbiology and Biotechnology **74:**768-775.

14. **Cherepanov, P. P.** および **W. Wackernagel.** 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.

【０１７１】

【表２４－２】

15. **Chow, T., M. J. Goldenthal, J. D. Cohen, M. Hegde** および **J. Marmur.** 1983. Identification and physical characterization of yeast maltase structural genes. Molecular and General Genetics MGG **191:**366-371.

16. **Chow, T. H. C., P. Sollitti** および **J. Marmur.** 1989. Structure of the multigene family of <i>MAL</i> loci in <i>Saccharomyces</i&gt. Molecular and General Genetics MGG **217:**60-69.

17. **Czar, M. J., J. C. Anderson, J. S. Bader** および **J. Peccoud.** 2009. Gene synthesis demystified. Trends in Biotechnology **27:**63-72.

18. **Daran, J. M., N. Dallies, D. Thines-Sempoux, V. Paquet** および **J. François.** 1995. Genetic and Biochemical Characterization of the UGP1 Gene Encoding the UDP-Glucose Pyrophosphorylase from Saccharomyces cerevisiae. European Journal of Biochemistry **233:**520-530.

19. **Datsenko, K. A.** および **B. L. Wanner.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America **97:**6640-6645.

20. **De Groeve, M., V. Depreitere, T. Desmet** および **W. Soetaert.** 2009. Enzymatic production of α-D-galactose 1-phosphate by lactose phosphorolysis. Biotechnology Letters **31:**1873-1877.

21. **De Mey, M.** 2007. Metabolic modelling and engineering of *Escherichia coli* to minimize acetate formation in recombinant DNA fermentation processes. Ghent University, Ghent.

22. **De Mey, M., A. Cerdobbel, K. Van Nieuland, J. Maertens, W. Soetaert** および **E. J. Vandamme.** 2006. Promoter Engineering: A Useful Tool for Fine Tunning Gene Expression in *Escherichia coli*. Department of Biochemical and Microbial Technology, Ghent University.

23. **De Mey, M., J. Maertens, G. J. Lequeux, W. K. Soetaert** および **E. J. Vandamme.** 2007. Construction and model-based analysis of a promoter library for *E. coli*: an indispensable tool for metabolic engineering. BMC Biotechnology **7:**34-48.

24. **De Virgilio, C., N. BÜRckert, W. Bell, P. JenÖ, T. Boller** および **A. Wiemken.** 1993. Disruption of TPS2, the gene encoding the 100-kDa subunit of the trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex in Saccharomyces cerevisiae, causes accumulation of trehalose-6-phosphate and loss of trehalose-6-phosphate phosphatase activity. European Journal of Biochemistry **212:**315-323.

25. **Dedhia, N. N., T. Hottiger** および **J. E. Bailey.** 1994. Overproduction of glycogen in *Escherichia coli* blocked in the acetate pathway improves cell growth. Biotechnology and Bioengineering **44:**132-139.

26. **Dickinson, J. R.** 1991. Biochemical and genetic studies on the function of, and relationship between, the PGI1- and CDC30-encoded phosphoglucose isomerases in Saccharomyces cerevisiae. Journal of General Microbiology **137:**765-770.

27. **Dippel, R.** および **W. Boos.** 2005. The Maltodextrin System of Escherichia coli: Metabolism and Transport. J. Bacteriol. **187:**8322-8331.

28. **Edwards, C. J., D. J. Innes, D. M. Burns** および **I. R. Beacham.** 1993. UDP-sugar hydrolase enzymes in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*: silent alleles of *ushA* in related strains of group I *Salmonella* isolates, and of *ushB* in wild type and K12 strains of *Escherichia coli* indicate recent and early silencing events, respectively I. Fems Microbiology Letters **114:**293-298.

【０１７２】

【表２４－３】

29. **Egan, S. E., R. Fliege, S. Tong, A. Shibata, R. E. Wolf, Jr.** および **T. Conway.** 1992. Molecular characterization of the Entner-Doudoroff pathway in *Escherichia coli:* sequence analysis and localization of promoters for the *edd-eda* operon. Journal of Bacteriology **174:**4638-4646.

30. **Farkas, I., T. A. Hardy, A. A. DePaoli-Roach** および **P. J. Roach.** 1990. Isolation of the GSY1 gene encoding yeast glycogen synthase and evidence for the existence of a second gene. Journal of Biological Chemistry **265:**20879-20886.

31. **Farkas, I., T. A. Hardy, M. G. Goebl** および **P. J. Roach.** 1991. Two glycogen synthase isoforms in Saccharomyces cerevisiae are coded by distinct genes that are differentially controlled. Journal of Biological Chemistry **266:**15602-15607.

32. **Flores, N., L. Leal, J. C. Sigala, R. de Anda, A. Escalante, A. Martinez, O. T. Ramirez, G. Gosset** および **F. Bolivar.** 2007. Growth recovery on glucose under aerobic conditions of an *Escherichia coli* strain carrying a phosphoenolpyruvate: Carbohydrate phosphotransferase system deletion by inactivating *arcA* and overexpressing the genes coding for glucokinase and galactose permease. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology **13:**105-116.

33. **Goedl, C., A. Schwarz, A. Minani** および **B. Nidetzky.** 2007. Recombinant sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides*: Characterization, kinetic studies of transglucosylation, and application of immobilised enzyme for production of a-D-glucose 1-phosphate. Journal of Biotechnology **129:**77-86.

34. **Gorsich, S., B. Dien, N. Nichols, P. Slininger, Z. Liu** および **C. Skory.** 2006. Tolerance to furfural-induced stress is associated with pentose phosphate pathway genes ZWF1, GND1, RPE1, and TKL1 in *Saccharomyces cerevisiae*. Applied Microbiology and Biotechnology **71:**339-349.

35. **Gräslund, S., P. Nordlund, J. Weigelt, B. M. Hallberg, J. Bray, O. Gileadi, S. Knapp, U. Oppermann, C. Arrowsmith, R. Hui, J. Ming, S. dhe-Paganon, H.-w. Park, S. Alexei, A. Yee, A. Edwards, R. Vincentelli, C. Cambillau, R. Kim, S.-H. Kim, Z. Rao, Y. Shi, T. C. Terwilliger, C.-Y. Kim, L.-W. Hung, G. S. Waldo, Y. Peleg, S. Albeck, T. Unger, O. Dym, J. Prilusky, J. L. Sussman, R. C. Stevens, S. A. Lesley, I. A. Wilson, A. Joachimiak, F. Collart, I. Dementieva, M. I. Donnelly, W. H. Eschenfeldt, Y. Kim, L. Stols, R. Wu, M. Zhou, S. K. Burley, J. S. Emtage, J. M. Sauder, D. Thompson, K. Bain, J. Luz, T. Gheyi, F. Zhang, S. Atwell, S. C. Almo, J. B. Bonanno, A. Fiser, S. Swaminathan, F. W. Studier, M. R. Chance, A. Sali, T. B. Acton, R. Xiao, L. Zhao, L. C. Ma, J. F. Hunt, L. Tong, K. Cunningham, M. Inouye, S. Anderson, H. Janjua, R. Shastry, C. K. Ho, D. Wang, H. Wang, M. Jiang, G. T. Montelione, D. I. Stuart, R. J. Owens, S. Daenke, A. Schütz, U. Heinemann, S. Yokoyama, K. Büssow** および **K. C. Gunsalus.** 2008. Protein production and purification. Nature Methods **5:**135-146.

36. **Hashimoto, H., A. Sakakibara, M. Yamasaki** および **K. Yoda.** 1997. Saccharomyces cerevisiae VIG9 Encodes GDP-mannose Pyrophosphorylase, Which Is Essential for Protein Glycosylation. Journal of Biological Chemistry **272:**16308-16314.

37. **Hebert, C. G., J. J. Valdes** および **W. E. Bentley.** 2008. Beyond silencing -- engineering applications of RNA interference and antisense technology for altering cellular phenotype. Current opinion in biotechnology **19:**500-505.

38. **Heillisch, J., R. G. Ritzel, R. C. von Borstel, A. Aguilera, R. Rodicio** および **F. K. Zimmermann.** 1989. The phosphofructokinase genes of yeast evolved from two duplication events. Gene **78:**309-321.

39. **Heinisch, J.** 1986. Isolation and characterization of the two structural genes coding for phosphofructokinase in yeast. Molecular and General Genetics MGG **202:**75-82.

【０１７３】

【表２４－４】

40. **Hoang, T. T., R. R. Karkhoff-Schweizer, A. J. Kutchma** および **H. P. Schweizer.** 1998. A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked Pseudomonas aeruginosa mutants. Gene **212:**77-86.

