

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6595449号
(P6595449)

(45) 発行日 令和1年10月23日 (2019. 10. 23)

(24) 登録日 令和1年10月4日 (2019. 10. 4)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 1/19 (2006. 01)	C 1 2 N 1/19 Z N A
C 1 2 N 5/10 (2006. 01)	C 1 2 N 5/10
C 1 2 P 5/02 (2006. 01)	C 1 2 P 5/02
C 1 2 N 15/60 (2006. 01)	C 1 2 N 15/60
C 1 2 N 15/54 (2006. 01)	C 1 2 N 15/54

請求項の数 20 (全 100 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-502782 (P2016-502782)	(73) 特許権者	511289736
(86) (22) 出願日	平成26年3月14日 (2014. 3. 14)		アミリス, インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2016-512047 (P2016-512047A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 946
(43) 公表日	平成28年4月25日 (2016. 4. 25)		08, エミリービル, ホリス ストリ
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/028421		ート 5885, スイート 100
(87) 国際公開番号	W02014/144135	(73) 特許権者	515009457
(87) 国際公開日	平成26年9月18日 (2014. 9. 18)		トータル マーケティング サービスズ
審査請求日	平成29年3月13日 (2017. 3. 13)		フランス国 エフ-92800 プテオ,
(31) 優先権主張番号	61/800, 356		ラ デファンス 10, クール ミッ
(32) 優先日	平成25年3月15日 (2013. 3. 15)		シュレ, 24
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100079108
			弁理士 稲葉 良幸
		(74) 代理人	100109346
			弁理士 大貫 敏史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アセチル補酵素 A 由来化合物を生産するためのホスホクトラーゼおよびホスホトランスアセチラーゼの使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

遺伝子改変酵母宿主細胞であって、

(a) 前記酵母宿主細胞において発現するホスホクトラーゼ (PK; EC 4. 1. 2. 9) をコードする異種核酸、

(b) 前記酵母宿主細胞において発現するホスホトランスアセチラーゼ (PTA; EC 2. 3. 1. 8) をコードする異種核酸、および

(c) アセチルホスフェートからアセテートへの変換を機能的に破壊する、アセチルホスフェートをアセテートに変換する内因性グリセロール-1-ホスファターゼ酵素 (EC 3. 1. 3. 21) の機能的破壊

を含み、

アセチルホスフェートをアセテートに変換する内因性酵素の機能的破壊を含まない遺伝子改変されていない酵母細胞と比較して増大した量のアセチル CoA 由来化合物を生産する、遺伝子改変酵母宿主細胞。

【請求項 2】

前記グリセロール-1-ホスファターゼが、GPP1/RHR2、GPP2/HOR2、ならびにその相同体から選択され、

前記相同体は、アセチルホスフェートをアセテートに変換し、かつ、GPP1/RHR2 または GPP2/HOR2 のアミノ酸配列に対して、アミノ酸配列が少なくとも 90% の配列同一性を有する、請求項 1 に記載の遺伝子改変酵母宿主細胞。

【請求項 3】

G P P 1 / R H R 2 またはその相同志体が機能的に破壊されており、

G P P 1 / R H R 2 の相同志体は、アセチルホスフェートをアセテートに変換し、かつ、G P P 1 / R H R 2 のアミノ酸配列に対して、アミノ酸配列が少なくとも 90 % の配列同一性を有する、請求項 2 に記載の遺伝子改変酵母宿主細胞。

【請求項 4】

G P P 2 / H O R 2 またはその相同志体が機能的に破壊されており、

G P P 2 / H O R 2 の相同志体は、アセチルホスフェートをアセテートに変換し、かつ、G P P 2 / H O R 2 のアミノ酸配列に対して、アミノ酸配列が少なくとも 90 % の配列同一性を有する、請求項 2 に記載の遺伝子改変酵母宿主細胞。

10

【請求項 5】

G P P 1 / R H R 2 と G P P 2 / H O R 2 の両方、または G P P 1 / R H R 2 の相同志体と G P P 2 / H O R 2 の相同志体の両方が機能的に破壊されており、

G P P 1 / R H R 2 の相同志体は、アセチルホスフェートをアセテートに変換し、かつ、G P P 1 / R H R 2 のアミノ酸配列に対して、アミノ酸配列が少なくとも 90 % の配列同一性を有し、G P P 2 / H O R 2 の相同志体は、アセチルホスフェートをアセテートに変換し、かつ、G P P 2 / H O R 2 のアミノ酸配列に対して、アミノ酸配列が少なくとも 90 % の配列同一性を有する、請求項 2 に記載の遺伝子改変酵母宿主細胞。

【請求項 6】

前記酵母宿主細胞において発現する、アシル化アセチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ (A D A ; E C 1 . 2 . 1 . 1 0) をコードする異種核酸をさらに含む、請求項 1 から 5 までのいずれか一項に記載の遺伝子改変酵母宿主細胞。

20

【請求項 7】

イソプレノイドを産生することができる、請求項 1 から 6 までのいずれか一項に記載の遺伝子改変酵母宿主細胞。

【請求項 8】

イソペンテニルピロホスフェートを作製するためのメバロン酸 (M E V) 経路の 1 種または複数種の酵素をコードする 1 種または複数種の異種核酸を含む、請求項 7 に記載の遺伝子改変酵母宿主細胞。

【請求項 9】

30

(a) 前記 M E V 経路の 1 種または複数種の酵素が、N A D H 使用 H M G - C o A レダクターゼを含む、

(b) 前記 M E V 経路の 1 種または複数種の酵素が、2 分子のアセチル C o A を縮合させてアセトアセチル C o A を形成する酵素を含む、

(c) 前記 M E V 経路の 1 種または複数種の酵素が、アセトアセチル C o A とアセチル C o A を縮合させて H M G - C o A を形成する酵素を含む、

(d) 前記 M E V 経路の 1 種または複数種の酵素が、H M G - C o A をメバロネートに変換する酵素を含む、

(e) 前記 M E V 経路の 1 種または複数種の酵素が、メバロネートをメバロネート 5 - ホスフェートにリン酸化する酵素を含む、

40

(f) 前記 M E V 経路の 1 種または複数種の酵素が、メバロネート 5 - ホスフェートをメバロネート 5 - ピロホスフェートに変換する酵素を含む、

(g) 前記 M E V 経路の 1 種または複数種の酵素が、メバロネート 5 - ピロホスフェートをイソペンテニルピロホスフェートに変換する酵素を含む、または

(h) 前記 M E V 経路の 1 種または複数種の酵素が、H M G - C o A シンターゼ、メバロン酸キナーゼ、ホスホメバロン酸キナーゼおよびメバロン酸ピロリン酸デカルボキシラーゼから選択される、

請求項 8 に記載の遺伝子改変酵母宿主細胞。

【請求項 10】

前記 M E V 経路の酵素の全てをコードする複数の異種核酸を含む、請求項 8 に記載の遺

50

伝子改変酵母宿主細胞。

【請求項 1 1】

(a) 前記 MEV 経路の 1 種または複数種の酵素をコードする前記 1 種または複数種の異種核酸が単一の転写調節因子の制御下にある、

(b) 前記 MEV 経路の 1 種または複数種の酵素をコードする前記 1 種または複数種の異種核酸が複数の異種性転写調節因子の制御下にある、

(c) イソペンテニルピロホスフェート (IPP) をジメチルアリルピロホスフェート (DMA PP) に変換することができる酵素をコードする異種核酸をさらに含む、

(d) IPP 分子および／または DMA PP 分子を縮合させてポリプレニル化合物を形成することができる酵素をコードする異種核酸をさらに含む、または

(e) IPP またはポリプレニルを修飾してイソプレノイド化合物を形成することができる酵素をコードする異種核酸をさらに含む、

請求項 8 から 10 までのいずれか一項に記載の遺伝子改変酵母宿主細胞。

【請求項 1 2】

IPP またはポリプレニルを修飾してイソプレノイド化合物を形成することができる前記酵素が、カレンシンターゼ、ゲラニオールシンターゼ、リナロールシンターゼ、リモネンシンターゼ、ミルセンシンターゼ、オシメンシンターゼ、 α -ピネンシンターゼ、 β -ピネンシンターゼ、 γ -テルピネンシンターゼ、テルピノレンシンターゼ、アモルファジエンシンターゼ、 α -ファルネセンシンターゼ、 β -ファルネセンシンターゼ、ファルネソールシンターゼ、ネロリドールシンターゼ、パチョロールシンターゼ、ノートカトンシンターゼ、およびアビエタジエンシンターゼからなる群から選択される、あるいは

(a) 前記イソプレノイドが、ヘミテルペン、モノテルペン、ジテルペン、トリテルペン、テトラテルペン、セスキテルペン、およびポリテルペンからなる群から選択される、

(b) 前記イソプレノイドが $C_5 \sim C_{20}$ イソプレノイドである、または

(c) 前記イソプレノイドが、アビエタジエン、アモルファジエン、カレン、 α -ファルネセン、 β -ファルネセン、ファルネソール、ゲラニオール、ゲラニルゲラニオール、イソプレン、リナロール、リモネン、ミルセン、ネロリドール、オシメン、パチョロール、 β -ピネン、サビネン、 γ -テルピネン、テルピノレン、およびバレンセンからなる群から選択される、

請求項 1 1 に記載の遺伝子改変酵母宿主細胞。

【請求項 1 3】

前記酵母細胞が *Saccharomyces cerevisiae* である、請求項 1 から 1 2 のいずれか一項に記載の遺伝子改変酵母宿主細胞。

【請求項 1 4】

イソプレノイドを産生するための方法であって、

(a) 請求項 7 から 1 3 までのいずれか一項に記載の遺伝子改変酵母宿主細胞の集団を、炭素源を含む培地中、前記イソプレノイド化合物を作製するのに適した条件下で培養するステップ、および

(b) 前記イソプレノイド化合物を前記培地から回収するステップを含む、方法。

【請求項 1 5】

酵母宿主細胞におけるアセチル CoA またはアセチル CoA 由来化合物の産生を増大させるための方法であって、

(a) 前記酵母宿主細胞においてホスホケトラーゼ (PK; EC 4. 1. 2. 9) をコードする異種核酸およびホスホトランスアセチラーゼ (PTA; EC 2. 3. 1. 8) をコードする異種核酸を発現させるステップ、および

(b) アセチルホスフェートからアセテートへの変換を機能的に破壊する、アセチルホスフェートをアセテートに変換する内因性グリセロール 1-ホスファターゼ酵素 (EC 3. 1. 3. 21) を機能的に破壊するステップを含む、方法。

【請求項 16】

前記グリセロール-1-ホスファターゼが G P P 1 / R H R 2、G P P 2 / H O R 2、ならびにその相同体から選択され、

前記相同体は、アセチルホスフェートをアセテートに変換し、かつ、G P P 1 / R H R 2 または G P P 2 / H O R 2 のアミノ酸配列に対して、アミノ酸配列が少なくとも 90% の配列同一性を有する、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

(a) G P P 1 / R H R 2 またはその相同体が機能的に破壊される、

(b) G P P 2 / H O R 2 またはその相同体が機能的に破壊される、

(c) G P P 1 / R H R 2 と G P P 2 / H O R 2 の両方、または G P P 1 / R H R 2 の相同体と G P P 2 / H O R 2 の相同体の両方が機能的に破壊され、

G P P 1 / R H R 2 の相同体は、アセチルホスフェートをアセテートに変換し、かつ、G P P 1 / R H R 2 のアミノ酸配列に対して、アミノ酸配列が少なくとも 90% の配列同一性を有する、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記酵母宿主細胞において、アシル化アセチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ (A D A ; E C 1. 2. 1. 10) をコードする異種核酸を発現するステップをさらに含む、請求項 15 から 17 までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

前記酵母宿主細胞が *Saccharomyces cerevisiae* である、請求項 15 から 18 までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

前記酵母宿主細胞が、アセチルホスフェートをアセテートに変換する内因性グリセロール-1-ホスファターゼ酵素 (E C 3. 1. 3. 21) の機能的破壊を含まない細胞と比較して増大した量のアセチル C o A またはアセチル C o A 由来化合物を産生する、請求項 15 から 19 までのいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この出願は、2013年3月15日に出願された米国仮出願第 61 / 800, 356 号 (この内容は、その全体が参考として本明細書に援用される) の優先権の利益を主張する。

【0002】

1. 発明の分野

本開示は、工学的に操作された宿主細胞においてアセチル C o A 由来化合物を産生するための組成物および方法に関する。

【背景技術】

【0003】

2. 背景

アセチル補酵素 A (アセチル C o A) は、ポリケチド、脂肪酸、イソプレノイド、フェノール類、アルカロイド、ビタミン、およびアミノ酸を含めた必須の生物学的化合物の合成における重要な中間体である。アセチル C o A に由来する代謝産物の中には、工業的に有用な化合物を含めた一次代謝産物および二次代謝産物がある。酵母では、アセチル C o A はピルビン酸代謝で生合成される (図 1)。しかし、この生合成経路では、ピルビン酸カルボキシラーゼおよび/またはピルビン酸デヒドロゲナーゼにより触媒される反応によって C O₂ が失われる。工業的な発酵環境において、ピルビン酸代謝に対する代替物をもたらし、解糖を減少させることの 1 つの利益は、ピルビン酸の脱カルボキシル化において産生される C O₂ が減少し、したがって、最終産物においてより多くの炭素を捕捉し、それにより、最大理論収量を上昇させることができることである。第 2 の利益は、産生される N A D H が減少し、したがって、それを再酸化するために必要な酸素が著しく減少する

ことである。これは、ホスホケトララーゼ（PK；EC 4. 1. 2. 9）とホスホアセチル
トランスフェラーゼ（PTA；EC 2. 3. 1. 8）を併せて発現させることによって実
現することができる。

【0004】

PKおよびPTAは、フルクトース-6-ホスフェート（F6P）またはキシロース
-5-ホスフェート（X5P）がアセチルCoAに変換される反応を触媒する。図1に示
されている通り、PKにより、ペントースホスフェート中間体であるキシロース（xy
ulose）5-ホスフェートから、または、さらに上の解糖中間体であるD-フルクト
ース6-ホスフェート（F6P）から引き出される。PKにより、X5Pがグリセルアル
デヒド3-ホスフェート（G3P）とアセチルホスフェートに分かれる、またはF6Pが
エリトロース4-ホスフェート（E4P）とアセチルホスフェートに分かれる。次いで、
PTAにより、アセチルホスフェートがアセチルCoAに変換される。G3Pはさらに下
の解糖に再度入ることができ、E4Pはペントースホスフェート経路またはトランスアル
ドラーゼおよびトランスケトララーゼの非酸化的ペントースホスフェート経路ネット
ワークを通じた循環による解糖に再度入ることができる。

【0005】

出願人らは、PK酵素およびPTA酵素を導入することで得ることができる異種性イソ
プレノイド産生の効率の改善について以前に記載した。その内容全体が参照により本明細
書に組み込まれる2012年11月9日出願の米国特許出願第13/673, 819号（
現在は米国特許第8, 415, 136号）を参照されたい。特に、ネイティブな酵母代謝
ネットワークにおいて生じる化学反応のみを使用してグルコースから細胞質ゾル内アセチ
ルCoAを合成する場合、メバロン酸経路によるグルコースからイソプレノイドであるフ
ァルネセンへの変換の可能性のある最大化学量論的収量は23.6wt%である。アセト
アルデヒドデヒドロゲナーゼ、アセチル化（ADA；EC 1. 2. 1. 10）およびNADH使用HMG-CoA
レダクターゼにより触媒される反応をメバロネート産生の代謝ネ
ットワークに含めることによって、理論的な最大化学量論的収量は25.2wt%に改善
される。さらにPKおよびPTAを導入することで、反応ネットワークは、最適な状態で
、29.8wt%またはそれを超える質量収量に到達することができ、これは最大理論収
量の有意な上昇である。

【0006】

Sondreggerらにより、キシロース利用酵母株におけるエタノール産生に関す
るPKおよびPTAの利益についても記載されている。その内容全体が参照により本明細
書に組み込まれるSondreggerら、Applied and Environmental Microbiology 70巻（5号）：2892～2897頁（20
04年）を参照されたい。Pichia stipitis由来のNAD（P）H依存性
キシロースレダクターゼおよびNAD⁺依存性キシリトールデヒドロゲナーゼの過剰発現
に起因する低エタノール収量に対処するために、S. cerevisiaeに異種ホスホ
ケトララーゼ経路（PK、PTA、およびADA）が導入された。この2つのオキシドレダ
クターゼ反応における補因子嗜好が異なることにより、還元された反応中間体であるキシ
リトールの広範囲にわたる蓄積、したがって、低エタノール収量として顕在化する嫌気性
レドックス平衡問題が引き起こされる。ホスホケトララーゼ経路を導入することによってレ
ドックス代謝の平衡化が行われ、それにより、エタノールに変換されるキシロース当たり
1つのNADHの正味の再酸化が導かれ、エタノール収量が25%改善される。しかし、
PKの過剰発現によっても、アセテート蓄積の増大および発酵速度の低下が導かれる。ホ
スホケトララーゼ経路と、アセトアルデヒドをアセテートに変換するALD6の変異を組み
合わせることによっていくらかのアセテート蓄積は減少させることができるが、組換えホ
スホケトララーゼ経路を通じたフラックスは、キシリトールおよびグリセロールの蓄積を完
全に排除するために必要になる最適なフラックスの約30%であった。著者らにより、ホ
スホケトララーゼ経路に基づくアセテート形成を妨げるためにホスホトランスアセチラーゼ
および／またはアセトアルデヒドデヒドロゲナーゼのより高い活性が必要であり得ること

が示唆された。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】米国特許第8,415,136号明細書

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Sondreggerら、Applied and Environmental Microbiology (2004年)70巻(5号):2892~2897頁

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

したがって、異種PK経路を導入することによりアセチルCoA由来化合物の収量の実質的な改善を導くことができるが、その一方で、PKおよびPTAによる最適な炭素フラックスを実現するために、この経路の実行のさらなる改善が必要であると思われる。本明細書で提供される組成物および方法は、この必要性に対処し、関連する利点も提供する。

【課題を解決するための手段】

【0010】

3. 発明の概要

20

本明細書では、工業的に有用な化合物を産生するためのホスホクトラゼ(PK)およびホスホトランスアセチラーゼ(PTA)の利用を改善するための組成物および方法が提供される。これらの組成物および方法は、ホスホクトラゼ経路に基づくアセテート蓄積が、PK触媒作用の産物であるアセチルホスフェートの酵素により触媒される加水分解に起因するという驚くべき発見に基づく。アセチルホスフェートの加水分解は、イソプレノイド、ポリケチド、および脂肪酸を含めたアセチルCoA由来の任意の種類の産物の産生に、炭素の枯渇によって負の影響を及ぼし得る望ましくない副反応である。アセチルホスフェート加水分解を触媒する宿主細胞内のネイティブな酵素を機能的に破壊することにより、アセテート蓄積が減少し、PK/PTA経路を通じたアセチルCoA産生への炭素フラックスが増大する。

30

【0011】

本明細書で提供される組成物および方法は、さらに、アセチルホスフェートからアセテートへの加水分解を触媒する酵母内のネイティブな酵素、すなわちGPP1/RHR2、およびそれと密接に関連するホモログであるGPP2/HOR2の予想外の発見に基づく。これらの酵素はどちらも、以前は単にグリセロール-1-ホスファターゼ(EC3.1.3.21;あるいは「グリセロール-3-ホスファターゼ」と称される)活性を有すると特徴付けられており、したがって、これらの酵素の無差別な(promiscuous)アセチル-ホスファターゼ活性は予想外のものである。PKおよびPTAを異種発現する細胞では、RHR2をコードする遺伝子およびHOR2をコードする遺伝子の一方または両方を欠失させることにより、アセテート蓄積の減少が導かれ、RHR2をコードする遺伝子を単独で欠失させることにより、アセテートレベルの実質的な低下が導かれる。さらに、PK、PTAおよびメバロン酸経路を含むように工学的に操作された細胞においてRHR2遺伝子を欠失させることにより、アセチルCoA由来イソプレノイドであるファルネセンの産生が相当に増大する。

40

【0012】

したがって、本明細書では、遺伝子改変宿主細胞および工業的に有用な化合物を産生するためのそれらの使用方法が提供される。一態様では、本明細書では、ホスホクトラゼ(PK;EC4.1.2.9)をコードする異種核酸、およびアセチルホスフェートをアセテートに変換する内因性酵素の機能的破壊を含む遺伝子改変宿主細胞が提供される。一部の実施形態では、遺伝子改変宿主細胞は、ホスホトランスアセチラーゼ(PTA;EC

50

2. 3. 1. 8) をコードする異種核酸をさらに含む。

【0013】

別の態様では、本明細書では、ホスホトランスアセチラーゼ (PTA; EC 2. 3. 1. 8) をコードする異種核酸、およびアセチルホスフェートをアセテートに変換する内因性酵素の機能的破壊を含む遺伝子改変宿主細胞が提供される。一部の実施形態では、遺伝子改変宿主細胞は、ホスホケトラーゼ (PK; EC 4. 1. 2. 9) をコードする異種核酸をさらに含む。

【0014】

一部の実施形態では、アセチルホスフェートをアセテートに変換する酵素はグリセロール-1-ホスファターゼ (EC 3. 1. 3. 21) である。一部の実施形態では、グリセロール-1-ホスファターゼは、GPP1/RHR2、GPP2HOR2、ならびにその相同体およびバリエーションからなる群から選択される。一部の実施形態では、遺伝子改変宿主細胞は、GPP1/RHR2の機能的破壊を含む。一部の実施形態では、遺伝子改変宿主細胞は、GPP2/HOR2の機能的破壊を含む。一部の実施形態では、遺伝子改変宿主細胞は、GPP1/RHR2とGPP2/HOR2の両方の機能的破壊を含む。

10

【0015】

一部の実施形態では、遺伝子改変宿主細胞は、アシル化アセチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ (ADA; EC 1. 2. 1. 10) をコードする異種核酸をさらに含む。一部の実施形態では、遺伝子改変宿主細胞は、ネイティブなピルビン酸デヒドロゲナーゼ (PDH) -バイパスの1種または複数種の酵素の機能的破壊をさらに含む。一部の実施形態では、PDH-バイパスの1種または複数種の酵素は、アセチルCoAシンテターゼ1 (ACS1)、アセチルCoAシンテターゼ2 (ACS2)、およびアルデヒドデヒドロゲナーゼ6 (ALD6) から選択される。

20

【0016】

一部の実施形態では、遺伝子改変宿主細胞は、異種アセチルCoA由来化合物を産生することができる。一部の実施形態では、異種アセチルCoA由来化合物は、イソプレノイド、ポリケチド、および脂肪酸からなる群から選択される。特定の実施形態では、遺伝子改変宿主細胞は、イソプレノイドを産生することができる。

【0017】

一部の実施形態では、遺伝子改変宿主細胞は、イソペンテニルピロホスフェートを作製するためのメバロン酸 (MEV) 経路の1種または複数種の酵素をコードする1種または複数種の異種核酸を含む。一部の実施形態では、MEV経路の1種または複数種の酵素は、NADH使用HMG-CoAレダクターゼを含む。一部の実施形態では、MEV経路の1種または複数種の酵素は、2分子のアセチルCoAを縮合させてアセトアセチルCoAを形成する酵素を含む。一部の実施形態では、MEV経路の1種または複数種の酵素は、アセトアセチルCoAとアセチルCoAを縮合させてHMG-CoAを形成する酵素を含む。一部の実施形態では、MEV経路の1種または複数種の酵素は、HMG-CoAをメバロネートに変換する酵素を含む。一部の実施形態では、MEV経路の1種または複数種の酵素は、メバロネートをメバロネート5-ホスフェートにリン酸化する酵素を含む。一部の実施形態では、MEV経路の1種または複数種の酵素は、メバロネート5-ピロホスフェートに変換する酵素を含む。一部の実施形態では、MEV経路の1種または複数種の酵素は、メバロネート5-ピロホスフェートをイソペンテニルピロホスフェートに変換する酵素を含む。一部の実施形態では、MEV経路の1種または複数種の酵素は、HMG-CoAシンターゼ、メバロン酸キナーゼ、ホスホメバロン酸キナーゼおよびメバロン酸ピロリン酸デカルボキシラーゼから選択される。一部の実施形態では、宿主細胞は、MEV経路の酵素の全てをコードする複数の異種核酸を含む。一部の実施形態では、MEV経路の1種または複数種の酵素をコードする1種または複数種の異種核酸は単一の転写調節因子の制御下にある。一部の実施形態では、MEV経路の1種または複数種の酵素をコードする1種または複数種の異種核酸は多数の異種性転写調節因子の制御下にある。一部の実施形態では、遺伝子改変宿主細胞は、イソペンテニルピ

30

40

50

ロホスフェート（IPP）をジメチルアリルピロホスフェート（DMA PP）に変換することができる酵素をコードする異種核酸をさらに含む。一部の実施形態では、遺伝子改変宿主細胞は、IPP分子および／またはDMA PP分子を縮合させてポリプレニル化合物を形成することができる酵素をコードする異種核酸をさらに含む。一部の実施形態では、遺伝子改変宿主細胞は、IPPまたはポリプレニルを修飾してイソプレノイド化合物を形成することができる酵素をコードする異種核酸をさらに含む。

【0018】

一部の実施形態では、IPPまたはポリプレニルを修飾してイソプレノイド化合物を形成することができる酵素は、カレンシンターゼ、ゲラニオールシンターゼ、リナロールシンターゼ、リモネンシンターゼ、ミルセンシンターゼ、オシメンシンターゼ、 α -ピネンシンターゼ、 β -ピネンシンターゼ、 γ -テルピネンシンターゼ、テルピノレンシンターゼ、アモルファジエンシンターゼ、 α -ファルネセンシンターゼ、 β -ファルネセンシンターゼ、ファルネソールシンターゼ、ネロリドールシンターゼ、パチョロール（p a t c h o u l i o l）シンターゼ、ノートカトンシンターゼ、およびアビエタジエンシンターゼからなる群から選択される。

10

【0019】

一部の実施形態では、イソプレノイドは、ヘミテルペン、モノテルペン、ジテルペン、トリテルペン、テトラテルペン、セスキテルペン、およびポリテルペンからなる群から選択される。一部の実施形態では、イソプレノイドはセスキテルペンである。一部の実施形態では、イソプレノイドは、 $C_5 \sim C_{20}$ イソプレノイドである。一部の実施形態では、イソプレノイドは、アビエタジエン、アモルファジエン、カレン、 α -ファルネセン、 β -ファルネセン、ファルネソール、ゲラニオール、ゲラニルゲラニオール、イソプレネン、リナロール、リモネン、ミルセン、ネロリドール、オシメン、パチョロール、 β -ピネン、サビネン、 γ -テルピネン、テルピノレン、およびバレンセンからなる群から選択される。

20

【0020】

別の態様では、本明細書では、イソプレノイドを産生することができる遺伝子改変宿主細胞であって、イソペンテニルピロホスフェートを作製するためのメバロン酸（MEV）経路の1種または複数種の酵素をコードする1種または複数種の異種核酸；ホスホケトラーゼ（PK）をコードする異種核酸；ホスホトランスアセチラーゼ（PTA）をコードする異種核酸；およびグリセロール-1-ホスファターゼ（EC 3. 1. 3. 21）の機能的破壊を含む細胞が提供される。一部の実施形態では、グリセロール-1-ホスファターゼは、GPP1/RHR2またはその相同体もしくはバリエーションである。一部の実施形態では、グリセロール-1-ホスファターゼは、GPP2/HOR2またはその相同体もしくはバリエーションである。

30

【0021】

別の態様では、本明細書では、イソプレノイドを産生することができる遺伝子改変宿主細胞であって、イソペンテニルピロホスフェートを作製するためのメバロン酸（MEV）経路の1種または複数種の酵素をコードする1種または複数種の異種核酸；アセチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ、アセチル化（ADA）をコードする異種核酸；ホスホケトラーゼ（PK）をコードする異種核酸；ホスホトランスアセチラーゼ（PTA）をコードする異種核酸；およびグリセロール-1-ホスファターゼ（EC 3. 1. 3. 21）の機能的破壊を含む細胞が提供される。一部の実施形態では、グリセロール-1-ホスファターゼは、GPP1/RHR2またはその相同体もしくはバリエーションである。一部の実施形態では、グリセロール-1-ホスファターゼは、GPP2/HOR2またはその相同体もしくはバリエーションである。

40

【0022】

別の態様では、本明細書では、イソプレノイドを産生することができる遺伝子改変宿主細胞であって、イソペンテニルピロホスフェートを作製するためのメバロン酸（MEV）経路の1種または複数種の酵素をコードする1種または複数種の異種核酸；アセチルアル

50

デヒドデヒドロゲナーゼ、アセチル化 (ADA) をコードする異種核酸；アセチル CoA シンテターゼ 1 (ACS1)、アセチル CoA シンテターゼ 2 (ACS2)、およびアルデヒドデヒドロゲナーゼ 6 (ALD6) からなる群から選択されるネイティブな PDH-バイパスの少なくとも 1 種の酵素の機能的破壊；ホスホクトラナーゼ (PK) をコードする異種核酸；ホスホトランスアセチラーゼ (PTA) をコードする異種核酸；およびグリセロール-1-ホスファターゼ (EC3. 1. 3. 21) の機能的破壊を含む細胞が提供される。一部の実施形態では、グリセロール-1-ホスファターゼは、GPP1/RHR2 またはその相同体もしくはバリエーションである。一部の実施形態では、グリセロール-1-ホスファターゼは、GPP2/HOR2 またはその相同体もしくはバリエーションである。

【0023】

10

別の態様では、本明細書では、イソプレノイドを産生することができる遺伝子改変宿主細胞であって、イソペンテニルピロホスフェートを作製するためのメバロン酸 (MEV) 経路の 1 種または複数種の酵素であって、NADH 使用 HMG-CoA レダクターゼを含む 1 種または複数種の酵素をコードする 1 種または複数種の異種核酸；アセチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ、アセチル化 (ADA) をコードする異種核酸；アセチル CoA シンテターゼ 1 (ACS1)、アセチル CoA シンテターゼ 2 (ACS2)、およびアルデヒドデヒドロゲナーゼ 6 (ALD6) からなる群から選択されるネイティブな PDH-バイパスの少なくとも 1 種の酵素の機能的破壊；ホスホクトラナーゼ (PK) をコードする異種核酸；ホスホトランスアセチラーゼ (PTA) をコードする異種核酸；およびグリセロール-1-ホスファターゼ (EC3. 1. 3. 21) の機能的破壊を含む細胞が提供される。一部の実施形態では、グリセロール-1-ホスファターゼは、GPP1/RHR2 またはその相同体もしくはバリエーションである。一部の実施形態では、グリセロール-1-ホスファターゼは、GPP2/HOR2 またはその相同体もしくはバリエーションである。

20

【0024】

別の態様では、本明細書では、イソプレノイドを産生することができる遺伝子改変宿主細胞であって、イソペンテニルピロホスフェートを作製するためのメバロン酸 (MEV) 経路の複数の酵素であって、アセチル CoA：マロニル CoA アシルトランスフェラーゼを含む複数の酵素をコードする 1 種または複数種の異種核酸；アセチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ、アセチル化 (ADA) をコードする異種核酸；アセチル CoA シンテターゼ 1 (ACS1)、アセチル CoA シンテターゼ 2 (ACS2)、およびアルデヒドデヒドロゲナーゼ 6 (ALD6) からなる群から選択されるネイティブな PDH-バイパスの少なくとも 1 種の酵素の機能的破壊；ホスホクトラナーゼ (PK) をコードする異種核酸；ホスホトランスアセチラーゼ (PTA) をコードする異種核酸；およびグリセロール-1-ホスファターゼ (EC3. 1. 3. 21) の機能的破壊を含む細胞が提供される。一部の実施形態では、グリセロール-1-ホスファターゼは、GPP1/RHR2 またはその相同体もしくはバリエーションである。一部の実施形態では、グリセロール-1-ホスファターゼは、GPP2/HOR2 またはその相同体もしくはバリエーションである。

30

【0025】

別の態様では、本明細書では、ポリケチドを産生することができる遺伝子改変宿主細胞であって、ポリケチド生合成経路の 1 種または複数種の酵素をコードする 1 種または複数種の異種核酸；ホスホクトラナーゼ (PK) をコードする異種核酸；ホスホトランスアセチラーゼ (PTA) をコードする異種核酸；およびグリセロール-1-ホスファターゼ (EC3. 1. 3. 21) の機能的破壊を含む細胞が提供される。一部の実施形態では、グリセロール-1-ホスファターゼは、GPP1/RHR2 またはその相同体もしくはバリエーションである。一部の実施形態では、グリセロール-1-ホスファターゼは、GPP2/HOR2 またはその相同体もしくはバリエーションである。

40

【0026】

別の態様では、本明細書では、脂肪酸を産生することができる遺伝子改変宿主細胞であって、脂肪酸生合成経路の 1 種または複数種の酵素をコードする 1 種または複数種の異種核酸；ホスホクトラナーゼ (PK) をコードする異種核酸；ホスホトランスアセチラーゼ (

50

P T A) をコードする異種核酸；およびグリセロール-1-ホスファターゼ (E C 3. 1. 3. 21) の機能的破壊を含む細胞が提供される。一部の実施形態では、グリセロール-1-ホスファターゼは、G P P 1 / R H R 2 またはその相同体もしくはバリエーションである。一部の実施形態では、グリセロール-1-ホスファターゼは、G P P 2 / H O R 2 またはその相同体もしくはバリエーションである。

【0027】

一部の実施形態では、本明細書で提供される遺伝子改変宿主細胞は、細菌細胞、真菌細胞、藻類細胞、昆虫細胞、および植物細胞からなる群から選択される。一部の実施形態では、細胞は酵母細胞である。一部の実施形態では、酵母は *S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e* である。

10

【0028】

一部の実施形態では、遺伝子改変宿主細胞は、アセチルホスフェートをアセテートに変換する内因性酵素の機能的破壊を含まない酵母細胞と比較して増大した量のアセチル C o A 由来化合物 (例えば、イソプレノイド、ポリケチド、または脂肪酸) を産生する。

【0029】

別の態様では、本明細書では、異種アセチル C o A 由来化合物を産生するための方法であって、本明細書に記載の異種アセチル C o A 由来化合物を産生することができる遺伝子改変宿主細胞の集団を、炭素源を含む培地中、前記異種アセチル C o A 由来化合物を作製するのに適した条件下で培養するステップ、および前記異種アセチル C o A 由来化合物を培地から回収するステップを含む方法が提供される。一部の実施形態では、異種アセチル C o A 由来化合物は、イソプレノイド、ポリケチド、および脂肪酸からなる群から選択される。

20

【0030】

別の態様では、本明細書では、宿主細胞におけるアセチル C o A またはアセチル C o A 由来化合物の産生を増大させるための方法であって、宿主細胞においてホスホケトラーゼ (P K ; E C 4. 1. 2. 9) をコードする異種核酸を発現させるステップ、およびアセチルホスフェートをアセテートに変換する内因性酵素を機能的に破壊するステップを含む方法が提供される。一部の実施形態では、当該方法は、宿主細胞においてホスホトランスアセチラーゼ (P T A ; E C 2. 3. 1. 8) をコードする異種核酸を発現させるステップをさらに含む。

30

【0031】

別の態様では、本明細書では、宿主細胞におけるアセチル C o A の産生を増大させるための方法であって、宿主細胞においてホスホトランスアセチラーゼ (P T A ; E C 2. 3. 1. 8) をコードする異種核酸を発現させるステップ、およびアセチルホスフェートをアセテートに変換する内因性酵素を機能的に破壊するステップを含む方法が提供される。一部の実施形態では、当該方法は、宿主細胞においてホスホケトラーゼ (P K ; E C 4. 1. 2. 9) をコードする異種核酸を発現させるステップをさらに含む。

【0032】

一部の実施形態では、アセチルホスフェートをアセテートに変換する酵素はグリセロール-1-ホスファターゼ (E C 3. 1. 3. 21) である。一部の実施形態では、グリセロール-1-ホスファターゼは、G P P 1 / R H R 2、G P P 2 / H O R 2、ならびにその相同体およびバリエーションから選択される。一部の実施形態では、G P P 1 / R H R 2 またはその相同体もしくはバリエーションを機能的に破壊する。一部の実施形態では、G P P 2 / H O R 2 またはその相同体もしくはバリエーションを機能的に破壊する。一部の実施形態では、G P P 1 / R H R 2 と G P P 2 / H O R 2 の両方、または G P P 1 / R H R 2 の相同体もしくはバリエーションと G P P 2 / H O R 2 の相同体もしくはバリエーションの両方を機能的に破壊する。一部の実施形態では、宿主細胞は、細菌細胞、真菌細胞、藻類細胞、昆虫細胞、および植物細胞からなる群から選択される。一部の実施形態では、宿主細胞は酵母細胞である。一部の実施形態では、酵母は *S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e* である。一部の実施形態では、宿主細胞は、アセチルホスフェートをアセテートに変

40

50

換する内因性酵素の機能的破壊を含まない酵母細胞と比較して増大した量のアセチルC o AまたはアセチルC o A由来化合物を産生する。

本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

(a) ホスホクエラターゼ (PK; EC 4. 1. 2. 9) をコードする異種核酸、および

(b) アセチルホスフェートをアセテートに変換する内因性酵素の機能的破壊を含む遺伝子改変宿主細胞。

(項目2)

ホスホトランスアセチラーゼ (PTA; EC 2. 3. 1. 8) をコードする異種核酸をさらに含む、項目1に記載の遺伝子改変宿主細胞。

(項目3)

(a) ホスホトランスアセチラーゼ (PTA; EC 2. 3. 1. 8) をコードする異種核酸、および

(b) アセチルホスフェートをアセテートに変換する内因性酵素の機能的破壊を含む遺伝子改変宿主細胞。

(項目4)

ホスホクエラターゼ (PK; EC 4. 1. 2. 9) をコードする異種核酸をさらに含む、項目3に記載の遺伝子改変宿主細胞。

(項目5)

アセチルホスフェートをアセテートに変換する前記酵素がグリセロール-1-ホスファターゼ (EC 3. 1. 3. 21) である、項目1から4までのいずれか一項に記載の遺伝子改変宿主細胞。

(項目6)

前記グリセロール-1-ホスファターゼが、GPP1/RHR2、GPP2/HOR2、ならびにその相同体およびバリエーションから選択される、項目5に記載の遺伝子改変宿主細胞。

(項目7)

GPP1/RHR2 またはその相同体もしくはバリエーションが機能的に破壊されている、項目6に記載の遺伝子改変宿主細胞。

(項目8)

GPP2/HOR2 またはその相同体もしくはバリエーションが機能的に破壊されている、項目6に記載の遺伝子改変宿主細胞。

(項目9)