41. **Ishihara, S., A. Hirata, S. Nogami, A. Beauvais, J.-P. Latge** および **Y. Ohya.** 2007. Homologous Subunits of 1,3-Beta-Glucan Synthase Are Important for Spore Wall Assembly in Saccharomyces cerevisiae. Eukaryotic Cell **6:**143-156.

42. **Keasling, J. D.** 1999. Gene-expression tools for the metabolic engineering of bacteria. Trends in Biotechnology **17:**452-460.

43. **Kiino, D. R., R. Licudine, K. Wilt, D. H. Yang** および **L. B. Rothman-Denes.** 1993. A cytoplasmic protein, NfrC, is required for bacteriophage N4 adsorption. Journal of Bacteriology **175:**7074-7080.

44. **Kim, C., S. Song** および **C. Park.** 1997. The D-allose operon of *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. **179:**7631-7637.

45. **Kogure, T., N. Wakisaka, H. Takaku** および **M. Takagi.** 2007. Efficient production of 2-deoxy-scyllo-inososе from D-glucose by metabolically engineered recombinant *Escherichia coli*. Journal of Biotechnology **129:**502-509.

46. **Kornberg, H. L.** 2001. Routes for fructose utilization by Escherichia coli. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology **3:**355-359.

47. **Kristensen, C. S., L. Eberl, J. M. Sanchez-Romero, M. Givskov, S. Molin** および **V. De Lorenzo.** 1995. Site-specific deletions of chromosomally located DNA segments with the multimer resolution system of broad-host-range plasmid RP4. Journal of Bacteriology **177:**52-58.

48. **Kuznetsova, E., M. Proudfoot, C. F. Gonzalez, G. Brown, M. V. Omelchenko, I. Borozan, L. Carmel, Y. I. Wolf, H. Mori, A. V. Savchenko, C. H. Arrowsmith, E. V. Koonin, A. M. Edwards** および **A. F. Yakunin.** 2006. Genome-wide Analysis of Substrate Specificities of the Escherichia coli Haloacid Dehalogenase-like Phosphatase Family. Journal of Biological Chemistry **281:**36149-36161.

49. **Lasserre, J.-P., E. Beyne, S. Pyndiah, D. Lapaillerie, S. Claverol** および **M. Bonneu.** 2006. A complexomic study of *Escherichia coli* using two-dimensional blue native/SDS polyacrylamide gel electrophoresis. Electrophoresis **27:**3306-3321.

50. **Llull, D., E. Garcia** および **R. Lopez.** 2001. Tts, a Processive b-Glucosyltransferase of *Streptococcus pneumoniae*, Directs the Synthesis of the Branched Type 37 Capsular Polysaccharide in Pneumococcus and Other Gram-positive Species. Journal of Biological Chemistry **276:**21053-21061.

51. **Lopez, F., M. Leube, R. Gil-Mascarell, J. P. Navarro-Aviñó** および **R. Serrano.** 1999. The yeast inositol monophosphatase is a lithium- and sodium-sensitive enzyme encoded by a non-essential gene pair. Molecular Microbiology **31:**1255-1264.

52. **Maitra, U. S.**および **H. Ankel.** 1973. The intermediate in the uridine diphosphate galactose 4-epimerase reaction: Resolution of an apparent ambiguity. Journal of Biological Chemistry **248:**1477-1479.

53. **Markovitz, A., R. J. Sydiskis** および **M. M. Lieberman.** 1967. Genetic and biochemical studies on mannose-negative mutants that are deficient in phosphomannose isomerase in *Escherichia coli* K-12. Journal of Bacteriology **94:**1492-1496.

【０１７４】

【表２４－５】

54. **Marolda, C., L.**および**M. Valvano, A. .** 1996. The GalF protein of *Escherichia coli* is not a UDP-glucose pyrophosphorylase but interacts with the GalU protein possibly to regulate cellular levels of UDP-glucose. Molecular Microbiology **22:**827-840.

55. **Marquardt, J. L., E. D. Brown, C. T. Walsh** および **K. S. Anderson.** 1993. Isolation and structural elucidation of a tetrahedral intermediate in the UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvoyl transferase enzymic pathway. Journal of the American Chemical Society **115:**10398-10399.

56. **Mazur, P., N. Morin, W. Baginsky, M. el-Sherbeini, J. Clemas, J. Nielsen** および **F. Foor.** 1995. Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-beta-D-glucan synthase. Mol. Cell. Biol. **15:**5671-5681.

57. **Meijer, W. H., I. J. van der Klei, M. Veenhuis** および **J. A. K. W. Kiel.** 2007. ATG Genes Involved in Non-Selective Autophagy are Conserved from Yeast to Man, but the Selective Cvt and Pexophagy Pathways also Require Organism-Specific Genes. Autophagy **3:**106-116.

58. **Moretti, S., F. Armougom, I. M. Wallace, D. G. Higgins, C. V. Jongeneel** および **C. Notredame.** 2007. The M-Coffee web server: a meta-method for computing multiple sequence alignments by combining alternative alignment methods. Nucleic Acids Research **35:**W645-W648.

59. **Mu, J., C. Cheng** および **P. J. Roach.** 1996. Initiation of Glycogen Synthesis in Yeast. Journal of Biological Chemistry **271:**26554-26560.

60. **Müller, S., F. K. Zimmermann** および **E. Boles.** 1997. Mutant studies of phosphofructo-2-kinases do not reveal an essential role of fructose-2, 6-bisphosphate in the regulation of carbon fluxes in yeast cells. Microbiology **143:**3055-3061.

61. **Murray, M.**および**M. L. Greenberg.** 2000. Expression of yeast INM1 encoding inositol monophosphatase is regulated by inositol, carbon source and growth stage and is decreased by lithium and valproate. Molecular Microbiology **36:**651-661.

62. **Nassau, P. M., S. L. Martin, R. E. Brown, A. Weston, D. Monsey, M. R. McNeil** および **K. Duncan.** 1996. Galactofuranose biosynthesis in *Escherichia coli* K-12: identification and cloning of UDP-galactopyranose mutase. Journal Of Bacteriology **178:**1047-1052.

63. **Neidhardt, F. C.** 1996. *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology. ASM Press, Washington, D.C.

64. **Nogae, I.**および**M. Johnston.** 1990. Isolation and characterization of the ZWF1 gene of Saccharomyces cerevisiae, encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase. Gene **96:**161-169.

65. **Novotny, M. J., J. Reizer, F. Esch** および **M. H. Saier, Jr.** 1984. Purification and properties of D-mannitol-1-phosphate dehydrogenase and D-glucitol-6-phosphate dehydrogenase from *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **159:**986-990.

66. **Oh, C.-S., D. A. Toke, S. Mandala** および **C. E. Martin.** 1997. ELO2 and ELO3, Homologues of theSaccharomyces cerevisiae ELO1 Gene, Function in Fatty Acid Elongation and Are Required for Sphingolipid Formation. Journal of Biological Chemistry **272:**17376-17384.

67. **Oriol, R., R. Mollicone, A. Cailleau, L. Balanzino** および **C. Breton.** 1999. Divergent evolution of fucosyltransferase genes from vertebrates, invertebrates, and bacteria. Glycobiology **9:**323-334.

【０１７５】

【表２４－６】

68. **Persson, M.**および **M. M. Palcic.** 2008. A high-throughput pH indicator assay for screening glycosyltransferase saturation mutagenesis libraries. Analytical Biochemistry **378:**1-7.

69. **Porchia, A. C.**および **G. L. Salerno.** 1996. Sucrose biosynthesis in a prokaryotic organism: Presence of two sucrose-phosphate synthases in *Anabaena* with remarkable differences compared with the plant-enzymes. Proceedings of the National Academy of Sciences **93:**13600-13604.

70. **Priem, B., M. Gilbert, W. W. Wakarchuk, A. Heyraud** および **E. Samain.** 2002. A new fermentation process allows large-scale production of human milk oligosaccharides by metabolically engineered bacteria. Glycobiology **12:**235-240.

71. **Ramakrishnan, B.**および **P. K. Qasba.** 2001. Crystal structure of lactose synthase reveals a large conformational change in its catalytic component, the [beta]1,4-galactosyltransferase-I. Journal of Molecular Biology **310:**205-218.

72. **Ramakrishnan, B., P. S. Shah** および **P. K. Qasba.** 2001. a-Lactalbumin (LA) Stimulates Milk b-1,4-Galactosyltransferase I (b4Gal-T1) to Transfer Glucose from UDP-glucose to N-Acetylglucosamine. Journal of Biological Chemistry **276:**37665-37671.