GPP1/RHR2 と GPP2/HOR2 の両方、または GPP1/RHR2 の相同体もしくはバリエーションと GPP2/HOR2 の相同体もしくはバリエーションの両方が機能的に破壊されている、項目6に記載の遺伝子改変宿主細胞。

(項目10)

イソプレノイドを産生することができる、項目1から9までのいずれか一項に記載の遺伝子改変宿主細胞。

(項目11)

イソペンテニルピロホスフェートを作製するためのメバロン酸 (MEV) 経路の1種または複数種の酵素をコードする1種または複数種の異種核酸を含む、項目10に記載の遺伝子改変宿主細胞。

(項目12)

前記MEV経路の1種または複数種の酵素が、NADH使用HMG-CoAレダクターゼを含む、項目11に記載の遺伝子改変宿主細胞。

(項目13)

前記MEV経路の1種または複数種の酵素が、2分子のアセチルC o Aを縮合させてアセトアセチルC o Aを形成する酵素を含む、項目11に記載の遺伝子改変宿主細胞。

(項目14)

10

20

30

40

50

前記MEV経路の1種または複数種の酵素が、アセトアセチルCoAとアセチルCoAを縮合させてHMG-CoAを形成する酵素を含む、項目11に記載の遺伝子改変宿主細胞。

(項目15)

前記MEV経路の1種または複数種の酵素が、HMG-CoAをメバロネートに変換する酵素を含む、項目11に記載の遺伝子改変宿主細胞。

(項目16)

前記MEV経路の1種または複数種の酵素が、メバロネートをメバロネート5-ホスフェートにリン酸化する酵素を含む、項目11に記載の遺伝子改変宿主細胞。

(項目17)

前記MEV経路の1種または複数種の酵素が、メバロネート5-ホスフェートをメバロネート5-ピロホスフェートに変換する酵素を含む、項目11に記載の遺伝子改変宿主細胞。

(項目18)

前記MEV経路の1種または複数種の酵素が、メバロネート5-ピロホスフェートをイソペンテニルピロホスフェートに変換する酵素を含む、項目11に記載の遺伝子改変宿主細胞。

(項目19)

前記MEV経路の1種または複数種の酵素が、HMG-CoAシンターゼ、メバロン酸キナーゼ、ホスホメバロン酸キナーゼおよびメバロン酸ピロリン酸デカルボキシラーゼから選択される、項目11に記載の遺伝子改変宿主細胞。

(項目20)

前記MEV経路の酵素の全てをコードする複数の異種核酸を含む、項目11に記載の遺伝子改変宿主細胞。

(項目21)

前記MEV経路の1種または複数種の酵素をコードする前記1種または複数種の異種核酸が単一の転写調節因子の制御下にある、項目11に記載の遺伝子改変宿主細胞。

(項目22)

前記MEV経路の1種または複数種の酵素をコードする前記1種または複数種の異種核酸が複数の異種性転写調節因子の制御下にある、項目11に記載の遺伝子改変宿主細胞。

(項目23)

イソペンテニルピロホスフェート (IPP) をジメチルアリルピロホスフェート (DMA PP) に変換することができる酵素をコードする異種核酸をさらに含む、項目11に記載の遺伝子改変宿主細胞。

(項目24)

IPP分子および／またはDMA PP分子を縮合させてポリプレニル化合物を形成することができる酵素をコードする異種核酸をさらに含む、項目11に記載の遺伝子改変宿主細胞。

(項目25)

IPPまたはポリプレニルを修飾してイソプレノイド化合物を形成することができる酵素をコードする異種核酸をさらに含む、項目11に記載の遺伝子改変宿主細胞。

(項目26)

IPPまたはポリプレニルを修飾してイソプレノイド化合物を形成することができる前記酵素が、カレンシンターゼ、グラニオールシンターゼ、リナロールシンターゼ、リモネンシンターゼ、ミルセンシンターゼ、オシメンシンターゼ、 α -ピネンシンターゼ、 β -ピネンシンターゼ、 γ -テルピネンシンターゼ、テルピノレンシンターゼ、アモルファジエンシンターゼ、 α -ファルネセンシンターゼ、 β -ファルネセンシンターゼ、ファルネソールシンターゼ、ネロリドールシンターゼ、パチョロールシンターゼ、ノートカトンシンターゼ、およびアビエタジエンシンターゼからなる群から選択される、項目25に記載の遺伝子改変宿主細胞。

10

20

30

40

50

(項目 27)

前記イソプレノイドが、ヘミテルペン、モノテルペン、ジテルペン、トリテルペン、テトラテルペン、セスキテルペン、およびポリテルペンからなる群から選択される、項目 10 に記載の遺伝子改変宿主細胞。

(項目 28)

前記イソプレノイドが $C_5 \sim C_{20}$ イソプレノイドである、項目 10 に記載の遺伝子改変宿主細胞。

(項目 29)

前記イソプレノイドが、アビエタジエン、アモルファジエン、カレン、 α -ファルネセン、 β -ファルネセン、ファルネソール、ゲラニオール、ゲラニルゲラニオール、イソプレレン、リナロール、リモネン、ミルセン、ネロリドール、オシメン、パチョロール、 β -ピネン、サビネン、 γ -テルピネン、テルピノレン、およびバレンセンからなる群から選択される、項目 10 に記載の遺伝子改変宿主細胞。

10

(項目 30)

細菌細胞、真菌細胞、藻類細胞、昆虫細胞、および植物細胞からなる群から選択される、項目 1 から 29 までのいずれか一項に記載の遺伝子改変宿主細胞。

(項目 31)

酵母細胞である、項目 1 から 29 までのいずれか一項に記載の遺伝子改変宿主細胞。

(項目 32)

前記酵母が *Saccharomyces cerevisiae* である、項目 31 に記載の遺伝子改変宿主細胞。

20

(項目 33)

アセチルホスフェートをアセテートに変換する内因性酵素の機能的破壊を含まない酵母細胞と比較して増大した量のアセチル CoA 由来化合物を産生する、項目 1 から 32 までのいずれか一項に記載の遺伝子改変宿主細胞。

(項目 34)

イソプレノイドを産生するための方法であって、

(a) 項目 10 から 33 までのいずれか一項に記載の遺伝子改変宿主細胞の集団を、炭素源を含む培地中、前記イソプレノイド化合物を作製するのに適した条件下で培養するステップ、および

30

(b) 前記イソプレノイド化合物を前記培地から回収するステップを含む、方法。

(項目 35)

宿主細胞におけるアセチル CoA またはアセチル CoA 由来化合物の産生を増大させるための方法であって、

(a) 前記宿主細胞においてホスホケトラーゼ (PK; EC 4. 1. 2. 9) をコードする異種核酸を発現させるステップ、および

(b) アセチルホスフェートをアセテートに変換する内因性酵素を機能的に破壊するステップ

を含む、方法。

40

(項目 36)

前記宿主細胞においてホスホトランスアセチラーゼ (PTA; EC 2. 3. 1. 8) をコードする異種核酸を発現させるステップをさらに含む、項目 35 に記載の方法。

(項目 37)

宿主細胞におけるアセチル CoA の産生を増大させるための方法であって、

(a) 前記宿主細胞においてホスホトランスアセチラーゼ (PTA; EC 2. 3. 1. 8) をコードする異種核酸を発現させるステップ、および

(b) アセチルホスフェートをアセテートに変換する内因性酵素を機能的に破壊するステップ

を含む、方法。

50

(項目 38)

前記宿主細胞においてホスホクラーゼ (PK; EC 4. 1. 2. 9) をコードする異種核酸を発現させるステップをさらに含む、項目 37 に記載の方法。

(項目 39)

アセチルホスフェートをアセテートに変換する前記酵素がグリセロール-1-ホスファターゼ (EC 3. 1. 3. 21) である、項目 35 から 38 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 40)

前記グリセロール-1-ホスファターゼが GPP1/RHR2、GPP2/HOR2、ならびにその相同体およびバリエーションから選択される、項目 39 に記載の方法。

10

(項目 41)

GPP1/RHR2 またはその相同体もしくはバリエーションが機能的に破壊されている、項目 40 に記載の方法。

(項目 42)

GPP2/HOR2 またはその相同体もしくはバリエーションが機能的に破壊されている、項目 40 に記載の方法。

(項目 43)

GPP1/RHR2 と GPP2/HOR2 の両方、または GPP1/RHR2 の相同体もしくはバリエーションと GPP2/HOR2 の相同体もしくはバリエーションの両方が機能的に破壊されている、項目 40 に記載の方法。

20

(項目 44)

前記宿主細胞が、細菌細胞、真菌細胞、藻類細胞、昆虫細胞、および植物細胞からなる群から選択される、項目 35 から 43 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 45)

前記宿主細胞が酵母細胞である、項目 35 から 43 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 46)

前記酵母が *Saccharomyces cerevisiae* である、項目 45 に記載の方法。

(項目 47)

前記宿主細胞が、アセチルホスフェートをアセテートに変換する内因性酵素の機能的破壊を含まない酵母細胞と比較して増大した量のアセチルCoA またはアセチルCoA 由来化合物を産生する、項目 35 から 46 までのいずれか一項に記載の方法。

30

【図面の簡単な説明】【0033】

【図1】図1は、酵母宿主細胞における糖（グルコースおよびキシロース）からアセチルCoA およびアセチルCoA 由来化合物への変換に関与する経路の略図である。太い矢印は組換えホスホクラーゼ経路を示す。アセチルホスフェートはアセチルCoA へのホスホクラーゼ (PK) /ホスホトランスアセチラーゼ (phosphotransacetylase) (PTA) 経路の中間体であり、RHR2 およびHOR2 によってアセテートに加水分解される。略語：G6P、グルコース-6-ホスフェート；R5P、リブロース-5-ホスフェート；X5P、キシロース-5-ホスフェート；F6P、フルクトース-6-ホスフェート；E4P、エリトロース (erythrose) -4-ホスフェート；FBP、フルクトース-1, 6-ビスホスフェート (biphosphate)；DHAP、ジヒドロキシアセトンホスフェート；G3P、グリセルアルデヒド-3-ホスフェート；PEP、ホスホエノールピルベート；ADA、アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ、アセチル化；ACP、アセチルホスフェート。

40

【図2】図2は、イソプレノイド産生のためのメバロン酸経路の代表的な酵素を示す図である。略語：AcCoA、アセチルCoA；AcAcCoA、アセトアセチルCoA；HMGCoA、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル-CoA；MeV5P、メバロネート-5-ホスフェート；MeV5DP、メバロネート-5-ジホスフェート；IPP、イ

50

ソペンテニルジホスフェート；DMA P P、ジメチルアリルピロホスフェート；E r g 1 0、アセチルC o Aチオラーゼ；A C C 1、アセチルC o Aカルボキシラーゼ；A A C S、アセトアセチルC o Aシンターゼ；E r g 1 3、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル-C o Aシンターゼ；H M G r、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル-C o Aレダクターゼ；E r g 1 2、メバロン酸キナーゼ；E r g 8、ホスホメバロン酸キナーゼ；E r g 1 9、メバロン酸ピロリン酸デカルボキシラーゼ。

【図3-1】図3 A～3 Bは、野生型（Y 9 6 7株、左）、ならびに、異種アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼアシル化（D z. e u t E）、およびネイティブなPDH-バイパスの欠失（a c s 1 Δ a c s 2 Δ a l d 6 Δ）を含む組換え酵母細胞（Y 1 2 8 6 9株；中央）、ならびに異種ホスホケトラゼ（L m. P K）およびホスホトランスアセチラーゼ（C k. P T A）をさらに含む組換え酵母細胞（Y 1 2 7 4 6株；右）の糖消費（A）およびアセテート産生（B）を示す図である。

10

【図3-2】図3 C～3 Dは、異種アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼアシル化（D z. e u t E）、およびネイティブなPDH-バイパスの欠失（a c s 1 Δ a c s 2 Δ a l d 6 Δ）を含む組換え酵母細胞（Y 1 2 8 6 9株；左）、ならびに、異種ホスホケトラゼ（L m. P K）（Y 1 9 3 9 0株；中央）またはホスホトランスアセチラーゼ（C k. P T A）をさらに含む組換え酵母細胞（Y 1 9 3 9 1株；右）の糖消費（C）およびアセテート産生（D）を示す図である。

【図4】図4は、野生型S. c e r e v i s i a e Y 9 6 7株の無細胞抽出物（C F E）における、120分の時間経過にわたるアセチルホスフェート加水分解の実証を示す図である。C F Eのみ（左）；C F Eと、それに加えて、30mMの、広範なスペクトルのホスファターゼ阻害剤であるフッ化ナトリウム（中央）、および熱失活させたC F E（右）が示されている。

20

【図5】図5は、Y 9 6 7無細胞抽出物に対する陰イオン交換クロマトグラフィーの結果を示す図である。緩衝液B（20mMのT r i s - C l、p H 7、1MのN a C l、10%グリセロール）の0～100%勾配を30カラム体積にわたって毎分0.5mLの流速で用いてタンパク質を溶出し、1mL画分を採取し、タンパク質ゲル電気泳動によって分析し（図5 B）、アセチルホスファターゼ活性についてアッセイした（図5 A）。A C P、アセチルホスフェート。

【図6】図6 Aは、Y 9 6 7の画分# 10に対する陰イオン交換クロマトグラフィーの結果を示す図である。この精製による最も活性な画分であった# 14を、質量分析によって分析して、画分中のタンパク質の同一性を決定した（図6 B）。R H R 2を活性な画分中のホスファターゼとして同定した。

30

【図7】図7は、野生型酵母株（Y 9 6 8）、または、R H R 2の欠失、H O R 2の欠失もしくはR H R 2とH O R 2の両方の欠失を含む組換え酵母株のC F Eに対するアセチルホスファターゼ活性アッセイの結果を示すグラフである。

【図8-1】図8 A～8 Cは、組換え酵母株集団のアセテートレベル（A）、グリセロールレベル（B）および光学濃度（C）を示すグラフである。Y 1 2 7 4 6. m s 6 3 9 0 9. m s 6 4 4 7 2株はPDH-バイパスの欠失（a c s 1 Δ a c s 2 Δ a l d 6 Δ）を含み、アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼアセチル化（D z. e u t E）、ホスホケトラゼ（L m. P K）、ホスホトランスアセチラーゼ（C k. P T A）、およびファルネセン産生経路内の遺伝子を異種発現する。Y 1 2 7 4 6. m s 6 3 9 0 9. m s 6 4 4 7 2 r h r 2 Δ株は、Y 1 2 7 4 6. m s 6 3 9 0 9. m s 6 4 4 7 2株と同質遺伝子型であるが、R H R 2の欠失をさらに含む（r h r 2 Δ）。

40

【図8-2】図8 D～8 Eは、組換え酵母株集団のアセテートレベル（D）および光学濃度（E）を示すグラフである。Y 1 2 7 4 5株は、PDH-バイパスの欠失（a c s 1 Δ a c s 2 Δ a l d 6 Δ）を含み、アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼアセチル化（D z. e u t E）、ホスホケトラゼ（L m. P K）、およびホスホトランスアセチラーゼ（C k. P T A）を異種発現する。Y 1 2 7 4 6 r h r 2 Δ株はY 1 2 7 4 6株と同質遺伝子型であるが、R H R 2の欠失をさらに含む（r h r 2 Δ）。

50

【図9】図9は、RHR2遺伝子がインタクトであるか（RHR2+）、または欠失している（rhr2-）組換え酵母株集団の相対的なファルネセンレベル（上）および相対的な光学濃度（下）を示す図である。Y968（右側のパネル）は野生型酵母株である。Y12869、ms63907、ms64472（「Y12869」；右から2番目のパネル）は、PDH-バイパスの欠失（acs1Δ acs2Δ ald6Δ）を含み、アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼアセチル化（Dz. eutE）およびファルネセン産生経路内の遺伝子を異種発現するが、ホスホケトラゼまたはホスホトランスアセチラーゼを発現しない。Y12746、ms63907、ms64472（「Y12746」；左から2番目のパネル）は、PDH-バイパスの欠失（acs1Δ acs2Δ ald6Δ）を含み、アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼアセチル化（Dz. eutE）およびファルネセン産生経路内の遺伝子を異種発現し、ファルネセンの合成に使用される細胞質ゾル内アセチルCoAを産生するための経路としてホスホケトラゼおよびホスホトランスアセチラーゼを使用する。Y12745、ms63907、ms64472（「Y12745」；左側のパネル）は、PDH-バイパスの欠失（acs1Δ acs2Δ ald6Δ）を含み、ファルネセン産生経路内の遺伝子、ファルネセンの合成に使用される細胞質ゾル内アセチルCoAを産生するための経路としてホスホケトラゼおよびホスホトランスアセチラーゼを使用する。

10

【発明を実施するための形態】

【0034】

5. 実施形態の詳細な説明

20

5.1 用語

本明細書で使用される場合、「異種」という用語は、通常は天然に見いだされないものを指す。「異種ヌクレオチド配列」という用語は、天然では所与の細胞において通常は見いだされないヌクレオチド配列を指す。このように、異種ヌクレオチド配列は、（a）その宿主細胞に対して外来（すなわち、その細胞に対して「外因性」）であるもの；（b）宿主細胞において天然に見いだされる（すなわち、「内因性」である）が、細胞内に天然ではない数量（すなわち、宿主細胞において天然に見いだされるよりも多いもしくは少ない数量）で存在するもの；または、（c）宿主細胞において天然に見いだされるが、その天然の遺伝子座以外に位置するものであり得る。「異種酵素」という用語は、天然では所与の細胞において通常は見いだされない酵素を指す。この用語は、（a）所与の細胞に対して外因性である（すなわち、宿主細胞に天然では存在しないまたは宿主細胞の所与の状況では天然には存在しないヌクレオチド配列によりコードされる）酵素；および（b）宿主細胞において天然に見いだされる（例えば、細胞に対して内因性のヌクレオチド配列によりコードされる酵素である）が、宿主細胞において天然ではない量（例えば、天然に見いだされるよりも多いまたは少ない量）で産生される酵素を包含する。

30

【0035】

他方では、「ネイティブ」または「内因性」という用語は、分子、特に酵素および核酸に関して本明細書で使用される場合、それが由来するまたは天然に見いだされる生物体において発現する分子をその発現レベルとは関係なく示し、発現レベルはネイティブな微生物におけるその分子の発現レベルよりも低くて、それと同等であっても、それよりも高くてもよい。ネイティブな酵素またはポリヌクレオチドの発現は、組換え微生物では改変され得ることが理解される。

40

【0036】

本明細書で使用される場合、例えば標的遺伝子、例えばPDH-バイパスの1種または複数種の遺伝子の「機能を破壊する」または「機能の破壊」とは、標的遺伝子を、宿主細胞において標的遺伝子によりコードされるタンパク質の活性が低下するように変更することを意味する。一部の実施形態では、標的遺伝子の機能的破壊により、標的遺伝子の発現レベルが、機能が破壊されていない場合のその発現と比較して少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または100%低下する。同

50

様に、例えば標的タンパク質、例えばアセチルホスファターゼ活性を有するタンパク質の「機能を破壊する」または「機能の破壊」とは、標的タンパク質を、宿主細胞においてタンパク質の活性が低下するように変更することを意味する。一部の実施形態では、標的タンパク質の機能的破壊により、標的タンパク質の活性または発現レベルが、機能が破壊されていない場合のその活性または発現と比較して少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または100%低下する。一部の実施形態では、宿主細胞における標的遺伝子によりコードされる標的タンパク質の活性が排除される。他の実施形態では、宿主細胞における標的遺伝子によりコードされる標的タンパク質の活性が低下する。標的遺伝子の機能的破壊は、遺伝子の全部または一部を欠失させ、その結果、遺伝子発現を排除するまたは低下させること、または遺伝子産物の活性を排除するまたは低下させることによって実現することができる。標的遺伝子の機能的破壊は、遺伝子の調節エレメント、例えば、遺伝子のプロモーターを変異させ、その結果、発現を排除するまたは低下させることによって、または、遺伝子のコード配列を変異させ、その結果、遺伝子産物の活性を排除するまたは低下させることによって実現することができる。一部の実施形態では、標的遺伝子の機能的破壊により、標的遺伝子の完全なオープンリーディングフレームが除去される。

10

【0037】

本明細書で使用される場合、「親細胞」という用語は、改変宿主細胞に対して工学的に操作された1つまたは複数の特定の遺伝子改変、例えば、ADAの異種発現、NADH使用HMG-CoAレダクターゼの異種発現、AACsの異種発現、ホスホクトラーゼの異種発現、ホスホトランスアセチラーゼの異種発現、およびメバロン酸経路の1種または複数種の酵素の異種発現からなる群から選択される1つまたは複数の改変を含まない以外は本明細書に開示されている遺伝子改変宿主細胞と同一の遺伝的背景を有する細胞を指す。

20

【0038】

本明細書で使用される場合、「産生」という用語は、一般に、本明細書で提供される遺伝子改変宿主細胞によって産生されるある量のイソプレノイドを指す。一部の実施形態では、産生は、宿主細胞によるイソプレノイドの収量で表される。他の実施形態では、産生は、イソプレノイドの産生における宿主細胞の生産性で表される。

【0039】

30

本明細書で使用される場合、「生産性」という用語は、経時的な（1時間当たり）宿主細胞を培養する発酵培養液の量（体積）当たりの産生されたイソプレノイドの量（重量）として表された、宿主細胞によるイソプレノイドの産生を指す。

【0040】

本明細書で使用される場合、「収量」という用語は、宿主細胞により消費された炭素源の量当たりの産生されたイソプレノイドの量として重量で表された、宿主細胞によるイソプレノイドの産生を指す。

【0041】

本明細書で使用される場合、「アセチルCoA由来化合物」という句は、その生合成においてアセチルCoAを基質として使用する化合物を指す。例示的なアセチルCoA由来化合物としては、これだけに限定されないが、イソプレノイド、ポリケチド、脂肪酸、およびアルコールが挙げられる。一部の実施形態では、アセチルCoA由来化合物は、エタノール、例えば、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第7,253,001号に記載のペントース基質から産生されるバイオエタノールである。

40

【0042】

本明細書で使用される場合、「バリエーション」という用語は、具体的に列挙されている「参照」ポリペプチド（例えば、野生型配列）とは、アミノ酸の挿入、欠失、変異、および置換により異なるが、参照ポリペプチドと実質的に同様の活性を保持するポリペプチドを指す。一部の実施形態では、バリエーションは、変異誘発などの組換えDNA技法によって創出される。一部の実施形態では、バリエーションポリペプチドは、その参照ポリペプチドとは

50

、1つの塩基性残基の別の塩基性残基での置換（すなわちL y sのA r gでの置換）、1つの疎水性残基の別の疎水性残基での置換（すなわちI l eのL e uでの置換）、または1つの芳香族残基の別の芳香族残基での置換（すなわちT y rのP h eでの置換）などにより異なる。一部の実施形態では、バリエーションは、参照配列の実質的な構造類似性がもたらされる保存的置換が得られる類似体を含む。このような保存的置換の例としては、これだけに限定することなく、アスパラギン酸のグルタミン酸での置換およびその逆；アスパラギンのグルタミンでの置換およびその逆；トレオニンのセリンでの置換およびその逆；アルギニンのリシンでの置換およびその逆；または、イソロイシン、バリンまたはロイシンのいずれかの互いでの置換が挙げられる。

【0043】

10

5. 2 宿主細胞

本明細書で提供される組成物および方法に有用な宿主細胞としては、古細菌細胞、原核生物細胞、または真核細胞が挙げられる。

【0044】

適切な原核生物宿主としては、これだけに限定されないが、種々のグラム陽性細菌、グラム陰性細菌、またはグラム不定細菌のいずれかが挙げられる。例としては、これだけに限定されないが、以下の属に属する細胞が挙げられる：A g r o b a c t e r i u m、A l i c y c l o b a c i l l u s、A n a b a e n a、A n a c y s t i s、A r t h r o b a c t e r、A z o b a c t e r、B a c i l l u s、B r e v i b a c t e r i u m、C h r o m a t i u m、C l o s t r i d i u m、C o r y n e b a c t e r i u m、E n t e r o b a c t e r、E r w i n i a、E s c h e r i c h i a、L a c t o b a c i l l u s、L a c t o c o c c u s、M e s o r h i z o b i u m、M e t h y l o b a c t e r i u m、M i c r o b a c t e r i u m、P h o r m i d i u m、P s e u d o m o n a s、R h o d o b a c t e r、R h o d o p s e u d o m o n a s、R h o d o s p i r i l l u m、R h o d o c o c c u s、S a l m o n e l l a、S c e n e d e s m u n、S e r r a t i a、S h i g e l l a、S t a p h l o c o c c u s、S t r e p t o m y c e s、S y n n e c o c c u s、およびZ y m o m o n a s。原核生物株の例としては、これだけに限定されないが、B a c i l l u s s u b t i l i s、B a c i l l u s a m y l o l i q u e f a c i n e s、B r e v i b a c t e r i u m a m m o n i a g e n e s、B r e v i b a c t e r i u m i m m a r i o p h i l u m、C l o s t r i d i u m b e i g e r i n c k i i、E n t e r o b a c t e r s a k a z a k i i、E s c h e r i c h i a c o l i、L a c t o c o c c u s l a c t i s、M e s o r h i z o b i u m l o t i、P s e u d o m o n a s a e r u g i n o s a、P s e u d o m o n a s m e v a l o n i i、P s e u d o m o n a s p u d i c a、R h o d o b a c t e r c a p s u l a t u s、R h o d o b a c t e r s p h a e r o i d e s、R h o d o s p i r i l l u m r u b r u m、S a l m o n e l l a e n t e r i c a、S a l m o n e l l a t y p h i、S a l m o n e l l a t y p h i m u r i u m、S h i g e l l a d y s e n t e r i a e、S h i g e l l a f l e x n e r i、S h i g e l l a s o n n e i、およびS t a p h y l o c o c c u s a u r e u sが挙げられる。特定の実施形態では、宿主細胞はE s c h e r i c h i a c o l i細胞である。

20

30

40

【0045】

適切な古細菌宿主としては、これだけに限定されないが、以下の属に属する細胞が挙げられる：A e r o p y r u m、A r c h a e g l o b u s、H a l o b a c t e r i u m、M e t h a n o c o c c u s、M e t h a n o b a c t e r i u m、P y r o c o c c u s、S u l f o l o b u s、およびT h e r m o p l a s m a。古細菌株の例としては、これだけに限定されないが、A r c h a e o g l o b u s f u l g i d u s、H a l o b a c t e r i u m s p.、M e t h a n o c o c c u s j a n n a s c h i i、M e t h a n o b a c t e r i u m t h e r m o a u t o t r o p h i c u m、T h e r m o p l a s m a a c i d o p h i l u m、T h e r m o p l a s m a v o l c a

50

nium、Pyrococcus horikoshii、Pyrococcus abyssi、およびAeropyrum pernixが挙げられる。

【0046】

適切な真核生物宿主としては、これだけに限定されないが、真菌細胞、藻類細胞、昆虫細胞、および植物細胞が挙げられる。一部の実施形態では、本方法において有用な酵母として、微生物受託機関（例えばIFO、ATCCなど）に寄託されており、とりわけ、以下の属に属する酵母が挙げられる：Aciculoconidium、Ambrosiozma、Arthroascus、Arxiozma、Ashbya、Babjevia、Bensingtonia、Botryoascus、Botryozyma、Brettanomyces、Bullera、Bulleromyces、Candida、Citeromyces、Clavispora、Cryptococcus、Cystofilobasidium、Debaryomyces、Dekkara、Dipodascopsis、Dipodascus、Eeniella、Endomycopsella、Eremascus、Eremothecium、Erythrobasidium、Fellomyces、Filobasidium、Galactomyces、Geotrichum、Guilliermondella、Hanseniaspora、Hansenula、Hasegawaea、Holtermannia、Hormoascus、Hyphopichia、Issatchenkia、Kloeckera、Kloeckeraspora、Kluyveromyces、Kondoa、Kuraishia、Kurtzmanomyces、Leucosporidium、Lipomyces、Lodderomyces、Malassezia、Metschnikowia、Mrakia、Myxozyma、Nadsonia、Nakazawaea、Nematosporea、Ogataea、Oosporidium、Pachysolen、Phachytichospora、Phaffia、Pichia、Rhodospiridium、Rhodotorula、Saccharomyces、Saccharomycodes、Saccharomycopsis、Saitoella、Sakaguchia、Saturnospora、Schizoblastosporion、Schizosaccharomyces、Schwanniomycetes、Sporidiobolus、Sporobolomyces、Sporopachydermia、Stephanoascus、Sterigmatomyces、Sterigmatosporidium、Symbiotaphrina、Sympodiomyces、Sympodiomycopsis、Torulaspora、Trichosporiella、Trichosporon、Trigonopsis、Tsuchiyaea、Udeniomyces、Waltomyces、Wickerhamia、Wickerhamiella、Williopsis、Yamadazyma、Yarrowia、Zygoascus、Zygosaccharomyces、Zygowilliopsis、およびZygozyma。

【0047】

一部の実施形態では、宿主微生物は、Saccharomyces cerevisiae、Pichia pastoris、Schizosaccharomyces pombe、Dekkera bruxellensis、Kluyveromyces lactis（以前はSaccharomyces lactisと称されていた）、Kluyveromyces marxianus、Arxula adeninivorans、またはHansenula polymorpha（現在はPichia angustaとして公知である）である。一部の実施形態では、宿主微生物は、Candida lipolytica、Candida guilliermondii、Candida krusei、Candida pseudotropicalis、またはCandida utilisなどのCandida属の株である。

【0048】

特定の実施形態では、宿主微生物はSaccharomyces cerevisia

10

20

30

40

50

eである。一部の実施形態では、宿主は、パン酵母、CBS7959、CBS7960、CBS7961、CBS7962、CBS7963、CBS7964、IZ-1904、TA、BG-1、CR-1、SA-1、M-26、Y-904、PE-2、PE-5、VR-1、BR-1、BR-2、ME-2、VR-2、MA-3、MA-4、CAT-1、CB-1、NR-1、BT-1、およびAL-1からなる群から選択される、*Saccharomyces cerevisiae*の株である。一部の実施形態では、宿主微生物は、PE-2、CAT-1、VR-1、BG-1、CR-1、およびSA-1からなる群から選択される、*Saccharomyces cerevisiae*の株である。特定の実施形態では、*Saccharomyces cerevisiae*の株はPE-2である。別の特定の実施形態では、*Saccharomyces cerevisiae*の株はCAT-1である。別の特定の実施形態では、*Saccharomyces cerevisiae*の株はBG-1である。

10

【0049】

一部の実施形態では、宿主微生物は、工業的発酵に適した微生物である。特定の実施形態では、微生物を、工業的発酵環境のストレス条件と認識される高溶媒濃度、高温、基質利用の拡大、栄養分の制限、糖および塩に起因する浸透ストレス、酸味、亜硫酸塩および細菌コンタミネーション、またはこれらの組合せの下で生存するのに適当な状態にする。

【0050】

5. 3 アセチルCoAへのホスホケトラーゼ (PK) /ホスホトランスアセチラーゼ (PTA) 経路

20

一部の実施形態では、本明細書で提供される遺伝子改変宿主細胞におけるホスホケトラーゼ経路は、細胞を、ホスホケトラーゼ、および任意選択でホスホトランスアセチラーゼをコードするポリヌクレオチドおよび／またはポリペプチドを発現するように工学的に操作することによって活性化される。したがって、一部の実施形態では、本明細書で提供される遺伝子改変宿主細胞は、ホスホケトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種ポリヌクレオチドを含む。他の実施形態、特に、ホスホケトラーゼ活性とは関係なく、アセチルホスフェートを代謝中間体として供給することができる実施形態では、本明細書で提供される遺伝子改変宿主細胞は、ホスホトランスアセチラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種ポリヌクレオチドを含む。他の実施形態では、本明細書で提供される遺伝子改変宿主細胞は、ホスホケトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種ポリヌクレオチドと、ホスホトランスアセチラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種ポリヌクレオチドの両方を含む。

30

【0051】

5. 3. 1 ホスホケトラーゼ (PK)

ホスホケトラーゼ (EC 4. 1. 2. 9) により、キシロース5-ホスフェートからグリセルアルデヒド3-ホスフェートおよびアセチルホスフェートへの変換；ならびに／またはフルクトース6-ホスフェートからエリトロース4-ホスフェートおよびアセチルホスフェートへの変換が触媒される。ホスホケトラーゼ活性は、キシロースを唯一の炭素源として用いて成長するいくつかの酵母株において同定されているが、グルコースを用いて成長する酵母株では同定されていない (EvansおよびRatledge, Arch. Microbiol. 139巻: 48~52頁; 1984年)。ホスホケトラーゼの阻害剤としては、これだけに限定されないが、エリトロース4-ホスフェートおよびグリセルアルデヒド3-ホスフェートが挙げられる。

40

【0052】

ホスホケトラーゼ活性をコードするポリヌクレオチド、遺伝子およびポリペプチドの多数の例が当技術分野で公知であり、本明細書で提供される遺伝子改変宿主細胞に使用することができる。一部の実施形態では、このようなポリヌクレオチド、遺伝子および／またはポリペプチドは、*Lactobacillus pentosus* MD363のキシロース5-ホスフェートケトラーゼ (XpkA) である (Posthumaら, Appl. Environ. Microbiol. 68巻: 831~7頁; 2002年)

50

。XpkAは、乳酸菌におけるホスホケトラゼ経路（PKP）の中心的な酵素であり、
 4.455 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ の特異的活性を示す（Posthumaら、Appl.
 Environ. Microbiol. 68巻：831～7頁；2002年）。
 他の実施形態では、このようなポリヌクレオチド、遺伝子および／またはポリペプチドは、
*Leuconostoc mesenteroides*のホスホケトラゼであり（Leeら、Biotechnol Lett. 27巻（12号）；853～858頁（2
 005年））、これは9.9 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ の特異的活性を示し、4.5を超える
 pHで安定である（Goldbergら、Methods Enzymol. 9巻：
 515～520頁；1966年）。このホスホケトラゼは、D-キシロース5-ホス
 フェートに対しては4.7mMのKmを示し、フルクトース6-ホスフェートに対しては
 29mMのKmを示す（Goldbergら、Methods Enzymol. 9巻
 ：515～520頁；1966年）。*Leuconostoc mesenteroides*
 の代表的なホスホケトラゼヌクレオチド配列としては、受託番号AY804190
 、および本明細書で提供される配列番号1が挙げられる。*Leuconostoc me*
*senteroides*の代表的なホスホケトラゼタンパク質配列としては、受託番号
 YP_819405、AAV66077.1、および本明細書で提供される配列番号2が
 挙げられる。他の実施形態では、このようなポリヌクレオチド、遺伝子および／またはポリ
 ペプチドは、例えば、Sondereggerら（Appl. Environ. Microbiol. 70巻：2892～7頁；2004年）によるペントース代謝性S
 . *cerevisiae*株に記載されている*B. lactis*由来のD-キシロース5
 -ホスフェート／D-フルクトース6-ホスフェートホスホケトラゼ遺伝子xfpであ
 る。

【0053】

他の有用なホスホケトラゼとしては、これだけに限定されないが、*Bifidobac*
terium dentium ATCC 27678 (ABIX02000002.
 1:2350400..2352877; EDT46356.1); *Bifidobac*
terium animalis (NC_017834.1:1127580..113
 0057; YP_006280131.1); および *Bifidobacterium*
pseudolongum (AY518216.1:988..3465; AAR987
 88.1); *Aspergillus nidulans* FGSC A4 (CBF76
 492.1); *Bifidobacterium longum* (AAR98787.1
); *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171 (ZP
 03646196.1); *Bifidobacterium animalis* su
 bsp. *lactis* HN019 (ZP_02962870.1); *Lactoba*
cillus plantarum WCFS1 (NP_786060.1); *Lact*
obacillus brevis subsp. *gravesensis* ATCC
 27305 (ZP_03940142.1); *Lactobacillus reut*
eri 100-23 (ZP_03073172.1); および *Leuconostoc*
mesenteroides subsp. *mesenteroides* ATCC
 8293 (YP_818922.1) に由来するものが挙げられる。

【0054】

他の有用なホスホケトラゼとしては、その内容全体が参照により本明細書に組み込ま
 れる国際公開第WO2011/15985号に記載されているものが挙げられる。これら
 のホスホケトラゼとしては、(YP_001601863.1; *Gluconacet*
obacter diazotrophicus Pal 5)、(YP_001093
 221.1; *Shewanella loihica* PV-4)、(YP_92679
 2.1; *Shewanella amazonensis* SB2B)、(YP_735
 093.1; *Shewanella* sp. MR-4)、(YP_001049439
 .1; *Shewanella baltica* OS155)、(ZP_0215788
 4.1; *Shewanella benthica* KT99)、(YP_001472

10

20

30

40

50

925.1; *Shewanella sediminis* HAW-EB3)、(YP_001759669.1; *Shewanella woodyi* ATCC 51908)、(YP_001673352.1; *Shewanella halifaxensis* HA W-EB4)、(YP_563733.1; *Shewanella denitrificans* OS217)、(ZP_05111697.1; *Legionella drancourtii* LLAP 12)、(EEQ84307.1; *Ajellomyces dermatitidis* ER-3)、(XP_002626734.1; *Ajellomyces dermatitidis* SLH14081)、(XP_001539009.1; *Ajellomyces capsulatus* NAm1)、(EEH04133.1; *Ajellomyces capsulatus* G186AR)、(EEH20258.1; *Paracoccidioides brasiliensis* Pb03)、(EEH44652.1; *Paracoccidioides brasiliensis* Pb 18)、(XP_002582752.1; *Uncinocarpus reesii* 1704)、(EER26377.1; *Coccidioides posadasii* C735 delta SOWgp)、(EEQ28085.1; *Microsporum canis* CBS 113480)、(XP_001819785.1; *Aspergillus oryzae* RIB40)、(XP_001399780.1; *Aspergillus niger*)、(XP_001263382.1; *Neosartorya fischeri* NRRL 181)、(XP_001271080.1; *Aspergillus clavatus* NRRL 1)、(XP_001213784.1; *Aspergillus terreus* NIH2624)、(CBF76492.1; *Aspergillus nidulans* FGSCA4)、(XP_002561913.1; *Penicillium chrysogenum* Wisconsin 54-1255)、(XP_002480391.1; *Talaromyces stipitatus* ATCC 10500)、(XP_002144014.1; *Penicillium stipitatus* ATCC 10500)、(XP_002144014.1; *Penicillium mameffeii* ATCC 18224)、(XP_754543.1; *Aspergillus fumigatus* Af293)、(XP_001556635.1; *Botryotinia fuckeliana* B05.1 0)、(XP_001592549.1; *Sclerotinia sclerotiorum* 1980)、(XP_386729.1; *Gibberella zeae* PH-1)、(EEU47171.1; *Nectria haematococca* mp VI 77-13-4)、(EEY16637.1; *Verticillium albo-atrum* VaMs.1 02)、(XP_956649.1; *Neurospora crassa* OR74A)、(XP_364271.2; *Magnaporthe grisea* 70-15)、(XP_001904585.1; *Podospira anserina*)、(XP_001836159.1; *Coprinospora cinerea* okayama7#130)、(NP_595963.1; *Schizosaccharomyces pombe*)、(XP_002173441.1; *Schizosaccharomyces japonicus* yFS275)、(XP_570860.1; *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* JEC21)、(XP_759561.1; *Ustilago maydis* 521)、(ZP_05027078.1; *Microcoleus chthonoplastes* PCC 7420)、(YP_003101114.1; *Actinosynnema mirum* DSM 43827)、(ZP_03568244.1; *Atopobium rimae* ATCC 49626)、(YP_003180237.1; *Atopobium parvulum* DSM 20469)、(ZP_03946928.1; *Atopobium vaginae* DSM 15829)、(ZP_03296299.1; *Collinsella stercoris* DSM 132

79)、(AAR98787.1; *Bifidobacterium longum*)、
 (ZP_03618909.1; *Bifidobacterium breve* DSM
 20213)、(ZP_03646196.1; *Bifidobacterium b*
ifidum NCIMB 41171)、(ZP_04448101.1; *Bifid*
obacterium angulatum DSM 20098)、(ZP_0332
 4204.1; *Bifidobacterium catenulatum* DSM 1
 6992)、(AAR98790.1; *Bifidobacterium sp.* CF
 AR 172)、(AAR98789.1; *Bifidobacterium pull*
orum)、(ZP_03937610.1; *Gardnerella vaginal*
is ATCC 14019)、(ZP_05965201.1; *Bifidobact*
erium gallicum DSM 20093)、(ZP_02962870.1
 ; *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*
 HNO19)、(AAR98788.1; *Bifidobacterium pseud*
olongum subsp. *Globosum*)、(ZP_03946518.1;
Atopobium vaginae DSM 15829)、(YP_0015111
 71.1; *Frankia sp.* EAN1pec)、(YP_713678.1; *F*
rankia alni ACN14a)、(YP_002778395.1; *Rhod*
ococcus opacus B4)、(YP_701466.1; *Rhodococ*
cus jostii RHA1)、(ZP_04383880.1; *Rhodococ*
cus erythropolis SK121)、(YP_947598.1; *Art*
hrobacter aurescens TC 1)、(CAD48946.1; *Pr*
opionibacterium freudenreichii subsp. *Sh*
ermanii)、(NP_791495.1; *Pseudomonas syring*
ae pv. *Tomato str.* DC3000)、(YP_003125992
 .1; *Chitinophaga pinensis* DSM 2588)、(ABX5
 6639.1; *Verrucomicrobiae bacterium* V4)、(Y
 P_002371883.1; *Cyanothece sp.* PCC 8801)、(
 YP_001806596.1; *Cyanothece sp.* ATCC 51142
)、(ZP_01730652.1; *Cyanothece sp.* CCY0110)
 、(CAQ48286.1; *Planktothrix rubescens* NIVA
 -CYA 98)、(ZP_03276298.1; *Arthrospira maxi*
ma CS-328)、(ZP_03157277.1; *Cyanothece sp.*
 PCC 7822)、(YP_002379031.1; *Cyanothece sp*
 . PCC 7424)、(YP_001658501.1; *Microcystis*
aeruginosa NIES-843)、(ZP_01621774.1; *Lyng*
bya sp. PCC 8106)、(NP_485524.1; *Nostoc sp*
 . PCC 7120)、(ZP_05036350.1; *Synechococcus*
sp. PCC 7335)、(YP_001514813.1; *Acaryochl*
oris marina MBIC 11 017)、(ZP_05039537.1;
Synechococcus sp. PCC 7335)、(ZP_02886235
 .1; *Burkholderia graminis* C4 DIM)、(ZP_032
 64503.1; *Burkholderia sp.* H160)、(ZP_01085
 819.1; *Synechococcus sp.* WH 5701)、(ZP_050
 45603.1; *Cyanobium sp.* PCC 7001)、(ZP_0112
 3645.1; *Synechococcus sp.* WH 7805)、(YP_00
 1223932.1; *Synechococcus sp.* WH 7803)、(ZP
 _01079038.1; *Synechococcus sp.* RS9917)、(Y
 P_001889002.1; *Burkholderia phytofirmans*
PsJN)、(YP_553967.1; *Burkholderia xenovora*
ns LB400)、(ZP_02881709.1; *Burkholderia gr*

aminis C4DIM)、(ZP_03270532.1; Burkholderia
 sp. H160)、(YP_001861620.1; Burkholderia
 phymatum STM815)、(YP_002755285.1; Acidob
 acterium capsulatum ATCC 51196)、(EDZ3888
 4.1; Leptospirillum sp. Group II '5-way C
 O')、(EES53204.1; Leptospirillum ferrodiaz
 otrophum)、(YP_172723.1; Synechococcus elo
 ngatus PCC 6301)、(NP_681976.1; Thermosyne
 chococcus elongatus BP-1)、(YP_114037.1; M
 ethylococcus capsulatus str. Bath)、(YP_0 10
 02482577.1; Cyanothece sp. PCC 7425)、(NP_
 442996.1; Synechocystis sp. PCC 6803)、(YP_
 _002482735.1; Cyanothece sp. PCC 7425)、(Z
 P_04774866.1; Allochromatium vinosum DSM
 180)、(ZP_01453148.1; Mariprofundus ferroo
 xydans PV-1)、(ZP_04830548.1; Gallionella
 ferruginea ES-2)、(XP_001273863.1; Aspergi
 llus clavatus NRRL 1)、(XP_001258643.1; Ne
 osartorya fischeri NRRL 181)、(XP_0017276 20
 8

 0.1; Aspergillus oryzae RIB40)、(XP_001396
 306.1; Aspergillus niger)、(XP_001216075.1
 ; Aspergillus terreus NIH2624)、(XP_002567
 130.1; Penicillium chrysogenum Wisconsin
 54-1255)、(XP_002143851.1; Penicillium mar
 neffeii ATCC 18224)、(XP_002480216.1; Talar
 omyces stipitatus ATCC 10500)、(XP_001559
 949.1; Botryotinia fuckeliana B05.10)、(XP 30
 _001593100.1; Sclerotinia sclerotiorum 19
 80)、(XP_001932192.1; Pyrenophora tritici r
 epentis Pt-1C-BFP)、(XP_001793729.1; Phaeo
 sphaeria nodorum SN 15)、(XP_567776.1; Cry
 ptococcus neoformans var. neoformans J
 EC21)、(XP_386504.1; Oibberella zeae PH-1)
 、(EEU46265.1; Nectria haematococca mp VI
 77-13-4)、(AC024516.1; Metarhizium anisopl
 iae)、(XP_959985.1; Neurospora crassa OR74
 A)、(XP_001904686.1; Podosporea anserine)、(40
 YP_002220141.1; Acidithiobacillus ferroox
 idans ATCC 53993)、(YP_001220128.1; Acidip
 hilium cryptum JF -5)、(YP_001471202.1; Th
 ermotoga lettingae TMO)、(YP_002352287.1;
 Dictyoglomus turgidum DSM 6724)、(YP_5717
 90.1; Nitrobacter hamburgensis X14)、(ZP_0
 1092401.1; Blastopirellula marina DSM 364
 5)、(YP_001340809.1; Marinomonas sp. MWYLI
)、(NP_866384.1; Rhodopirellula baltica SH
 1)、(ZP_05108502.1; Legionella drancourti 50

i LLAP 12)、(ZP_04995817.1;Streptomyces sp. Mg1)、(ZP_04023055.1;Lactobacillus reuteri SD2112)、(ZP_03960060.1;Lactobacillus vaginalis ATCC 49540)、(ZP_03073172.1;Lactobacillus reuteri 100-23)、(ZP_05553031.1;Lactobacillus coleohominis 101-4-CHN)、(ZP_05863347.1;Lactobacillus fermentum 28-3-CHN)、(ZP_04021289.1;Lactobacillus acidophilus ATCC 4796)、(ZP_03995194.1;Lactobacillus crispatus 1V-V01)、(ZP_04010922.1;Lactobacillus ultunensis DSM 16047)、(ZP_05549961.1;Lactobacillus crispatus 125-2-CRN)、(ZP_03951361.1;Lactobacillus gasserii 1V-V03)、(ZP_05744515.1;Lactobacillus iners DSM 13335)、(YP_618635.1;Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus ATCC 11842)、(ZP_03955917.1;Lactobacillus jensenii 1V-VI6)、(ZP_03942415.1;Lactobacillus buchneri ATCC 11577)、(ZP_01544800.1;Oenococcus oeni ATCC BAA-1163)、(NP_786060.1;Lactobacillus plantarum WCFSI)、(Q937F6;XPKA_LACPE)、(YP_394903.1;Lactobacillus sakei subsp. sakei 23K)、(YP_803891.1;Pediococcus pentosaceus ATCC 25745)、(BAI40727.1;Lactobacillus rhamnosus GG)、(ZP_03940142.1;Lactobacillus brevis subsp. Gravesensis ATCC 27305)、(ZP_04009273.1;Lactobacillus salivarius ATCC 11741)、(ZP_03958643.1;Lactobacillus ruminis ATCC 25644)、(ZP_04431433.1;Bacillus coagulans 36D1)、(ZP_04601906.1;Kingella oralis ATCC 51147)、(ZP_05736927.1;Granulicatella adiacens ATCC 49175)、(YP_001449631.1;Streptococcus gordonii str. Challis substr. CHI)、(NP_736274.1;Streptococcus agalactiae NEM316)、(ZP_04442854.1;Listeria grayi DSM 20601)、(ZP_05646360.1;Enterococcus casseliflavus EC30)、(ZP_05650322.1;Enterococcus gallinarum EG2)、(ZP_05675307.1;Enterococcus faecium Com12)、(BAH69929.1;Mycoplasma fermentans PG 18)、(YP_002000006.1;Mycoplasma arthritidis 15 8L3-1)、(YP_001256266.1;Mycoplasma agalactiae PG2)、(YP_001988835.1;Lactobacillus casei BL23)、(NP_786753.1;Lactobacillus plantarum WCFS 1)、(ZP_04009976.1;Lactobacillus salivarius ATCC 11741)、(YP_818922.1;Leuconostoc mesenteroides subsp. Mesenteroides ATCC 8293)、(YP_794669.1;Lactobacillus brevis ATCC 367)、(ZP_04782553.1;Weissella pa

ramesenteroides ATCC 33313)、(YP_00172745
 4.1;Leuconostoc citreum KM20)、(YP_819405
 .1;Leuconostoc mesenteroides subsp. mese
 nteroides ATCC 8293)、(ABX75772.1;Lactoco
 ccus lactis subsp. Lactis)、(YP_811314.1;
 Oenococcus oeni PSU-1)、(ZP_02951191.1;Cl
 ostridium butyricum 5521)、(ZP_05390294.1
 ;Clostridium carboxidivorans P7)、(NP_347
 971.1;Clostridium acetobutylicum ATCC 82
 4)、(ZP_03800296.1;Coproccoccus comes ATCC
 27758)、(ZP_04857624.1;Ruminococcus sp.
 5_1_39B FAA)、(ZP_04743029.2;Roseburia in
 testinalis L 1-82)、(ZP_02038271.1;Bacter
 oides capillosus ATCC 29799)、(XP_0021805
 42.1;Phaeodactylum tricomutum CCAP 1055/
 1)、(YP_568630.1;Rhodopseudomonas palustr
 is BisB5)、(YP_487462.1;Rhodopseudomonas
 palustris HaA2)、(NP_947019.1;Rhodopseudo
 monas palustris CGA009)、(YP_533660.1;Rho
 dopseudomonas palustris BisB18)、(YP_9735
 12.1;Polaromonas naphthalenivorans CJ2)、
 (ZP_01464191.1;Stigmatella aurantiaca DW
 4/3-1)、(YP_001267778.1;Pseudomonas putid
 a Fl)、(YP_829644.1;Arthrobacter sp. FB24
)、(YP_002486392.1;Arthrobacter chlorophe
 nolicus A6)、(ZP_05816651.1;Sanguibacter
 keddiei DSM 10542)、(YP_002883053.1;Beut
 enbergia cavemae DSM 12333)、(YP_00316154
 0.1;Jonesia denitrificans DSM 20603)、(ZP
 _03911482.1;Xylanimonas cellulolytica
 DSM 15894)、(CAJ57850.1;Cellulomonas flav
 igena)、(YP_001134605.1;Mycobacterium gil
 vum PYR-GCK)、(YP_953877.1;Mycobacterium
 vanbaalenii PYR-1)、(YP_003155611.1;Brach
 ybacterium faecium DSM 4810)、(YP_0031481
 27.1;Kytococcus sedentarius DSM 20547)、(Y
 P_001221168.1;Clavibacter michiganensis
 subsp. michiganensis NCPPB 382)、(YP_001
 158426.1;Salinispora tropica CNB-440)、(Y
 P_001536420.1;Salinispora arenicola CNS-
 205)、(ZP_04608302.1;Micromonospora sp. A
 TCC 39149)、(YP_887914.1;Mycobacterium sm
 egmatis str. MC2 155)、(YP_639956.1;Mycob
 acterium sp. MCS)、(ZP_04749157.1;Mycobac
 terium kansasii ATCC 12478)、(YP_00185103
 9.1;Mycobacterium marinumM)、(NP_960507.1
 ;Mycobacterium avium subsp. paratubercul
 osis K-10)、(ZP_05224330.1;Mycobacterium
 intracellulare ATCC 13950)、(YP_001703240
 .1;Mycobacterium abscessus)、(ZP_00995133

10

20

30

40

50

1; *Janibacter* sp. HTCC2649)、(YP_291026.1; *Thermobifida fusca* YX)、(ZP_04031845.1; *Thermomonospora curvata* DSM 43183)、(ZP_04475514.1; *Streptosporangium roseum* DSM 43021)、(ZP_04335641.1; *Nocardiosis dassonvillei* subsp. *dassonvillei* DSM 43111)、(ZP_04482201.1; *Stackebrandtia nassauensis* DSM 44728)、(YP_003099712.1; *Actinosynnema mirum* DSM 43827)、(NP_733508.1; *Streptomyces coelicolor* A3(2))、(CAJ88379.1; *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877)、(ZP_05536883.1; *Streptomyces griseoflavus* Tu4000)、(ZP_05020421.1; *Streptomyces svaceus* ATCC 29083)、(CBG67625.1; *Streptomyces scabiei* 87.22)、(NP_822448.1; *Streptomyces avermitilis* MA-4680)、(ZP_04689547.1; *Streptomyces ghanaensis* ATCC 14672)、(ZP_05530021.1; *Streptomyces viridochromogenes* DSM 40736)、(ZP_05512501.1; *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 53653)、(ZP_05800927.1; *Streptomyces flayogriseus* ATCC 33331)、(YP_001828275.1; *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* NBRC 13350)、(ZP_04705493.1; *Streptomyces albus* J1074)、(ZP_04996963.1; *Streptomyces* sp. Mg1)、(ZP_05485309.1; *Streptomyces* sp. SPB78)、(ZP_03860882.1; *Kribbella flayida* DSM 17836)、(YP_117539.1; *Nocardia farcinica* IFM 10152)、(YP_001505556.1; *Frankia* sp. EAN1pec)、(YP_482627.1; *Frankia* sp. Cc13)、(YP_003116893.1; *Catenulisporea acidiphila* DSM 44928)、(YP_872280.1; *Acidothermus lolyticus* LIB)、(YP_924807.1; *Nocardioidea* sp. JS614)、(YP_001104157.1; *Saccharopolyspora erythraea* NRRL 2338)、(YP_002282673.1; *Rhizobium leguminosarum* by. *trifolii* WSM2304)、(YP_002977256.1; *Rhizobium leguminosarum* by. *trifolii* WSM1325)、(YP_001979796.1; *Rhizobium etli* CIAT 652)、(YP_470926.1; *Rhizobium etli* CFN 42)、(YP_002540633.1; *Agrobacterium radiobacter* K84)、(ZP_05182366.1; *Brucella* sp. 83/13)、(ZP_04683384.1; *Ochrobactrum intermedium* LMG 3301)、(YP_001373254.1; *Ochrobactrum anthropi* ATCC 49188)、(YP_001204109.1; *Bradyrhizobium* sp. ORS278)、(YP_001238418.1; *Bradyrhizobium* sp. BTA1)、(NP_769158.1; *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110)、(YP_577164.1; Ni

trobacter hamburgensis X14)、(YP_002961612.1; *Methylobacterium extorquens* AM 1)、(YP_674792.1; *Mesorhizobium* sp. BNC1)、(ZP_05813617.1; *Mesorhizobium opportunistum* WSM2075)、(YP_318559.1; *Nitrobacter winogradskyi* Nb-255)、(YP_001755280.1; *Methylobacterium radiotolerans* JCM 2831)、(YP_001753119.1; *Methylobacterium radiotolerans* JCM 2831)、(YP_003066011.1; *Methylobacterium extorquens* DM4)、(YP_002964777.1; *Methylobacterium extorquens* AM 1)、(YP_002501292.1; *Methylobacterium nodulans* ORS 2060)、(YP_002495265.1; *Methylobacterium nodulans* ORS 2060)、(YP_001770387.1; *Methylobacterium* sp. 4-46)、(YP_002944712.1; *Variovorax paradoxus* S110)、(ZP_01156757.1; *Oceanicola granulatus* HTCC2516)、(ZP_01628787.1; *Nodularia spumigena* CCY9414)、(YP_001865546.1; *Nostoc punctiforme* PCC 73102)、(YP_321015.1; *Anabaena variabilis* ATCC 29413)、(ZP_03769140.1; *Nostoc azollae* '0708)、(NP_923943.1; *Gloeobacter violaceus* PCC 7421)、(YP_477385.1; *Synechococcus* sp. JA-2-3B'a (2-13))、(YP_001328659.1; *Sinorhizobium medicae* WSM419)、(YP_765670.1; *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841)、(NP_384212.2; *Sinorhizobium meliloti* 1021)、(ZP_02928455.1; *Verrucomicrobium spinosum* DSM 4136)、(YP_001637539.1; *Methylobacterium extorquens* Pal)、(ZP_01045825.1; *Nitrobacter* sp. Nb-311A)、(ZP_02736602.1; *Gemmata obscuriglobus* UQM 2246)、(YP_003157871.1; *Desulfomicrobium baculatum* DSM 4028)、(ZP_03631304.1; *bacterium Ellin514*)、(ZP_04577558.1; *Oxalobacter formigenes* HOxBLS)、(ZP_04579712.1; *Oxalobacter formigenes* OXCC13)、(YP_826169.1; *Solibacter usitatus* Ellin6076)、(YP_002018753.1; *Pelodictyon phaeocyclathratiforme* BU-1)、(YP_002016285.1; *Prosthecochloris aestuarii* DSM 271)、(YP_001943369.1; *Chlorobium limicola* DSM 245)、(NP_662409.1; *Chlorobium tepidum* TLS)、(ZP_01386179.1; *Chlorobium ferrooxidans* DSM 13031)、(YP_375422.1; *Chlorobium luteolum* DSM 273)、(YP_285277.1; *Dechloromonas aromatica* RCB)、(YP_314589.1; *Thiobacillus denitrificans* ATCC 25259)、(YP_545002.1; *Methylobacillus flagellatus* KT)、(NP_842139.1; *Nitrosomonas europaea* ATCC 19718)、(YP_748274.1; *Nitrosomonas eutropha* C91)、(YP_411688.1; Ni

trosospira multiformis ATCC 25196)、(YP_344700.1; *Nitrosococcus oceani* ATCC 19707)、(YP_007004.1; *Candidatus Protochlamydia amoebophila* UWE25)、(NP_435833.1; *Sinorhizobium meliloti* 1021)、(ZP_04421874.1; *Sulfurospirillum deleyianum* DSM 6946)、(NP_107054.1; *Mesorhizobium loti* MAF303099)、(YP_002289797.1; *Oligotropho carboxidovorans* OM5)、(YP_001833312.1; *Beijerinckia indica* subsp. *indica* ATCC 9039)が挙げられる。

10

【0055】

本明細書で提供される組成物および方法において同様に有用なホスホクトラゼとしては、本明細書に記載のホスホクトラゼのいずれかの「誘導体」といわれる分子が挙げられる。このような「誘導体」は以下の特性を有する：(1)本明細書に記載のホスホクトラゼのいずれかと実質的な相同性を共有し、かつ、(2)X5Pからグリセルアルデヒド3-ホスフェート(G3P)およびアセチルホスフェートへの変換；またはF6Pからエリトース4-ホスフェート(E4P)およびアセチルホスフェートへの変換を触媒することができる。ホスホクトラゼの誘導体は、誘導体のアミノ酸配列がホスホクトラゼのアミノ酸配列と少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%同じであれば、ホスホクトラゼと「実質的な相同性」を共有するといえる。

20

【0056】

5.3.2 ホスホトランスアセチラーゼ(PTA)

一部の実施形態では、本明細書で提供される遺伝子改変宿主細胞は、ホスホトランスアセチラーゼをコードする異種ヌクレオチド配列を含む。ホスホトランスアセチラーゼ(EC2.3.1.8)により、アセチルホスフェートがアセチルCoAに変換される。

【0057】

ホスホトランスアセチラーゼ活性をコードするポリヌクレオチド、遺伝子およびポリペプチドの多数の例が当技術分野で公知であり、本明細書で提供される遺伝子改変宿主細胞に使用することができる。一部の実施形態では、このようなポリヌクレオチド、遺伝子および/またはポリペプチドは、*Clostridium kluyveri*由来のホスホトランスアセチラーゼである。*Clostridium kluyveri*の代表的なホスホトランスアセチラーゼヌクレオチド配列としては、受託番号NC_009706.1:1428554..1429555、および本明細書で提供される配列番号3が挙げられる。*Clostridium kluyveri*の代表的なホスホトランスアセチラーゼタンパク質配列としては、受託番号YP_001394780および本明細書で提供される配列番号4が挙げられる。他の有用なホスホトランスアセチラーゼとしては、これだけに限定されないが、*Lactobacillus reuteri*(NC_010609.1:460303..461277; YP_001841389.10); *Bacillus subtilis*(NC_014479.1:3671865..3672836; YP_003868063.1); *Methanosarcina thermophila*(L23147.1:207..1208; AAA72041.1); *Lactobacillus sanfranciscensis*(BAB19267.1); *Lactobacillus plantarum* WCFS1(NP_784550.1); *Lactobacillus fermentum* ATCC 14931(ZP_03944466.1); *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. 168(NP_391646.1); *Methanosarcina thermophila*(AAA72041.1); *Clostridium thermocellum* DSM 4150(ZP_03152606.1); *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824(NP_3483

30

40

50

68. 1) ; *Clostridium kluyveri* DSM 555 (YP 001394780. 1) ; *Veillonella parvula* DSM 2008 (ZP 03855267. 1) ; および *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Paratyphi* A str. ATCC 9150 (YP__149725. 1) に由来するものが挙げられる。

【0058】

他の有用なホスホトランスアセチラーゼとしては、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる国際公開第WO2011/15985号に記載されているものが挙げられる。これらのホスホトランスアセチラーゼとしては、(ZP__05427766. 1 ; *Eubacterium saphenum* ATCC 49989)、(ZP__03627696. 1 ; *bacterium Ellin*514)、(ZP__03131770. 1 ; *Chthonio bacter flavus* Ellin428)、(YP__001878031. 1 ; *Akkermansia muciniphila* TCCBA A-835)、(ZP__04562924. 1 ; *Citrobacter* sp. 30__2)、(YP__001451936. 1 ; *Citrobacter koseri* ATCC BAA-895)、(YP__149725. 1 ; *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Paratyphi* A str. ATCC 9150)、(YP__001569496. 1 ; *Salmonella enterica* subsp. *anzonae* serovar 62 : z4, z23 : --)、(NP__416953. 1 ; *Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655)、(YP__002920654. 1 ; *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044)、(ZP__04637797. 1 ; *Yersinia intermedia* ATCC 29909)、(ZP__01222604. 1 ; *Photobacterium profundum* 3TCK)、(ZP__02156855. 1 ; *Shewanella benthica* KT99)、(YP__958508. 1 ; *Marinobacter aquaeolei* VT8)、(YP__066771. 1 ; *Desulfotalea psychrophila* LSV54)、(YP__002780531. 1 ; *Rhodococcus opacus* B4)、(YP__703506. 1 ; *Rhodococcus jostii* RHA1)、(ZP__05479963. 1 ; *Streptomyces* sp. AA4)、(YP__002761398. 1 ; *Gemmatimonas aurantiaca* T-27)、(ZP__04670189. 1 ; *Clostridiales bacterium* 1_7_47FAA)、(ZP__05493958. 1 ; *Clostridium papyrosolvens* DSM 2782)、(YP__003143506. 1 ; *Slackia heliotrinireducens* DSM 20476)、(ZP__05090822. 1 ; *Ruegeria* sp. R11)、(ZP__01748021. 1 ; *Sagittula stellata* E-37)、(NP__604069. 1 ; *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586)、(ZP__05814734. 1 ; *Fusobacterium* sp. 3_1_33)、(ZP__06026613. 1 ; *Fusobacterium periodonticum* ATCC 33693)、(ZP__05617632. 1 ; *Fusobacterium* sp. 3_1_5R)、(ZP__05628030. 1 ; *Fusobacterium* sp. D12)、(ZP__04860946. 1 ; *Fusobacterium vanum* ATCC 27725)、(ZP__04567444. 1 ; *Fusobacterium mortiferum* ATCC 9817)、(YP__001489437. 1 ; *Arcobacter butzleri* RM4018)、(YP__003163236. 1 ; *Leptotrichia buccalis* C-1013-b)、(ZP__05902420. 1 ; *Leptotrichia hofstadii* F0254)、(ZP__06011308. 1 ; *Leptotrichia goodfellowii*

10

20

30

40

50

F0264)、(ZP_04479548.1; *Streptobacillus moniliformis* DSM 12112)、(ZP_03855267.1; *Veillonella parvula* DSM 2008)、(ZP_03928523.1; *Acidaminococcus* sp. D21)、(NP_970659.1; *Treponema denticola* ATCC 35405)、(ZP_05621510.1; *Treponema vincentii* ATCC 35580)、(NP_218534.1; *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* str. Nichols)、(ZP_04047318.1; *Brachyspira murdochii* DSM 12563)、(YP_002720478.1; *Brachyspira hyodysenteriae* WAL)、(YP_001740706.1; *Candidatus Cloacamonas acidaminovorans*)、(EER05013.1; *Perkinsus mannus* ATCC 50983)、(YP_945582.1; *Borrelia turicatae* 91E135)、(YP_001884013.1; *Borrelia hermsii* DAH)、(YP_002222233.1; *Borrelia duttonii* Ly)、(ZP_03675306.1; *Borrelia spielmanii* A14S)、(ZP_03435394.1; *Borrelia afzelii* ACA-1)、(ZP_03540018.1; *Borrelia garinii* Far04)、(ZP_03672928.1; *Borrelia valaisiana* VS116)、(NP_212723.1; *Borrelia burgdorferi* B31)、(YP_001956287.1; uncultured *Termites* group 1 bacterium phylotype Rs-D17)、(NP_975268.1; *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC str. PG1)、(YP_424216.1; *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* ATCC 27343)、(YP_053283.1; *Mesoplasma florum* L1)、(CAK99540.1; *Spiroplasma citri*)、(NP_072966.1; *Mycoplasma genitalium* G37)、(NP_110116.1; *Mycoplasma pneumomae* M129)、(NP_853403.1; *Mycoplasma gallisepticum* R)、(NP_757889.1; *Mycoplasma penetrans* HF-2)、(YP_116016.1; *Mycoplasma hyopneumoniae* 232)、(YP_002960607.1; *Mycoplasma conjunctivae*)、(YP_001256282.1; *Mycoplasma agalactiae* PG2)、(BAH69503.1; *Mycoplasma fermentans* PG18)、(YP_278771.1; *Mycoplasma synoviae* 53)、(NP_326068.1; *Mycoplasma pulmonis* UAB CTIP)、(YP_015865.1; *Mycoplasma mobile* 163K)、(YP_001256630.1; *Mycoplasma agalactiae* PG2)、(YP_802685.1; *Buchnera aphidicola* str. Cc (Cinara cedri))、(YP_001885432.1; *Clostridium botulinum* B str. Eklund 17B)、(YP_001308302.1; *Clostridium beijerinckii* NCL MB 8052)、(ZP_05131280.1; *Clostridium* sp. 7_2_43FAA)、(ZP_02948604.1; *Clostridium butyricum* 5521)、(NP_562641.1; *Clostridium perfringens* str. 13)、(ZP_05391232.1; *Clostridium carboxidivorans* P7)、(YP_001394780.1; *Clostridium kluyveri* DSM 555)、(ZP_02995419.1; *Clostridium sporogenes* ATCC 1557

9)、(NP_781870.1; *Clostridium tetani* E88)、
 (ZP_04862192.1; *Clostridium botulinum* D str.
 1873)、(YP_878298.1; *Clostridium novyi*
 NT)、(ZP_04804960.1; *Clostridium cellulo-*
vorans 743B)、(NP_348368.1; *Clostridium ace-*
tobutylicum ATCC 824)、(ACA51668.1; *Thermo-*
anaerobacterium saccharolyticum)、(ZP_05
 336886.1; *Thermoanaerobacterium thermosa-*
ccharolyticum SM 571)、(NP_623097.1; *Therm-*
oanaerobacter tengcongensis MB4)、(YP_00
 1663354.1; *Thermoanaerobacter* sp. X514)、
 (YP_002508771.1; *Halothermothrix orenii*
 H 168)、(YP_003190679.1; *Desulfotomaculum*
acetoxidans DSM 771)、(YP_001917776.1; *Nat-*
ranaerobius thermophiles JW INM-WN-LF)、(Y
 P_360288.1; *Carboxydotherrmus hydrogenofor-*
mans Z-2901)、(EY83551.1; *Bacteroides* sp. 2
 _1_33B)、(ZP_02033408.1; *Parabacteroides m-*
erdae ATCC 43184)、(NP_905297.1; *Porphyrom-*
onas gingivalis W83)、(ZP_04056000.1; *Porp-*
hyromonas uenonis 60-3)、(ZP_04389884.1; *P-*
orphyromonas endodontalis ATCC 35406)、(Z
 P_02068815.1; *Bacteroides uniformis* ATCC
 8492)、(ZP_03460749.1; *Bacteroides eggerth-*
ii DSM 20697)、(ZP_03676944.1; *Bacteroides*
cellulosilyticus DSM 14838)、(YP_097761.
 1; *Bacteroides fragilis* YCH46)、(ZP_045458
 25.1; *Bacteroides* sp. D1)、(ZP_03643544.1;
Bacteroides coprophilus DSM 18228)、(ZP_0
 3207078.1; *Bacteroides plebeius* DSM 17135
)、(YP_001297855.1; *Bacteroides vulgatus* A
 TCC 8482)、(ZP_05736702.1; *Prevotella tann-*
erae ATCC 51259)、(ZP_06007587.1; *Prevotel-*
la bergensis DSM 17361)、(ZP_05858935.1; *P-*
r

evotella veroralis F0319)、(ZP_05916997.1
 ; *Prevotella* sp. oral taxon 472 str. F029
 5)、(YP_002308782.1; *Candidatus Azo bacter-*
oides pseudotrichonymphae genomovar. CF
 P2)、(YP_753459.1; *Syntrophomonas wolfei* s
 ubsp. *wolfei* str. Goettingen)、(ZP_017713
 89.1; *Collinsella aerofaciens* ATCC 25986)
 、(ZP_03296849.1; *Collinsella stercoris* DS
 M 13279)、(ZP_04445308.1; *Collinsella ntes-*
tinalis DSM 13280)、(ZP_03567515.1; *Atopob-*
ium rimae ATCC 49626)、(YP_003179667.1; *Ato-*
pobium parvulum DSM 20469)、(ZP_03946133.
 1; *Atopobium vaginae* DSM 15829)、(ZP_03990
 50

654. 1; *Oribacterium sinus* F0268)、(ZP_04450849. 1; *Abiotrophia defective* ATCC 49176)、
 (ZP_05797601. 1; *Oribacterium* sp. oral taxon 078 str. F0262)、(ZP_03730247. 1; *Clostridium* sp. M62/1)、(ZP_04856252. 1; *Ruminococcus* sp. 5_1_39BFAA)、(ZP_01966332. 1; *Ruminococcus obeum* ATCC 29174)、(ZP_05345616. 1; *Bryantella formatexigens* DSM 14469)、(ZP_03780829. 1; *Blautia hydrogenotrophica* DSM 10507)、(ZP_03289360. 1; *Clostridium n* 10
exile DSM 1787)、(ZP_02042092. 1; *Ruminococcus gnavus* ATCC 29149)、(ZP_03168112. 1; *Ruminococcus lactaris* ATCC 29176)、(ZP_01968837. 1; *Ruminococcus torques* ATCC 27756)、
 (ZP_02430426. 1; *Clostridium scindens* ATCC 35704)、(ZP_03779744. 1; *Clostridium hylemonae* DSM 15053)、(ZP_02234595. 1; *Dorea formicigenerans* ATCC 27755)、(ZP_01994673. 1; *Dorea longicatena* DSM 13814)、(YP_001558442. 1; *Clostridium phytofermentans* ISDg)、(ZP_04667085. 1; *Clostridiales bacterium* 1_7_47FAA)、(ZP_02085391. 1; *Clostridium boltea* ATCC BAA-613)、(ZP_05790853. 1; *Butyrivibrio crossotus* DSM 2876)、(ZP_02026034. 1; *Eubacterium ventriosum* ATCC 27560)、(YP_002930513. 1; *Eubacterium eligens* ATCC 27750)、(ZP_04808213. 1; *Helicobacter pullorum* MIT 98-5489)、(ZP_03656120. 1; *Helicobacter* 30
Canadensis MIT 98-5491)、(ZP_04583217. 1; *Helicobacter winghamensis* ATCC BAA-430)、
 (NP_860840. 1; *Helicobacter hepaticus* ATCC 51449)、(ZP_03657896. 1; *Helicobacter cinaedi* CCUG 18818)、(ZP_02417779. 1; *Anaerostipes caccae* DSM 14662)、(ZP_02437622. 1; *Clostridium* sp. SS211)、(ZP_02205430. 1; *Coprococcus eutactus* ATCC 27759)、(ZP_02692616. 1; *Epulopiscium* sp. 'N. t. morphotype B')、(YP_003182082. 1; *Eggerthella lenta* DSM 2243)、(YP_003151027. 1; *Cryptobacterium cur* 40
tum DSM 15641)、(YP_003143601. 1; *Slackia heliotrinireducens* DSM 20476)、(ZP_05498135. 1; *Clostridium papyrosolvans* DSM 2782)、
 (ZP_03152606. 1; *Clostridium thermocellum* JW20)、(YP_001180817. 1; *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* DSM 8903)、(AAA72041. 1; *Methanosarcina thermophila*)、(NP_618482. 1; *Methanosarcina acetivorans* C2A)、(YP_305342. 1; *Methanosarcina barkeri* str. Fusaro)、(ZP_02142278. 1; *Roseobacter litoralis* Och 149)、(YP_681184. 1; *Roseobacter denitr* 50

ificans Och 114)、(YP_001533168.1; Dinoroseobacter shibae DFL 12)、(ZP_05124935.1; Rhodobacteraceae bacterium KLH11)、(ZP_05786337.1; Silicibacter lacuscaerulensis ITI-1157)、(YP_001313586.1; Sinorhizobium medicae WSM419)、(NP_437512.1; Sinorhizobium meliloti 1021)、(ZP_04682129.1; Ochrobactrum intermedium LMG 3301)、(YP_001372036.1; Ochrobactrum anthropic ATCC 49188)、(YP_001888115.1; Burkholderia phytofirmans PsJN)、(YP_554613.1; Burkholderia xenovorans LB400)、(YP_001862297.1; Burkholderia phymatum STM815)、(YP_297974.1; Ralstonia eutropha JMP134)、(YP_002008219.1; Cupriavidus taiwanensis)、(YP_001584488.1; Burkholderia multivorans multivorans)、(YP_002233797.1; Burkholderia cenocepacia J2315)、(ZP_01220235.1; Photobacterium profundum 3TCK)、(ZP_03698361.1; Luticola nitroferum 2002)、(ZP_01811515.1; Vibrionales bacterium SWAT-3)、(ZP_00988349.1; Vibrio splendidus 12B01)、(ZP_01866234.1; Vibrio shilonii AK1)、(ZP_05885163.1; Vibrio coralliilyticus ATCCBAA-450)、(AAS78789.1; Paracoccus denitrificans)、(YP_345196.1; Rhodobacter sphaeroides 2.4.1)、(AAN08490.1; Castellaniella defragrans)、(ZP_00961345.1; Roseovarius nubinhibens ISM)、(YP_168755.1; Ruegeria pomeroyi DSS-3)、(ZP_01901193.1; Roseobacter sp. AzwK-3b)、(ZP_01752570.1; Roseobacter sp. SK209-2-6)、(ZP_02140073.1; Roseobacter litoralis Och 149)、(YP_510789.1; Jannaschia sp. CCS1)、(ZP_05073153.1; Rhodobacterales bacterium HTCC2083)、(YP_822367.1; Candidatus Solibacter usitatus Ellin6076)、(ZP_01313101.1; Desulfuromonas acetoxidans DSM 684)、(YP_357950.1; Pelobacter carbinolicus DSM 2380)、(YP_002537084.1; Geobacter sp. FRC-32)、(YP_001232124.1; Geobacter uraniireducens Rf4)、(NP_953751.1; Geobacter sulfurreducens PCA)、(YP_384000.1; Geobacter metallireducens GS-15)、(YP_900968.1; Pelobacter propionicus DSM 2379)、(YP_001951452.1; Geobacter lovleyi SZ)、(ZP_05311922.1; Geobacter sp. M18)、(YP_003021758.1; Geobacter sp. M21)、(YP_358255.1; Pelobacter carbinolicus DSM 2380)、(ZP_03906856.1; Denitrovibrio acetiphilus DSM 12809)、(YP_001997093.1; Chloroherpeton thalassium ATCC 35110)、(ZP_0192485