73. **Rasmussen, L., H. Sperling-Petersen** および **K. Mortensen.** 2007. Hitting bacteria at the heart of the central dogma: sequence-specific inhibition. Microbial Cell Factories **6:**24.

74. **Rider, M. H., L. Bertrand, D. Vertommen, P. A. Michels, G. G. Rousseau** および **L. Hue.** 2004. 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: Head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis. Biochemical Journal **381:**561-579.

75. **Riitta, V.**および **V. Martti.** 1995. Comparison of the phenotypes of the *lpxA* and *lpxD* mutants of *Escherichia coli*. FEMS Microbiology Letters **134:**227-232.

76. **Rodriguez, A., T. De La Cera, P. Herrero** および **F. Moreno.** 2001. The hexokinase 2 protein regulates the expression of the GLK1, HXK1 and HXK2 genes of Saccharomyces cerevisiae. Biochem. J. **355:**625-631.

77. **Ruffing, A.** および **R. R. Chen.** 2006. Metabolic engineering of microbes for oligosaccharide and polysaccharide synthesis. Microbial Cell Factories **5**.

78. **Rush, J. S., P. D. Rick** および **C. J. Waechter.** 1997. Polyisoprenyl phosphate specificity of UDP-GlcNAc:undecaprenyl phosphate N-acetylglucosaminyl 1-P transferase from *E.coli*. Glycobiology **7:**315-322.

79. **Sauer, B.** 1987. Functional expression of the cre-lox site-specific recombination system in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Molecular and Cellular Biology **7:**2087-2096.

80. **Schweizer, H. P.** 2003. Applications of the *Saccharomyces cerevisiae* Flp- FRT system in bacterial genetics. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology **5:**67-77.

81. **Segawa, T.**および **T. Fukasawa.** 1979. The enzymes of the galactose cluster in Saccharomyces cerevisiae. Purification and characterization of galactose-1-phosphate uridylyltransferase. Journal of Biological Chemistry **254:**10707-10709.

82. **Sinnott, M. L.** 1978. Ions, ion-pairs and catalysis by the lacZ b-galactosidase of *Escherichia coli*. FEBS Letters **94:**1-9.

83. **Smith, D. J., A. Proudfoot, L. Friedli, L. S. Klig, G. Paravicini** および **M. A. Payton.** 1992. PMI40, an intron-containing gene required for early steps in yeast mannosylation. Mol. Cell. Biol. **12:**2924-2930.

【０１７６】

【表２４－７】

84. **Stagljar, I., S. te Heesen** および **M. Aebi.** 1994. New phenotype of mutations deficient in glucosylation of the lipid-linked oligosaccharide: cloning of the ALG8 locus. Proceedings of the National Academy of Sciences **91:**5977-5981.

85. **Sternberg, N., D. Hamilton** および **R. Hoess.** 1981. Bacteriophage P1 site-specific recombination : II. Recombination between loxP and the bacterial chromosome. Journal of Molecular Biology **150:**487-507.

86. **Stevenson, G., K. Andrianopoulos, M. Hobbs** および **P. R. Reeves.** 1996. Organization of the *Escherichia coli* K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid. Journal of Bacteriology **178:**4885-4893.

87. **Stevenson, G., B. Neal, D. Liu, M. Hobbs, N. H. Packer, M. Batley, J. W. Redmond, L. Lindquist** および **P. Reeves.** 1994. Structure of the O antigen of *Escherichia coli* K-12 and the sequence of its *rfb* gene cluster. Journal of Bacteriology **176:**4144-4156.

88. **Tallon, R., P. Bressollier** および **M. C. Urdaci.** 2003. Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. Research in Microbiology **154:**705-712.

89. **Taussig, R.**および **M. Carlson.** 1983. Nucleotide sequence of The yeast SUC2 gene for invertase. Nucleic Acids Research **11:**1943-1954.

90. **Teste, M.-A., J. M. François** および **J.-L. Parrou.** 2010. Characterization of a New Multigene Family Encoding Isomaltases in the Yeast Saccharomyces cerevisiae, the IMA Family. Journal of Biological Chemistry **285:**26815-26824.

91. **Thoden, J. B.**および **H. M. Holden.** 2005. The Molecular Architecture of Galactose Mutarotase/UDP-Galactose 4-Epimerase from Saccharomyces cerevisiae. Journal of Biological Chemistry **280:**21900-21907.

92. **Trinchera, M.**および **S. Bozzaro.** 1996. *Dictyostelium* cytosolic fucosyltransferase synthesizes H type 1 trisaccharide *in vitro*. FEBS Letters **395:**68-72.

93. **Tsuda, M.** 1998. Use of a transposon-encoded site-specific resolution system for construction of large and defined deletion mutations in bacterial chromosome. Gene **207:**33-41.

94. **Wang, J., E. D. Gilles, J. W. Lengeler** および **K. Jahreis.** 2001. Modeling of inducer exclusion and catabolite repression based on a PTS-dependent sucrose and non-PTS-dependent glycerol transport systems in Escherichia coli K-12 and its experimental verification. Journal of Biotechnology **92:**133-158.

95. **Watzele, G.**および **W. Tanner.** 1989. Cloning of the glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase gene from yeast. Pheromonal regulation of its transcription. Journal of Biological Chemistry **264:**8753-8758.

96. **Wedekind, J. E., P. A. Frey** および **I. Rayment.** 1996. The Structure of nucleotidylated histidine-166 of galactose-1-phosphate uridylyltransferase provides insight into phosphoryl group Transfer. Biochemistry **35:**11560-11569.

97. **Weissborn, A. C., Q. Liu, M. K. Rumley** および **E. P. Kennedy.** 1994. UTP: alpha-D-glucose-1-phosphate uridylyltransferase of *Escherichia coli*: isolation and DNA sequence of the *galU* gene and purification of the enzyme. Journal of Bacteriology **176:**2611-2618.

98. **Williams, J., J. Luke** および **C. Hodgson.** 2009. Strain engineering by genome mass transfer: Efficient chromosomal trait transfer method utilizing donor genomic DNA and recipient recombineering hosts. Molecular Biotechnology **43:**41-51.

【０１７７】

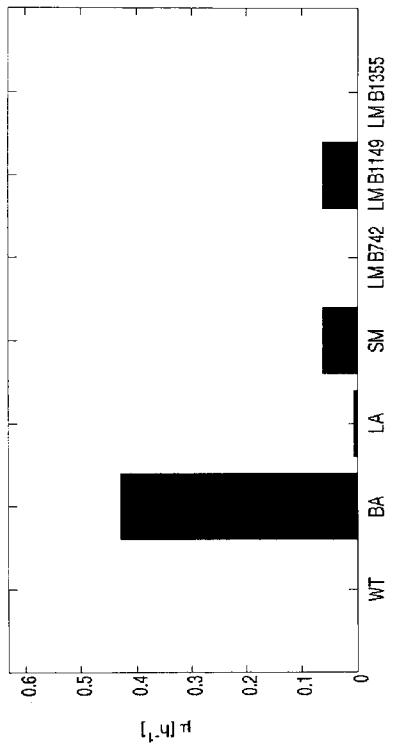
【表２４－８】

99. **Yamamoto, K., A. Nakayama, Y. Yamamoto** および **S. Tabata.** 2004. Val216 decides the substrate specificity of alpha-glucosidase in Saccharomyces cerevisiae. European Journal of Biochemistry **271:**3414-3420.

100. **Zhang, J. B., P. Kowal, X. Chen** および **P. G. Wang.** 2003. Large-scale synthesis of globotriose derivatives through recombinant *E. coli*. Organic & Biomolecular Chemistry **1:**3048-3053.

101. **Zhao, J., T. Baba, H. Mori** および **K. Shimizu.** 2004. Global metabolic response of *Escherichia coli* to *gnd* or *zwf* gene-knockout, based on 13C-labeling experiments and the measurement of enzyme activities. Applied Microbiology and Biotechnology **64:**91-98.