8. 1; *Victivallis vadensis* ATCCBAA-548)、(ZP_03439825. 1; *Helicobacter pylori* 98-10)、
 (YP_003057614. 1; *Helicobacter pylori* B38)、
 (YP_001910417. 1; *Helicobacter pylori* Shi470)、
 (NP_223559. 1; *Helicobacter pylori* J99)、
 (YP_665033. 1; *Helicobacter acinonychis* str. Sheeba)、
 (ZP_01810337. 1; *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* CG8486)、
 (ZP_00366840. 1; *Campylobacter coli* RM2228)、
 (ZP_00370527. 1; *Campylobacter upsaliensis* RM3195)、
 (YP_002575219. 1; *Campylobacter lari* RM2100)、
 (YP_001406718. 1; *Campylobacter hominis* ATCCBAA-381)、
 (ZP_05624820. 1; *Campylobacter gracilis* RM3268)、
 (YP_891988. 1; *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* 82-40)、
 (YP_

10

001466901. 1; *Campylobacter concisus* 13826)、
 (YP_001408221. 1; *Campylobacter curvus* 525. 92)、
 (ZP_05363348. 1; *Campylobacter showae* RM3277)、
 (ZP_03742933. 1; *Bifidobacterium pseudocatenulatum* DSM 20438)、
 (ZP_02918887. 1; *Bifidobacterium dentium* ATCC 27678)、
 (ZP_02028883. 1; *Bifidobacterium adolescentis* L2-32)、
 (ZP_04448100. 1; *Bifidobacterium angulatum* DSM 20098)、
 (ZP_03618886. 1; *Bifidobacterium breve* DSM 20213)、
 (ZP_03976084. 1; *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 55813)、
 (YP_002323183. 1; *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697)、
 (ZP_03646187. 1; *Bifidobacterium bifidum* NCLMB 41171)、
 (ZP_03937611. 1; *Gardnerella vaginalis* ATCC 14019)、
 (ZP_02962869. 1; *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019)、
 (ZP_05965185. 1; *Bifidobacterium gallium* DSM 20093)、
 (ZP_02043408. 1; *Actinomyces odontolyticus* ATCC 17982)、
 (ZP_03925176. 1; *Actinomyces coleocanis* DSM 15436)、
 (NP_601948. 1; *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032)、
 (NP_739201. 1; *Corynebacterium efficiens* YS-314)、
 (NP_940379. 1; *Corynebacterium diphtheria* NCTC 13129)、
 (ZP_04835255. 1; *Corynebacterium glucuronolyticum* ATCC 51867)、
 (ZP_05708623. 1; *Corynebacterium genitalium* ATCC 33030)、
 (ZP_03977910. 1; *Corynebacterium lipophiloflavum* DSM 44291)、
 (ZP_03932064. 1; *Corynebacterium accolens* ATCC 49725)、
 (ZP_05366890. 1; *Corynebacterium tuberculostearicum* SK141)、
 (YP_

20

30

40

50

002835817. 1; *Corynebacterium aumucosum* ATCC 700975)、(YP_250020. 1; *Corynebacterium jeikeium* K411)、(YP_001801132. 1; *Corynebacterium urealyticum* DSM 7109)、(YP_002906954. 1; *Corynebacterium kroppenstedtii* DSM 44385)、(ZP_03393297. 1; *Corynebacterium amycolatum* SK46)、(ZP_03718987. 1; *Neisseria flavescens* NRL30031/H 210)、(ZP_05318956. 1; *Neisseria sicca* ATCC 29256)、(YP_001598731. 1; *Neisseria meningitides* 053442)、(ZP_04602977. 1; *Kingella oralis* ATCC 51147)、(YP_426466. 1; *Rhodospirillum rubrum* ATCC 11170)、(NP_871183. 1; *Wigglesworthia glossinidia endosymbiont of Glossina brevipalpis*)、(NP_777793. 1; *Buchnera aphidicola* str. Bp (Baizongia pistaciae))、(YP_003249406. 1; *Fibrobacter succmogenes* subsp. *succmogenes* S85)、(ZP_03535302. 1; *Mycobacterium tuberculosis* T17)、(ZP_04056438. 1; *Capnocytophaga gingivalis* ATCC 33624)、(YP_003108500. 1; *Candidatus Sulcia muelleri* SMDS EM)、(P77844; *Corynebacterium glutamicum*)、(ZP_03994160. 1; *Mobiluncus mulieris* ATCC 35243)、(ZP_03922640. 1; *Mobiluncus curtisi* ATCC 43063)、(ZP_03716209. 1; *Eubacterium hallii* DSM 3353)、(ZP_03718143. 1; *Eubacterium hallii* DSM 3353)、(ZP_05614434. 1; *Faecalibacterium prausnitzii* A2-165)、(ZP_02034852. 1; *Bacteroides capillosus* ATCC 29799)、(ZP_03753543. 1; *Roseburia inulinivorans* DSM 16841)、(ZP_04745275. 2; *Roseburia intestinalis* L1-82)、(YP_002937332. 1; *Eubacterium rectale* ATCC 33656)、(ZP_02074244. 1; *Clostridium* sp. L2-50)、(ZP_04455374. 1; *Shuttleworthia satellites* DSM 14600)、(ZP_03488480. 1; *Eubacterium bifforme* DSM 3989)、(ZP_02078327. 1; *Eubacterium dolichum* DSM 3991)、(ZP_02077559. 1; *Eubacterium dolichum* DSM 3991)、(ZP_03305532. 1; *Anaerococcus hydrogenalis* DSM 7454)、(ZP_05473291. 1; *Anaerococcus vaginalis* ATCC 51170)、(ZP_03931050. 1; *Anaerococcus tetradius* ATCC 35098)、(YP_003153463. 1; *Anaerococcus prevotii* DSM 20548)、(ZP_03916048. 1; *Anaerococcus lactolyticus* ATCC 51172)、(NP_607213. 1; *Streptococcus pyogenes* MGAS8232)、(AAK34003. 1; *Streptococcus pyogenes* M1GAS)、(YP_002562185. 1; *Streptococcus uberis* 01401)、(YP_002744451. 1; *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus*)、(BAH88016. 1; *Streptococcus*

mutans NN2025)、(ZP_02920305.1;Streptococcus infantarius subsp. infantarius ATCC BAA-102)、(YP_329798.1;Streptococcus agalactiae A909)、(ZP_04061789.1;Streptococcus salivarius SK126)、(YP_139881.1;Streptococcus thermophiles LMG 18311)、(ZP_04525024.1;Streptococcus pneumomae CCR1 1974)、(ZP_06060573.1;Streptococcus sp. 2_1_36 FAA)、(YP_001198423.1;Streptococcus suis 05ZYH33)、(NP_964739.1;Lactobacillus johnsonii NCC 533)、(YP_193610.1;Lactobacillus acidophilus NCFM)、(ZP_04011019.1;Lactobacillus ultunensis DSM 16047)、(ZP_03995297.1;Lactobacillus crispatus JV-VOL)、(ZP_05752753.1;Lactobacillus helveticus DSM 20075)、(ZP_03956024.1;Lactobacillus jensenii JV-V16)、(ZP_04645187.1;Lactobacillus jensenii 269-3)、(YP_618719.1;Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus ATCC 11842)、(ZP_05744366.1;Lactobacillus iners DSM 13335)、(NP_391646.1;Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168)、(YP_001423045.1;Bacillus amyloliquefaciens FZB42)、(YP_081073.1;Bacillus licheniformis ATCC 14580)、(ZP_03055101.1;Bacillus pumilus ATCC 7061)、(YP_002317098.1;Anoxybacillus flavithermus WKI)、(YP_002951270.1;Geobacillus sp. WCH70)、(YP_001127443.1;Geobacillus thermodenitrificans NG80-2)、(YP_149268.1;Geobacillus kaustophilus HTA426)、(ZP_01861251.1;Bacillus sp. SG-1)、(ZP_03228176.1;Bacillus coahuilensis m4-4)、(ZP_01173945.1;Bacillus sp. NRRLB-14911)、(NP_693944.1;Oceanobacillus iheyensis HTE831)、(ZP_04314753.1;Bacillus cereus BGSC 6E1)、(YP_014727.1;Listeria monocytogenes str. 4b F2365)、(ZP_04443757.1;Listeria grayi DSM 20601)、(NP_244690.1;Bacillus halodurans C-125)、(YP_177402.1;Bacillus clausii KSM-K16)、(YP_002885816.1;Exiguobacterium sp. AT1b)、(YP_001812721.1;Exiguobacterium sibiricum 255-15)、(ZP_02169346.1;Bacillus selenitireducens MLS10)、(ZP_04818386.1;Staphylococcus epidermidis M23864:W1)、(ZP_03612973.1;Staphylococcus capitis SK14)、(ZP_04677798.1;Staphylococcus wamerei L37603)、(NP_763914.1;Staph

ylococcus epidermidis ATCC 12228)、(ZP_05
 685678.1;Staphylococcus aureus A9635)、(Y
 P_254319.1;Staphylococcus haemolyticus J
 CSC1435)、(ZP_04059818.1;Staphylococcus h
 ominis SK119)、(ABR57177.1;Staphylococcus
 xylosus)、(YP_302214.1;Staphylococcus sa
 prophyticus subsp. saprophyticus ATCC 15
 305)、(YP_002633340.1;Staphylococcus camo
 sus subsp. camosus TM300)、(YP_002561236.
 1;Macroccoccus caseolyticus JCSC5402)、(ZP 10
 _03944466.1;Lactobacillus fermentum ATCC
 14931)、(ZP_05553502.1;Lactobacillus col
 eohominis 101-4-CHN)、(ZP_03959629.1;Lact
 obacillus vaginalis ATCC 49540)、(YP_0012
 71004.1;Lactobacillus reuteri DSM 20016)
 、(ZP_05745668.1;Lactobacillus antri DSM
 16041)、(YP_818931.1;Leuconostoc mesenter
 oides subsp. mesenteroides ATCC 8293)、(Y
 P_001727831.1;Leuconostoc citreum KM20)、
 (ZP_04782044.1;Weissella paramesentero i 20
 des ATCC 33313)、(ZP_01544468.1;Oenococcu
 s oeni ATCC BAA-1163)、(ZP_05737294.1;Gran
 ulicatella adiacens ATCC 49175)、(ZP_0585
 1915.1;Granulicatella elegans ATCC 70063
 3)、(ZP_02183965.1;Camobacterium sp. AT7)、
 (ZP_05649755.1;Enterococcus gallinarum E
 G2)、(ZP_03947918.1;Enterococcus faecalis
 TX0104)、(ZP_03982224.1;Enterococcus fae
 cium TX1330)、(YP_395954.1;Lactobacillus
 sakei subsp. sakei 23K)、(ZP_04449762.1;C 30
 atonella morbi ATCC 51271)、(YP_001032100
 .1;Lactococcus lactis subsp. cremons MG1
 363)、(YP_806234.1;Lactobacillus casei AT
 CC 334)、(NP_784550.1;Lactobacillus plant
 arum WCFS1)、(YP_794848.1;Lactobacillus b
 revis ATCC 367)、(ZP_03954831.1;Lactobaci
 llus hilgardii ATCC 8290)、(BAB19267.1;La
 ctobacillus sanfranciscensis)、(ZP_039582
 88.1;Lactobacillus ruminis ATCC 25644)、(Y
 P_536042.1;Lactobacillus salivarius UCC 40
 118)、(ZP_05747635.1;Erysipelothrix rhusi
 opathiae ATCC 19414)、(YP_803875.1;Pedioc
 occus pentosaceus ATCC 25745)、(ZP_020937
 84.1;Parvimonas micra ATCC 33270)、(YP_001
 692923.1;Finegoldia magna ATCC 29328)、(ZP
 _04431499.1;Bacillus coagulans 36D1)、(ZP
 _04775813.1;Gemella haemolysans ATCC 103
 79)、(YP_001360609.1;Kineococcus radiotol
 erans SRS30216)、(ZP_01115869.1;Reinekea
 blandensis MED297)、(YP_003074238.1;Tered 50

inibac turnterrae T7901)、(YP_958411.1; *Marinobacter quaeolei* VT8)、(YP_435580.1; *Haella chejuensis* KCTC 2396)、(YP_001189125.1; *Pseudomonas mendocina* ymp)、(YP_792443.1; *Pseudomonas aerugmosa* UCBPP-PA14)、(NP_791001.1; *Pseudomonas synngae* pv. *tomato* str. DC3000)、(YP_258069.1; *Pseudomonas fluorescens* Pf-5)、(YP_606637.1; *Pseudomonas entomophila* L48)、(YP_002800579.1; *Azotobacter vinelandii* DJ)、(YP_001171663.1; *Pseudomonas stutzeri* A1501)、(NP_840385.1; *Nitrosomonas europaea* ATCC 19718)、(YP_002801221.1; *Azotobacter vinelandii* DJ)、(YP_002787111.1; *Deinococcus deserti* VCD115)、(YP_603523.1; *Deinococcus geothermalis* DSM 11300)、(NP_293799.1; *Deinococcus radiodurans* R1)、(YP_521550.1; *Rhodoferax ferrireducens* T118)、(YP_530962.1; *Rhodopseudomonas palustris* BisB18)、(YP_531882.1; *Rhodopseudomonas palustris* BisA53)、(ZP_02367347.1; *Burkholderia oklahomensis* C6786)、(YP_428079.1; *Rhodospirillum rubrum* ATCC 11170)、(YP_530535.1; *Rhodopseudomonas palustris* BisB18)、(NP_901200.1; *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472)、(ZP_03698345.1; *Lutella nitroferum* 2002)、(YP_001279250.1; *Psychrobacter* sp. PRwf-1)、(YP_579484.1; *Psychrobacter cryohalolentis* K5)、(ZP_05618978.1; *Enhydrobacter aerosaccus* SK60)、(ZP_05362319.1; *Acinetobacter radiorens* SK82)、(YP_045288.1; *Acinetobacter* sp. ADP1)、(ZP_05823314.1; *Acinetobacter* sp. RUH2624)、(ZP_03824416.1; *Acinetobacter* sp. ATCC 27244)、(YP_001380280.1; *Anaeromyxobacter* sp. Fw109-5)、(YP_466103.1; *Anaeromyxobacter dehalogenans* 2CP-C)、(YP_088190.1; *Mannheimia succiniciproducens* MBE L55E)、(YP_001344949.1; *Actinobacillus succinogenes* 130Z)、(YP_003007411.1; *Aggregatibacter aphrophilus* NJ8700)、(ZP_01788798.1; *Haemophilus influenzae* 3655)、(YP_719012.1; *Haemophilus somnus* 129PT)、(NP_245642.1; *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* str. Pm70)、(ZP_05920444.1; *Pasteurella dagmatis* ATCC 43325)、(ZP_00133992.2; *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 1 str. 4074)、(ZP_04753547.1; *Actinobacillus minor* NM305)、(NP_873873.1; *Haemophilus ducreyi* 35000HP)、(ZP_04978908.1; *Mannheimia haemolytica* PHL213)、(YP_002475022.1; *Haem*

ophilus parasuis SH0165)、(ZP_05730581.1; Pantoea sp. At-9b)、(YP_001907133.1; Erwinia tasmaniensis Et1/99)、(YP_455287.1; Sodalis glossinidius str. 'morsitans')、(ZP_05723922.1; Dickeya dadantii Ech586)、(YP_003258889.1; Pectobacterium wasabiae WPP163)、(YP_002988159.1; Dickeya dadantii Ech703)、(NP_668938.1; Yersinia pestis KIM 10)、(YP_001479543.1; Serratia proteamaculans 568)、(YP_002934098.1; Edwardsiella ictaluri 93-146)、(YP_002151502.1; Proteus mirabilis HI4320)、(NP_930328.1; Photorhabdus luminescens subsp. laumondii TTO1)、(YP_002920553.1; Klebsiella pneumomae NTUH-K2044)、(YP_001177557.1; Enterobacter sp. 638)、(YP_003211286.1; Cronobacter turicensis)、(BAA04663.1; Escherichia coli)、(YP_002924403.1; Candidatus Hamiltonella defensa 5AT (Acyrtosiphon pisum))、(ZP_03827735.1; Pectobacterium carotovorum subsp. brasiliensis PBR1692)、(ZP_01159282.1; Photobacterium sp. SKA34)、(YP_130973.1; Photobacterium profundum SS9)、(ZP_06052481.1; Grimontia hollisae CIP 101886)、(ZP_05877035.1; Vibrio fumiissii CIP 102972)、(ZP_05881960.1; Vibrio metschnikoyii CIP 69.14)、(ZP_05881960.1; Vibrio metschnikoyii CIP 69.1

10

20

30

4)、(ZP_02196748.1; Vibrio sp. および4)、(NP_934927.1; Vibrio vulnificus YJ016)、(ZP_01866446.1; Vibrio shilonii AKI)、(YP_002416612.1; Vibrio splendidus LGP32)、(YP_002263486.1; Alii vibrio salmonicida LFI1238)、(ZP_04415114.1; Vibrio cholerae by. albensis VL426)、(YP_001143125.1; Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida A449)、(YP_002892091.1; Tolumonas auensis DSM 9187)、(ZP_01215350.1; Psychromonas sp. CNPT3)、(YP_944598.1; Psychromonas ingrahamii 37)、(YP_001473443.1; Shewanella sediminis HAW-EB3)、(YP_001761257.1; Shewanella woodyi ATCC 51908)、(YP_001094519.1; Shewanella loihica PV-4)、(YP_001674811.1; Shewanella halifaxensis HAW-EB4)、(YP_869191.1; Shewanella sp. ANA-3)、(YP_927371.1; Shewanella amazonensis SB2B)、(YP_751160.1; Shewanella frigidimarina NCLMB 400)、(YP_563413.1; Shewanella denitrificans OS217)、(YP_001475

40

50

272. 1; *Shewanella sediminis* HAW-EB3)、(YP_001674949. 1; *Shewanella halifaxensis* HAW-EB4)、(ZP_04716660. 1; *Alteromonas macleodii* ATCC 27126)、(YP_662160. 1; *Pseudoalteromonas atlantica* T6c)、(ZP_01612225. 1; *Alteromonadales bacterium* TW-7)、(ZP_01134640. 1; *Pseudoalteromonas tunicate* D2)、(YP_269873. 1; *Colwellia psychrerythrae* a 34H)、(YP_001341167. 1; *Marinomonas* sp. MWYL1)、(ZP_01077352. 1; *Marinomonas* sp. MED121)、(YP_001209362. 1; *Dichelobacter nodosus* VCS1703A)、(ZP_05705193. 1; *Cardiobacterium hominis* ATCC 15826)、(EEY62817. 1; *Phytophthora infestans* T30-4)、(EEY62816. 1; *Phytophthora infestans* T30-4)、(XP_001694504. 1; *Chlamydomonas reinhardtii*)、(XP_001753120. 1; *Physcomitrella patens* subsp. *Patens*)、(YP_001804510. 1; *Cyanothece* sp. ATCC 51142)、(ZP_01729220. 1; *Cyanothece* sp. CCY0110)、(YP_003138337. 1; *Cyanothece* sp. PCC 8802)、(YP_002380034. 1; *Cyanothece* sp. PCC 7424)、(YP_001661110. 1; *Microcystis aeruginosa* NIES-843)、(YP_002485151. 1; *Cyanothece* sp. PCC 7425)、(NP_441027. 1; *Synechocystis* sp. PCC 6803)、(ZP_01061171. 1; *Leeuwenhoekia* *blandensis* MED217)、(YP_001195862. 1; *Flavobacterium johnsoniae* UW101)、(YP_003194927. 1; *Robiginitalea biformata* HTCC2501)、(ZP_01107792. 1; *Flavobacteriales bacterium* HTCC2170)、(ZP_01051731. 1; *Polaribacter* sp. MED152)、(ZP_01119204. 1; *Polaribacter irgensii* 23-P)、(ZP_03390929. 1; *Capnocytophaga sputigena* ATCC 33612)、(YP_003141977. 1; *Capnocytophaga ochracea* DSM 7271)、(YP_012240. 1; *Desulfovibrio vulgaris* str. *Hildenborough*)、(YP_002436276. 1; *Desulfovibrio vulgaris* str. 'Miyazaki F')、(YP_389730. 1; *Desulfovibrio desulfuricans* subsp. *desulfuricans* str. G20)、(YP_002992165. 1; *Desulfovibrio salexigens* DSM 2638)、(YP_003197901. 1; *Desulfohalobium retbaense* DSM 5692)、(YP_003157577. 1; *Desulfomicrobium baculatum* DSM 4028)、(ZP_03737911. 1; *Desulfonatronospira thiodismutans* AS03-1)、(YP_002990332. 1; *Desulfovibrio salexigens* DSM 2638)、(ZP_03312237. 1; *Desulfovibrio piger* ATCC 29098)、(YP_002478890. 1; *Desulfovibrio desulfuricans* subsp. *desulfuricans* str. ATCC 27774)、(YP_064294. 1; *Desulfotalea psychrophila* LSV54)、(YP_594656. 1; *Lawso*

nia intracellularis PHE/MN1-00)、(ZP_0162
 1820.1;Lyngbya sp. PCC 8106)、(ZP_0327289
 9.1;Arthrospira maxima CS-328)、(YP_84559
 6.1;Syntrophobacter fumaroxidans MPOB)、(ZP_04773932.1;Allochro-
 matium vinosum DSM 180)、(NP_869002.1;Rhodopirellula baltic
 a SH 1)、(YP_392571.1;Sulfurimonas denitr
 ificans DSM 1251)、(ZP_05071717.1;Campylo
 bacteriales bacterium GD 1)、(ZP_04421899.
 1;Sulfurospirillum deleyianum DSM 6946)、
 (YP_001359295.1;Sulfurovum sp. NBC37-1)、
 (YP_951544.1;Mycobacterium vanbaalenii P
 YR-1)、(YP_001131488.1;Mycobacterium gilv
 um PYR-GCK)、(YP_637714.1;Mycobacterium s
 p. MCS)、(YP_885188.1;Mycobacterium smegm
 atis str. MC2 155)、(YP_001704953.1;Mycob
 acterium abscessus)、(ZP_04747529.1;Mycob
 acterium kansasii ATCC 12478)、(YP_001849
 024.1;Mycobacterium marinum M)、(NP_21492
 2.1;Mycobacterium tuberculosis H37Rv)、(N
 P_962819.1;Mycobacterium avium subsp. pa
 ratuberculosis K-10)、(ZP_05223872.1;Mycob
 acterium intracellulare ATCC 13950)、(YP
 _002764919.1;Rhodococcus erythropolis PR
 4)、(YP_702162.1;Rhodococcus jostii RHA1)
 、(YP_121562.1;Nocardia farcinica IFM 101
 52)、(ZP_04025361.1;Tsukamurella pauromet
 abola DSM 20162)、(YP_003275431.1;Gordon
 ia bronchialis DSM 43247)、(YP_003160610.1
 ;Jonesia denitrificans DSM 20603)、(ZP_05
 816650.1;Sanguibacter keddiei DSM 10542
)、(ZP_04368027.1;Cellulomonas flavigena
 DSM 20109)、(YP_002883054.1;Beutenbergia
 cavemae DSM 12333)、(ZP_03911481.1;Xylani
 monas cellulolytica DSM 15894)、(YP_924
 143.1;Nocardiooides sp. 1S614)、(ZP_0386478
 9.1;Kribbella flavida DSM 17836)、(ZP_011
 31057.1;marine actinobacterium PHSC20C1)
 、(YP_001708941.1;Clavibacter michiganens
 is subsp. Sepedonicus)、(YP_061462.1;Leif
 sonia xyli subsp. xyli str. CTCB07)、(YP_
 748183.1;Nitrosomonas eutropha C91)、(YP_
 003116892.1;Catenulispora acidiphila DSM
 44928)、(YP_003199983.1;Nakamurella muit
 ipartita DSM 44233)、(YP_003154321.1;Brac
 hybacterium faecium DSM 4810)、(ZP_039274
 92.1;Actinomyces urogenitalis DSM 15434)
 、(YP_003148931.1;Kytococcus sedentarius
 DSM 20547)、(ZP_05803950.1;Streptomyces f
 lavogriseus ATCC 33331)、(YP_001823623.1;

Streptomyces griseus subsp. *griseus* NBRC 13350)、(ZP_05002693. 1; *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064)、(ZP_05015493. 1; *Streptomyces svinceus* ATCC 29083)、(ZP_05538660. 1; *Streptomyces griseoflavus* Tu4000)、(ZP_04685789. 1; *Streptomyces ghanaensis* ATCC 14672)、(ZP_05534308. 1; *Streptomyces viridochromogenes* DSM 40736)、(ZP_05523554. 1; ;

10

Streptomyces lividans TK24)、(NP_823999. 1; *Streptomyces avermitilis* MA-4680)、(CBG69921. 1; *Streptomyces scabiei* 87. 22)、(ZP_04704905. 1; *Streptomyces albus* 11074)、(ZP_04997745. 1; *Streptomyces* sp. Mg1)、(ZP_05509147. 1; *Streptomyces* sp. C)、(ZP_05514718. 1; *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 53653)、(ZP_04994290. 1; *Streptomyces* sp. SPB74)、(ZP_04474082. 1; *Streptosporangium roseum* DSM 43021)、(YP_001160501. 1; *Salinispora tropica* CNB-440)、(YP_001538853. 1; *Salinispora arenicola* CNS-205)、(ZP_04605575. 1; *Micromonospora* sp. ATCC 39149)、(YP_832716. 1; *Arthrobacter* sp. FB24)、(ABR13603. 1; *Arthrobacter oxydans*)、(YP_002956296. 1; *Micrococcus luteus* NCTC 2665)、(ZP_05367249. 1; *Rothia mucilaginosa* ATCC 25296)、(YP_001854004. 1; *Kocuria rhizophila* DC2201)、(ZP_04984463. 1; *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* FSC022)、(YP_001677422. 1; *Francisella philomiragia* subsp. *philomiragia* ATCC 25017)、(YP_588827. 1; *Baumannia cicadellinicola* str. Hc (Homalodisca oagulata))、(NP_240007. 1; *Buchnera aphidicola* str. APS (Acyrtosiphon pisum))、(ZP_05057494. 1; *Verrucomicrobiae bacterium* DG1235)、(ZP_02930252. 1; *Verrucomicrobium spinosum* DSM 4136)、(ZP_01452386. 1; *Mariprofundus ferrooxydans* PV-1)、および (ZP_01307392. 1; *Bermanella marisrubri*) が挙げられる。

20

30

40

【0059】

本明細書で提供される組成物および方法において同様に有用なホスホトランスアセチラーゼとしては、本明細書に記載のホスホトランスアセチラーゼのいずれかの「誘導体」といわれる分子が挙げられる。このような「誘導体」は以下の特性を有する：(1) 本明細書に記載のホスホトランスアセチラーゼのいずれかと実質的な相同性を共有し、かつ、(2) アセチルホスフェートからアセチルCoAへの変換を触媒することができる。ホスホトランスアセチラーゼの誘導体は、誘導体のアミノ酸配列がホスホトランスアセチラーゼのアミノ酸配列と少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%同じであれば、ホスホトランスアセチラーゼと「実質的な相同性」を共

50

有するといえる。

【0060】

5. 4 アセチルホスファターゼ活性の機能的破壊

一部の実施形態では、本明細書で提供される遺伝子改変宿主細胞は、アセチルホスフェートをアセテートに変換する酵素的機能の破壊を含む。一部の実施形態では、酵素は宿主細胞のネイティブなものである。

【0061】

一部の実施形態では、アセチルホスフェートをアセテートに変換する酵素はグリセロール-1-ホスファターゼ (EC 3. 1. 3. 21) である。一部の実施形態では、グリセロール-1-ホスファターゼ活性を有する酵素は、RHR2 (GPP1/RHR2; 系統名: YIL053W)、またはそのホモログもしくはバリエーションである。GPP1/RHR2は、グリセロール生合成に関与する構成的に発現されるグリセロール-1-ホスファターゼであり、嫌気ストレスおよび浸透ストレスの両方に応答して誘導される。例えば、それぞれその内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、Norbeckら、J Biol Chem 271巻(23号): 13875~13881頁(1996年); Norbeckら、J Biol Chem 272巻(9号): 13875~13881頁(1996年); Pahlmanら、J Biol Chem 276巻(5号): 3555~3563頁(2001年); NevoigtおよびStahl、FEMS Microbiol Rev 21巻(3号): 231~41頁(1997年); ByrneおよびWolf、Genome Res 15巻(10号): 1456~61頁、およびHirayamaら、Mol Gen Genet 249巻(2号): 127~38頁を参照されたい。S. cerevisiaeのGPP1/RHR2遺伝子の配列は以前に記載されている。例えば、Norbeckら、J Biol Chem 271巻(23号): 13875~13881頁(1996年)、およびPahlmanら、J Biol Chem 276巻(5号): 3555~3563頁(2001年)を参照されたい。Gpp1/Rhr2により以下の反応が触媒されることが以前に記載されている:

グリセロール-1-ホスフェート + H₂O ⇌ グリセロール + ホスフェート

代表的なSaccharomyces cerevisiaeのGPP1/RHR2ヌクレオチド配列としては、受託番号NM_001179403. 1、および本明細書で提供される配列番号5が挙げられる。代表的なSaccharomyces cerevisiaeのGpp1/Rhr2タンパク質配列としては、受託番号NP_012211、および本明細書で提供される配列番号6が挙げられる。

【0062】

同じくアセチルホスフェートのアセテートへの加水分解を触媒するGPP1/RHR2の密接に関連するホモログはHOR2 (GPP2/HOR2; 系統名: YER062C) である。Gpp2/Hor2も同様に、以下の反応を触媒することができるグリセロール-1-ホスファターゼであることが以前に記載されている: グリセロール-1-ホスフェート + H₂O ⇌ グリセロール + ホスフェート。したがって、GPP2/HOR2の機能的破壊も同様に本明細書で提供される組成物および方法に使用される。S. cerevisiaeのGPP2/HOR2遺伝子の配列は以前に記載されている。例えば、Norbeckら、J. of Biological Chemistry 271巻(23号): 13875~13881頁(1996年)、およびPahlmanら、J. of Biological Chemistry 276巻(5号): 3555~3563頁(2001年)を参照されたい。代表的なSaccharomyces cerevisiaeのGPP2/HOR2ヌクレオチド配列としては、受託番号NM_001178953. 3、および本明細書で提供される配列番号7が挙げられる。代表的なSaccharomyces cerevisiaeのGpp1/Rhr2タンパク質配列としては、受託番号NP_010984、および本明細書で提供される配列番号8が挙げられる。

【0063】

当技術分野で理解される通り、S. cerevisiae以外の酵母に天然に存在する

G P P 1 / R H R 2 および / または G P P 2 / H O R 2 のホモログも同様に本明細書に記載の方法を使用して失活させることができる。さらに、アセチルホスファターゼ活性をコードするポリヌクレオチド、遺伝子および / またはポリペプチド（例えば、R H R 2 および / または H O R 2）を、他のポリヌクレオチド、遺伝子および / もしくはポリペプチド配列を同定するため、または他の宿主細胞におけるアセチルホスファターゼ活性を有するホモログを同定するために使用することができる。このような配列は、例えば、文献においておよび / または当業者に周知のバイオインフォマティクスデータベースにおいて同定することができる。例えば、他の細胞型におけるアセチルホスファターゼ活性をコードする配列のバイオインフォマティクスを使用した同定は、本明細書で提供されるものなどのアセチルホスファターゼ活性および / またはグリセロール 1 - ホスファターゼ活性をコードする公知の DNA 配列およびポリペプチド配列を伴う公的に利用可能なデータベースの B L A S T（上記）検索によって実現することができる。同一性は、初期状態のパラメータ、ギャップペナルティ（G A P P E N A L T Y）= 10、ギャップ長ペナルティ（G A P L E N G T H P E N A L T Y）= 0.1、およびタンパク質重み行列の G o n n e t 250 シリーズを使用したアラインメントの C l u s t a l W 法に基づいたものであってよい。

10

【0064】

一部の実施形態では、アセチルホスフェートをアセテートに変換する内因性酵素（例えば、R H R 2 または H O R 2）の活性または発現が少なくとも約 50% 低下する。別の実施形態では、アセチルホスフェートをアセテートに変換する内因性酵素の活性または発現が、アセチルホスフェートをアセテートに変換する内因性酵素の活性または発現の低下または欠失を含まない組換え微生物と比較して少なくとも約 60%、少なくとも約 65%、少なくとも約 70%、少なくとも約 75%、少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、または少なくとも約 99% 低下する。一部の実施形態では、アセチルホスフェートをアセテートに変換する内因性酵素は R H R 2 またはその相同体である。一部の実施形態では、アセチルホスフェートをアセテートに変換する内因性酵素は H O R 2 またはその相同体である。

20

【0065】

当業者に理解される通り、これだけに限定されないが、調節型プロモーターの使用、弱い構成的プロモーターの使用、二倍体酵母におけるタンパク質をコードする遺伝子の 2 つのコピーのうちの 1 つの破壊、二倍体酵母における遺伝子の両方のコピーの破壊、アンチセンス核酸の発現、s i R N A の発現、内因性プロモーターの負の調節因子の過剰発現、内因性遺伝子もしくは異種遺伝子の活性の変更、特異的活性が低い異種遺伝子の使用など、またはこれらの組合せを含めた、グリセロール 1 - ホスファターゼ（例えば、R H R 2 および / または H O R 2）などのアセチルホスフェートをアセテートに変換するタンパク質の活性を低下させるまたは破壊するために利用可能ないくつかの機構が存在する。

30

【0066】

一部の実施形態では、遺伝子改変宿主細胞は、アセチルホスファターゼ活性（例えば、R H R 2、H O R 2 またはそのホモログもしくはバリエント）をコードする少なくとも 1 種の遺伝子の変異を含み、それにより、前記遺伝子によりコードされるポリペプチドの活性の低下がもたらされる。別の実施形態では、遺伝子改変宿主細胞は、アセチルホスファターゼ活性をコードする遺伝子（例えば、R H R 2、H O R 2 またはそのホモログもしくはバリエント）の部分的な欠失を含み、それにより、遺伝子によりコードされるポリペプチドの活性の低下がもたらされる。別の実施形態では、遺伝子改変宿主細胞は、アセチルホスファターゼ活性をコードする遺伝子（例えば、R H R 2、H O R 2 またはそのホモログもしくはバリエント）の完全な欠失を含み、それにより、遺伝子によりコードされるポリペプチドの活性の低下がもたらされる。さらに別の実施形態では、遺伝子改変宿主細胞は、アセチルホスファターゼ活性をコードする遺伝子（例えば、R H R 2、H O R 2 またはそのホモログもしくはバリエント）に付随する調節領域の改変を含み、それにより、前記遺伝子によりコードされるポリペプチドの発現の低下がもたらされる。さらに

40

50

別の実施形態では、遺伝子改変宿主細胞は、転写調節因子の改変を含み、それにより、アセチルホスファターゼ活性をコードする遺伝子（例えば、RHR2、HOR2またはそのホモログもしくはバリエーション）の転写の低下がもたらされる。

【0067】

一部の実施形態では、アセチルホスフェートからアセテートへの変換を触媒することができるタンパク質をコードする1種または複数種の遺伝子の破壊は、微生物細胞に構築物が導入されると、このような遺伝子（例えば、RHR2またはHOR2）を特異的に破壊し、それにより、破壊された遺伝子を非機能的にすることができる「破壊構築物」を使用することによって実現される。一部の実施形態では、標的遺伝子の破壊により、機能的タンパク質の発現が妨げられる。一部の実施形態では、標的遺伝子の破壊により、破壊された遺伝子から非機能的タンパク質が発現される。一部の実施形態では、アセチルホスフェートをアセテートに変換することができるタンパク質をコードする遺伝子の破壊は、「破壊性配列」を相同組換えにより標的遺伝子座に組み込むことによって実現される。このような実施形態では、破壊構築物は、標的遺伝子座のヌクレオチド配列の対と相同なヌクレオチド配列の対（相同配列）で挟まれた破壊性配列を含む。標的遺伝子の標的部分を破壊構築物で置き換えると、破壊性配列により、標的遺伝子からの機能的タンパク質の発現が妨げられるまたは非機能的タンパク質の発現が引き起こされる。

【0068】

遺伝子を破壊することができる破壊構築物は、当技術分野で周知の標準の分子生物学技法を使用して構築することができる。例えば、Sambrookら、2001年、Molecular Cloning — A Laboratory Manual、第3版、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、NY、およびAusubelら編、現行版、Current Protocols in Molecular Biology、Greene Publishing Associates and Wiley Interscience、NYを参照されたい。本方法の実施において変動し得る破壊構築物のパラメータとしては、これだけに限定されないが、相同配列の長さ；相同配列のヌクレオチド配列；破壊性配列の長さ；破壊性配列のヌクレオチド配列、および標的遺伝子のヌクレオチド配列が挙げられる。一部の実施形態では、各相同配列の長さの有効な範囲は50～5,000塩基対である。特定の実施形態では、各相同配列の長さは約500塩基対である。遺伝子ターゲティングのために必要な相同性の長さの考察に関しては、Hastyら、Mol Cell Biol 11巻：5586～91頁（1991年）を参照されたい。一部の実施形態では、相同配列は標的遺伝子のコード配列を含む。他の実施形態では、相同配列は標的遺伝子の上流または下流の配列を含む。一部の実施形態では、1つの相同配列は標的遺伝子のコード配列の5'側に位置するヌクレオチド配列と相同なヌクレオチド配列を含み、他の相同配列は標的遺伝子のコード配列の3'側に位置するヌクレオチド配列と相同なヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、破壊性配列は、破壊性配列を含む微生物細胞の選択を可能にする選択マーカーをコードするヌクレオチド配列を含む。したがって、このような実施形態では、破壊構築物は、二重の機能、すなわち、標的遺伝子を機能的に破壊する機能と、標的遺伝子が機能的に破壊された細胞を同定するための選択マーカーをもたらし機能を有する。一部の実施形態では、標的遺伝子によりコードされる野生型タンパク質のある程度の活性を有する融合タンパク質が生じ得る翻訳リードスルーを防止するために、終結コドン、選択マーカーをコードするヌクレオチド配列の下流にインフレームで配置する。一部の実施形態では、破壊性配列の長さは一塩基対である。コード配列に単一の塩基対を挿入することにより、機能的タンパク質の発現が妨げられ得るフレームシフト変異が構成され得るので、標的遺伝子を破壊するためには単一の塩基対の挿入で十分であり得る。一部の実施形態では、破壊配列の配列は、相同配列間に位置する標的遺伝子のヌクレオチド配列とは単一の塩基対が異なる。標的遺伝子内のヌクレオチド配列を破壊性配列で置き換えると、導入される単一の塩基対の置換により、タンパク質内の重要な部位における単一のアミノ酸の置換および非機能的タンパク質の発現がもたらされ得る

10

20

30

40

50

。しかし、非常に短い破壊性配列を使用して実施された破壊は自然突然変異によって野生型配列に戻りしやすく、したがって、宿主株にアセチルホスファターゼ機能の回復をもたらされることが理解されるべきである。したがって、特定の実施形態では、破壊性配列は一塩基対～数塩基対よりも長い。反対の極端な場合では、過剰な長さの破壊性配列では中程度の長さの破壊性配列に対していかなる利点も付与される見込みがなく、トランスフェクションまたはターゲティングの効率が低下する可能性がある。この場合の過剰な長さとは、標的遺伝子内の選択された相同配列間の距離よりも何倍もの長さである。したがって、ある特定の実施形態では、破壊性配列の長さは2～2,000塩基対であり得る。他の実施形態では、破壊性配列の長さは、破壊構築物内の相同配列とマッチする標的遺伝子座の領域間の距離とほぼ同等の長さである。

10

【0069】

一部の実施形態では、破壊構築物は直鎖DNA分子である。他の実施形態では、破壊構築物は環状DNA分子である。一部の実施形態では、環状破壊構築物は、上記の通り破壊性配列によって隔てられた相同配列の対を含む。一部の実施形態では、環状破壊構築物は単一の相同配列を含む。このような環状破壊構築物は、標的遺伝子座に組み込まれると、直線になり、相同配列の一部が各末端に位置し、標的遺伝子ヌクレオチド配列のいずれも置き換えることなく、破壊構築物の残りのセグメントが標的遺伝子に挿入され、それを破壊する。特定の実施形態では、環状破壊構築物の単一の相同配列は標的遺伝子のコード配列内に位置する配列と相同である。

【0070】

20

破壊構築物は、それだけに限定することなく当業者に公知の任意の方法によって微生物細胞に導入することができる。このような方法としては、これだけに限定されないが、細胞による溶液からの分子の直接取り込み、または、例えばリポソームもしくは免疫リポソーム (immunoliposome) を使用したリポフェクションにより容易にした取り込み；粒子媒介性トランスフェクションなどが挙げられる。例えば、米国特許第5,272,065号；Goeddelら編、1990年、Methods in Enzymology、185巻、Academic Press, Inc., CA；Kriegler、1990年、Gene Transfer and Expression — A Laboratory Manual、Stockton Press、NY；Sambrookら、1989年、Molecular Cloning — A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、NY、およびAusubelら編、現行版、Current Protocols in Molecular Biology、Greene Publishing Associates and Wiley Interscience、NYを参照されたい。酵母細胞を形質転換するための特定の方法は当技術分野で周知である。Hinnenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75巻：1292～3頁（1978年）；Creggら、Mol. Cell. Biol. 5巻：3376～3385頁（1985年）を参照されたい。例示的な技法としては、これだけに限定されないが、スフェロプラスト法、電気穿孔、PEG1000媒介性形質転換、および酢酸リチウムまたは塩化リチウム媒介性形質転換が挙げられる。

30

40

【0071】

5.5 アセチルCoA産生を改善するためのさらなる改変

5.5.1 ADA

一部の実施形態では、本明細書で提供される遺伝子改変宿主細胞は、アシル化アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ（あるいは「アセチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ、アセチル化」、「アセチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ、アシル化」、またはADAと称される（EC1.2.1.10））をコードする1種または複数種の異種ヌクレオチド配列をさらに含む。

【0072】

本明細書で提供される組成物および方法に有用な、この反応を触媒することができるタ

50

ンパク質としては、以下の4種のタンパク質が挙げられる：

(1) アセチルCoAからアセトアルデヒドへの可逆的な変換、およびその後のアセトアルデヒドからエタノールへの可逆的な変換を触媒する二機能性タンパク質。この種類のタンパク質の例は、*E. coli*におけるAdhEタンパク質(Gen Bank No: NP_415757)である。AdhEは、遺伝子融合の進化的な産物であると思われる。AdhEタンパク質のNH₂末端領域はアルデヒド:NAD⁺オキシドレダクターゼと高度に相同であり、COOH末端領域はFe²⁺依存性エタノール:NAD⁺オキシドレダクターゼのファミリーと相同である(Membrillo-Hernandezら、(2000年) J. Biol. Chem. 275巻: 33869~33875頁)。*E. coli* AdhEは金属に触媒される酸化を受け、したがって、酸素感受性である(Tamaritら(1998年) J. Biol. Chem. 273巻: 3027~32頁)。

10

【0073】

(2) 厳密にまたは通性の嫌気性微生物におけるアセチルCoAからアセトアルデヒドへの可逆的な変換を触媒するが、アルコール脱水素酵素活性を有さないタンパク質。この種類のタンパク質の例は、*Clostridium kluyveri*において報告されている(Smithら(1980年) Arch. Biochem. Biophys. 203巻: 663~675頁)。

ADAは*Clostridium kluyveri* DSM 555 (受託番号: EDK33116)のゲノム内にアノテートされている。相同なタンパク質AcdHが*Lactobacillus plantarum*のゲノムにおいて同定される(受託番号: NP_784141)。この種類のタンパク質の別の例は*Clostridium beijerinckii* NRRL B593におけるald遺伝子産物である(Tothら(1999年) Appl. Environ. Microbiol. 65巻: 4973~4980頁、受託番号: AAD31841)。

20

【0074】

(3) エタノールアミン異化に関与するタンパク質。エタノールアミンは、炭素源と窒素源の両方として多くの腸内細菌により利用され得る(Stojiljkovicら(1995年) J. Bacteriol. 177巻: 1357~1366頁)。エタノールアミンは、まずエタノールアミンアンモニアリアーゼによってアンモニアおよびアセトアルデヒドに変換され、その後、アセトアルデヒドがADAによってアセチルCoAに変換される。この種類のADAの例は*Salmonella typhimurium*におけるEutEタンパク質である(Stojiljkovicら(1995年) J. Bacteriol. 177巻: 1357~1366頁、受託番号: AAL21357; U18560. 1も参照されたい)。*E. coli*もエタノールアミンを利用することができ(Scarlettら(1976年) J. Gen. Microbiol. 95巻: 173~176頁)、*S. typhimurium*におけるEutEタンパク質と相同なEutEタンパク質(受託番号: AAG57564; EU897722. 1も参照されたい)を有する。

30

【0075】

(4) 4-ヒドロキシ-2-ケトバレレート異化に関与する二機能性アルドラーゼ-デヒドロゲナーゼ複合体の一部であるタンパク質。このような二機能性酵素により、多くの細菌種におけるフェノール、トルエート、ナフタレン、ビフェニルおよび他の芳香族化合物の分解の中間体であるカテコールに対するメタ開裂経路の最終的な2つのステップが触媒される(PowlowskiおよびShingler(1994年) Biodegradation 5巻: 219~236頁)。4-ヒドロキシ-2-ケトバレレートは、まず、4-ヒドロキシ-2-ケトバレレートアルドラーゼによってピルビン酸およびアセトアルデヒドに変換され、その後、アセトアルデヒドがADAによってアセチルCoAに変換される。この種類のADAの例は*Pseudomonas* sp CF600におけるDmpFタンパク質(受託番号: CAA43226)である(Shinglerら(1992年) J. Bacteriol. 174巻: 711~24頁)。*E. coli*は、

40

50

Pseudomonas sp. CF600におけるDmpFタンパク質と相同なMphFタンパク質を有する (Fernandezら (1997年) J. Bacteriol. 179巻: 2573~2581頁、受託番号: NP_414885)。

【0076】

一部の実施形態では、本明細書に記載の組成物および方法に有用なADA (またはこのような活性をコードする核酸配列) は、その内容全体が参照により組み込まれる国際公開第WO2009/013159号に記載の*Escherichia coli* adhE、*Entamoeba histolytica* adh2、*Staphylococcus aureus* adhE、*Piromyces* sp. E2 adhE、*Clostridium kluyveri* (EDK33116)、*Lactobacillus plantarum* acdH、および*Pseudomonas putida* (YP001268189) からなる群から選択される。一部の実施形態では、ADAは、*Clostridium botulinum* eutE (FR745875. 1)、*Desulfotalea psychrophila* eutE (CR522870. 1)、*Acinetobacter* sp. HBS-2 eutE (ABQ44511. 2)、*Caldithrix abyssi* eutE (ZP_09549576)、および*Halorubrum lacusprofundi* ATCC 49239 (YP_002565337. 1) からなる群から選択される。

【0077】

特定の実施形態では、本明細書で提供される組成物および方法に有用なADAは、*Dickeya zeae*由来のeutEである。代表的な*Dickeya zeae*のeutEヌクレオチド配列としては、受託番号NC_012912. 1: 1110476... 1111855、および本明細書で提供される配列番号9が挙げられる。代表的な*Dickeya zeae*のeutEタンパク質配列としては、受託番号YP_003003316、および本明細書で提供される配列番号10が挙げられる。

【0078】

本明細書で提供される組成物および方法において同様に有用なADAとしては、本明細書に記載のADAのいずれかの「誘導体」といわれる分子が挙げられる。このような「誘導体」は以下の特性を有する: (1) 本明細書に記載のADAのいずれかと実質的な相同性を共有する、および (2) アセトアルデヒドからアセチルCoAへの変換を触媒することができる。ADAの誘導体は、誘導体のアミノ酸配列が本明細書に記載のADAのいずれかのアミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%同じであれば、ADAと「実質的な相同性」を共有するといえる。

【0079】

5. 5. 2 PDH-バイパスの機能的破壊

アセチルCoAは、ミトコンドリアにおいてPDH複合体により触媒されるピルビン酸の酸化的脱カルボキシル化によって形成され得る。しかし、*S. cerevisiae*はアセチルCoAをミトコンドリアの外に輸送することができないので、PDHバイパスは、細胞質ゾル区画内にアセチルCoAをもたらすことにおいて重要な役割を果たし、ピルビン酸をアセチルCoAに変換するためのPDH反応に対する代替の経路をもたらす。PDHバイパスには、酵素であるピルビン酸デカルボキシラーゼ (PDC; EC 4. 1. 1. 1)、アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ (ACDH; EC 1. 2. 1. 5およびEC 1. 2. 1. 4)、およびアセチルCoAシンテターゼ (ACS; EC 6. 2. 1. 1) が関与する。ピルビン酸デカルボキシラーゼにより、ピルビン酸からアセトアルデヒドおよび二酸化炭素への脱カルボキシル化が触媒される。アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼにより、アセトアルデヒドが酢酸に酸化される。*S. cerevisiae*では、アルデヒドデヒドロゲナーゼのファミリーは5種のメンバーを含有する。ALD2 (YMR170c)、ALD3 (YMR169c)、およびALD6 (YPL061w) は細胞質ゾル内アイソフォームに対応し、ALD4 (YOR374w) およびALD5 (YER073

w) はミトコンドリア内の酵素をコードする。主要な細胞質ゾル内アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼアイソフォームは、A L D 6によりコードされる。アセテートからのアセチルC o Aの形成はA C Sにより触媒され、A T Pの加水分解を伴う。A C Sは2つの構造遺伝子、A C S 1およびA C S 2によりコードされる。

【0080】

一部の実施形態では、本明細書で提供される遺伝子改変宿主細胞は、P D H-バイパス経路の1種または複数種の遺伝子の機能的破壊をさらに含む。一部の実施形態では、宿主細胞のP D H-バイパスの1種または複数種の遺伝子の破壊により、以下の反応のうちの1つまたは複数を触媒する能力が損なわれた遺伝子改変微生物細胞が生じる：(1) ピルビン酸デカルボキシラーゼによるピルビン酸からアセトアルデヒドへの脱カルボキシル化；(2) アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼによるアセトアルデヒドからアセテートへの変換、および(3) アセチルC o AシンテターゼによるアセテートおよびC o AからのアセチルC o Aの合成。

10

【0081】

一部の実施形態では、親細胞と比較して、宿主細胞はP D H-バイパス経路の1種または複数種の遺伝子の機能的破壊を含み、機能が低下したまたは非機能的P D H-バイパス経路の単独で、または弱いA D Aと組み合わせた活性は、宿主細胞の成長、生存能力、および／または健康を支持するために十分でない。

【0082】

一部の実施形態では、P D H-バイパスの1種または複数種の内因性タンパク質の活性または発現が少なくとも約50%低下する。別の実施形態では、P D H-バイパスの1種または複数種の内因性タンパク質の活性または発現が、P D H-バイパスの1種または複数種の内因性タンパク質の活性または発現の低下または欠失を含まない組換え微生物と比較して少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、または少なくとも約99%低下する。

20

【0083】

5. 5. 2. 1 A L D 4およびA L D 6

一部の実施形態では、宿主細胞におけるアルデヒドデヒドロゲナーゼ(A C D H)活性をコードする1種または複数種の遺伝子を機能的に破壊する。一部の実施形態では、アルデヒドデヒドロゲナーゼは、A L D 2、A L D 3、A L D 4、A L D 5、A L D 6、ならびにそのホモログおよびバリエーションからなる群から選択される遺伝子によりコードされる。

30

【0084】

一部の実施形態では、遺伝子改変宿主細胞は、A L D 4の機能的破壊を含む。代表的な*Saccharomyces cerevisiae*のA L D 4ヌクレオチド配列としては、受託番号NM_001183794、および本明細書で提供される配列番号11が挙げられる。代表的な*Saccharomyces cerevisiae*のA l d 4タンパク質配列としては、受託番号NP_015019.1、および本明細書で提供される配列番号12が挙げられる。

40

【0085】

一部の実施形態では、遺伝子改変宿主細胞は、細胞質ゾル内アルデヒドデヒドロゲナーゼ(A L D 6)の機能的破壊を含む。A l d 6 pは、ネイティブなP D H-バイパスにおいて、アセトアルデヒドがアセテートに変換されるように機能する。代表的な*Saccharomyces cerevisiae*のA L D 6ヌクレオチド配列としては、受託番号SCU56604、および本明細書で提供される配列番号13が挙げられる。代表的な*Saccharomyces cerevisiae*のA l d 6タンパク質配列としては、受託番号A A B 0 1 2 1 9、および本明細書で提供される配列番号14が挙げられる。

【0086】

当技術分野において理解される通り、*S. cerevisiae*以外の酵母に天然に存

50

在するアルデヒドデヒドロゲナーゼのホモログも同様に本明細書に記載の方法を使用して失活させることができる。

【0087】

当業者には理解される通り、2種以上のアルデヒドデヒドロゲナーゼの活性または発現を低下させるまたは排除することができる。具体的な一実施形態では、ALD4およびALD6またはそのホモログもしくはバリエーションの活性または発現を低下させるまたは排除する。別の具体的な実施形態では、ALD5およびALD6またはそのホモログもしくはバリエーションの活性または発現を低下させるまたは排除する。さらに別の具体的な実施形態では、ALD4、ALD5、およびALD6またはそのホモログもしくはバリエーションの活性または発現を低下させるまたは排除する。さらに別の具体的な実施形態では、細胞質ゾルに局在するアルデヒドデヒドロゲナーゼ ALD2、ALD3、およびALD6またはそのホモログもしくはバリエーションの活性または発現を低下させるまたは排除する。さらに別の具体的な実施形態では、ミトコンドリアに局在するアルデヒドデヒドロゲナーゼ、ALD4およびALD5またはそのホモログもしくはバリエーションの活性または発現を低下させるまたは排除する。

10

【0088】

5.5.2.2 ACS1およびACS2

一部の実施形態では、宿主細胞におけるアセチルCoAシンテターゼ(ACS)活性をコードする1種または複数種の遺伝子を機能的に破壊する。一部の実施形態では、アセチルCoAシンテターゼは、ACS1、ACS2、ならびにそのホモログおよびバリエーションからなる群から選択される遺伝子によりコードされる。

20

【0089】

一部の実施形態では、宿主細胞におけるアセチルCoAシンテターゼ(ACS)活性をコードする1種または複数種の遺伝子を機能的に破壊する。ACS1およびACS2はどちらもアセテートをアセチルCoAに変換することができるアセチルCoAシンテターゼである。ACS1は呼吸性条件下でのみ発現され、ACS2は構成的に発現される。ACS2をノックアウトすると、株は呼吸性条件(例えば、エタノール、グリセロール、またはアセテート培地)では成長することができるが、発酵性炭素源(例えば、スクロース、グルコース)では死滅する。

【0090】

一部の実施形態では、遺伝子改変宿主細胞は、ACS1の機能的破壊を含む。*S. cerevisiae*のACS1遺伝子の配列は以前に記載されている。例えば、Nagaura, Gene 37巻(1~3号):247~253頁(1985年)を参照されたい。代表的な*Saccharomyces cerevisiae*のACS1ヌクレオチド配列としては、受託番号X66425、および本明細書で提供される配列番号15が挙げられる。代表的な*Saccharomyces cerevisiae*のAcs1タンパク質配列としては、受託番号AAC04979、および本明細書で提供される配列番号16が挙げられる。

30

【0091】

一部の実施形態では、遺伝子改変宿主細胞は、ACS2の機能的破壊を含む。*S. cerevisiae*のACS2遺伝子の配列は以前に記載されている。例えば、Van den Berg, Eur. J. Biochem. 231巻(3号):704~713頁(1995年)を参照されたい。代表的な*Saccharomyces cerevisiae*のACS2ヌクレオチド配列としては、受託番号S79456、および本明細書で提供される配列番号17が挙げられる。代表的な*Saccharomyces cerevisiae*のAcs2タンパク質配列としては、受託番号CAA97725、および本明細書で提供される配列番号18が挙げられる。

40

【0092】

当技術分野において理解される通り、*S. cerevisiae*以外の酵母に天然に存在するアセチルCoAシンテターゼのホモログも同様に本明細書に記載の方法を使用して

50

失活させることができる。

【0093】

一部の実施形態では、宿主細胞は、呼吸性条件下で（すなわち、宿主細胞を例えばエタノール、グリセロール、またはアセテートの存在下で成長させた場合に）アセテートをアセチルCoAに変換することができる細胞質ゾル内アセチルCoAシンテターゼ活性を含む。一部のこのような実施形態では、宿主細胞はACS1活性を含む酵母細胞である。他の実施形態では、親細胞と比較して、宿主細胞は、呼吸性条件下では内因性アセチルCoAシンテターゼ活性を含まない、またはそれが低下している。一部のこのような実施形態では、宿主細胞は、親細胞と比較してACS1活性を含まない、またはそれが低下している酵母細胞である。

10

【0094】

一部の実施形態では、宿主細胞は、非呼吸性条件下で（すなわち、宿主細胞を発酵性炭素源（例えば、スクロース、グルコース）の存在下で成長させた場合に）アセテートをアセチルCoAに変換することができる細胞質ゾル内アセチルCoAシンテターゼ活性を含む。一部のこのような実施形態では、宿主細胞はACS2活性を含む酵母細胞である。他の実施形態では、親細胞と比較して、宿主細胞は、非呼吸性条件下で内因性アセチルCoAシンテターゼ活性を含まない、またはそれが低下している。一部のこのような実施形態では、宿主細胞は、親細胞と比較して、ACS2活性を含まない、またはそれが低下している酵母細胞である。

【0095】

20

一部の実施形態では、宿主細胞は、異種PKおよび細胞質ゾル内アセチルCoAシンテターゼ活性（例えば、ACS1および／またはACS2）を含む。このような実施形態では、宿主細胞においてPKによりアセチルホスフェートが産生される。インタクトな細胞質ゾル内ACS活性により、RHR2および／またはHOR2により触媒されるアセチルホスフェートのアセチルCoAへの加水分解の結果として蓄積するアセテートが変換され得る。

【0096】

5. 6 イソプレノイド産生のためのMEV経路

一部の実施形態では、本明細書で提供される遺伝子改変宿主細胞は、MEV経路の1種または複数種の異種酵素を含む。一部の実施形態では、MEV経路の1種または複数種の酵素は、アセチルCoAとマロニルCoAを縮合させてアセトアセチルCoAを形成する酵素を含む。一部の実施形態では、MEV経路の1種または複数種の酵素は、2分子のアセチルCoAを縮合させてアセトアセチルCoAを形成する酵素を含む。一部の実施形態では、MEV経路の1種または複数種の酵素は、アセトアセチルCoAとアセチルCoAを縮合させてHMG-CoAを形成する酵素を含む。一部の実施形態では、MEV経路の1種または複数種の酵素は、HMG-CoAをメバロネートに変換する酵素を含む。一部の実施形態では、MEV経路の1種または複数種の酵素は、メバロネートをメバロネート5-ホスフェートにリン酸化する酵素を含む。一部の実施形態では、MEV経路の1種または複数種の酵素は、メバロネート5-ホスフェートをメバロネート5-ピロホスフェートに変換する酵素を含む。一部の実施形態では、MEV経路の1種または複数種の酵素は、メバロネート5-ピロホスフェートをイソペンテニルピロホスフェートに変換する酵素を含む。

30

40

【0097】

一部の実施形態では、MEV経路の1種または複数種の酵素は、アセチルCoAチオラーゼ、アセトアセチルCoAシンテターゼ、HMG-CoAシンテターゼ、HMG-CoAレダクターゼ、メバロン酸キナーゼ、ホスホメバロン酸キナーゼおよびメバロン酸ピロリン酸デカルボキシラーゼからなる群から選択される。一部の実施形態では、アセトアセチルCoAの形成を触媒することができるMEV経路の酵素に関しては、遺伝子改変宿主細胞は、2分子のアセチルCoAを縮合させてアセトアセチルCoAを形成する酵素、例えばアセチルCoAチオラーゼ；またはアセチルCoAとマロニルCoAを縮合させてアセ

50

トアセチルC o Aを形成する酵素、例えばアセトアセチルC o Aシンターゼのいずれかを含む。一部の実施形態では、遺伝子改変宿主細胞は、2分子のアセチルC o Aを縮合させてアセトアセチルC o Aを形成する酵素、例えばアセチルC o Aチオラーゼと、アセチルC o AとマロニルC o Aを縮合させてアセトアセチルC o Aを形成する酵素、例えばアセトアセチルC o Aシンターゼの両方を含む。

【0098】

一部の実施形態では、宿主細胞は、MEV経路の2種以上の酵素をコードする1種または複数種の異種ヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、宿主細胞は、MEV経路の2種の酵素をコードする1種または複数種の異種ヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、宿主細胞は、HMG-C o Aをメバロネートに変換することができる酵素およびメバロネートをメバロネート5-ホスフェートに変換することができる酵素をコードする1種または複数種の異種ヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、宿主細胞は、MEV経路の3種の酵素をコードする1種または複数種の異種ヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、宿主細胞は、MEV経路の4種の酵素をコードする1種または複数種の異種ヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、宿主細胞は、MEV経路の5種の酵素をコードする1種または複数種の異種ヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、宿主細胞は、MEV経路の6種の酵素をコードする1種または複数種の異種ヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、宿主細胞は、MEV経路の7種の酵素をコードする1種または複数種の異種ヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、宿主細胞は、MEV経路の酵素の全てをコードする複数の異種核酸を含む。

【0099】

一部の実施形態では、遺伝子改変宿主細胞は、イソペンテニルピロホスフェート (IPP) をジメチルアリルピロホスフェート (DMAPP) に変換することができる酵素をコードする異種核酸をさらに含む。一部の実施形態では、遺伝子改変宿主細胞は、IPP分子および／またはDMAPP分子を縮合させてポリプレニル化合物を形成することができる酵素をコードする異種核酸をさらに含む。一部の実施形態では、遺伝子改変宿主細胞は、IPPまたはポリプレニルを修飾してイソプレノイド化合物を形成することができる酵素をコードする異種核酸をさらに含む。

【0100】

5. 6. 1 アセチルC o AからアセトアセチルC o Aへの変換

一部の実施形態では、遺伝子改変宿主細胞は、2分子のアセチル補酵素Aを縮合させてアセトアセチルC o Aを形成することができる酵素、例えばアセチルC o Aチオラーゼをコードする異種ヌクレオチド配列を含む。このような酵素をコードするヌクレオチド配列の実例としては、これだけに限定されないが、(NC_000913 REGION: 2324131. 2325315; *Escherichia coli*)、(D49362; *Paracoccus denitrificans*)、および(L20428; *Saccharomyces cerevisiae*)が挙げられる。

【0101】

アセチルC o Aチオラーゼにより、2分子のアセチルC o Aの可逆的な縮合が触媒されてアセトアセチルC o Aが生じるが、この反応は熱力学的に好ましくない；アセトアセチルC o AチオリシスがアセトアセチルC o A合成よりも好まれる。アセトアセチルC o Aシンターゼ (AACS) (あるいはアセチルC o A：マロニルC o Aアシルトランスフェラーゼ；EC 2. 3. 1. 194と称される) により、アセチルC o AとマロニルC o Aが縮合してアセトアセチルC o Aが形成される。アセチルC o Aチオラーゼとは対照的に、AACSにより触媒されるアセトアセチルC o A合成は、付随するマロニルC o Aの脱カルボキシル化に起因して、基本的にエネルギーが好まれる反応である。さらに、AACSはアセトアセチルC o Aに対してチオリシス活性を示さず、したがって、反応は不可逆的である。

【0102】

アセチルC o Aチオラーゼおよび異種ADAおよび／またはホスホトランスアセチラー

ゼ (PTA) を含む宿主細胞では、アセチル CoA チオラーゼにより触媒される可逆反応では、アセトアセチル CoA チオリシスが好まれ、大きなアセチル CoA プールが生じ得る。ADA の可逆的な活性を考えると、このアセチル CoA プールにより、今度はアセチル CoA がアセトアルデヒドに変換される逆反応に向けて ADA が駆動され、それにより、アセチル CoA 産生に向かう ADA によってもたらされる利益が減少する可能性がある。同様に、PTA の活性は可逆的であり、したがって、大きなアセチル CoA プールにより、アセチル CoA がアセチルホスフェートに変換される逆反応に向けて PTA が駆動される可能性がある。したがって、一部の実施形態では、アセチル CoA に対する強力な引きをもたらして ADA および PTA の正反応を駆動するために、本明細書で提供される遺伝子改変宿主細胞の MEV 経路ではアセトアセチル CoA シンターゼを利用してアセチル CoA およびマロニル CoA からアセトアセチル CoA を形成する。

10

【0103】

一部の実施形態では、AACS は *Streptomyces* sp. CL190 株に由来する (Okamura ら、Proc Natl Acad Sci USA 107 巻 (25 号) : 11265~70 頁 (2010 年))。代表的な *Streptomyces* sp. CL190 株の AACS ヌクレオチド配列としては、受託番号 AB540131.1、および本明細書で提供される配列番号 19 が挙げられる。代表的な *Streptomyces* sp. CL190 株の AACS タンパク質配列としては、受託番号 D7URV0、BAJ10048、および本明細書で提供される配列番号 20 が挙げられる。本明細書で提供される組成物および方法に有用な他のアセトアセチル CoA シンターゼとしては、これだけに限定されないが、*Streptomyces* sp. (AB183750 ; KO-3988 BAD86806) ; *S. anulatus* 9663 株 (FN178498 ; CAX48662) ; *Streptomyces* sp. KO-3988 (AB212624 ; BAE78983) ; *Actinoplanes* sp. A40644 (AB113568 ; BAD07381) ; *Streptomyces* sp. C (NZ_ACEW010000640 ; ZP_05511702) ; *Nocardioopsis dassonvillei* DSM 43111 (NZ_ABUI01000023 ; ZP_04335288) ; *Mycobacterium ulcerans* AgY99 (NC_008611 ; YP_907152) ; *Mycobacterium marinum* M (NC_010612 ; YP_001851502) ; *Streptomyces* sp. Mg1 (NZ_DS570501 ; ZP_05002626) ; *Streptomyces* sp. AA4 (NZ_ACEV01000037 ; ZP_05478992) ; *S. roseosporus* NRRL 15998 (NZ_ABYB01000295 ; ZP_04696763) ; *Streptomyces* sp. ACTE (NZ_ADFD01000030 ; ZP_06275834) ; *S. viridochromogenes* DSM 40736 (NZ_ACEZ01000031 ; ZP_05529691) ; *Frankia* sp. CcI3 (NC_007777 ; YP_480101) ; *Nocardia brasiliensis* (NC_018681 ; YP_006812440.1) ; および *Austwickia chelonae* (NZ_BAGZ01000005 ; ZP_10950493.1) が挙げられる。追加の適切なアセトアセチル CoA シンターゼとして、その内容全体が参照により組み込まれる米国特許出願公開第 2010/028554 9 号および同第 2011/0281315 号に記載されているものが挙げられる。

20

30

40

【0104】

本明細書で提供される組成物および方法において同様に有用なアセトアセチル CoA シンターゼとしては、本明細書に記載のアセトアセチル CoA シンターゼのいずれかの「誘導体」といわれる分子が挙げられる。このような「誘導体」は以下の特性を有する：(1) 本明細書に記載のアセトアセチル CoA シンターゼのいずれかと実質的な相同性を共有する、および (2) アセトアセチル CoA が形成されるアセチル CoA とマロニル CoA の不可逆的な縮合を触媒することができる。アセトアセチル CoA シンターゼの誘導体は

50

、誘導体のアミノ酸配列がアセトアセチルC o Aシンターゼのアミノ酸配列と少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%同じであれば、アセトアセチルC o Aシンターゼと「実質的な相同性」を共有するといえる。

【0105】

5. 6. 2 アセトアセチルC o AからHMG-C o Aへの変換

一部の実施形態では、宿主細胞は、アセトアセチルC o AとアセチルC o Aの別の分子を縮合させて3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル-C o A (HMG-C o A)を形成することができる酵素、例えばHMG-C o Aシンターゼをコードする異種ヌクレオチド配列を含む。このような酵素をコードするヌクレオチド配列の実例としては、これだけに限定されないが、(NC_001145. complement 19061. 20536; *Saccharomyces cerevisiae*)、(X96617; *Saccharomyces cerevisiae*)、(X83882; *Arabidopsis thaliana*)、(AB037907; *Kitasatospora grisicola*)、(BT007302; *Homo sapiens*)、および(NC_002758, Locus tag SAV2546, GeneID 1122571; *Staphylococcus aureus*)が挙げられる。

【0106】

5. 6. 3 HMG-C o Aのメバロネートへの変換

一部の実施形態では、宿主細胞は、HMG-C o Aをメバロネートに変換することができる酵素、例えばHMG-C o Aレダクターゼをコードする異種ヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、HMG-C o Aレダクターゼは、NADH使用ヒドロキシメチルグルタリル-C o Aレダクターゼ-C o Aレダクターゼである。HMG-C o Aレダクターゼ(EC1. 1. 1. 34; EC1. 1. 1. 88)は、(S)-HMG-C o Aから(R)-メバロネートへの還元的脱アシル化を触媒するものであり、クラスI HMG rおよびクラスII HMG rの2つのクラスにカテゴリー化することができる。クラスIは真核生物および大多数の古細菌由来の酵素を含み、クラスIIはある特定の原核生物および古細菌のHMG-C o Aレダクターゼを含む。配列の相違に加えて、この2つのクラスの酵素は、これらの補因子特異性に関しても異なる。NADPHを排他的に利用するクラスI酵素とは異なり、クラスII HMG-C o Aレダクターゼは、NADPHとNADHを識別するその能力が変動する。例えば、Hedlら、*Journal of Bacteriology* 186巻(7号): 1927~1932頁(2004年)を参照されたい。クラスII HMG-C o Aレダクターゼを選択するための補因子特異性が以下に提供される。

【0107】

【表1】

表1. クラスII HMG-CoAレダクターゼを選択するための補因子特異性

供給源	補酵素特異性	K_m^{NADPH} (μM)	K_m^{NADH} (μM)
<i>P. mevalonii</i>	NADH		80
<i>A. fulgidus</i>	NAD(P)H	500	160
<i>S. aureus</i>	NAD(P)H	70	100
<i>E. faecalis</i>	NADPH	30	

本明細書で提供される組成物および方法に有用なHMG-C o Aレダクターゼとしては、NADHを補因子として利用することができるHMG-C o Aレダクターゼ、例えば、*P. mevalonii*、*A. fulgidus*または*S. aureus*由来のHMG-

C o Aレダクターゼが挙げられる。特定の実施形態では、HMG-C o Aレダクターゼ、例えば、*P. mevalonii*、*S. pomeroyi*または*D. acidovorans*由来のHMG-C o Aレダクターゼは、NADHのみを補因子として利用することができる。

【0108】

一部の実施形態では、NADH使用HMG-C o Aレダクターゼは*Pseudomonas mevalonii*に由来する。HMG-C o Aレダクターゼ (EC 1. 1. 1. 88) をコードする*Pseudomonas mevalonii*の野生型mva遺伝子の配列は以前に記載されている。BeachおよびRodwell、J. Bacteriol. 171巻：2994～3001頁 (1989年) を参照されたい。代表的な*Pseudomonas mevalonii*のmvaAヌクレオチド配列としては、受託番号M24015、および本明細書で提供される配列番号21が挙げられる。代表的な*Pseudomonas mevalonii*のHMG-C o Aレダクターゼタンパク質配列としては、受託番号AAA25837、P13702、MVAA_PSEMV、および本明細書で提供される配列番号22が挙げられる。

10

【0109】

一部の実施形態では、NADH使用HMG-C o Aレダクターゼは*Silicibacter pomeroyi*に由来する。代表的な*Silicibacter pomeroyi*のHMG-C o Aレダクターゼヌクレオチド配列としては、受託番号NC_006569. 1、および本明細書で提供される配列番号23が挙げられる。代表的な*Silicibacter pomeroyi*のHMG-C o Aレダクターゼタンパク質配列としては、受託番号YP_164994、および本明細書で提供される配列番号24が挙げられる。

20

【0110】

一部の実施形態では、NADH使用HMG-C o Aレダクターゼは*Delftia acidovorans*に由来する。代表的な*Delftia acidovorans*のHMG-C o Aレダクターゼヌクレオチド配列としては、NC_010002 REGION: complement (319980. . 321269)、および本明細書で提供される配列番号25が挙げられる。代表的な*Delftia acidovorans*のHMG-C o Aレダクターゼタンパク質配列としては、受託番号YP_001561318、および本明細書で提供される配列番号26が挙げられる。

30

【0111】

一部の実施形態では、NADH使用HMG-C o Aレダクターゼは*Solanum tuberosum*に由来する (Craneら、J. Plant Physiol. 159巻：1301～1307頁 (2002年))。

【0112】

本明細書で提供される組成物および方法において同様に有用なNADH使用HMG-C o Aレダクターゼとしては、本明細書に記載のNADH使用HMG-C o Aレダクターゼ、例えば、*P. mevalonii*、*S. pomeroyi*および*D. acidovorans*に由来するもののいずれかの「誘導体」といわれる分子が挙げられる。このような「誘導体」は以下の特性を有する： (1) 本明細書に記載のNADH使用HMG-C o Aレダクターゼのいずれかと実質的な相同性を共有する、および (2) 補因子としてNADHを優先的に使用しながら (S) -HMG-C o Aから (R) -メバロネートへの還元的脱アシル化を触媒することができる。NADH使用HMG-C o Aレダクターゼの誘導体は、誘導体のアミノ酸配列がNADH使用HMG-C o Aレダクターゼのアミノ酸配列と少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%同じであれば、NADH使用HMG-C o Aレダクターゼと「実質的な相同性」を共有するといえる。

40

【0113】

本明細書で使用される場合、「NADH使用」という句は、NADH使用HMG-C o

50

Aレダクターゼが、例えば、NADHに対する特異的活性がNADPHに対するものよりも高いことが実証されることにより、補因子としてNADPHよりもNADHに対して選択的であることを意味する。一部の実施形態では、補因子としてのNADHに対する選択性は、 $k_{cat}^{(NADH)} / k_{cat}^{(NADPH)}$ 比で表される。一部の実施形態では、NADH使用HMG-CoAレダクターゼの $k_{cat}^{(NADH)} / k_{cat}^{(NADPH)}$ 比は少なくとも5、10、15、20、25または25超である。一部の実施形態では、NADH使用HMG-CoAレダクターゼはNADHを排他的に使用する。例えば、NADHを排他的に使用するNADH使用HMG-CoAレダクターゼは、*in vitro*においてNADHを唯一の補因子として供給するといくらかの活性を示し、NADPHを唯一の補因子として供給した場合には検出可能な活性を示さない。その内容全体が本明細書に組み込まれるKimら、*Protein Science* 9巻：1226～1234頁（2000年）、およびWildingら、*J. Bacteriol.* 182巻（18号）：5147～52頁（2000年）に記載されているものを含めた、補因子特異性を決定するための当技術分野で公知の任意の方法を利用して、補因子としてNADHを好むHMG-CoAレダクターゼを同定することができる。

10

【0114】

一部の実施形態では、NADH使用HMG-CoAレダクターゼは、NADPHよりもNADHに対して選択的になるように、例えば、補因子結合ポケットの部位特異的変異誘発によって工学的に操作されている。NADH選択性を工学的に操作するための方法はWatanaabeら、*Microbiology* 153巻：3044～3054頁（2007年）に記載されており、HMG-CoAレダクターゼの補因子特異性を決定するための方法は、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれるKimら、*Protein Sci.* 9巻：1226～1234頁（2000年）に記載されている。

20

【0115】

一部の実施形態では、NADH使用HMG-CoAレダクターゼは、メバロネート分解経路をネイティブに含む宿主種、例えば、メバロネートをその唯一の炭素源として異化する宿主種に由来する。これらの実施形態の中では、通常そのネイティブな宿主細胞内の内部移行した（R）-メバロネートの（S）-HMG-CoAへの酸化的アシル化を触媒するNADH使用HMG-CoAレダクターゼを利用して、メバロネート生合成経路を含む遺伝子改変宿主細胞における逆反応、すなわち（S）-HMG-CoAから（R）-メバロネートへの還元的脱アシル化を触媒する。メバロネートをそれらの唯一の炭素源として成長することができる原核生物は、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、Andersonら、*J. Bacteriol.* 171巻（12号）：6468～6472頁（1989年）；Beachら、*J. Bacteriol.* 171巻：2994～3001頁（1989年）；Benschら、*J. Biol. Chem.* 245巻：3755～3762頁；Fimongnariら、*Biochemistry* 4巻：2086～2090頁（1965年）；Siddiqiら、*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 8巻：110～113頁（1962年）；Siddiqiら、*J. Bacteriol.* 93巻：207～214頁（1967年）、およびTakatsujiら、*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 110巻：187～193頁（1983年）に記載されている。

30

40

【0116】

本明細書で提供される組成物および方法の一部の実施形態では、宿主細胞は、NADH使用HMGrとNADPH使用HMG-CoAレダクターゼの両方を含む。NADPH使用HMG-CoAレダクターゼをコードするヌクレオチド配列の実例としては、これだけに限定されないが、（NM_206548；*Drosophila melanogaster*）、（NC_002758、*Locus tag* SAV2545、*GeneID* 1122570；*Staphylococcus aureus*）、（AB015627；*Streptomyces* sp. KO 3988）、（AX128213、切断型HMG-CoAレダクターゼをコードする配列をもたらず；*Saccharomyce*