【図２】



【図１１】

AGCATGATCGAACACATCATGCAGTCGATGCAATTCCCGGCGGAATTGATTGAGAAGG
TTTGCGGAACTATCTAAAACGTTGCAGACAAAGGACAAAGCA***ATGGCAATCCACAATC***
GTGCAGGCCAACCTGCACAACAGAGTGATTTGATTAACGTCGCCCAACTGACGGCGCA
ATATTATGTACTGAAACCAGAAGCAGGGAATGCGGAGCACGCGGTGAAATTCGGTACT
TCCGGTCACCGTGGCAGTGCAGCGCGCCACAGCTTTAACGAGCCGCACATTCTGGCGA
TCGCTCAGGCAATTGCTGAAGAACGTGCGAAAAACGGCATCACTGGCCCTTGCTATGT
GGGTAAAGATACTCACGCCCTGTCCGAACCTGCATTCATTTCCGTTCTGGAAGTGCTG
GCAGCGAACGGCGTTGATGTCATTGTGCAGGAAAACAATGGCTTCACCCCGACGCCTG
CCGTTTCCAATGCCATCCTGGTTCACAATAAAAAAGGTGGCCCGCTGGCAGACGGTAT
CGTGATTACACCGTCCCATAACCCGCCGGAAGATGGTGGAATCAAATACAATCCGCCA
AATGGTGGCCCGGCTGATACCAACGTCACTAAAGTGGTGGAAGACAGGGCCAACGCAC
TGCTGGCCGATGGCCTGAAAGGCGTGAAGCGTATCTCCCTCGACGAAGCGATGGCATC
CGGTCATGTGAAAGAGCAGGATCTGGTGCAGCCGTTCGTGGAAGGTCTGGCCGATATC
GTTGATATGGCCGCGATTCAGAAAGCGGGCCTGACGCTGGGCGTTGATCCGCTGGGCG
GTTCCGGTATCGAATACTGGAAGCGTATTGGCGAGTATTACAACCTCAACCTGACTAT
CGTTAACGATCAGGTCGATCAAACCTTCCGCTTTATGCACCTTGATAAAGACGGCGCG
ATCCGTATGGACTGCTCCTCCGAGTGTGCGATGGCGGGCCTGCTGGCACTGCGTGATA
AGTTCGATCTGGCGTTTGCTAACGACCCGGATTATGACCGTCACGGTATCGTCACTCC
GGCAGGTTTGATGAATCCGAACCACTACCTGGCGGTGGCAATCAATTACCTGTTCCAG
CATCGTCCGCAGTGGGGCAAAGATGTTGCCGTCGGTAAAACGCTGGTTTCATCTGCGA
TGATCGACCGTGTGGTCAACGACTTGGGCCGTAAACTGGTAGAAGTCCCGGTAGGTTT
CAAATGGTTTGTCGATGGTCTGTTCGACGGCAGCTTCGGCTTTGGCGGCGAAGAGAGT
GCAGGGGCTTCCTTCCTGCGTTTCGACGGCACGCCGTGGTCCACCGACAAAGACGGCA
TCATCATGTGTCTGCTGGCGGCGGAAATCACCGCTGTCACCGGTAAGAACCCGCAGGA
ACACTACAACGAACTGGCAAAACGCTTTGGTGCGCCGAGCTACAACCGTTTGCAGGCA
GCTGCGACTTCCGCACAAAAAGCGGCGCTGTCTAAGCTGTCTCCGGAAATGGTGAGCG
CCAGCACCCTGGCAGGTGACCCGATCACCGCGCGCCTGACTGCTGCTCCGGGCAACGG
TGCTTCTATTGGCGGTCTGAAAGTGATGACTGACAACGGCTGGTTCGCCGCGCGTCCG
TCAGGCACGGAAGACGCATATAAGATCTACTGCGAAAGCTTCCTCGGTGAAGAACATC
GCAAGCAGATTGAGAAAGAAGCGGTTGAGATTGTTAGCGAAGTTCTGAAAAACGCGTA
AACACATTTAATAAAAAAAGGGCGGTCGCAAGATCGCCCTTTTTTACGTATGACAAAC
ACAGAATTGCCTGATGCGCTACGCTTATCAGGCCTACGAGGAT

【図１２】

CGTACACGCGTTTACTTTGCGGCAGATGAACAAACGCTGCTGAAAAATGGTAA
TCAGACCAAGCCGAAACATGTGCCAGGCACGCCGTATTGGGTGATCACCAACA
CCAACACCGGCCGTAAATGCAGCATGATCGAACACATCATGCAGTCGATGCAA
TTCCCGGCGGAATTGATTGAGAAGGTTTGCGGAACTATCTAAAACGTTGCAGA
CAAAGGACAAAGCA***GTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTA***
GAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTCATATGACACATTT
AATAAAAAAAGGGCGGTCGCAAGATCGCCCTTTTTTACGTATGACAAACACAG
AATTGCCTGATGCGCTACGCTTATCAGGCCTACGAGGATGGTGCAATATATTG
AATTTAAGCGATTTTGTAGGCCGGATAAGGCGTTCACGCCGCATCCGGCAAAA
ACAACGAACACTTTGTCAACAAACTGAGTAGC

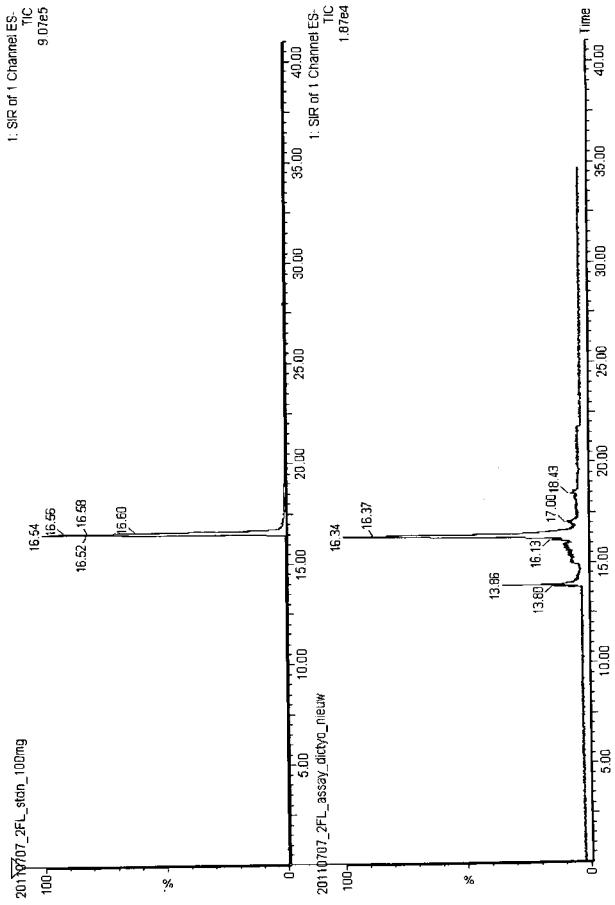
【図１３】

CGTACACGCGTTTACTTTGCGGCAGATGAACAAACGCTGCTGAAAAATGGTAATCA
GACCAAGCCGAAACATGTGCCAGGCACGCCGTATTGGGTGATCACCAACACCAACA
CCGGCCGTAAATGCAGCATGATCGAACACATCATGCAGTCGATGCAATTCCCGGCG
GAATTGATTGAGAAGGTTTGCGGAACTATCTAAAACGTTGCAGACAAAGGACAAAG
CA*GTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTC*
GGAATAGGAACTAAGGAGGATATTCATATGGACCGATATCCCGGGCGGCCGCTTCA
TTTATAAATTTCTTGACATTTTGGAATAGATGTGATATAATGTGTACATATCCATG
GCGGCCGCTCTAGAAGAAGCTTGGGATCCGTCGACCTCGAATTCGGAGGAAACAAA
GATGGGGGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGAGTAAAGGAG
AAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTTGAATTAGATGGTGATGTTAAT
GGGCACAAATTTTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAAACT
TACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACTACCTGTTCCATGGCCAACACTTG
TCACTACTTTCGGGTATGGTGTTCAATGCTTTGCNAGATACCCAGATCATATGAAA
CAGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACAGGAAAGAACTAT
ATTTTTCAAAGATGACGGGAACTACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTG
ATACCCTTGTTAATAGAATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGAAAC
ATTCTTGGACACAAATTGGAATACAACTATAACTCACACAATGTATACATCATGGC
AGACAAACAAAAGAATGGAATCAAAGTTAACTTCAAAATTAGACACAACATTGAAG
ATGGAAGCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGC
CCTGTCCTTTTACCAGACAACCATTACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTCGAAAGA
TCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCCTTCTTGAGTTTGTAACAGCTGCTGGGA
TTACACATGGCATGGATGAACTATACAAATAACTGCAGGTCGACCATATGGGAGAG
CTCCCAACGCGTTGGATGCAGGCATGCAAGCTTGGCTGTTTTGGCGGATGAGAGAA
GATTTTCAGCCTGATACAGATTAAATCAGAACGCAGAAGCGGTCTGATAAAACAGA
ATTTGCCTGGCGGCAGTAGCGCGGTGGTCCCACCTGACCCCATGCCGAACTCAGAA
GTGAAACGCCGTAGCGCCGATGGTAGTGTGGGGTCTCCCCATGCGAGAGTAGGGAA
CTGCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTT
ATCTGTTGTTTGTCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGGGAGCGGA
TTTGAACGTTGCGAAGCAACGGCCCGGAGGGTGGCGGGCAGGACGCCCGCCATAAA
*CTGCCAGGCATCAAATTAAGCAGAAGGCCATCCTGACGGATG*CTACTGCGAAAGCT
TCCTCGGTGAAGAACATCGCAAGCAGATTGAGAAAGAAGCGGTTGAGATTGTTAGC
GAAGTTCTGAAAAACGCGTAACTACTGCGAAAGCTTCCTCGGTGAAGAACATCGCA
AGCAGATTGAGAAAGAAGCGGTTGAGATTGTTAGCGAAGTTCTGAAAAACGCGTAA
ACACATTTAATAAAAAAAGGGCGGTCGCAAGATCGCCCTTTTTTACGTATGACAAA
CACAGAATTGCCTGATGCGCTACGCTTATCAGGCCTACGAGGATGGTGCAATATAT
TGAATTTAAGCGATTTTGTAGGCCGGATAAGGCGTTCACGCCGCATCCGGCAAAAA
CAACGAACACTTTGTCAACAAACTGAGTAGCTCAAGGAAATCCCA