50

s cerevisiae)、および (NC_001145: 相補体 (115734. 118898; *Saccharomyces cerevisiae*) が挙げられる。

【0117】

5. 6. 4 メバロネートからメバロネート-5-ホスフェートへの変換

一部の実施形態では、宿主細胞は、メバロネートをメバロネート-5-ホスフェートに変換することができる酵素、例えば、メバロン酸キナーゼをコードする異種ヌクレオチド配列を含む。このような酵素をコードするヌクレオチド配列の実例としては、これだけに限定されないが、(L77688; *Arabidopsis thaliana*)、および (X55875; *Saccharomyces cerevisiae*) が挙げられる。

【0118】

5. 6. 5 メバロネート-5-ホスフェートからメバロネート-5-ピロホスフェートへの変換

一部の実施形態では、宿主細胞は、メバロネート-5-ホスフェートをメバロネート-5-ピロホスフェートに変換することができる酵素、例えばホスホメバロン酸キナーゼをコードする異種ヌクレオチド配列を含む。このような酵素をコードするヌクレオチド配列の実例としては、これだけに限定されないが、(AF429385; *Hevea brasiliensis*)、(NM_006556; *Homo sapiens*)、および (NC_001145. 相補体 712315. 713670; *Saccharomyces cerevisiae*) が挙げられる。

【0119】

5. 6. 6 メバロネート-5-ピロホスフェートからIPPへの変換

一部の実施形態では、宿主細胞は、メバロネート-5-ピロホスフェートをイソペンテニルジホスフェート (IPP) に変換することができる酵素、例えばメバロン酸ピロリン酸デカルボキシラーゼをコードする異種ヌクレオチド配列を含む。このような酵素をコードするヌクレオチド配列の実例としては、これだけに限定されないが、(X97557; *Saccharomyces cerevisiae*)、(AF290095; *Enterococcus faecium*)、および (U49260; *Homo sapiens*) が挙げられる。

【0120】

5. 6. 7 IPPからDMA PPへの変換

一部の実施形態では、宿主細胞は、MEV経路により生成したIPPをジメチルアリルピロホスフェート (DMA PP) に変換することができる酵素、例えばIPPイソメラーゼをコードする異種ヌクレオチド配列をさらに含む。このような酵素をコードするヌクレオチド配列の実例としては、これだけに限定されないが、(NC_000913. 3031087. 3031635; *Escherichia coli*)、および (AF082326; *Haematococcus pluvialis*) が挙げられる。

【0121】

5. 6. 8 ポリプレニルシンターゼ

一部の実施形態では、宿主細胞は、IPP分子および／またはDMA PP分子を縮合させて炭素を6つ以上含有するポリプレニル化合物を形成することができるポリプレニルシンターゼをコードする異種ヌクレオチド配列をさらに含む。

【0122】

一部の実施形態では、宿主細胞は、1分子のIPPと1分子のDMA PPを縮合させて1分子のゲラニルピロホスフェート (「GPP」) を形成することができる酵素、例えばGPPシンターゼをコードする異種ヌクレオチド配列を含む。このような酵素をコードするヌクレオチド配列の実例としては、これだけに限定されないが、(AF513111; *Abies grandis*)、(AF513112; *Abies grandis*)、(AF513113; *Abies grandis*)、(AY534686; *Antirrhinum majus*)、(AY534687; *Antirrhinum majus*)、(Y17376; *Arabidopsis thaliana*)、(AE0168

10

20

30

40

50

77、Locus AP11092; *Bacillus cereus*; ATCC 14579)、(AJ243739; *Citrus sinensis*)、(AY534745; *Clarkia breweri*)、(AY953508; *Ips pini*)、(DQ286930; *Lycopersicon esculentum*)、(AF182828; *Mentha x piperita*)、(AF182827; *Mentha x piperita*)、(MPI249453; *Mentha x piperita*)、(PZE431697、Locus CAD24425; *Paracoccus zeaxanthinifaciens*)、(AY866498; *Picrorhiza kurooa*)、(AY351862; *Vitis vinifera*) および (AF203881、Locus AAF12843; *Zymomonas mobilis*) が挙げられる。

10

【0123】

一部の実施形態では、宿主細胞は、2分子のIPPと1分子のDMAPPを縮合させるかIPPの分子をGPPの分子に付加してファルネシルピロホスフェート(「FPP」)の分子を形成することができる酵素、例えばFPPシンターゼをコードする異種ヌクレオチド配列を含む。このような酵素をコードするヌクレオチド配列の実例としては、これだけに限定されないが、(ATU80605; *Arabidopsis thaliana*)、(ATHFPS2R; *Arabidopsis thaliana*)、(AAU36376; *Artemisia annua*)、(AF461050; *Bos taurus*)、(D00694; *Escherichia coli* K-12)、(AE009951、Locus AAL95523; *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586)、(GFFPPSGEN; *Gibberella fujikuroi*)、(CP000009、Locus AAW60034; *Gluconobacter oxydans* 621H)、(AF019892; *Helianthus annuus*)、(HUMFAPS; *Homo sapiens*)、(KLFPFSQCR; *Kluyveromyces lactis*)、(LAU15777; *Lupinus albus*)、(LAU20771; *Lupinus albus*)、(AF309508; *Mus musculus*)、(NCFPPSGEN; *Neurospora crassa*)、(PAFPS1; *Parthenium argentatum*)、(PAFPS2; *Parthenium arg* 30 *entatum*)、(RATFAPS; *Rattus norvegicus*)、(YSCFPP; *Saccharomyces cerevisiae*)、(D89104; *Schizosaccharomyces pombe*)、(CP000003、Locus AAT87386; *Streptococcus pyogenes*)、(CP000017、Locus AAZ51849; *Streptococcus pyogenes*)、(NC_008022、Locus YP_598856; *Streptococcus pyogenes* MGAS10270)、(NC_008023、Locus YP_600845; *Streptococcus pyogenes* MGAS2096)、(NC_008024、Locus YP_602832; *Streptococcus pyogenes* MGAS10750)、(MZEFPS; *Zea mays*)、(AE000657、Locus AAC06913; *Aquifex aeolicus* VF5)、(NM_202836; *Arabidopsis thaliana*)、(D84432、Locus BAA12575; *Bacillus subtilis*)、(U12678、Locus AAC28894; *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110)、(BACFDPS; *Geobacillus stearothermophilus*)、(NC_002940、Locus NP_873754; *Haemophilus ducreyi* 35000HP)、(L42023、Locus AAC23087; *Haemophilus influenzae* Rd KW20)、(J05262; *Homo sapiens*)、(YP_395294; *Lactobacillus sakei* subsp. *sake* 40 *sake* 50

i 23K)、(NC_005823、Locus YP_000273; *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni str. Fiocruz L1-130)、(AB003187; *Micrococcus luteus*)、(NC_002946、Locus YP_208768; *Neisseria gonorrhoeae* FA 1090)、(U00090、Locus AAB91752; *Rhizobium* sp. NGR234)、(J05091; *Saccharomyces cerevisiae*)、(CP000031、Locus AAV93568; *Silicibacter pomeroyi* DSS-3)、(AE008481、Locus AAK99890; *Streptococcus pneumoniae* R6)、および(NC_004556、Locus NP_779706; *Xylella fastidiosa* Temecula1)が挙げられる。

10

【0124】

一部の実施形態では、宿主細胞は、IPPとDMAPPまたはIPPとFPPを組み合わせてゲラニルゲラニルピロホスフェート(「GGPP」)を形成することができる酵素をコードする異種ヌクレオチド配列をさらに含む。このような酵素をコードするヌクレオチド配列の実例としては、これだけに限定されないが、(ATHGERPYRS; *Arabidopsis thaliana*)、(BT005328; *Arabidopsis thaliana*)、(NM_119845; *Arabidopsis thaliana*)、(NZ_AAJM01000380、Locus ZP_00743052; *Bacillus thuringiensis* serovar israelensis、ATCC 35646 sq1563)、(CRGGPPS; *Catharanthus roseus*)、(NZ_AABF02000074、Locus ZP_00144509; *Fusobacterium nucleatum* subsp. *vincentii*、ATCC 49256)、(GFGGPPSGN; *Gibberella fujikuroi*)、(AY371321; *Ginkgo biloba*)、(AB055496; *Hevea brasiliensis*)、(AB017971; *Homo sapiens*)、(MCI276129; *Mucor circinelloides* f. *lusitanicus*)、(AB016044; *Mus musculus*)、(AABX01000298、Locus NCU01427; *Neurospora crassa*)、(NCU20940; *Neurospora crassa*)、(NZ_AAKL01000008、Locus ZP_00943566; *Ralstonia solanacearum* UW551)、(AB118238; *Rattus norvegicus*)、(SCU31632; *Saccharomyces cerevisiae*)、(AB016095; *Synechococcus elongatus*)、(SAGGPS; *Sinapis alba*)、(SSOGDS; *Sulfolobus acidocaldarius*)、(NC_007759、Locus YP_461832; *Syntrophus aciditrophicus* SB)、(NC_006840、Locus YP_204095; *Vibrio fischeri* ES114)、(NM_112315; *Arabidopsis thaliana*)、(ERWCRTTE; *Pantoea agglomerans*)、(D90087、Locus BAA14124; *Pantoea ananatis*)、(X52291、Locus CAA36538; *Rhodobacter capsulatus*)、(AF195122、Locus AAF24294; *Rhodobacter sphaeroides*)、および(NC_004350、Locus NP_721015; *Streptococcus mutans* UA159)が挙げられる。

20

30

40

【0125】

5. 6. 9 テルペンシンターゼ

一部の実施形態では、宿主細胞は、ポリプレニルを修飾してヘミテルペン、モノテルペン、セスキテルペン、ジテルペン、トリテルペン、テトラテルペン、ポリテルペン、ステロイド化合物、カロテノイド、または修飾されたイソプレノイド化合物を形成することが

50

できる酵素をコードする異種ヌクレオチド配列をさらに含む。

【0126】

一部の実施形態では、異種ヌクレオチドは、カレンシンターゼをコードする。適切なヌクレオチド配列の実例としては、これだけに限定されないが、(AF461460、REGION: 43. 1926; *Picea abies*) および (AF527416、REGION: 78. 1871; *Salvia stenophylla*) が挙げられる。

【0127】

一部の実施形態では、異種ヌクレオチドは、ゲラニオールシンターゼをコードする。適切なヌクレオチド配列の実例としては、これだけに限定されないが、

(AJ457070; *Cinnamomum tenuipilum*)、(AY362553; *Ocimum basilicum*)、(DQ234300; *Perilla frutescens* 1864株)、(DQ234299; *Perilla citriodora* 1861株)、(DQ234298; *Perilla citriodora* 4935株)、および (DQ088667; *Perilla citriodora*) が挙げられる。

10

【0128】

一部の実施形態では、異種ヌクレオチドはリナロールシンターゼをコードする。適切なヌクレオチド配列の実例としては、これだけに限定されないが、(AF497485; *Arabidopsis thaliana*)、(AC002294、Locus AAB71482; *Arabidopsis thaliana*)、(AY059757; *Arabidopsis thaliana*)、(NM_104793; *Arabidopsis thaliana*)、(AF154124; *Artemisia annua*)、(AF067603; *Clarkia breweri*)、(AF067602; *Clarkia concinna*)、(AF067601; *Clarkia breweri*)、(U58314; *Clarkia breweri*)、(AY840091; *Lycopersicon esculentum*)、(DQ263741; *Lavandula angustifolia*)、(AY083653; *Mentha citrate*)、(AY693647; *Ocimum basilicum*)、(XM_463918; *Oryza sativa*)、(AP004078、Locus BAD07605; *Oryza sativa*)、(XM_463918、Locus XP_463918; *Oryza sativa*)、(AY917193; *Perilla citriodora*)、(AF271259; *Perilla frutescens*)、(AY473623; *Picea abies*)、(DQ195274; *Picea sitchensis*)、および (AF444798; *Perilla frutescens* 変種 *crispa* 栽培品種 No. 79) が挙げられる。

20

30

【0129】

一部の実施形態では、異種ヌクレオチドは、リモネンシンターゼをコードする。適切なヌクレオチド配列の実例としては、これだけに限定されないが、(+)ーリモネンシンターゼ (AF514287、REGION: 47. 1867; *Citrus limon*) および (AY055214、REGION: 48. 1889; *Agastache rugosa*) および (−)ーリモネンシンターゼ (DQ195275、REGION: 1. 1905; *Picea sitchensis*)、(AF006193、REGION: 73. 1986; *Abies grandis*)、および (MHC4SLSP、REGION: 29. 1828; *Mentha spicata*) が挙げられる。

40

【0130】

一部の実施形態では、異種ヌクレオチドは、ミルセンシンターゼをコードする。適切なヌクレオチド配列の実例としては、これだけに限定されないが、(U87908; *Abies grandis*)、(AY195609; *Antirrhinum majus*)、(AY195608; *Antirrhinum majus*)、(NM_127982; *Arabidopsis thaliana* TPS10)、(NM_113485;

50

Arabidopsis thaliana ATTPS-CIN)、(NM_113483;*Arabidopsis thaliana* ATTPS-CIN)、(AF271259;*Perilla frutescens*)、(AY473626;*Picea abies*)、(AF369919;*Picea abies*)、および(AJ304839;*Quercus ilex*)が挙げられる。

【0131】

一部の実施形態では、異種ヌクレオチドは、オシメンシンターゼをコードする。適切なヌクレオチド配列の実例としては、これだけに限定されないが、(AY195607;*Antirrhinum majus*)、(AY195609;*Antirrhinum majus*)、(AY195608;*Antirrhinum majus*)、(AK221024;*Arabidopsis thaliana*)、(NM_113485;*Arabidopsis thaliana* ATTPS-CIN)、(NM_113483;*Arabidopsis thaliana* ATTPS-CIN)、(NM_117775;*Arabidopsis thaliana* ATTPS03)、(NM_001036574;*Arabidopsis thaliana* ATTPS03)、(NM_127982;*Arabidopsis thaliana* TPS10)、(AB110642;*Citrus unshiu* CitMTSL4)、および(AY575970;*Lotus corniculatus* var. *japonicus*)が挙げられる。

【0132】

一部の実施形態では、異種ヌクレオチドは、 α -ピネンシンターゼをコードする。適切なヌクレオチド配列の実例としては、これだけに限定されないが、(+) α -ピネンシンターゼ(AF543530、REGION:1.1887;*Pinus taeda*)、(-) α -ピネンシンターゼ(AF543527、REGION:32.1921;*Pinus taeda*)、および(+) / (-) α -ピネンシンターゼ(AGU87909、REGION:6111892;*Abies grandis*)が挙げられる。

【0133】

一部の実施形態では、異種ヌクレオチドは、 β -ピネンシンターゼをコードする。適切なヌクレオチド配列の実例としては、これだけに限定されないが、(-) β -ピネンシンターゼ(AF276072、REGION:1.1749;*Artemisia annua*)および(AF514288、REGION:26.1834;*Citrus limon*)が挙げられる。

【0134】

一部の実施形態では、異種ヌクレオチドは、サビネンシンターゼをコードする。適切なヌクレオチド配列の実例としては、これだけに限定されないが、*Salvia officinalis*由来のAF051901、REGION:26.1798が挙げられる。

【0135】

一部の実施形態では、異種ヌクレオチドは、 γ -テルピネンシンターゼをコードする。適切なヌクレオチド配列の実例としては、(*Citrus limon*由来のAF514286、REGION:30.1832)および(*Citrus unshiu*由来のAB110640、REGION 1.1803)が挙げられる。

【0136】

一部の実施形態では、異種ヌクレオチドは、テルピノレンシンターゼをコードする。適切なヌクレオチド配列の実例としては、これだけに限定されないが、(*Oscimum basilicum*由来のAY693650)および(*Pseudotsuga menziesii*由来のAY906866、REGION:10.1887)が挙げられる。

【0137】

一部の実施形態では、異種ヌクレオチドは、アモルファジエンシンターゼをコードする。適切なヌクレオチド配列の実例は、米国特許出願公開第2004/0005678号の配列番号37である。

【0138】

一部の実施形態では、異種ヌクレオチドは、 α -ファルネセンシンターゼをコードする。適切なヌクレオチド配列の実例としては、これだけに限定されないが、*Pyrus communis cultivar d'Anjou* (セイヨウナシ; 遺伝子名AFS1) 由来のDQ309034および*Malus domestica* (リンゴ; 遺伝子AFS1) 由来のAY182241が挙げられる。*Pechouus*ら、*Planta* 219巻(1号): 84~94頁(2004年)。

【0139】

一部の実施形態では、異種ヌクレオチドは、 β -ファルネセンシンターゼをコードする。適切なヌクレオチド配列の実例としては、これだけに限定されないが、*Mentha x piperita* (ペパーミント; 遺伝子Tspa11) 由来の受託番号AF024615、および*Artemisia annua* 由来のAY835398が挙げられる。*Picaud*ら、*Phytochemistry* 66巻(9号): 961~967頁(2005年)。

10

【0140】

一部の実施形態では、異種ヌクレオチドは、ファルネソールシンターゼをコードする。適切なヌクレオチド配列の実例としては、これだけに限定されないが、*Zea mays* 由来の受託番号AF529266および*Saccharomyces cerevisiae* 由来のYDR481C (遺伝子Pho8) が挙げられる。*Song, L., Applied Biochemistry and Biotechnology* 128巻: 149~158頁(2006年)。

20

【0141】

一部の実施形態では、異種ヌクレオチドは、ネロリドールシンターゼをコードする。適切なヌクレオチド配列の実例としては、これだけに限定されないが、*Zea mays* 由来のAF529266が挙げられる(トウモロコシ; 遺伝子tps1)。

【0142】

一部の実施形態では、異種ヌクレオチドは、パチョロールシンターゼをコードする。適切なヌクレオチド配列の実例としては、これだけに限定されないが、*Pogostemon cablin* 由来のAY508730 REGION: 1. 1659が挙げられる。

【0143】

一部の実施形態では、異種ヌクレオチドは、ノートカトンシンターゼをコードする。適切なヌクレオチド配列の実例としては、これだけに限定されないが、*Citrus sinensis* 由来のAF441124 REGION: 1. 1647および*Perilla frutescens* 由来のAY917195 REGION: 1. 1653が挙げられる。

30

【0144】

一部の実施形態では、異種ヌクレオチドは、アビエタジエンシンターゼをコードする。適切なヌクレオチド配列の実例としては、これだけに限定されないが、(U50768; *Abies grandis*) および (AY473621; *Picea abies*) が挙げられる。

40

【0145】

一部の実施形態では、宿主細胞はC₅ イソプレノイドを産生する。これらの化合物は1つのイソプレン単位に由来し、ヘミテルペンとも称される。ヘミテルペンの実例はイソプレンである。他の実施形態では、イソプレノイドはC₁₀ イソプレノイドである。これらの化合物は、2つのイソプレン単位に由来し、モノテルペンとも称される。モノテルペンの実例は、リモネン、シトロネロール(*citranello*)、ゲラニオール、メントール、ペリリルアルコール、リナロール、ツジヨン、およびミルセンである。他の実施形態では、イソプレノイドは、C₁₅ イソプレノイドである。これらの化合物は、3つのイソプレン単位に由来し、セスキテルペンとも称される。セスキテルペンの実例は、ペリプラノンB、ギンコライドB(*ginkgolide B*)、アモルファジエン、アルテ

50

ミシニン、アルテミシン酸、バレンセン、ノートカトン、エピセドロール (epi-cedrol)、エピアリストロケン (epi-aristolochene)、ファルネソール、ゴシポール、サントニン (sanonin)、ペリプラノン、フォルスコリン、およびパチョロール (パチョリアルコールとしても公知である) である。他の実施形態では、イソプレノイドは、 C_{20} イソプレノイドである。これらの化合物は、4つのイソプレン単位に由来し、ジテルペンとも称される。ジテルペンの实例は、カスベン (casbene)、エリュテロビン、バクリタキセル、プロストラチン、シュードプテロシン (pseudopterosin)、およびタキサジエンである。さらに他の例では、イソプレノイドは、 $C_{20} +$ イソプレノイドである。これらの化合物は、5つ以上のイソプレン単位に由来し、トリテルペン (6つのイソプレン単位に由来する C_{30} イソプレノイド化合物)、例えば、アルブルシド E (arbruside E)、ブルセアンチン (bruceantin)、テストステロン、プロゲステロン、コルチゾン、ジギトキシン、およびスクアレン; テトラテルペン (8つのイソプレノイドに由来する C_{40} イソプレノイド化合物)、例えば β -カロテン; およびポリテルペン (9つ以上のイソプレン単位に由来する $C_{40} +$ イソプレノイド化合物)、例えばポリイソプレンを含む。一部の実施形態では、イソプレノイドは、アビエタジエン、アモルファジエン、カレン、 α -ファルネセン、 β -ファルネセン、ファルネソール、ゲラニオール、ゲラニルゲラニオール、イソプレン、リナロール、リモネン、ミルセン、ネロリドール、オシメン、パチョロール、 β -ピネン、サビネン、 γ -テルピネン、テルピノレンおよびバレンセンからなる群から選択される。イソプレノイド化合物としては、これだけに限定されないが、カロテノイド (例えば、リコピン、 α -および β -カロテン、 α -および β -クリプトキサンチン、ビキシン、ゼアキサンチン、アスタキサンチン、およびルテイン)、ステロイド化合物、ならびに他の化学基により修飾されたイソプレノイドで構成される化合物、例えば混合テルペン-アルカロイド、ならびに補酵素 Q-10 も挙げられる。

【0146】

5. 6. 10 イソプレノイドを産生する方法

別の態様では、本明細書では、イソプレノイドを産生するための方法であって、(a) イソプレノイドを産生することができる本明細書に記載の遺伝子改変宿主細胞のいずれかの集団を、炭素源を含む培地中、イソプレノイド化合物を作製するのに適した条件下で培養するステップ、および (b) 前記イソプレノイド化合物を培地から回収するステップを含む方法が提供される。

【0147】

一部の実施形態では、遺伝子改変宿主細胞は、ホスホクトラゼの異種発現、ホスホトランスアセチラーゼの異種発現、メバロン酸経路の1種または複数種の酵素の異種発現、および任意選択で、ADAの異種発現、NADH使用HMG-CoAレダクターゼの異種発現、およびAACSの異種発現からなる群から選択される1つまたは複数の改変を含み、遺伝子改変宿主細胞は、1つまたは複数の改変を含まない親細胞または遺伝子改変宿主細胞の1つまたは複数の改変のサブセットのみを含むが他の点では遺伝的に同一の親細胞と比較して増大した量のイソプレノイド化合物を産生する。一部の実施形態では、増大した量は、例えば、収量、産生、生産性で、細胞培養物1リットル当たりのグラム数で、乾燥細胞重量1グラム当たりのミリグラム数で、細胞培養物の単位体積当たりで、単位乾燥細胞重量当たりで、単位時間当たりの細胞培養物の単位体積当たりで、または単位時間当たりの単位乾燥細胞重量当たりで測定して、少なくとも1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%または100%超である。

【0148】

一部の実施形態では、宿主細胞は、発酵培地1リットル当たり約10グラムを超える高レベルのイソプレノイドを産生する。一部のこのような実施形態では、イソプレノイドは細胞培養物1リットル当たり約10~約50グラム、約15グラム超、約20グラム超、約25グラム超、または約30グラム超の量で産生される。

【0149】

一部の実施形態では、宿主細胞は、乾燥細胞重量1グラム当たり約50ミリグラムを超える高レベルのイソプレノイドを産生する。一部のこのような実施形態では、イソプレノイドは乾燥細胞重量1グラム当たり約50～約1500ミリグラム、約100ミリグラム超、約150ミリグラム超、約200ミリグラム超、約250ミリグラム超、約500ミリグラム超、約750ミリグラム超、または約1000ミリグラム超の量で産生される。

【0150】

一部の実施形態では、宿主細胞は、親細胞によって産生されるイソプレノイドのレベルよりも、細胞培養物の単位体積当たり、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約2倍、少なくとも約2.5倍、少なくとも約5倍、少なくとも約10倍、少なくとも約20倍、少なくとも約30倍、少なくとも約40倍、少なくとも約50倍、少なくとも約75倍、少なくとも約100倍、少なくとも約200倍、少なくとも約300倍、少なくとも約400倍、少なくとも約500倍、または少なくとも約1,000倍、またはそれ以上高いものである高レベルのイソプレノイドを産生する。

10

【0151】

一部の実施形態では、宿主細胞は、親細胞によって産生されるイソプレノイドのレベルよりも、単位乾燥細胞重量当たり、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約2倍、少なくとも約2.5倍、少なくとも約5倍、少なくとも約10倍、少なくとも約20倍、少なくとも約30倍、少なくとも約40倍、少なくとも約50倍、少なくとも約75倍、少なくとも約100倍、少なくとも約200倍、少なくとも約300倍、少なくとも約400倍、少なくとも約500倍、または少なくとも約1,000倍、またはそれより高いものである高レベルのイソプレノイドを産生する。

20

【0152】

一部の実施形態では、宿主細胞は、親細胞によって産生されるイソプレノイドのレベルよりも、単位時間当たりの細胞培養物の単位体積当たり、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約2倍、少なくとも約2.5倍、少なくとも約5倍、少なくとも約10倍、少なくとも約20倍、少なくとも約30倍、少なくとも約40倍、少なくとも約50倍、少なくとも約75倍、少なくとも約100倍、少なくとも約200倍、少なくとも約300倍、少なくとも約400倍、少なくとも約500倍、または少なくとも約1,000倍、またはそれより高いものである高レベルのイソプレノイドを産生する。

30

【0153】

一部の実施形態では、宿主細胞は、親細胞によって産生されるイソプレノイドのレベルよりも、単位時間当たりの単位乾燥細胞重量当たり、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約2倍、少なくとも約2.5倍、少なくとも約5倍、少なくとも約10倍、少なくとも約20倍、少なくとも約30倍、少なくとも約40倍、少なくとも約50倍、少なくとも約75倍、少なくとも約100倍、少なくとも約200倍、少なくとも約300倍、少なくとも約400倍、少なくとも約500倍、または少なくとも約1,000倍、またはそれより高いものである高イソプレノイドを産生する。

40

50

【0154】

大多数の実施形態では、宿主細胞による高レベルのイソプレノイドの産生を誘導性化合物によって誘導することができる。このような宿主細胞を誘導性化合物の不在下で容易に操作することができる。次いで、誘導性化合物を添加して宿主細胞による高レベルのイソプレノイドの産生を誘導する。他の実施形態では、宿主細胞による高レベルのイソプレノイドの産生を、例えば成長温度、培地の構成物などの培養条件を変化させることによって誘導することができる。

【0155】

5. 6. 11 培養培地および培養条件

微生物培養物を維持し、成長させるための材料および方法は微生物学または発酵科学の当業者に周知である（例えば、Baileyら、Biochemical Engineering Fundamentals、第2版、McGraw Hill、New York、1986年を参照されたい）。宿主細胞、発酵、およびプロセスの特定の必要条件に応じて、好気性条件、微好気性条件、または嫌気性条件について適切な培養培地、pH、温度、および必要条件を考察しなければならない。

10

【0156】

本明細書で提供されるイソプレノイドを産生する方法は、これだけに限定されないが、細胞培養プレート、フラスコ、または発酵槽を含めた適切な容器中の適切な培養培地（例えば、パントテン酸を補充したまたは補充していない）で実施することができる。さらに、当該方法は、微生物の産物の工業生産を支持するための当技術分野で公知の任意の発酵の規模で実施することができる。攪拌層型発酵槽、エアリフト型発酵槽、気泡型発酵槽、またはこれらの任意の組合せを含めた任意の適切な発酵槽を使用することができる。Saccharomyces cerevisiaeを宿主細胞として利用する特定の実施形態では、Kosaricら、Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry、第6版、12巻、398～473頁、Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA、Weinheim、Germanyに詳細に記載されている通り、発酵槽において株を成長させることができる。

20

【0157】

一部の実施形態では、培養培地は、イソプレノイドを産生することができる遺伝子改変微生物が生存すること、すなわち、成長および生存能力を維持することができる任意の培養培地である。一部の実施形態では、培養培地は、同化できる炭素、窒素源およびリン酸源を含む水性培地である。このような培地は、適切な塩、無機物、金属および他の栄養分も含んでよい。一部の実施形態では、炭素源および必須の細胞栄養分のそれぞれを増加的または継続的に発酵培地に添加し、必要な栄養分のそれぞれを、例えば、炭素源をバイオマスに変換する細胞の代謝機能または呼吸機能に基づく所定の細胞の成長曲線に従って、基本的に、成長している細胞による効率的な同化のために必要な最小限のレベルに維持する。

30

【0158】

微生物を培養するための適切な条件および適切な培地は当技術分野で周知である。一部の実施形態では、適切な培地は、例えば、誘導因子（例えば、遺伝子産物をコードする1つまたは複数のヌクレオチド配列が誘導性プロモーターの制御下にある場合）、リプレッサー（例えば、遺伝子産物をコードする1つまたは複数のヌクレオチド配列が抑圧可能なプロモーターの制御下にある場合）、または選択剤（例えば、遺伝子改変を含む微生物を選択するための抗生物質）などの1種または複数種の追加の作用剤を補充したものである。

40

【0159】

一部の実施形態では、炭素源は、単糖（monosaccharide）（単糖（simple sugar））、二糖、多糖、非発酵性炭素源、またはこれらの1つまたは複数の組合せである。適切な単糖の非限定的な例としては、グルコース、ガラクトース、マ

50

ンノース、フルクトース、キシロース、リボース、およびこれらの組合せが挙げられる。適切な二糖の非限定的な例としては、スクロース、ラクトース、マルトース、トレハロース、セロビオース、およびこれらの組合せが挙げられる。適切な多糖の非限定的な例としては、デンプン、グリコーゲン、セルロース、キチン、およびこれらの組合せが挙げられる。適切な非発酵性炭素源の非限定的な例としては、アセテートおよびグリセロールが挙げられる。

【0160】

培養培地中のグルコースなどの炭素源の濃度は、細胞の成長を促進するが、使用される微生物の成長を抑圧するほどには高くないものであるべきである。一般には、培養は、グルコースなどの炭素源を、成長およびバイオマスの所望のレベルが実現されるレベルであるが、検出不可能なレベル（約0.1 g/L未満の検出限界）で添加して行われる。他の実施形態では、培養培地中のグルコースなどの炭素源の濃度は約1 g/L超、好ましくは約2 g/L超、より好ましくは約5 g/L超である。さらに、培養培地中のグルコースなどの炭素源の濃度は、一般には、約100 g/L未満、好ましくは約50 g/L未満、より好ましくは約20 g/L未満である。培養物成分濃度への言及は、最初の成分濃度および/または進行中の成分濃度のどちらを指す場合もあることに留意するべきである。いくつかの場合には、培養中に培養培地から炭素源を枯渇させることが望ましい。

10

【0161】

適切な培養培地に使用することができる同化できる窒素の供給源としては、これだけに限定されないが、単純な窒素源、有機窒素源および複合窒素源が挙げられる。このような窒素源としては、無水アンモニア、アンモニウム塩ならびに動物起源、植物起源および/または微生物起源の物質が挙げられる。適切な窒素源としては、これだけに限定されないが、タンパク質加水分解産物、微生物バイオマス加水分解産物、ペプトン、酵母抽出物、硫酸アンモニウム、尿素、およびアミノ酸が挙げられる。一般には、培養培地中の窒素源の濃度は、約0.1 g/L超、好ましくは約0.25 g/L超、より好ましくは約1.0 g/L超である。しかし、ある特定の濃度を超えると、窒素源を培養培地に添加することは微生物の成長のために有利ではない。結果として、培養培地中の窒素源の濃度は、約20 g/L未満、好ましくは約10 g/L未満、より好ましくは約5 g/L未満である。さらに、いくつかの場合には、培養中に培養培地から窒素源を枯渇させることが望ましい。

20

【0162】

有効な培養培地は、無機塩、ビタミン、微量金属または成長プロモーターなどの他の化合物を含有してよい。このような他の化合物は、有効な培地中の炭素、窒素または無機物供給源の中に存在してもよく、培地に特異的に添加することもできる。

30

【0163】

培養培地は、適切なリン酸源も含有してよい。このようなリン酸源は、無機リン酸源および有機リン酸源の両方を含む。好ましいリン酸源としては、これだけに限定されないが、リン酸二水素ナトリウムまたはリン酸一水素ナトリウム、リン酸二水素カリウムまたはリン酸一水素カリウム、リン酸アンモニウムならびにこれらの混合物などのリン酸塩が挙げられる。一般には、培養培地中のリン酸の濃度は約1.0 g/L超、好ましくは約2.0 g/L超、より好ましくは約5.0 g/L超である。しかし、ある特定の濃度を超えると、リン酸を培養培地に添加することは、微生物の成長のために有利ではない。したがって、培養培地中のリン酸の濃度は、一般には約20 g/L未満、好ましくは約15 g/L未満、より好ましくは約10 g/L未満である。

40

【0164】

適切な培養培地は、マグネシウムの供給源も、好ましくは硫酸マグネシウム七水和物などの生理的に許容される塩の形態で含んでよいが、同様の量のマグネシウムをもたらず濃度の他のマグネシウム源を使用することができる。一般には、培養培地中のマグネシウムの濃度は約0.5 g/L超、好ましくは約1.0 g/L超、より好ましくは約2.0 g/L超である。しかし、ある特定の濃度を超えると、マグネシウムを培養培地に添加することは微生物の成長のために有利ではない。したがって、培養培地中のマグネシウムの濃度

50

は、一般には、約10 g/L未満、好ましくは約5 g/L未満、より好ましくは約3 g/L未満である。さらに、いくつかの場合には、培養中に培養培地からマグネシウム源を枯渇させることが望ましい。

【0165】

一部の実施形態では、培養培地は、クエン酸三ナトリウムの二水和物などの生物学的に許容されるキレート化剤も含んでよい。このような例では、培養培地中のキレート化剤の濃度は約0.2 g/L超、好ましくは約0.5 g/L超、より好ましくは約1 g/L超である。しかし、ある特定の濃度を超えると、キレート化剤を培養培地に添加することは微生物の成長のために有利ではない。したがって、培養培地中のキレート化剤の濃度は、一般には、約10 g/L未満、好ましくは約5 g/L未満、より好ましくは約2 g/L未満である。

10

【0166】

培養培地は、培養培地の所望のpHを維持するために生物学的に許容される酸または塩基を最初に含んでもよい。生物学的に許容される酸としては、これだけに限定されないが、塩酸、硫酸、硝酸、リン酸およびこれらの混合物が挙げられる。生物学的に許容される塩基としては、これだけに限定されないが、水酸化アンモニウム、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムおよびこれらの混合物が挙げられる。一部の実施形態では、使用される塩基は水酸化アンモニウムである。

【0167】

培養培地は、これだけに限定されないが塩化カルシウムを含めた生物学的に許容されるカルシウム源も含んでよい。一般には、培養培地中の塩化カルシウム二水和物などのカルシウム源の濃度は、約5 mg/Lから約2000 mg/Lまでの範囲内、好ましくは約20 mg/Lから約1000 mg/Lまでの範囲内、より好ましくは約50 mg/Lから約500 mg/Lまでの範囲内である。

20

【0168】

培養培地は、塩化ナトリウムも含んでよい。一般には、培養培地中の塩化ナトリウムの濃度は、約0.1 g/Lから約5 g/Lまでの範囲内、好ましくは約1 g/Lから約4 g/Lまでの範囲、より好ましくは約2 g/Lから約4 g/Lまでの範囲内である。

【0169】

一部の実施形態では、培養培地は、微量金属も含んでよい。このような微量金属は、便宜上、培養培地の残りの部分とは別に調製することができるストック溶液として培養培地に添加することができる。一般には、培養培地に添加されるこのような微量金属溶液の量は、約1 mL/L超、好ましくは約5 mL/L超、より好ましくは約10 mL/L超である。しかし、ある特定の濃度を超えると、微量金属を培養培地に添加することは微生物の成長のために有利ではない。したがって、培養培地に添加されるこのような微量金属溶液の量は、一般には、約100 mL/L未満、好ましくは約50 mL/L未満、より好ましくは約30 mL/L未満である。微量金属をストック溶液に添加することに加えて、個々の成分を、それぞれが上記の微量金属溶液の範囲により規定される成分の量に独立に対応する範囲内で別々に添加してもよいことに留意するべきである。

30

【0170】

培養培地は、パントテン酸、ビオチン、カルシウム、パントテン酸、イノシトール、ピリドキシン-HCl、およびチアミン-HClなどの他のビタミンも含んでよい。このようなビタミンは、便宜上、培養培地の残りの部分とは別に調製することができるストック溶液として培養培地に添加することができる。しかし、ある特定の濃度を超えると、ビタミンを培養培地に添加することは微生物の成長のために有利ではない。

40

【0171】

本明細書に記載の発酵方法は、これだけに限定されないが、回分、流加、細胞再利用、連続および半連続を含めた従来の培養方式で実施することができる。一部の実施形態では、発酵は流加方式で行われる。このような場合、発酵の産生段階の間のパントテン酸を含めた培地の成分のいくつかは培養中に枯渇させる。一部の実施形態では、このような成分

50

を、例えば産生段階の最初に比較的高濃度で培養物に補充し、その結果、添加が必要になるまでの期間にわたって成長および／またはイソプレノイド産生を支持することができる。これらの成分の好ましい範囲を、レベルが培養物から枯渇したら添加を行うことによって培養全体を通して維持する。培養培地中の成分のレベルは、例えば、定期的に培養培地から試料採取し、濃度についてアッセイすることによってモニターすることができる。あるいは、標準の培養手順を展開したら、培養全体を通して特定の時間における既知のレベルに対応する時間設定した間隔で添加を行うことができる。当業者には理解される通り、栄養分の消費の速度は、培養中に培地の細胞密度が上昇するにつれて上昇する。さらに、外来微生物が培養培地中に導入されることを回避するために、当技術分野で公知の無菌添加法を使用して添加を実施する。さらに、培養中に少量の消泡剤を添加することができる。

10

【0172】

培養培地の温度は、遺伝子改変細胞の成長および／またはイソプレノイドの産生に適した任意の温度であってよい。例えば、培養培地に種菌を接種する前に、培養培地を約20℃から約45℃までの範囲内の温度、好ましくは約25℃から約40℃までの範囲内の温度、より好ましくは約28℃から約32℃までの範囲内の温度にし、その温度で維持することができる。

【0173】

培養培地のpHは、酸または塩基を培養培地に添加することによって制御することができる。pHを制御するためにアンモニアを使用する場合では、アンモニアは培養培地中の窒素源としての機能も都合よく果たす。pHは約3.0から約8.0まで、より好ましくは約3.5から約7.0まで、最も好ましくは約4.0から約6.5までで維持することが好ましい。