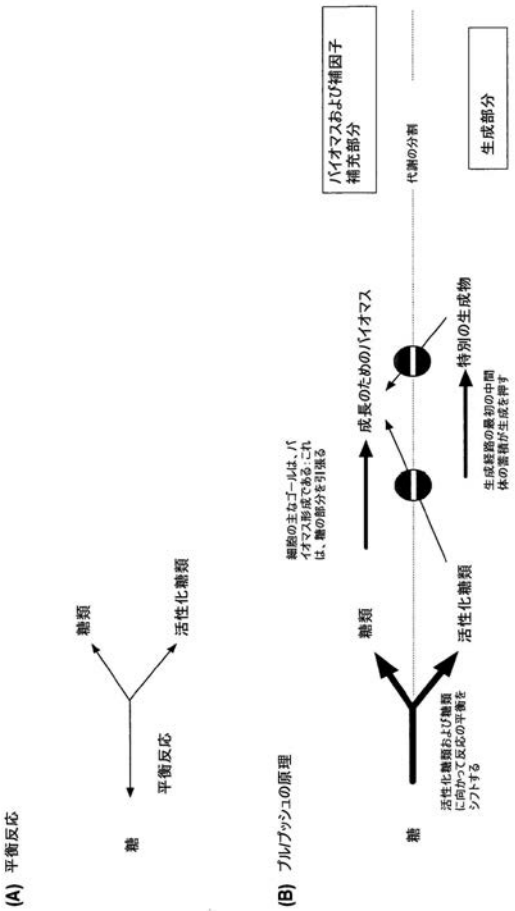
【図１４】

CGTACACGCGTTTACTTTGCGGCAGATGAACAAACGCTGCTGAAAAATGGTAATC
AGACCAAGCCGAAACATGTGCCAGGCACGCCGTATTGGGTGATCACCAACACCAA
CACCGGCCGTAAATGCAGCATGATCGAACACATCATGCAGTCGATGCAATTCCCG
GCGGAATTGATTGAGAAGGTTTGCGGAACTATCTAAAACGTTGCAGACAAAGGAC
AAAGCA**ACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTG**
TCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGGGAGCGGATTTGAACGTTG
CGAAGCAACGGCCCGGAGGGTGGCGGGCAGGACGCCCGCCATAAACTGCCAGGCA
TCAAATTAAGCAGAAGGCCATCCTGACGGATGGCCTTTTTGCGTGGCCAGTGCCA
AGCTTGCATGCAGATTGCAGCATTACACGTCTTGAGCGATTGTGTAGGCTGGAGC
TGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTTCA
AGATCCCCTCACGCTGCCGCAAGCACTCAGGGCGCAAGGGCTGCTAAAGGAAGCG
GAACACGTAGAAAGCCAGTCCGCAGAAACGGTGCTGACCCCGGATGAATGTCAGC
TACTGGGCTATCTGGACAAGGGAAAACGCAAGCGCAAAGAGAAAGCAGGTAGCTT
GCAGTGGGCTTACATGGCGATAGCTAGACTGGGCGGTTTTATGGACAGCAAGCGA
ACCGGAATTGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAAGTA
AACTGGATGGCTTTCTTGCCGCCAAGGATCTGATGGCGCAGGGGATCAAGATCTG
ATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCAAGATCCCCTCACGCTGCCGCAAGCA
CTCAGGGCGCAAGGGCTGCTAAAGGAAGCGGAACACGTAGAAAGCCAGTCCGCAG
AAACGGTGCTGACCCCGGATGAATGTCAGCTACTGGGCTATCTGGACAAGGGAAA
ACGCAAGCGCAAAGAGAAAGCAGGTAGCTTGCAGTGGGCTTACATGGCGATAGCT
AGACTGGGCGGTTTTATGGACAGCAAGCGAACCGGAATTGCCAGCTGGGGCGCCC
TCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAAGTAAACTGGATGGCTTTCTTGCCGCCAA
GGATCTGATGGCGCAGGGGATCAAGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTT
TCGCGCGGGACTCTGGGGTTCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCCAACCTGCCAT
CACGAGATTTCGATTCCACCGCCGCCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGT
TTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTC
TCTACTGCGAAAGCTTCCTCGGTGAAGAACATCGCAAGCAGATTGAGAAAGAAGC
GGTTGAGATTGTTAGCGAAGTTCTGAAAAACGCGTAAACACATTTAATAAAAAAA
GGGCGGTCGCAAGATCGCCCTTTTTTACGTATGACAAACACAGAATTGCCTGATG
CGCTACGCTTATCAGGCCTACGAGGATGGTGCAATATATTGAATTTAAGCGATTT
TGTAGGCCGGATAAGGCGTTCACGCCGCATCCGGCAAAAACAACGAACACTTTGT
CAACAAACTGAGTAGCTCAAGGAAATCCCA