20

【0174】

一部の実施形態では、培養培地のグルコース濃度などの炭素源濃度を培養中にモニターする。培養培地のグルコース濃度は、例えば、上清、例えば培養培地の無細胞成分などのグルコース濃度をモニターするために使用することができるグルコースオキシダーゼ酵素試験または高圧液体クロマトグラフィーの使用などの公知の技法を使用してモニターすることができる。前記の通り、炭素源濃度は、細胞の成長阻害が起こるレベルよりも低く維持するべきである。このような濃度は生物体によって変動し得るが、炭素源としてのグルコースに関しては、約60g/Lを超えるグルコース濃度で細胞の成長阻害が起こり、これは試験によって容易に決定することができる。したがって、グルコースを炭素源として使用する場合、グルコースを発酵槽に送り込み、検出限界未満に維持することが好ましい。あるいは、培養培地中のグルコース濃度を約1g/Lから約100g/Lまでの範囲内、より好ましくは約2g/Lから約50g/Lまでの範囲内、およびさらにより好ましくは約5g/Lから約20g/Lまでの範囲内で維持する。炭素源濃度は、例えば、実質的に純粋なグルコース溶液を添加することによって所望のレベル内に維持することができるが、元の培養培地の一定分量を添加することによって培養培地の炭素源濃度を維持することが許容され、それが好ましい場合がある。元の培養培地の一定分量の使用は、培地中の他の栄養分（例えば、窒素源およびリン酸源）の濃度を同時に維持することができるので、望ましい場合がある。同様に、培養培地中の微量金属濃度を、微量金属溶液の一定分量を添加することによって維持することができる。

30

40

【0175】

5.6.12 イソプレノイドの回収

イソプレノイドが宿主細胞によって産生されたら、それを、その後の使用のために、当技術分野で公知の任意の適切な分離および精製方法を使用して回収または単離することができる。一部の実施形態では、イソプレノイドを含む有機相を発酵物から遠心分離によって分離する。他の実施形態では、イソプレノイドを含む有機相を発酵物から自然に分離させる。他の実施形態では、イソプレノイドを含む有機相を発酵物から解乳化剤および／または造核剤を発酵反応物に添加することによって分離する。解乳化剤の実例としては、凝

50

集剤および凝固薬が挙げられる。造核剤の実例としては、イソプレノイド自体の液滴ならびにドデカン、ミリスチン酸イソプロピル (isopropyl myristate)、およびオレイン酸メチルなどの有機溶媒が挙げられる。

【0176】

これらの細胞において産生されるイソプレノイドは、培養上清中に存在し、かつ／または宿主細胞に付随し得る。イソプレノイドが宿主細胞に付随する実施形態では、イソプレノイドの回収は、細胞を透過処理または溶解する方法を含み得る。その代わりに、またはそれと同時に、これだけに限定されないが、クロマトグラフィー、抽出、溶媒抽出、膜分離、電気透析、逆浸透、蒸留、化学的な誘導体化および結晶化を含めた回収プロセスを使用して培養培地中のイソプレノイドを回収することができる。

10

【0177】

一部の実施形態では、イソプレノイドを有機相中に存在し得る他の産物から分離する。一部の実施形態では、分離は、吸着、蒸留、ガス-液体抽出（ストリップング）、液液抽出（溶媒抽出）、限外濾過、および標準のクロマトグラフィー技法を使用して実現される。

【0178】

5.7 ポリケチド

一部の実施形態では、本明細書で提供される遺伝子改変宿主細胞は、アセチルCoAからポリケチドを産生することができる。ポリケチドは、協調した活性部位の群を含有する大きな多酵素タンパク質複合体である、ポリケチドシンターゼ（PKS）と称される酵素活性の集合により触媒される逐次的な反応によって合成される。ポリケチド生合成は、アセチルCoA、プロピオニルCoA、ブチリルCoAなどの単純な2炭素構成要素、3炭素構成要素、4炭素構成要素およびそれらの活性化された誘導体であるマロニルCoA、メチルマロニルCoAおよびエチルマロニルCoAから始まり、主にクライゼン縮合反応によるマロニルCoA由来単位の脱炭酸縮合を通じて段階的に進行する。PKS遺伝子は通常、細菌において、および真核生物における遺伝子クラスターにおいて1つのオペロン内に組織化されている。3つの型のポリケチドシンターゼが特徴付けられている：I型ポリケチドシンターゼは、大きな、高度なモジュラータンパク質であり、2つのクラス：1）ドメインを周期的に再使用する反復PKSおよび2）別々のモジュール配列を含有し、ドメインを繰り返さないモジュラーPKSに細分される。II型ポリケチドシンターゼは、単機能性タンパク質の凝集体であり、III型ポリケチドシンターゼはアシル担体タンパク質ドメインを使用しない。

20

30

【0179】

連続的な鎖伸長ステップのそれぞれに下記の通りケト還元、脱水およびエノイル、還元の固定されたひと続きがある脂肪酸の生合成とは異なり、ポリケチド生合成の個々の鎖伸長中間体は、官能基修飾の全てを受けるか、官能基修飾の一部を受けるか、官能基修飾を受けないかであり、それにより、多数の化学的に多様な産物がもたらされる。異なる開始単位および鎖伸長単位の使用ならびに新しい立体異性体の生成により、さらなる複雑さが生じる。

【0180】

ポリケチドシンターゼにより導かれる完全なポリケチド合成の順序は以下に従う（N末端からC末端の順序で）：アシル担体タンパク質への最初の炭素構成要素の開始またはローディング、成長しているマクロライド鎖の伸長を触媒する伸長モジュールおよび合成されたマクロライドの放出を触媒する終結モジュール。この生合成において活性な成分ドメインまたは別々の酵素機能性としては、開始剤、伸長剤および中間アシル単位のローディングのためのアシルトランスフェラーゼ；成長しているマクロライドをチオールエステルとして保持するアシル担体タンパク質；鎖伸長を触媒するβ-ケト-アシルシンターゼ；アルコール官能性への最初の還元に関与するβ-ケトレダクターゼ；水を排除して不飽和チオールエステルを生じさせるデヒドラターゼ；最終的な還元を触媒して完全に飽和させるエノイルレダクターゼ、およびマクロライドの放出および環化を触媒するチオールエ

40

50

ステラーゼが挙げられる。

一部の実施形態では、本明細書に開示されている遺伝子改変微生物は、アセチルC o AおよびマロニルC o Aの少なくとも1つをアシル担体タンパク質と縮合させることができる酵素、例えばアシルトランスフェラーゼをコードする異種ヌクレオチド配列を含む。

【0181】

一部の実施形態では、本明細書に開示されている遺伝子改変微生物は、アセチルC o AおよびマロニルC o Aからなる群から選択される第1の反応物とマロニルC o AまたはメチルマロニルC o Aからなる群から選択される第2の反応物を縮合させてポリケチド産物を形成することができる酵素、例えば β -ケート-アシルシンターゼをコードする異種ヌクレオチド配列を含む。

10

【0182】

一部の実施形態では、本明細書に開示されている遺伝子改変微生物は、ポリケチド化合物上の β -ケート化学基を β -ヒドロキシ基に還元することができる酵素、例えば β -ケートレダクターゼをコードする異種ヌクレオチド配列を含む。

【0183】

一部の実施形態では、本明細書に開示されている遺伝子改変微生物は、ポリケチド化合物のアルカン化学基を脱水させて α - β -不飽和アルケンを産生することができる酵素、例えばデヒドラターゼをコードする異種ヌクレオチド配列を含む。

【0184】

一部の実施形態では、本明細書に開示されている遺伝子改変微生物は、ポリケチド化合物の α - β -二重結合を飽和アルカンに還元することができる酵素、例えばエノイルレダクターゼをコードする異種ヌクレオチド配列を含む。

20

【0185】

一部の実施形態では、本明細書に開示されている遺伝子改変微生物は、アシル担体タンパク質からポリケチド化合物を加水分解することができる酵素、例えばチオエステラーゼをコードする異種ヌクレオチド配列を含む。

【0186】

一部の実施形態では、ポリケチド産生細胞は、K S触媒領域を含む酵素をコードする1種または複数種の異種ヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、ポリケチド産生細胞は、A T触媒領域を含む酵素をコードする1種または複数種の異種ヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、ポリケチド産生細胞は、A T触媒領域を含む酵素をコードする2種以上の異種ヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、ポリケチド産生細胞は、C L F触媒領域を含む酵素をコードする1種または複数種の異種ヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、ポリケチド産生細胞は、A C P活性を含む酵素をコードする1種または複数種の異種ヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、ポリケチド産生細胞は、A C P活性を含む酵素をコードする2種以上の異種ヌクレオチド配列を含む。

30

【0187】

特定の実施形態では、ポリケチド産生細胞は、最小の芳香族P K S系、例えば、それぞれK S触媒領域を含む酵素、A T触媒領域を含む酵素、C L F触媒領域を含む酵素、およびA C P活性を含む酵素をコードする異種ヌクレオチド配列を含む。特定の実施形態では、ポリケチド産生細胞は、最小のモジュラーP K S系、例えば、それぞれK S触媒領域を含む酵素、A T触媒領域を含む酵素、およびA C P活性を含む酵素をコードする異種ヌクレオチド配列を含む。さらに別の特定の実施形態では、ポリケチド産生細胞は、新規のポリケチド合成のためのモジュラー芳香族P K S系、例えば、それぞれK S触媒領域を含む酵素、A T触媒領域を含む1種または複数種の酵素、およびA C P活性を含む1種または複数種の酵素をコードする異種ヌクレオチド配列を含む。

40

【0188】

一部の実施形態では、最小のP K S系、例えば、最小の芳香族P K S系または最小のモジュラーP K S系を含むポリケチド産生細胞は、最終産物ポリケチドの産生に寄与し得る追加の触媒活性をさらに含む。一部の実施形態では、ポリケチド産生細胞は、新生ポリケ

50

チド骨格の環化を容易にするシクラーゼ（CYC）触媒領域を含む酵素をコードする１種または複数種の異種ヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、ポリケチド産生細胞は、ケトレダクターゼ（KR）触媒領域を含む酵素をコードする１種または複数種の異種ヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、ポリケチド産生細胞は、アロマトラーゼ（ARO）触媒領域を含む酵素をコードする１種または複数種の異種ヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、ポリケチド産生細胞は、エノイルレダクターゼ（ER）触媒領域を含む酵素をコードする１種または複数種の異種ヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、ポリケチド産生細胞は、チオエステラーゼ（TE）触媒領域を含む酵素をコードする１種または複数種の異種ヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、ポリケチド産生細胞は、ACPのパンテテイル化をもたらしホロACPシンターゼ活性を含む酵素をコードする１種または複数種の異種ヌクレオチド配列をさらに含む。

10

【0189】

一部の実施形態では、ポリケチド産生細胞は、合成後ポリケチド修飾活性を付与する１種または複数種の異種ヌクレオチド配列をさらに含む。一部の実施形態では、ポリケチド産生細胞は、例えば、抗生物質活性を有するポリケチドが望まれる場合に、ポリケチドの合成後修飾をもたらしグリコシラーゼ活性を含む酵素をコードする１種または複数種の異種ヌクレオチド配列をさらに含む。一部の実施形態では、ポリケチド産生細胞は、ヒドロキシラーゼ活性を含む酵素をコードする１種または複数種の異種ヌクレオチド配列をさらに含む。一部の実施形態では、ポリケチド産生細胞は、エポキシダーゼ活性を含む酵素をコードする１種または複数種の異種ヌクレオチド配列をさらに含む。一部の実施形態では、ポリケチド産生細胞は、メチラーゼ活性を含む酵素をコードする１種または複数種の異種ヌクレオチド配列をさらに含む。

20

【0190】

一部の実施形態では、ポリケチド産生細胞は、これだけに限定されないが、ポリケチド合成経路の酵素の少なくとも１種、および、アセチルCoA化合物を修飾して、マクロライド、抗生物質、抗真菌薬、細胞増殖抑制化合物、抗コレステロール化合物、抗寄生虫化合物、コクシジウム抑制化合物、動物成長プロモーターまたは殺虫剤などのポリケチド産物形成することができる酵素を含めた生合成酵素をコードする１種または複数種の異種ヌクレオチド配列をさらに含む。一部の実施形態では、HACD化合物はポリエンである。一部の実施形態では、HACD化合物は環状ラクトンである。一部の実施形態では、HACD化合物は、14員、15員、または16員のラクトン環を含む。一部の実施形態では、HACD化合物は、ポリケチドマクロライド、抗生物質、抗真菌薬、細胞増殖抑制薬、抗コレステロール薬、抗寄生虫薬、コクシジウム抑制薬、動物成長プロモーターおよび殺虫剤からなる群から選択されるポリケチドである。

30

【0191】

一部の実施形態では、ポリケチド産生細胞は、異種ヌクレオチド配列、例えば、これだけに限定されないが、以下のポリケチドから選択されるポリケチドを産生することができるPKS酵素およびポリケチド修飾酵素をコードする配列を含む：アベルメクチン（例えば、米国特許第5,252,474号；米国特許第4,703,009号；欧州特許公開第118,367号；MacNeilら、1993年、「Industrial Microorganisms: Basic and Applied Molecular Genetics」；Baltz、Hegeman、& Skatrud編（ASM）、245～256頁、「A Comparison of the Genes Encoding the Polyketide Synthases for Avermectin, Erythromycin, and Nemadectin」；MacNeilら、1992年、Gene 115巻：119～125頁；ならびにIkedaおよびOmura、1997年、Chem. Res. 97巻：2599～2609頁を参照されたい）；カンジジジン（FR008）（例えば、Huら、1994年、Mol. Microbiol. 14巻：163～172頁を参照されたい）；カルボマイシン、クラマイシン（例えば、Berghら、Biotechnol Appl Bio

40

50

hem. 1992年2月;15巻(1号):80~9頁を参照されたい);ダウノルビ
 シン(例えば、J Bacteriol. 1994年10月;176巻(20号):6
 270~80頁を参照されたい);エポチロン(例えば、PCT公開第99/66028
 号;およびPCT公開第00/031247号を参照されたい);エリスロマイシン(例
 えば、PCT公開第93/13663号;米国特許第6,004,787号;米国特許第
 5,824,513号;Donadioら、1991年、Science 252巻:6
 75~9頁;およびCortesら、1990年11月8日、Nature 348巻:
 176~8頁を参照されたい);FK-506(例えば、Motamediら、1998
 年;Eur. J Biochem. 256巻:528~534頁;およびMotam
 ediら、1997年、Eur. J Biochem. 244巻:74~80頁を参
 照されたい);FK-520(例えば、PCT公開第00/020601号;およびNi
 elsenら、1991年、Biochem. 30巻:5789~96頁を参照されたい);
 グリセウシン(Griseusin)(例えば、Yuら、J Bacteriol.
 1994年5月;176巻(9号):2627~34頁を参照されたい);ロバスタ
 チン(例えば、米国特許第5,744,350号を参照されたい);フレノリシン(Fr
 enolycin)(例えば、Khoslaら、Bacteriol. 1993年4月
 ;175巻(8号):2197~204頁;およびBibbら、Gene 1994年5
 月3日;142巻(1号):31~9頁を参照されたい);グラナチシン(例えば、Sh
 ermanら、EMBO J. 1989年9月;8巻(9号):2717~25頁;お
 よびBechtoldら、Mol Gen Genet. 1995年9月20日;24
 8巻(5号):610~20頁を参照されたい);メデルマイシン(例えば、Ichin
 oseら、Microbiology 2003年7月;149巻(Pt 7号):163
 3~45頁を参照されたい);モネンシン(例えば、Arrowsmithら、Mol
 Gen Genet. 1992年8月;234巻(2号):254~64頁を参照され
 たい);ノナクチン(例えば、FEMS Microbiol Lett. 2000年
 2月1日;183巻(1号):171~5頁を参照されたい);ナナオマイシン(例
 えば、Kitaoraら、J Antibiot (Tokyo)、1980年7月;33巻(7号)
):711~6頁を参照されたい);ネマデクチン(例えば、MacNeillら、199
 3年、上記を参照されたい);ニダマイシン(Niddamycin)(例えば、PCT
 公開第98/51695号;およびKakavasら、1997年、J. Bacter
 iol. 179巻:7515~7522頁を参照されたい);オレアンドマイシン(例
 えば、Swanら、1994年、Mol. Gen. Genet. 242巻:358
 ~362頁;PCT公開第00/026349号;Olanoら、1998年、Mol.
 Gen. Genet. 259巻(3号):299~308頁;およびPCT特許出
 願公開第WO99/05283号を参照されたい);オキシテトラサイクリン(例
 えば、Kimら、Gene. 1994年4月8日;141巻(1号):141~2頁を参照さ
 れたい);ピクロマイシン(例えば、PCT公開第99/61599号;PCT公開第0
 0/00620号;Xueら、1998年、Chemistry & Biology
 5巻(11号):661~667頁;Xueら、1998年10月、Proc. Natl.
 Acad. Sci. USA 95巻:12111~12116頁を参照されたい);
 プラテノリド(例えば、欧州特許公開第791,656号;および米国特許第5,
 945,320号を参照されたい);ラパマイシン(例えば、Schweckeら、19
 95年8月、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92巻:783
 9~7843頁;およびAparicioら、1996年、Gene 169巻:9~1
 6頁を参照されたい);リファマイシン(例えば、PCT公開第WO98/07868号
 ;およびAugustら、1998年2月13日、Chemistry & Biolo
 gy、5巻(2号):69~79頁を参照されたい);ソランギウム(Sorangium)
 (例えば、米国特許第6,090,601号を参照されたい);ソラフェン(例
 えば、米国特許第5,716,849号;Schuppら、1995年、J. Bacter
 iology 177巻:3673~3679頁を参照されたい);スピノシン(例えば

10

20

30

40

50

、PCT公開第99/46387号を参照されたい)；スピラマイシン(例えば、米国特許第5,098,837号を参照されたい)；テトラセノマイシン(例えば、Summersら、J Bacteriol. 1992年3月；174巻(6号)：1810～20頁；およびShenら、J Bacteriol. 1992年6月；174巻(11号)：3818～21頁を参照されたい)；テトラサイクリン(例えば、J Am Chem Soc. 2009年12月9日；131巻(48号)：17677～89頁を参照されたい)；タイロシン(例えば、米国特許第5,876,991号；米国特許第5,672,497号；米国特許第5,149,638号；欧州特許公開第791,655号；欧州特許公開第238,323号；Kuhstossら、1996年、Gene 183巻：231～6頁；ならびにMerson-Davies およびCundliffe、1994年、Mol. Microbiol. 13巻：349～355頁を参照されたい)；および6-メチルサリチル酸(methylsalicylic acid)(例えば、Richardsonら、Metab Eng. 1999年4月；1巻(2号)：180～7頁；およびShaoら、Biochem Biophys Res Commun. 2006年6月23日；345巻(1号)：133～9頁を参照されたい)。

10

【0192】

5.8 脂肪酸

一部の実施形態では、本明細書で提供される遺伝子改変宿主細胞は、アセチルCoAから脂肪酸を産生することができる。脂肪酸は、脂肪酸シンターゼにより触媒されるアセチルCoAおよびマロニルCoAからの一連の脱炭酸クライゼン縮合反応によって合成される。ポリケチドシンターゼと同様に、脂肪酸シンターゼは単一の酵素ではなく、272 kDaの多機能性ポリペプチドで構成され、基質が1つの機能性ドメインから次の機能性ドメインに渡される酵素系である。2つの主要なクラスの脂肪酸シンターゼが特徴付けられている：I型脂肪酸シンターゼは、哺乳動物および真菌(しかし真菌のシンターゼと哺乳動物のシンターゼの構造的配置は異なる)および細菌のCMN群(コリネバクテリア、マイコバクテリア、およびノカルジア)に共通する単一の多機能性ポリペプチドである。古細菌および真正細菌に見いだされるII型シンターゼは、脂肪酸の合成に関与する一連の別個の単機能性酵素である。シンターゼの2つのクラスにおける脂肪酸の伸長および還元機構は、これらの触媒事象に関与する酵素ドメインの大部分が2つのクラスの間で相同であるので、同じである。

20

30

【0193】

脱炭酸クライゼン縮合反応における脂肪酸鎖の伸長の各ラウンド後に、ケトレダクターゼ、デヒドラターゼ、およびエノールレダクターゼの逐次的な作用によってβ-ケト基が完全に飽和した炭素鎖に還元される。成長している脂肪酸鎖はアシル担体タンパク質に付着したこれらの活性部位間を移動し、最終的には、炭素鎖の長さが16(パルミチン酸(palmitic acid))に達するとチオエステラーゼの作用によって放出される。

【0194】

一部の実施形態では、本明細書に開示されている遺伝子改変微生物は、これだけに限定されないが、脂肪酸合成経路の酵素の少なくとも1種、およびアセチルCoA化合物を修飾して、パルミチン酸、パルミトイルCoA、パルミトレイン酸、サピエン酸、オレイン酸、リノール酸、α-リノレン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、エルカ酸、およびドコサヘキサエン酸などの脂肪酸産物を形成することができる酵素を含めた生合成酵素をコードする異種ヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、HACD化合物は、パルミチン酸、パルミトイルCoA、パルミトレイン酸、サピエン酸、オレイン酸、リノール酸、α-リノレン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、エルカ酸、およびドコサヘキサエン酸からなる群から選択される脂肪酸である。

40

【0195】

一部の実施形態では、本明細書に開示されている遺伝子改変微生物は、アセチルCoA

50

およびマロニルC o Aの少なくとも1つをアシル担体タンパク質と共有結合により連結することができる酵素、例えばアシルトランスフェラーゼをコードする異種ヌクレオチド配列を含む。

【0196】

一部の実施形態では、本明細書に開示されている遺伝子改変微生物は、それぞれアシル担体タンパク質（ACP）に結合したアセチル化学的部分とマロニル化学的部分を縮合させてアセトアセチル-ACPを形成することができる酵素、例えばβ-ケトアシル-ACPシンターゼをコードする異種ヌクレオチド配列を含む。

【0197】

一部の実施形態では、本明細書に開示されている遺伝子改変微生物は、NADPHを用いてアセトアセチル-ACP内の二重結合を還元してD-3-ヒドロキシブチリルヒドロキシラーゼ-ACP内にヒドロキシル基を形成することができる酵素、例えば、β-ケトアシル-ACPレダクターゼをコードする異種ヌクレオチド配列を含む。

10

【0198】

一部の実施形態では、本明細書に開示されている遺伝子改変微生物は、D-3-ヒドロキシブチリルヒドロキシラーゼ-ACPを脱水してベータ炭素とガンマ炭素の間に二重結合を創出し、それによりクロトニル-ACPを形成することができる酵素、例えばβ-ヒドロキシアシル-ACPデヒドラーゼをコードする異種ヌクレオチド配列を含む。

【0199】

一部の実施形態では、本明細書に開示されている遺伝子改変微生物は、NADPHを用いてクロトニルACPを還元してブチリル-ACPを形成することができる酵素、例えばエノイルACPレダクターゼをコードする異種ヌクレオチド配列を含む。

20

【0200】

一部の実施形態では、本明細書に開示されている遺伝子改変微生物は、アシル担体タンパク質からC16アシル化合物を加水分解してパルミチン酸を形成することができる酵素、例えばチオエステラーゼをコードする異種ヌクレオチド配列を含む。

【0201】

一部の実施形態では、脂肪酸産生細胞は、遺伝子改変されていない親細胞と比較して1種または複数種の脂肪酸の産生の増大をもたらすために、アセチルC o Aシンターゼおよび／またはマロニルC o Aシンターゼをコードする1種または複数種の異種ヌクレオチド配列を含む。

30

【0202】

例えば、アセチルC o A産生を増大させるために、以下の遺伝子のうちの1つまたは複数細胞において発現させることができる：p d h、p a n K、a c e E F（ピルビン酸および2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ複合体のE I pデヒドロゲナーゼ成分およびE 2 pジヒドロリポアミドアシルトランスフェラーゼ成分をコードする）、f a b H、f a b D、f a b G、a c p P、およびf a b F。このような酵素をコードするヌクレオチド配列の実例としては、これだけに限定されないが、p d h（B A B 3 4 3 8 0、A A C 7 3 2 2 7、A A C 7 3 2 2 6）、p a n K（c o a A、A A C 7 6 9 5 2としても公知）、a c e E F（A A C 7 3 2 2 7、A A C 7 3 2 2 6）、f a b H（A A C 7 4 1 7 5）、f a b D（A A C 7 4 1 7 6）、f a b G（A A C 7 4 1 7 7）、a c p P（A A C 7 4 1 7 8）、f a b F（A A C 7 4 1 7 9）が挙げられる。

40

【0203】

一部の実施形態では、細胞において脂肪酸分解に関与するタンパク質をコードする遺伝子を減弱させるまたはノックアウトすることにより、脂肪酸レベルの上昇をもたらすことができる。例えば、f a d E、g p s A、i d h A、p f l b、a d h E、p t a、p o x B、a c k A、および／またはa c k Bの発現レベルを、工学的に操作された宿主細胞において、当技術分野で公知の技法を使用して減弱させるまたはノックアウトすることができる。このようなタンパク質をコードするヌクレオチド配列の実例としては、これだけに限定されないが、f a d E（A A C 7 3 3 2 5）、g s p A（A A C 7 6 6 3 2）、I

50

d h A (A A C 7 4 4 6 2)、p f l b (A A C 7 3 9 8 9)、a d h E (A A C 7 4 3 2 3)、p t a (A A C 7 5 3 5 7)、p o x B (A A C 7 3 9 5 8)、a c k A (A A C 7 5 3 5 6)、および a c k B (B A B 8 1 4 3 0) が挙げられる。生じた宿主細胞を適切な環境で成長させると、アセチル C o A 産生レベルが上昇する。

【0204】

一部の実施形態では、脂肪酸産生細胞は、アセチル C o A をマロニル C o A に変換することができる酵素、例えば、多サブユニット A c c A B C D タンパク質をコードする異種ヌクレオチド配列を含む。A c c A B C D をコードする適切なヌクレオチド配列の実例としては、これだけに限定されないが、受託番号 A A C 7 3 2 9 6、E C 6 . 4 . 1 . 2 が挙げられる。

10

【0205】

一部の実施形態では、脂肪酸産生細胞は、リパーゼをコードする異種ヌクレオチド配列を含む。リパーゼをコードする適切なヌクレオチド配列の実例としては、これだけに限定されないが、受託番号 C A A 8 9 0 8 7 および C A A 9 8 8 7 6 が挙げられる。

【0206】

一部の実施形態では、細胞において、脂肪酸生合成経路の初期のステップ（例えば、a c c A B C D、f a b H、および f a b l）を阻害する長鎖アシル A C P のレベルの上昇を導く可能性がある P l s B を阻害することにより、脂肪酸レベルの上昇を実施することができる。P l s B の発現レベルは、工学的に操作された宿主細胞において、当技術分野で公知の技法を使用して減弱させるまたはノックアウトすることができる。P l s B をコードする適切なヌクレオチド配列の実例としては、これだけに限定されないが、受託番号 A A C 7 7 0 1 1 が挙げられる。特定の実施形態では、p l s B D 3 1 I E 変異を使用して、細胞における利用可能なアシル C o A の量を増大させることができる。

20

【0207】

一部の実施形態では、細胞において、f a b A の抑制をもたらす s f a 遺伝子を過剰発現させることにより、一価不飽和脂肪酸の産生の増大をもたらすことができる。s f a をコードする適切なヌクレオチド配列の実例としては、これだけに限定されないが、受託番号 A A N 7 9 5 9 2 が挙げられる。

【0208】

一部の実施形態では、細胞において、脂肪酸基質の鎖長を制御する酵素、例えばチオエステラーゼの発現を調節することにより、脂肪酸レベルの上昇をもたらすことができる。一部の実施形態では、脂肪酸産生細胞は、t e s 遺伝子または f a t 遺伝子を過剰発現するように改変されている。適切な t e s ヌクレオチド配列の実例としては、これだけに限定されないが、受託番号：(t e s A : A A C 7 3 5 9 6、E . c o l i 由来、C₁₈:₁ 脂肪酸を産生することができる) および (t e s B : A A C 7 3 5 5 5、E . c o l i 由来) が挙げられる。適切な f a t ヌクレオチド配列の実例としては、これだけに限定されないが、(f a t B : Q 4 1 6 3 5 および A A A 3 4 2 1 5、U m b e l l u l a r i a c a l i f o r n i a 由来、C₁₂:₀ 脂肪酸を産生することができる)、(f a t B 2 : Q 3 9 5 1 3 および A A C 4 9 2 6 9、C u p h e a h o o k e r i a n a 由来、C₈:₀ ~ C₁₀:₀ 脂肪酸を産生することができる)、(f a t B 3 : A A C 4 9 2 6 9 および A A C 7 2 8 8 1、C u p h e a h o o k e r i a n a 由来、C₁₄:₀ ~ C₁₆:₀ 脂肪酸を産生することができる)、(f a t B : Q 3 9 4 7 3 および A A C 4 9 1 5 1、C i n n a m o n u m c a m p h o r u m 由来、C₁₄:₀ 脂肪酸を産生することができる)、(f a t B [M 1 4 1 T] : C A A 8 5 3 8 8、A r a b i d o p s i s t h a l i a n a 由来、C₁₆:₁ 脂肪酸を産生することができる)、(f a t A : N P 1 8 9 1 4 7 および N P 1 9 3 0 4 1、A r a b i d o p s i s t h a l i a n a 由来、C₁₈:₁ 脂肪酸を産生することができる)、(f a t A : C A C 3 9 1 0 6、B r a d v r h i i z o b i u m j a p o n i c u m 由来、C₁₈:₁ 脂肪酸を優先的に産生することができる)、(f a t A : A A C 7 2 8 8 3、C u p h e a h o o k e r i a n a 由来、C₁₈:₁ 脂肪酸を産生することができる)、および (f a t A 1

30

40

50

、AAL79361、Helianthus annuus 由来)が挙げられる。

【0209】

一部の実施形態では、細胞において、当技術分野で公知の技法を使用してチオエステラーゼC₁₈の発現または活性を減弱させることにより、C₁₀脂肪酸のレベルの上昇をもたらすことができる。チオエステラーゼC₁₈をコードする適切なヌクレオチド配列の実例としては、これだけに限定されないが、受託番号AAC73596およびPOADA1が挙げられる。他の実施形態では、細胞において、当技術分野で公知の技法を使用してチオエステラーゼC₁₀の発現または活性を増大させることにより、C₁₀脂肪酸のレベルの上昇をもたらすことができる。チオエステラーゼC₁₀をコードする適切なヌクレオチド配列の実例としては、これだけに限定されないが、受託番号Q39513が挙げられる。

10

【0210】

一部の実施形態では、細胞において、当技術分野で公知の技法を使用して非C₁₄脂肪酸を産生する内因性チオエステラーゼの発現または活性を減弱させることにより、C₁₄脂肪酸のレベルの上昇をもたらすことができる。他の実施形態では、細胞において、当技術分野で公知の技法を使用して基質C₁₄-ACPを使用するチオエステラーゼの発現または活性を増大させることにより、C₁₄脂肪酸のレベルの上昇をもたらすことができる。このようなチオエステラーゼをコードする適切なヌクレオチド配列の実例としては、これだけに限定されないが、受託番号Q39473が挙げられる。

20

【0211】

一部の実施形態では、細胞において、当技術分野で公知の技法を使用して非C₁₂脂肪酸を産生する内因性チオエステラーゼの発現または活性を減弱させることにより、C₁₂脂肪酸のレベルの上昇をもたらすことができる。他の実施形態では、細胞において、当技術分野で公知の技法を使用して基質C₁₂-ACPを使用するチオエステラーゼの発現または活性を増大させることにより、C₁₂脂肪酸のレベルの上昇をもたらすことができる。このようなチオエステラーゼをコードする適切なヌクレオチド配列の実例としては、これだけに限定されないが、受託番号Q41635が挙げられる。

【0212】

5. 9 他の化合物を産生するためのPK/PTA

一部の実施形態では、本明細書で提供される遺伝子改変宿主細胞（例えば、PK/PTAおよびアセチルホスファターゼ活性、例えば、RHR2、HOR2またはその相同体をコードするポリペプチドの機能的破壊を含む宿主細胞）を、米国特許出願公開第20120156735号に記載の通り、細胞内ピルビン酸から開始されて、例えば、2, 3-ブタンジオール、2-ブタノール、2-ブタノン、バリン、ロイシン、乳酸、リンゴ酸塩、イソアミルアルコール、およびイソブタノールが産生される生合成経路が発現されるように工学的に操作する。生合成経路による産物形成へのピルビン酸の利用可能性を増大させるために、ピルビン酸を利用する生合成経路を発現するように工学的に操作された組換え宿主細胞における酵素ピルビン酸デカルボキシラーゼ(PDC)の破壊が使用されている。ピルビン酸を利用する生合成経路の産物を産生するためにPDC-KO組換え宿主細胞を使用することができるが、PDC-KO組換え宿主細胞はそれらが成長するために、外因性炭素基質の補充（例えば、エタノールまたはアセテート）を必要とする。特に、2種の外因性炭素基質が必要であり、そのうちの一方が所望の産物に変換され、他方は成長するためにこのような補充を必要とする組換え宿主細胞によって完全にまたは部分的にアセチルCoAに変換される。しかし、異種ホスホケトラーゼ経路の発現により、異種PK/PTAでないPDC-KO細胞と比較して、その成長のためにこれらの外因性炭素基質をもたらす必要性が低下するまたは排除される。したがって、アセチルホスフェートのアセテートへの加水分解を触媒することができるRHR2、HOR2またはその相同体の追加の機能的破壊により、これらの細胞において細胞の成長のために利用可能な基質としてのアセチルCoAの供給を増大させるPK/PTAの能力がさらに改善されることが予想される。

30

40

50

【0213】

5. 10 遺伝子改変細胞を作製する方法

本明細書では、上記の改変のうちの1つまたは複数、例えば、PK、PTA、および／または、例えばアセチルCoA由来化合物の生合成経路の酵素をコードする1種または複数種の異種核酸を含むように遺伝子操作された宿主細胞を作出するための方法も提供される。宿主細胞における異種酵素の発現は、酵素をコードするヌクレオチド配列を、宿主細胞における発現を可能にする調節エレメントの制御下で含む核酸を宿主細胞に導入することによって実現することができる。一部の実施形態では、核酸は、染色体外プラスミドである。他の実施形態では、核酸は、ヌクレオチド配列を宿主細胞の染色体に組み込むことができる染色体内組み込みベクターである。

10

【0214】

これらのタンパク質をコードする核酸は、それだけに限定することなく当業者に公知の任意の方法によって宿主細胞に導入することができる（例えば、Hinnenら（1978年）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75巻：1292～3頁；Creggら（1985年）Mol. Cell. Biol. 5巻：3376～3385頁；Goeddelら編、1990年、Methods in Enzymology、185巻、Academic Press, Inc.、CA；Krieger、1990年、Gene Transfer and Expression — A Laboratory Manual、Stockton Press、NY；Sambrookら、1989年、Molecular Cloning — A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、NY；およびAusubelら編、現行版、Current Protocols in Molecular Biology、Greene Publishing Associates and Wiley Interscience、NYを参照されたい）。例示的な技法としては、これだけに限定されないが、スフェロプラスチ法、電気穿孔、PEG1000媒介性形質転換、および酢酸リチウムまたは塩化リチウム媒介性形質転換が挙げられる。

20

【0215】

宿主細胞における酵素のコピー数は、酵素をコードする遺伝子の転写を改変することによって変更することができる。これは、例えば、酵素をコードするヌクレオチド配列のコピー数を改変することによって（例えば、ヌクレオチド配列を含む発現ベクターのより多くもしくはより少ないコピー数を使用することによって、またはヌクレオチド配列の追加のコピーを宿主細胞のゲノムに導入することによって、または宿主細胞のゲノム内のヌクレオチド配列を欠失させるもしくは破壊することによって）、オペロンのポリシストロニックmRNA上のコード配列の順序を変化させること、もしくはオペロンを分割して、それぞれがそれ自体制御エレメントを有する個々の遺伝子にすることによって、またはヌクレオチド配列が作動可能に連結したプロモーターもしくはオペレーターの強度を増大させることによって実現することができる。その代わりに、またはそれに加えて、宿主細胞における酵素のコピー数を、酵素をコードするmRNAの翻訳のレベルを改変することによって変更することができる。これは、例えば、mRNAの安定性を改変すること、リボソーム結合部位の配列を改変すること、酵素コード配列のリボソーム結合部位と開始コドンの間の距離または配列を改変すること、酵素コード領域の開始コドンの5'側の「上流」に位置するもしくはそれと近接するシストロン間領域全体を改変すること、ヘアピンおよび特殊化された配列を使用してmRNA転写物の3'末端を安定化すること、酵素のコドン使用を改変すること、酵素の生合成において使用される稀なコドンtRNAの発現を変更すること、ならびに／または酵素の安定性を、例えば、そのコード配列の変異によって増大させることによって実現することができる。

30

40

【0216】

宿主細胞における酵素の活性は、これだけに限定されないが、宿主細胞において溶解性の増大または減少を示す改変された形態の酵素を発現させること、酵素の活性の阻害をも

50

【 0 2 1 7 】

【 0 2 1 8 】

【 0 2 1 9 】

一部の実施形態では、選択マーカーにより、遺伝子改変微生物における栄養要求性 (auxotrophy) (例えば、栄養要求性 (nutritional auxotrophy)) がレスキューされる。このような実施形態では、親微生物は、アミノ酸またはヌクレオチド生合成経路において機能し、それが非機能的になると親細胞が1種または複数種の栄養分の補充を伴わない培地では成長することができなくなるような1種または複数種の遺伝子産物の機能的破壊を含む。このような遺伝子産物としては、これだけに限定されないが、酵母におけるHIS3、LEU2、LYS1、LYS2、MET15、TRP1、ADE2、およびURA3遺伝子産物が挙げられる。次いで、親細胞を破壊された遺伝子産物の機能的コピーをコードする発現ベクターまたは染色体組み込み構築物で形質転換することによって栄養要求性表現型をレスキューすることができ、生成した遺伝子改変宿主細胞を、親細胞の栄養要求性表現型の喪失に基づいて選択することができる。URA3遺伝子、TRP1遺伝子、およびLYS2遺伝子を選択マーカーとして利用することには、正の選択と負の選択の両方が可能であるので、顕著な利点がある。正の選択はURA3変異、TRP1変異、およびLYS2変異の栄養要求性の補完によって行い、負の選択は特異的な阻害剤、すなわち、それぞれ原栄養株の成長は妨げるが、それぞれURA3変異体、TRP1変異体、およびLYS2変異体の成長は可能にする5-フルオロオロ