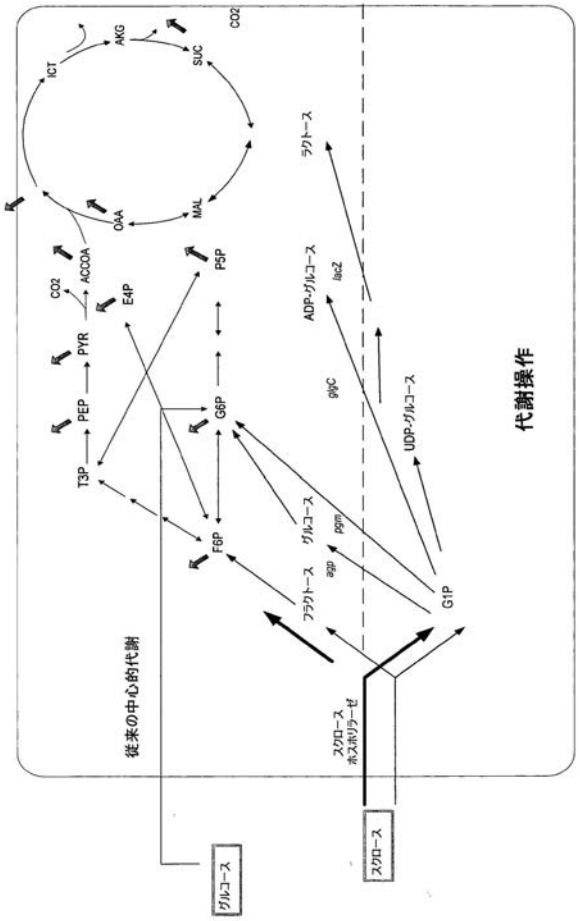
【図２１】



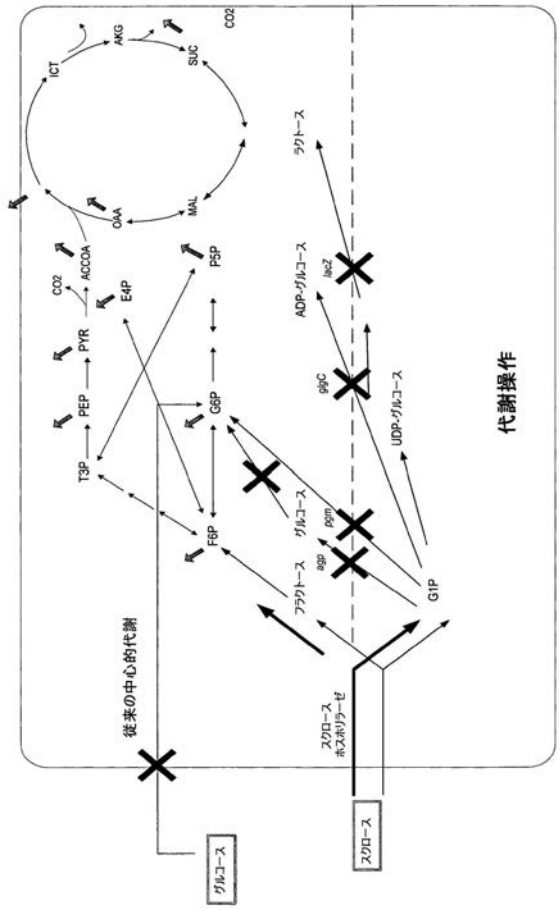
【図１】



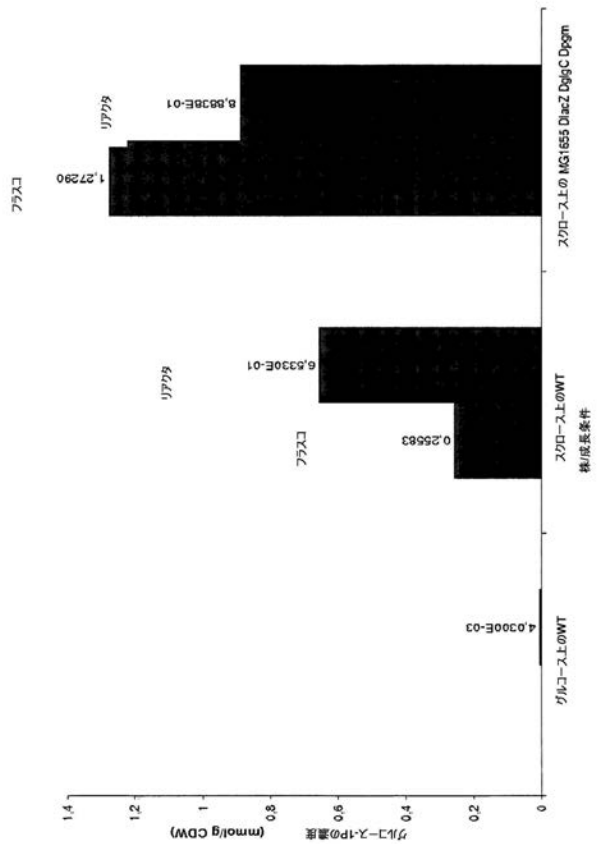
【図３】


代謝操作
従来の中心的代謝
グルコース
スクロース
スクロース ホスホリラーゼ
G1P
F6P
T3P
PEP
PYR
ACCOA
CO2
E4P
G6P
P5P
OAA
CIT
AKG
SUC
MAL
CO2
ADP-グルコース
glgC
lacZ
UDP-グルコース
ラクトース
agp
pgm
グルコース
フラクトース

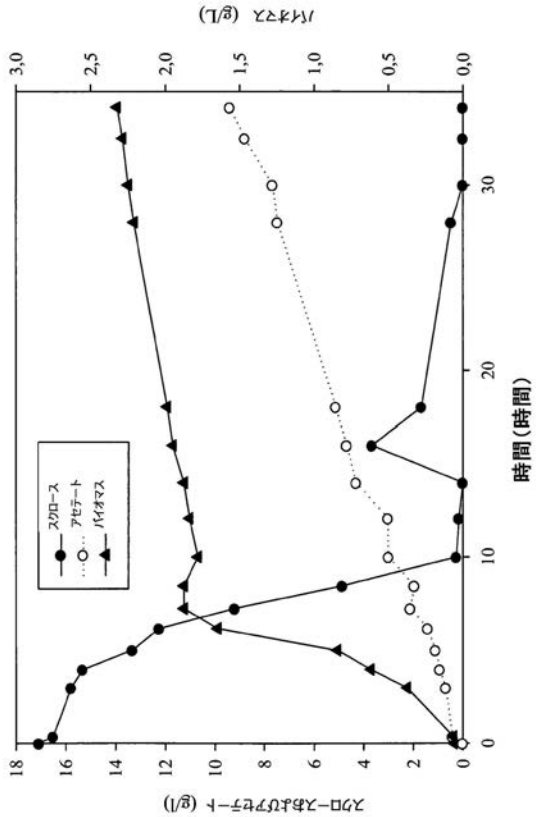
【図４】


代謝操作
従来の中心的代謝
グルコース
スクロース
スクロース ホスホリラーゼ
G1P
F6P
T3P
PEP
PYR
ACCOA
CO2
E4P
G6P
P5P
OAA
CIT
AKG
SUC
MAL
CO2
ADP-グルコース
glgC
lacZ
UDP-グルコース
ラクトース
agp
pgm
グルコース
フラクトース

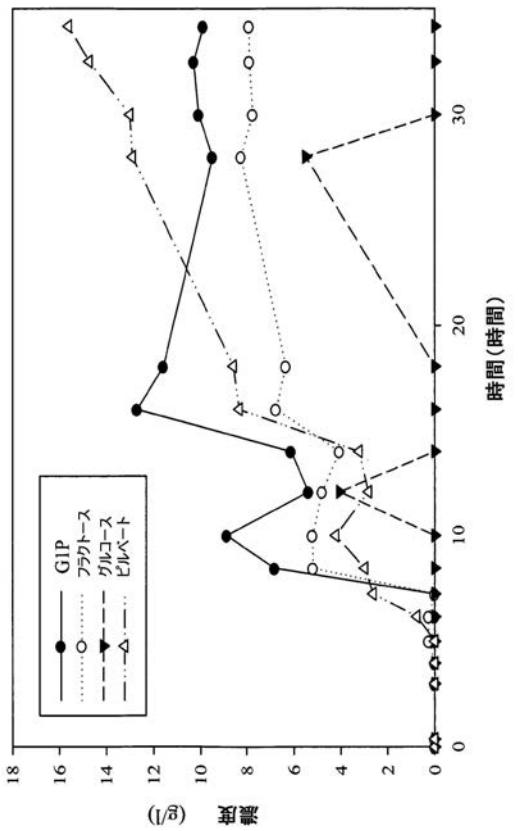
【図５】


グルコース上のWT
スクロース上のWT
スクロース上の MG1655 DlacZ DglgC Dpgm
株/成長条件
フラスコ
リアクタ
4.03006E-03
0.255583
6.53306E-01
1.27290
8.86386E-01
グルコース-1-Pの濃度 (mmol/g CDW)

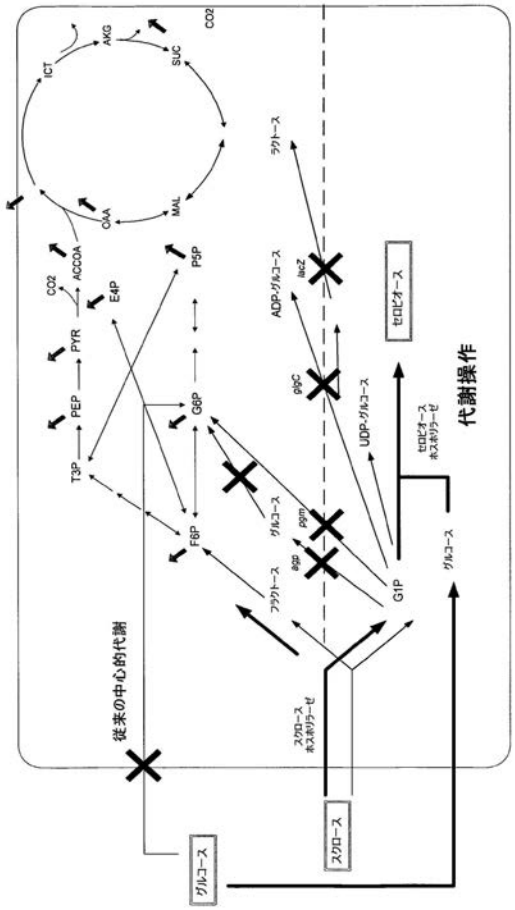
【図６】


スクロースおよびグルコース (g/l)
バイオマス (g/L)
時間 (時間)
スクロース
アセテート
バイオマス

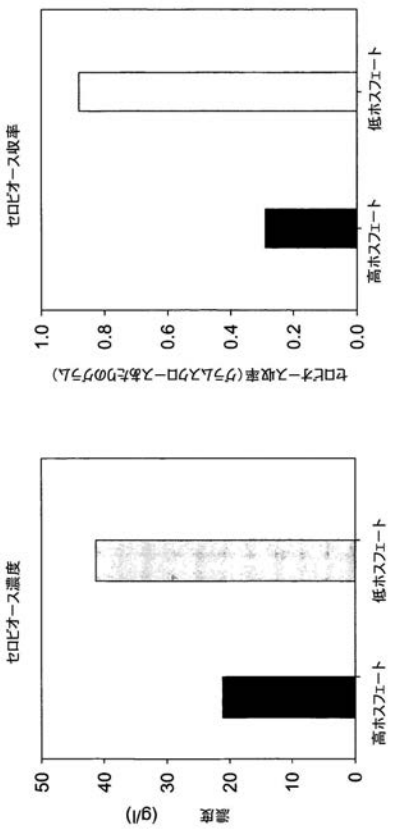
【図７】


G1P
フラクトース
グルコース
ピルベート
濃度 (g/l)
時間（時間）

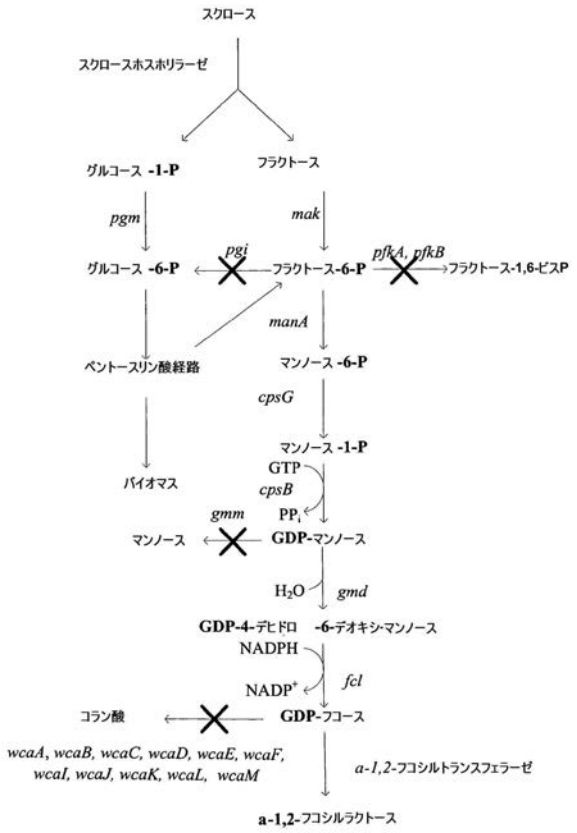
【図８】


CO2
AKG
SUC
ICT
MAL
OAA
ACCOA
E4P
P5P
PYR
PEP
T3P
G6P
F6P
G1P
ラクトース
ADP-グルコース
UDP-グルコース
スクロース
グルコース
従来の中心的代謝
代謝操作
セロビオース

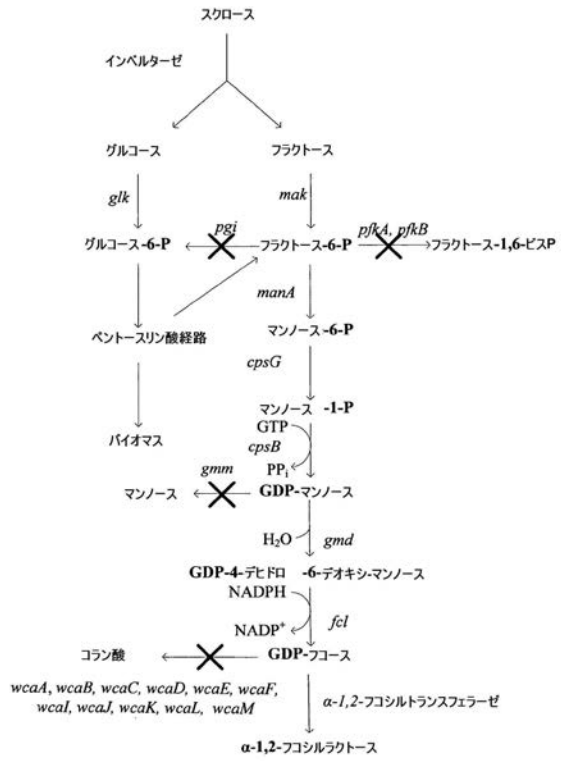
【図９】


セロビオース吸収率
低ホスフェート
高ホスフェート
セロビオース濃度
濃度 (g/l)

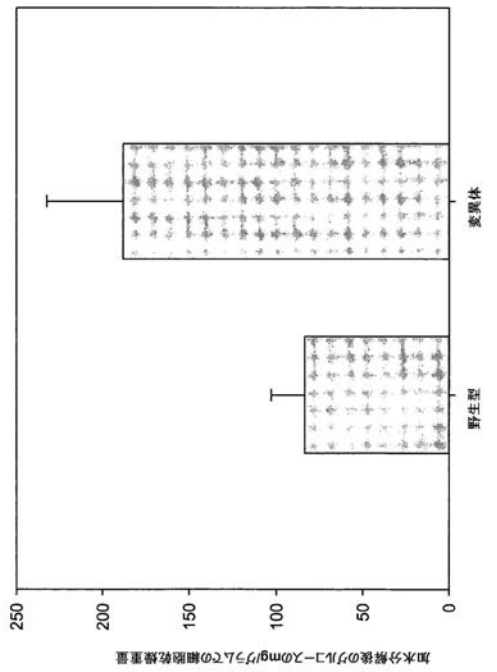
【図１０－１】


スクロース
スクロースホスホリラーゼ
グルコース -1-P
フラクトース
pgm
mak
pgi
pfkA, pfkB
グルコース -6-P
フラクトース-6-P
フラクトース-1,6-ビスP
manA
ペントースリン酸経路
マンノース -6-P
cpsG
マンノース -1-P
GTP
cpsB
バイオマス
gmm
PPi
マンノース
GDP-マンノース
H2O
gmd
GDP-4-デヒドロ -6-デオキシ-マンノース
NADPH
NADP+
fcl
コラン酸
GDP-フコース
wcaA, wcaB, wcaC, wcaD, wcaE, wcaF,
wcaI, wcaJ, wcaK, wcaL, wcaM
a-1,2-フコシルトランスフェラーゼ
a-1,2-フコシルラクトース

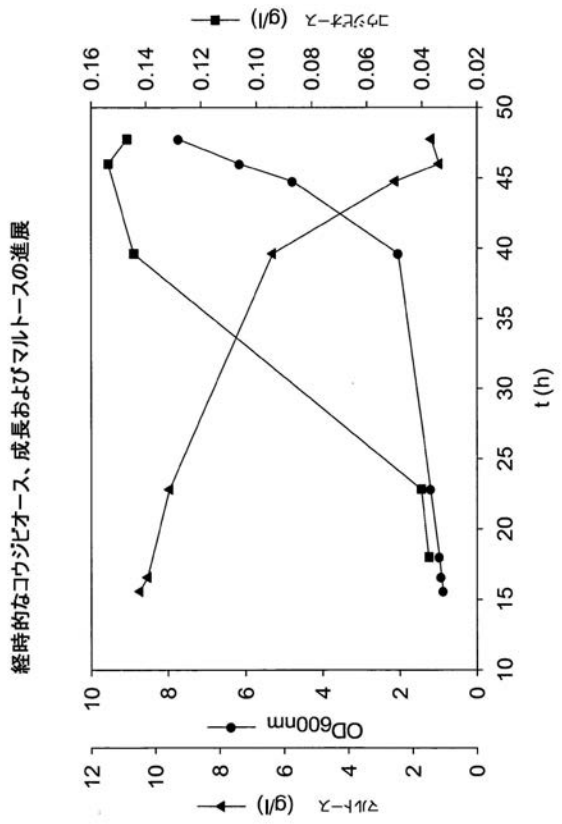
【図１０－２】



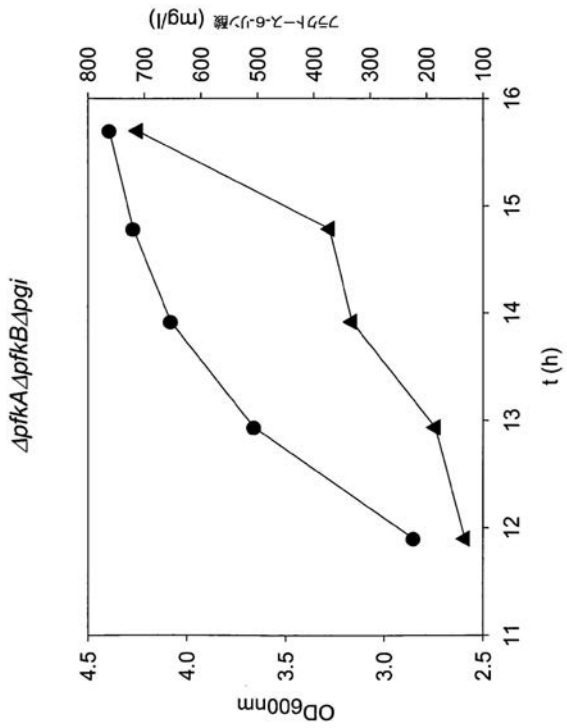
【図１５】



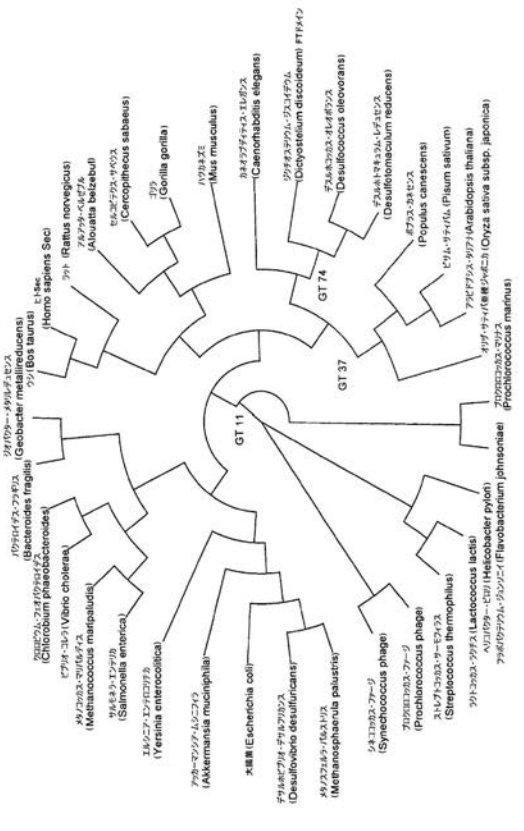
【図１６】



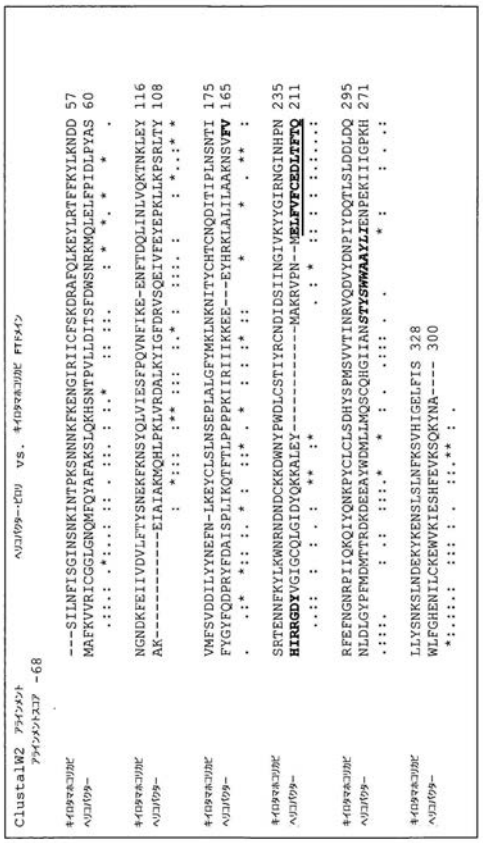
【図１７】



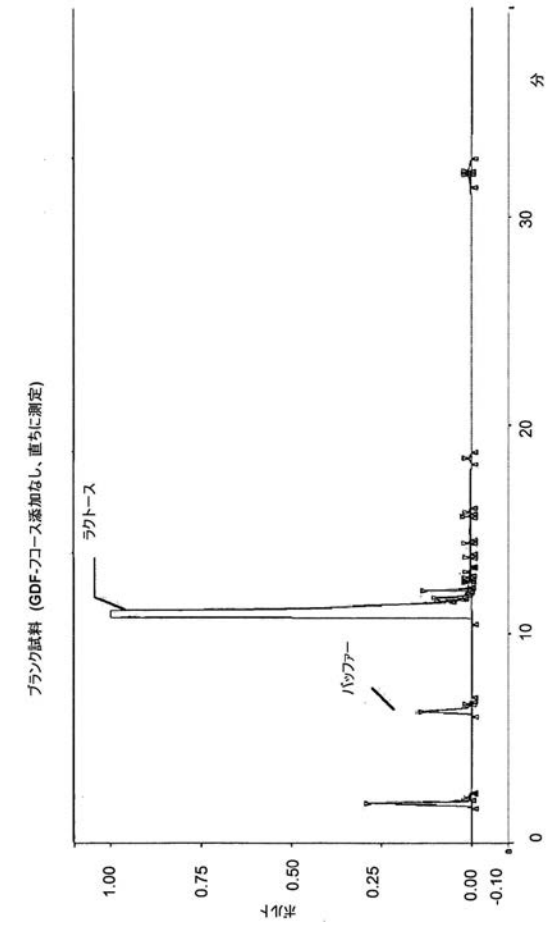
【図１８】



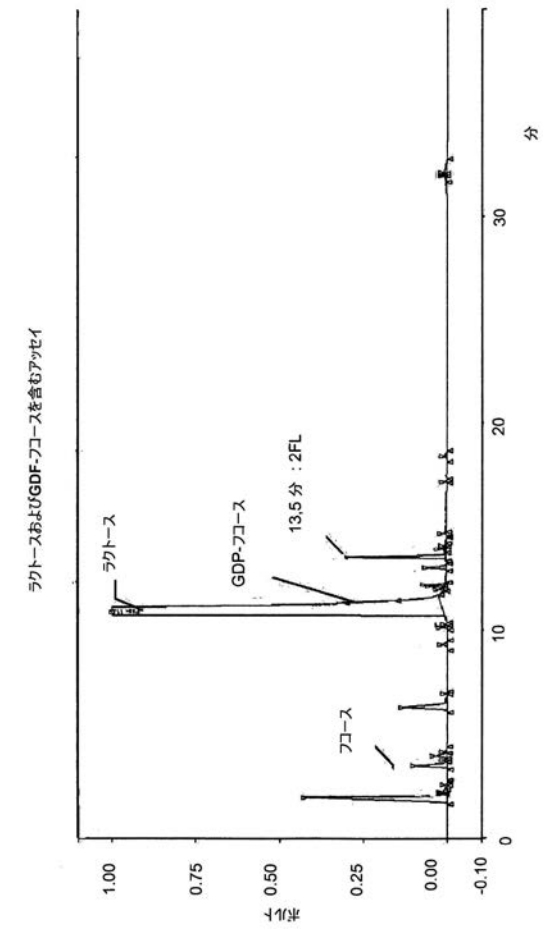
【図１９】



【図２０－１】



【図２０－２】



【配列表】
2017018093000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ　9/10	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	9/10		
Ｃ１２Ｎ　15/09	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/00	Ａ	

(74)代理人　100166936
弁理士　稲本　潔
(74)代理人　100174883
弁理士　冨田　雅己
(72)発明者　マルテンス，ジョー
ベルギー、ビー－９０００　ヘント、クロメネレボーグ　３０／１０２
(72)発明者　ボープルツ，ヨエリ
ベルギー、ブレーデネ　８４５０、フランクライクラーン　１０
(72)発明者　デ　メイ，マルヤン
ベルギー、ビー－９０００　ヘント、ウルスリーネンストラート　４　バス　１

Ｆターム(参考)　4B050 CC04 DD03 DD04 DD13 EE02 EE03 EE04 FF01 FF03E FF18
HH01 LL05
4B064 AF01 AF04 CA02 CA19 CA21 CC03 CC06 CC07 CC12 CC24
CD01 CD02 CD09 CD20 CD21 CE02 CE03 CE16 DA16
4B065 AA01Y AA21Y AA26X AA57Y AA80X AA89Y AB01 AC14 BA02 BA03
BA21 BB02 BB03 BB15 BB16 BB19 BB20 BB29 BB37 BB39
BC02 BC03 BC05 BC09 BC11 BC26 BD04 BD09 BD10 BD15
BD16 CA21 CA27 CA60