ト酸 (FOA)、5-フルオロアントラニル酸、およびアミノアジピン酸 (aAA) に基づく。他の実施形態では、選択マーカーにより、公知の選択方法によって同定することができる他の非致死的欠損または表現型がレスキューされる。

【0220】

本開示の方法、組成物および生物体において有用な具体的な遺伝子およびタンパク質が本明細書に記載されているが、このような遺伝子に対する絶対的な同一性は必要ないことが理解される。例えば、ポリペプチドまたは酵素をコードする配列を含む特定の遺伝子またはポリヌクレオチドを変化させ、活性についてスクリーニングすることができる。一般には、このような変化は、保存的変異およびサイレント変異を含む。このような改変されたまたは変異したポリヌクレオチドおよびポリペプチドを、機能的酵素の発現について当技術分野で公知の方法を使用してスクリーニングすることができる。

10

【0221】

遺伝暗号の固有の縮重に起因して、実質的に同じまたは機能的に同等のポリペプチドをコードする他のポリヌクレオチドも、このような酵素をコードするポリヌクレオチドをクローニングし、それを発現させるために使用することができる。

【0222】

当業者には理解される通り、コード配列を、特定の宿主におけるその発現が増強されるように改変することが有利であり得る。遺伝暗号は64種の可能性のあるコドンに伴い重複するものであるが、大多数の生物体では、一般には、これらのコドンのサブセットが使用される。ある種においてほとんどの場合に利用されるコドンは最適なコドンと称され、それほど利用されないコドンは稀なまたは低使用コドンに分類される。コドンは、時には「コドン最適化」または「種コドンバイアスの制御」と称されるプロセスで宿主の好ましいコドン使用が反映されるように置換することができる。

20

【0223】

特定の原核生物宿主または真核生物宿主に好まれるコドンを含む最適化されたコード配列 (Murrayら、1989年、Nucleic Acids Res. 17巻: 477~508頁) を、例えば、翻訳の速度を増大させるため、または、最適化されていない配列から産生される転写物と比較して半減期が長いことなどの望ましい特性を有する組換えRNA転写物を産生するために調製することができる。翻訳終止コドンを宿主の嗜好が反映されるように改変することができる。例えば、S. cerevisiaeおよび哺乳動物の典型的な終止コドンは、それぞれUAAおよびUGAである。単子葉植物の典型的な終止コドンはUGAであり、昆虫およびE. coliでは、一般にUAAが終止コドンとして使用される (Dalphinら、1996年、Nucleic Acids Res. 24巻: 216~8頁)。

30

【0224】

遺伝暗号の縮重性に起因して、ヌクレオチド配列が異なる種々のDNA分子を、本開示の所与の酵素をコードするために使用することができることが当業者には理解される。上記の生合成酵素をコードするネイティブなDNA配列は、本明細書では、ただ単に本開示のある実施形態を例示するために参照されており、本開示は、本開示の方法において利用される酵素のポリペプチドおよびタンパク質のアミノ酸配列をコードする任意の配列のDNA分子を包含する。同様に、ポリペプチドは、一般には、所望の活性の喪失または著しい喪失を伴うことなくそのアミノ酸配列に1つまたは複数のアミノ酸置換、欠失、および挿入を許容し得る。本開示は、本明細書に記載の具体的なタンパク質とは異なるアミノ酸配列を有するこのようなポリペプチドを、当該改変ポリペプチドまたはバリエーションポリペプチドが参照ポリペプチドの酵素的同化活性または異化活性を有する限りは包含する。さらに、本明細書に示されているDNA配列によりコードされるアミノ酸配列は、ただ単に本開示の複数の実施形態を例示する。

40

【0225】

さらに、本明細書で提供される組成物および方法に有用な酵素のホモログは本開示に包含される。一部の実施形態では、2つのタンパク質 (またはタンパク質の領域) は、アミ

50

ノ酸配列が少なくとも約30%、40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する場合、実質的に相同である。2つのアミノ酸配列、または2つの核酸配列のパーセント同一性を決定するために、最適に比較するために配列をアラインメントする（例えば、最適なアラインメントのために第1のアミノ酸配列または核酸配列と第2のアミノ酸配列または核酸配列の一方または両方にギャップを導入することができ、また、比較する目的で非相同配列を無視することができる）。一実施形態では、比較する目的でアラインメントする参照配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも30%、一般には少なくとも40%、より一般には少なくとも50%、さらに一般には少なくとも60%、さらにより一般には少なくとも70%、80%、90%、100%である。次いで、対応するアミノ酸位またはヌクレオチド位のアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第1の配列内のある位置が、第2の配列内の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドによって占有されている場合、それらの分子はその位置において同一である（本明細書で使用される場合、アミノ酸または核酸「同一性」は、アミノ酸または核酸「相同性」と等しい）。2つの配列間のパーセント同一性は、2つの配列を最適にアラインメントするために導入する必要があるギャップの数、および各ギャップの長さを考慮に入れた、それらの配列が共有する同一の位置の数の関数である。

10

【0226】

タンパク質またはペプチドに関して「相同」が使用される場合、同一ではない残基の位置は、多くの場合、保存的アミノ酸置換によって異なることが理解される。「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸残基が同様の化学的性質（例えば、電荷または疎水性）を有する側鎖（R基）を有する別のアミノ酸残基で置換されたものである。一般に、保存的アミノ酸置換によりタンパク質の機能的性質は実質的に変化しない。2つまたはそれより多いアミノ酸配列が保存的置換によって互いと異なる場合では、パーセント配列同一性または相同性の程度を上向きに調整して置換の保存的性質を補正することができる。この調整を行うための手段は当業者には周知である（例えば、Pearson W. R.、1994年、Methods in Mol Biol 25巻：365～89頁を参照されたい）。

20

【0227】

以下の6群はそれぞれ、互いに保存的置換になるアミノ酸を含有する：1）セリン（S）、トレオニン（T）；2）アスパラギン酸（D）、グルタミン酸（E）；3）アスパラギン（N）、グルタミン（Q）；4）アルギニン（R）、リシン（K）；5）イソロイシン（I）、ロイシン（L）、アラニン（A）、バリン（V）、および6）フェニルアラニン（F）、チロシン（Y）、トリプトファン（W）。

30

【0228】

ポリペプチドの配列相同性は、パーセント配列同一性とも称され、一般には、配列解析ソフトウェアを使用して測定される。分子配列と異なる生物体由来の多数の配列を含有するデータベースの比較に使用される典型的なアルゴリズムは、コンピュータプログラムBLASTである。多数の異なる生物体由来の配列を含有するデータベースを検索する場合、アミノ酸配列を比較することが典型的である。

40

【0229】

さらに、前述の酵素をコードする任意の遺伝子（または本明細書で言及されている任意の他の遺伝子（またはその発現を制御もしくは調節する任意の調節エレメント））を、当業者に公知の定向進化または合理的変異誘発などの遺伝子工学／タンパク質工学技法によって最適化することができる。このような措置により、当業者が酵素を酵母における発現および活性のために最適化することが可能になる。

【0230】

さらに、これらの酵素をコードする遺伝子を他の真菌種および細菌種から同定することができ、この経路を調節するために発現させることができる。これだけに限定されないが、*S. cerevisiae*および*S. uvarum*を含めた*Saccharomyce*

50

s spp.、K. thermotolerans、K. lactis、およびK. marxianusを含めたKluyveromyces spp.、Pichia spp.、H. polymorphaを含めたHansenula spp.、Candida spp.、Trichosporon spp.、Y. spp. stipitisを含めたYamadazyma spp.、Torulaspora pretoriensis、Issatchenkia orientalis、S. pombeを含めたSchizosaccharomyces spp.、Cryptococcus spp.、Aspergillus spp.、Neurospora spp.、またはUstilago spp.を含めた種々の生物体がこれらの酵素の供給源として機能し得る。嫌気性真菌由来の遺伝子の供給源としては、これだけに限定されないが、Piromyces spp.、Orpinomyces spp.、またはNeocallimastix spp.が挙げられる。有用な原核生物酵素の供給源としては、これだけに限定されないが、Escherichia coli、Zymomonas mobilis、Staphylococcus aureus、Bacillus spp.、Clostridium spp.、Corynebacterium spp.、Pseudomonas spp.、Lactococcus spp.、Enterobacter spp.、およびSalmonella spp.が挙げられる。

【0231】

追加の相同な遺伝子および相同な酵素を同定するために、当業者に公知の技法が適し得る。一般に、類似の遺伝子および／または類似の酵素は機能分析によって同定することができ、機能的な類似性を有する。類似の遺伝子および類似の酵素を同定するために、当業者に公知の技法が適し得る。例えば、相同なまたは類似のPK、PTA、RHR2またはHOR2遺伝子、タンパク質、または酵素を同定するための技法としては、これだけに限定されないが、目的の遺伝子／酵素公開された配列に基づくプライマーを使用したPCRによる遺伝子のクローニング、または目的の遺伝子の間で保存された領域を増幅するために設計された変性プライマーを使用した変性PCRによる遺伝子のクローニングを挙げることができる。さらに、当業者は、機能的な相同性または類似性を有する相同なまたは類似の遺伝子、タンパク質、または酵素を同定するための技法を使用することができる。これらの技法は、細胞または細胞培養を触媒酵素の活性に関して、前記活性についてのin vitro酵素アッセイによって検査すること（例えば、本明細書またはKirita ni, K.、Branched-Chain Amino Acids Methods Enzymology、1970年に記載の通り）、次いで、前記活性を有する酵素を精製することによって単離すること、酵素のタンパク質配列をエドマン分解などの技法によって決定すること、可能性のある核酸配列に対してPCRプライマーを設計すること、前記DNA配列をPCRによって増幅すること、および前記核酸配列をクローニングすることを含む。相同なまたは同様の遺伝子および／または相同なまたは同様の酵素、類似の遺伝子および／または類似の酵素またはタンパク質を同定するための技法は、候補遺伝子または酵素に関するデータをBRENDA、KEGG、またはMetaCycなどのデータベースと比較することも包含する。本明細書における教示に従って上記のデータベース内で候補遺伝子または酵素を同定することができる。

【実施例】

【0232】

6. 実施例

6.1 実施例1：

PKおよびPTAを発現する宿主細胞におけるアセテート産生

この実施例では、ホスホケトララーゼおよびホスホトランスアセチラーゼを異種発現する酵母株におけるアセテートの産生を記載している。

【0233】

6.1.1 材料および方法

6.1.1.1 株の工学的操作

6. 1. 1. 1. 1 Y967およびY968

Y967およびY968は野生型原栄養 *Saccharomyces cerevisiae* CEN. PK2であり、Y967はMat Aであり、Y968はMat alphaである。Y12869、Y12746、およびこれらの誘導体の全ての出発株は *Saccharomyces cerevisiae* Y003株 (CEN. PK2、Mat アルファ、ura3-52、trp1-289、leu2-3, 122、his3⁺1) であった。*S. cerevisiae* のDNA媒介性形質転換は全て、Gietz RWおよびWoods RA、Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology. Part B. San Diego, CA: Academic Press Inc. 87~96頁 (2002年) に記載されている通り標準の酢酸リチウム手順を使用して行い、全ての場合において、構築物の組み込みをゲノムDNAのPCR増幅によって確認した。

【0234】

6. 1. 1. 1. 2 Y12869

Y12869を、Y003への3回の連続的な組み込みによって生成した。まず、導入することによりACS2遺伝子座の上流のヌクレオチドの配列からなる配列と下流のヌクレオチドの配列からなる配列に挟まれたネイティブな *S. cerevisiae* LEU2遺伝子からなる組み込み構築物 (i2235; 配列番号27) を導入することによって遺伝子ACS2を欠失させた。この構築物は、*S. cerevisiae* 宿主細胞に導入されると、相同組換えによってゲノムのACS2遺伝子座に組み込まれ、その組み込み配列でACS2コード配列が置き換えられることによってACS2が機能的に破壊され得る。形質転換体を、2% EtOHを唯一の炭素源として含有するCSM-leuプレートにプレATINGし、PCR増幅によって確認した。生じた株はY4940であった。

【0235】

次に、ALD6を欠失させ、*Dickeya zeae eutE* を、以下に示されている組み込み構築物 (i74804; 配列番号28) を用いてY4940に導入した。

【0236】

【化1】

ALD6US	pTDH3	DzeutE	tTEF2	TRP1	TEF2	DzeutE	tTDH3	ALD6DS
--------	-------	--------	-------	------	------	--------	-------	--------

この組み込み構築物は、選択マーカー (TRP1)、ならびにTDH3プロモーター (ネイティブな *S. cerevisiae* TDH3コード領域の840塩基対上流) およびTEF2ターミネーター (ネイティブな *S. cerevisiae* TEF2コード領域の508塩基対下流) の制御下にある *Dickeya zeae* 由来の *eutE* (NCBI参照配列: YP_003003316.1) をコードする酵母コドン最適化配列遺伝子の2つのコピーを含む。これらの成分は、ALD6遺伝子座の上流のヌクレオチド配列と下流のヌクレオチド配列に挟まれている。この構築物は、宿主細胞に導入されると、相同組換えによって宿主細胞のゲノムに組み込まれ、その組み込み配列でALD6コード配列が置き換えられることによってALD6が機能的に破壊される。構築物は米国特許第8, 221, 982号に記載の方法を使用して組み立てた。構築物をY4940に導入してそれを形質転換し、2% グルコースを伴うCSM-TRPプレート上で形質転換体を選択し、PCR増幅によって確認した。生じた株はY12602であった。

【0237】

次に、Y12602において、それ自体のプロモーターおよびターミネーターの下にある、ACS1の上流のヌクレオチド配列と下流のヌクレオチド配列に挟まれたネイティブな *S. cerevisiae* HIS3遺伝子からなる組み込み構築物 (i76220; 配列番号29) を導入することによってACS1を欠失させた。形質転換体を、2% グルコースを唯一の炭素源として含有するCSM-hisプレートにプレATINGし、PCR増幅によって確認した。生じた株はY12747であった。

【0238】

次に、Y12747を、ネイティブなURA3配列から増幅されたPCR産物で形質転換した。この配列により、ura3-52変異が修復される。RoseおよびWinston、Mol Gen Genet 193巻：557～560頁（1984年）を参照されたい。形質転換体を、2%グルコースを唯一の炭素源として含有するCSM-uraプレートにプレーティングし、PCR増幅によって確認した。生じた株はY12869であった。

【0239】

6. 1. 1. 1. 3 Y12745

Y12745を、Y4940への3回の連続的な組み込みによって生成した。まず、Y4940を以下に示されている組み込み構築物（i73830；配列番号30）で形質転換した。

【0240】

【化2】

BUD9US	pTDH3	Lm.PK	tTDH3	URA3	1x920	Y12745	EHQ14	BUD9DS
--------	-------	-------	-------	------	-------	--------	-------	--------

この組み込み構築物は、*S. cerevisiae* BUD9遺伝子座の上流のヌクレオチド配列からなる相同配列と下流のヌクレオチド配列からなる相同配列で挟まれた、選択マーカー（URA3）；TDH3プロモーター（TDH3コード配列の870bp上流）およびTDH3ターミネーター（TDH3コード配列の259bp下流）の下にある*Leuconostoc mesenteroides*由来のホスホケトラゼの酵母コドン最適化バージョン（NCBI参照配列YP_819405.1）；TDH3プロモーター（TDH3コード配列の870bp上流）およびPGK1ターミネーター（PGK1コード配列の259bp下流）の制御下にある*Clostridium kluyveri*ホスホトランスアセチラーゼの酵母コドン最適化バージョン（NCBI参照配列：YP_001394780.1）を含む。この構築物は、宿主細胞に導入されると、相同組換えによって宿主細胞のゲノムに組み込まれ、その組み込み配列でBUD9コード配列が置き換えられることによってBUD9が機能的に破壊される。構築物は米国特許第8, 221, 982号に記載の方法を使用して組み立てた。2%グルコースを伴うCSM-URAプレート上で形質転換体を選択した。生じた株を以下に示されている構築物（i74810；配列番号31）で形質転換した。

【0241】

【化3】

ALD6US	pTDH3	Lm.PK	tTDH3	TRP1	EHQ13	Y12745	EHQ14	ALD6DS
--------	-------	-------	-------	------	-------	--------	-------	--------

この構築物は、ALD6遺伝子座の上流のヌクレオチド配列からなる相同配列と下流のヌクレオチド配列からなる相同配列で挟まれた、選択マーカー（TRP1）；TDH3プロモーター（TDH3コード配列の870bp上流）およびTDH3ターミネーター（TDH3コード配列の259bp下流）の下にある*Leuconostoc mesenteroides*由来のホスホケトラゼの2つのコピーを含む。この構築物は、宿主細胞に導入されると、相同組換えによって宿主細胞のゲノムに組み込まれ、その組み込み配列でALD6コード配列が置き換えられることによってALD6が機能的に破壊される。構築物は米国特許第8, 221, 982号に記載の方法を使用して組み立てた。2%グルコースを伴うCSM-URAプレート上で形質転換体を選択し、PCR増幅によって確認した。

【0242】

次に、それ自体のプロモーターおよびターミネーターの下にある、ACS1の上流のヌクレオチド配列と下流のヌクレオチド配列に挟まれたネイティブな*S. cerevisiae*

a e H I S 3 遺伝子からなる組み込み構築物 (i 7 6 2 2 0 ; 配列番号 2 9) を導入することによって A C S 1 を欠失させた。形質転換体を、2 % グルコースを唯一の炭素源として含有する C S M - h i s プレートにプレーティングし、P C R 増幅によって確認した。

【 0 2 4 3 】

6 . 1 . 1 . 1 . 4 Y 1 2 7 4 6

Y 1 2 7 4 6 を、Y 4 9 4 0 への 3 回の連続的な組み込みによって生成した。まず、Y 4 9 4 0 を以下に示されている組み込み構築物 (i 7 3 8 3 0 ; 配列番号 3 0) で形質転換した。

【 0 2 4 4 】

【 化 4 】

BUD9US	pTDH3	Lm.PK	tTDH3	URA3	TKG1	CK.PTA	ENG1p	BUD9DS
--------	-------	-------	-------	------	------	--------	-------	--------

この組み込み構築物は、S . c e r e v i s i a e B U D 9 遺伝子座の上流のヌクレオチド配列からなる相同配列と下流のヌクレオチド配列からなる相同配列で挟まれた、選択マーカー (U R A 3) ; T D H 3 プロモーター (T D H 3 コード配列の 8 7 0 b p 上流) および T D H 3 ターミネーター (T D H 3 コード配列の 2 5 9 b p 下流) の下にある L e u c o n o s t o c m e s e n t e r o i d e s 由来のホスホケトラゼの酵母コドン最適化バージョン (N C B I 参照配列 Y P _ 8 1 9 4 0 5 . 1) ; T D H 3 プロモーター (T D H 3 コード配列の 8 7 0 b p 上流) および P G K 1 ターミネーター (P G K 1 コード配列の 2 5 9 b p 下流) の制御下にある C l o s t r i d i u m k l u y v e r i 20
ホスホトランスアセチラーゼの酵母コドン最適化バージョン (N C B I 参照配列 : Y P _ 0 0 1 3 9 4 7 8 0 . 1) を含む。この構築物は、宿主細胞に導入されると、相同組換えによって宿主細胞のゲノムに組み込まれ、その組み込み配列で B U D 9 コード配列が置き換えられることによって B U D 9 が機能的に破壊される。構築物は米国特許第 8 , 2 2 1 , 9 8 2 号に記載の方法を使用して組み立てた。2 % グルコースを伴う C S M - U R A プレート上で形質転換体を選択した。

【 0 2 4 5 】

生じた株を以下に示されている構築物 (i 7 4 8 1 0 ; 配列番号 3 1) で形質転換した

【 0 2 4 6 】

【 化 5 】

ALD6US	pTDH3	Lm.PK	tTDH3	TRP1	ENG1	Lm.PK	tTDH3	ALD6DS
--------	-------	-------	-------	------	------	-------	-------	--------

この構築物は、A L D 6 遺伝子座の上流のヌクレオチド配列からなる相同配列と下流のヌクレオチド配列からなる相同配列で挟まれた、選択マーカー (T R P 1) ; T D H 3 プロモーター (T D H 3 コード配列の 8 7 0 b p 上流) および T D H 3 ターミネーター (T D H 3 コード配列の 2 5 9 b p 下流) の下にある L e u c o n o s t o c m e s e n t e r o i d e s 由来のホスホケトラゼの 2 つのコピーを含む。この構築物は、宿主細胞に導入されると、相同組換えによって宿主細胞のゲノムに組み込まれ、その組み込み配列で A L D 6 コード配列が置き換えられることによって A L D 6 が機能的に破壊される。構築物は米国特許第 8 , 2 2 1 , 9 8 2 号に記載の方法を使用して組み立てた。2 % グルコースを伴う C S M - U R A プレート上で形質転換体を選択し、P C R 増幅によって確認した。

【 0 2 4 7 】

最後に、生じた株を以下に示されている構築物 (i 7 6 2 2 1 ; 配列番号 3 2) で形質転換した。

【 0 2 4 8 】

10

20

30

40

50

【化 6】

ACS1US	pTDH3	DzeutE	tTEF2	HIS3	Z4311	310470	EHQ1d	ACS1DS
--------	-------	--------	-------	------	-------	--------	-------	--------

この構築物は、選択マーカー（HIS3）；ならびにTDH3プロモーター（ネイティブな*S. cerevisiae* TDH3コード領域の840塩基対上流）およびTEF2ターミネーター（ネイティブな*S. cerevisiae* TEF2コード領域の508塩基対下流）の制御下にある*Dickeya zeae*由来のeutE（NCBI参照配列：YP_003003316.1）をコードする酵母コドン最適化配列遺伝子の2つのコピーを含む。これらの成分は、ACS1遺伝子座の上流のヌクレオチド配列と下流のヌクレオチド配列に挟まれている。この構築物は、宿主細胞に導入されると、相同組換えによって宿主細胞のゲノムに組み込まれ、その組み込み配列でACS1コード配列が置き換えられることによってACS1が機能的に破壊される。構築物は米国特許第8,221,982号に記載の方法を使用して組み立てた。2%グルコースを伴うCSM-HISプレート上で形質転換体を選択し、PCR増幅によって確認した。生じた株はY12746であった。

10

【0249】

6.1.1.1.5 Y19390

Y19390は、Y12869の直接の派生物である。Y12869のウラシル要求性誘導体を以下に示されている組み込み構築物MS49253（配列番号36）で形質転換した：

20

【0250】

【化 7】

BUD9US	pTDH3	Lm.PK	tTDH3	URA3	EHQ1	Lm.PK	pTDH3	BUD9DS
--------	-------	-------	-------	------	------	-------	-------	--------

この組み込み構築物は、*S. cerevisiae* BUD9遺伝子座の上流のヌクレオチド配列からなる相同配列と下流のヌクレオチド配列からなる相同配列で挟まれた、選択マーカー（URA3）；TDH3プロモーター（TDH3コード配列の870bp上流）およびTDH3ターミネーター（TDH3コード配列の259bp下流）の下にある*Leuconostoc mesenteroides*由来のホスホケトラーゼの酵母コドン最適化バージョン（NCBI参照配列YP_819405.1）の2つのコピーを含む。この構築物は、宿主細胞に導入されると、相同組換えによって宿主細胞のゲノムに組み込まれ、その組み込み配列でBUD9コード配列が置き換えられることによってBUD9が機能的に破壊される。構築物は米国特許第8,221,982号に記載の方法を使用して組み立てた。2%グルコースを伴うCSM-URAプレート上で形質転換体を選択した。

30

【0251】

6.1.1.1.6 Y19391

Y19391は、Y12869の直接の派生物である。Y12869のウラシル要求性誘導体を以下に示されている組み込み構築物MS49298（配列番号37）で形質転換した：

40

【0252】

【化 8】

BUD9US	pTDH3	Ck.PTA	tPGK1	URA3	tPGK1	Ck.PTA	pTDH3	BUD9DS
--------	-------	--------	-------	------	-------	--------	-------	--------

この組み込み構築物は、*S. cerevisiae* BUD9遺伝子座の上流のヌクレオチド配列からなる相同配列と下流のヌクレオチド配列からなる相同配列で挟まれた、選択マーカー（URA3）；TDH3プロモーター（TDH3コード配列の870bp上流

50

）およびPGK1ターミネーター（PGK1コード配列の259bp下流）の制御下にある*Clostridium kluyveri*由来のホスホトランスアセチラーゼの酵母コドン最適化バージョン（NCBI参照配列：YP_001394780.1）の2つのコピーを含む。この構築物は、宿主細胞に導入されると、相同組換えによって宿主細胞のゲノムに組み込まれ、その組み込み配列でBUD9コード配列が置き換えられることによってBUD9が機能的に破壊される。構築物は米国特許第8,221,982号に記載の方法を使用して組み立てた。2%グルコースを伴うCSM-URAプレート上で形質転換体を選択した。

【0253】

6.1.1.2 培養条件

Y967、Y12869、Y12745、Y12746、Y19390およびY19391の種菌培養物を、単一のコロニーから、50mMのコハク酸、pH5.0、および20g/Lのスクロースを伴うシード培地5ml中、30℃、200rpmで一晩成長させた（15g/Lの硫酸アンモニウム、8g/Lのリン酸カリウム、6.1g/Lの硫酸マグネシウム、150mg/LのEDTA、57.5mg/Lの硫酸亜鉛、4.8mg/Lの塩化コバルト、3.24mg/Lの塩化マンガン、5mg/Lの硫酸銅、29.4mg/Lの塩化カルシウム、27.8mg/Lの硫酸鉄、4.8mg/L モリブデン酸ナトリウム、0.6mg/Lのビオチン、12mg/Lのパントテン酸カルシウム、12mg/Lのニコチン酸、30mg/Lのイノシトール、12mg/Lの塩酸チアミン、12mg/Lの塩酸ピリドキシン、0.24mg/Lのパラアミノ安息香酸）。次いで、前培養物を、50mMのコハク酸pH5.0、および40g/Lのスクロースを伴うシード培地25mlを含む125mlのフラスコに接種し、最初のOD600を0.1にし、30℃、200rpmで成長させた。

【0254】

6.1.1.3. アセテート、フルクトース、グルコース、およびスクロースの定量化

全細胞ブロス1mlを1.5mlのエッペンドルフチューブに移し、卓上遠心分離機を使用して13,000RPMで1分回転させて上清を清澄化することによってアセテートおよび糖（フルクトース、グルコース、スクロース）を定量化した。次いで、上清を8mMの硫酸で希釈し（1:1v/v）、ボルテックスし、再度遠心分離した後に、1.8mlのバイアルに移した。BioRad Aminex HPLX-87H 300mm×7.8mmカラムを使用して、可変性の波長および屈折率検出を伴うAgilent 1200 HPLCを用いて試料を分析した。移動相は4mMの硫酸であり、カラム温度は40℃であり、流速は毎分0.5mlであった。

【0255】

6.1.1.4. 結果

図3Bには、野生型Cen. PK2、Y967がバッチ確定スクロース振とうフラスコ培養物中での成長中にアセテートを産生することが示されている。PDH-バイパスの欠失（acs1Δ acs2Δ ald6Δ）を含み、アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼアシル化（Dz.eutE）を異種発現するY12869により産生されるアセテートは、PDH-バイパスを使用する野生型対照よりもはるかに少なく、これはアセトアルデヒドをアセテートに変換する細胞質ゾル内アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼであるALD6の欠失に起因する可能性がある。PDH-バイパスの欠失を含み（acs1Δ acs2Δ ald6Δ）、アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼアシル化（Dz.eutE）ならびにホスホケトラーゼ（Lm.PK）およびホスホトランスアセチラーゼ（Ck.PTA）を異種発現するY12746株では、アセテートの大きな増大が観察され、野生型Y967によって産生される量に勝る。Y12869での結果により、acs1Δ acs2Δ ald6Δであり、細胞質ゾル内アセチルCoAにフラックスを持っていくためにADAを使用する株ではアセテートのベースラインレベルが非常に低いことが示される。全ての場合において、糖消費の速度は同等であり（本明細書では、糖とは、培地中のスク

ロース、グルコース、およびフルクトースの合計と定義される)、これにより、アセテートレベルの差異がフィードストックの示差的な消費に起因するものではないことが例証される(図3A)。これらの結果により、Y12746におけるアセテートの増大は、ホスホケトラゼおよび/またはホスホトランスアセチラーゼの存在に起因することが示唆される。ホスホケトラゼおよびホスホトランスアセチラーゼの両方の触媒活性によりアセチルホスフェートが産生される。したがって、Y12746における自発的なまたは触媒されるアセチルホスフェートの加水分解からアセテート蓄積が生じ得る。

【0256】

ADA、PKおよびPTAを発現する株(Y12746)におけるアセテートの供給源を決定するために、細胞質ゾル内AcCoAをもたらしのためにADAのみを使用する株(Y12869、PDH-バイパスの欠失(*acs1Δ acs2Δ ald6Δ*))を含み、アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼアシル化(*Dz. eutE*)を異種発現する)を、

(1) Y19390をもたらし、強力なプロモーター $P_{T_{DH3}}$ によって駆動されるPKの2つの過剰発現したコピーをコードする組込み構築物、または(2) Y19391をもたらし、強力なプロモーター $P_{T_{DH3}}$ によって駆動されるPTAの2つの過剰発現したコピーをコードする組込み構築物のいずれかで形質転換した。図3Dに示されている通り、PKまたはPTAのいずれかを発現する株では親株と比較してアセテート蓄積の増大が観察された。アセテートレベルが示差的な糖消費に起因するものではないことを例証するために糖消費が図3Cに示されている。PKはX5PをアセチルホスフェートおよびG3Pに変換するものであり、PTAは、アセチルCoA+Piとアセチルホスフェート+CoAを相互変換する。これらの知見により、図1に示されるように、PKによりX5Pから引き出されたものであれ、PTAによりAcCoAから引き出されたものであれ、アセチルホスフェートがアセテートに加水分解され得ることが示唆される。

【0257】

6.2 実施例2:

*Saccharomyces cerevisiae*における主要なアセチルホスファターゼの同定

この実施例では、酵母においてアセチルホスフェートを加水分解することができる酵素の同定を記載している。

【0258】

6.2.1 材料および方法

6.2.1.1 細胞培養

所与の酵母株の単一のコロニーを、2%デキストロースを伴う酵母抽出物ペプトン培地(YPD) 5mL中で一晩発端培養として培養した。翌日、YPD 50mLをこの発端培養物に接種し、OD600を0.2にした。別段の指定がない限り、フラスコを30℃、200RPMで振とうしながら24時間インキュベートした。

【0259】

6.2.1.2 無細胞抽出物の調製

細胞培養物を15mLのファルコンチューブ3つに分け、4000×gで5分遠心分離することによって収集した。次いで、上清を廃棄し、氷冷した緩衝液W(100mMのTris-HCl、pH8.0、150mMのNaCl、10%グリセロール) 10mLに再懸濁させ、その後、4000×gで5分遠心分離することによって細胞を洗浄した。上清を廃棄し、細胞を溶解緩衝液(100mMのTris-HCl、pH8.0、150mMのNaCl、10%グリセロール、1mMのDTT、10mL当たり1つのEDTAフリープロテアーゼインヒビター錠(Roche)) 1mLに再懸濁させた。次いで、細胞を、リングキャップを伴う2mLのプラスチックスクリーキャップ微量遠心チューブ(Fisher Brand 520-GRD)に移し、破壊ビーズ(Disruption beads, 0.5Mm、Fisher)およびビーズビーターを使用して、6M/Sで1分間にわたって細胞を溶解させた。チューブをすぐに氷水浴に入れ、少なくとも5分置いた。次いで、チューブを再度ビーズビーターに戻し、6M/Sで1分置き、氷浴

に戻して5分置いた。チューブを最低でも16000×gで20分回転させて細胞片をペレット化した。次いで、上清を新しい低温チューブに移した。タンパク質の濃度を、タンパク質についての典型的なBradfordアッセイを使用して測定した(Bradford MM A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem 72巻、248～254頁(1976年))。

【0260】

6. 2. 1. 3 アセチルホスファターゼ反応およびアセチルホスフェートの定量化 10

アセチルホスファターゼ活性アッセイを、30℃、100mMのTris-HCl、pH7.5、150mMのNaCl、および1mMのMgCl²⁺からなる反応緩衝液中で行った。アセチルホスフェートを、示されている通り5mMまたは10mMのいずれかの出発濃度になるまで添加した。無細胞抽出物を示されている量で添加することによって反応を開始させた。ホスファターゼ阻害について試験するために、選択のためにフッ化ナトリウムをウェルに30mMの濃度で添加した。密閉した96ウェルプレートで反応を行い、反応生成物の総体積は250μlであった。アセチルホスフェート濃度を、LipmannおよびTuttle(Lipmann F、Tuttle LC、J. Biol. Chem. 159巻、21～28頁(1945年))により開発された方法によって

測定した。反応混合物50μlを2Mのヒドロキシルアミン、pH6.8、50μlに添加し、十分に混合し、室温で少なくとも10分インキュベートした。次いで、15%トリクロ酢酸34μlを添加し、混合し、その後、4NのHCl、34μl、および5%FeCl₃、34μlをそれぞれ添加した後に十分に混合した。次いで、プレートを、スイングバケットローターJS-5.3を伴うBeckman遠心分離機J-Eにおいて、3000rpmで5分遠心分離して沈殿したタンパク質をペレット化した。次いで、次いで、上清150μlを新鮮な96ウェル透明平底プレート(Greiner Bio-One Cat. -No.: 655161)に移した。プレートを、Molecular Devices SpectraMax M5プレートリーダーによって505nmの波長において読み取った。 20

【0261】

6. 2. 1. 4 活性なホスファターゼ画分の精製 30

所与の酵母株の単一のコロニーを、2%デキストロースを伴う酵母抽出物ペプトン培地(YPD)5mL中で一晚発端培養として培養した。翌日、500mlのYPDを伴う2.8Lのフェルンバッハフラスコ2つにこの発端培養物を接種し、OD600を0.2にした。フラスコを、30℃、160RPMで振とうしながら24時間インキュベートした。培養物を、4000×gで5分遠心分離することによって収集した。細胞ペレットを滅菌水500mLで洗浄し、4000×gで5分遠心分離した。次いで、細胞ペレットを、氷冷した溶解緩衝液(100mMのTris-HCl、pH8.0、150mMのNaCl、10%グリセロール、1mMのDTT、10mL当たり1つのEDTAフリープロテアーゼインヒビター錠(Roche))50mLに再懸濁させた。細胞浮遊液を、破碎ビーズ(Disruption beads、0.5Mm、Fisher)5mLを満たした15mLのファルコンチューブ6つに分割した。次いで、チューブをビーズビーターに入れ、6M/Sで45秒置いた。チューブをすぐに氷水浴に入れ、少なくとも5分置いた。ビーズビティングをさらに3回繰り返し、各破碎セグメントの間に氷水浴に少なくとも5分入れた。チューブを、4℃に冷却したJA-20ローター内のBeckman遠心分離機J-Eで16,000rpm(30,966×g)で30分回転させて、細胞片をペレット化した。細胞溶解物を、Saltら(Selective flocculation of cellular contaminants from soluble proteins using polyethyleneimine: A study of several organisms and polymer mol 40

ecular weights. Enzyme and Microbial Technology 17巻、107～113頁(1995年))に記載されている選択的フロキュレーション法によって以下の通りさらに清澄化した:無細胞溶解物を、5mMのNaOHストック溶液を添加することによってpH7.4に調整した。次いで、等体積のPEI/Borax溶液(0.5MのNaCl、0.25%PEI、100mMのBorax)を細胞溶解物に添加し、十分に混合した。次いで、混合物を、4℃、2,500×gで30分遠心分離した。次いで、硫酸アンモニウムを80%の飽和濃度に達するまで絶えず攪拌しながらゆっくりと添加することによってタンパク質沈殿させた。攪拌をさらに10分継続し、次いで、Beckman JA-20ローターにおいて4℃、15,000rpmで10分遠心分離することによって沈殿したタンパク質を収集した。上清を除去し、タンパク質を緩衝液A(20mMのTris-Cl、pH7、10%グリセロール)に穏やかに再懸濁させた。次いで、タンパク質を、3,500Da分子量カットオフ透析カセット(Pierce#66300)0.5～3mLに添加し、1.5Lの緩衝液A中、4℃で一晩透析した。透析した試料を16000×gで10分遠心分離して、沈殿したタンパク質をペレット化した。タンパク質の濃度を、タンパク質についての典型的なBradfordアッセイを使用して測定した(Bradford MM, A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem 72巻、248～254頁(1976年))。タンパク質20mgをGE AKTAE explorer FPLCのSource 15Q 4.6/100 PE陰イオン交換カラムにローディングした。緩衝液B(20mMのTris-Cl、pH7、1MのNaCl、10%グリセロール)の0～100%勾配を30カラム体積にわたって毎分0.5mLの流速で用いてタンパク質を溶出し、試料1mLを採取した。各画分の活性をアッセイするために、各画分75μLを、100mMのTris-Cl、pH7、150mMのNaCl、1mMのMgCl₂を含有する反応物250μL中8mMのACPに添加し、上記の通りアッセイした。この分離からの活性な画分を緩衝液Aに対して一晩、再度透析した。次いで、試料全体を同じSource 15Q 4.6/100 PE陰イオン交換カラムにローディングし、0～45%緩衝液Bの勾配を30カラム体積にわたって毎分0.5mLの流速で用いて溶出し、試料1mLを採取した。試料を活性について上記の通りアッセイした。

【0262】

6.2.1.5 タンパク質ゲル電気泳動

タンパク質画分を、基準ゲル電気泳動系を使用して分析した。画分10μLを、5%v/v2-メルカプトエタノールを伴う2×Laemmli試料緩衝液(BioRad Cat番号161-0737)10μLに添加し、10分煮沸した。次いで、試料を短時間遠心分離し、15μLを26ウェル4～15%Criterion(商標)TGX(商標)Precast Gelにローディングし、1×Tris-グリシン-SDS緩衝液(BioRadにより調製されたもの、10×Tris/Glycine/SDS#161-0732)に130ボルトで50分流した。ゲルを脱イオン水200mLで3回、それぞれ5分すすいだ。次いで、SimplyBlue(商標)SafeStain(Life Technologies Cat番号LC6060)をゲルに添加してゲルを完全に覆い、次いで、室温で1時間、穏やかにゆすりながらインキュベートした。次いで、SafeStainを廃棄し、ゲルを、脱イオン水200mLを用いて1時間ゆすりながら洗浄した。

【0263】

6.2.1.6 活性なホスファターゼ画分中のタンパク質の同定

タンパク質消化およびペプチドの分離

総タンパク質100μgを、その後にLC-MS/MSによって同定するためにトリプシンによるタンパク質分解に供した。総タンパク質100μgを、Tris-カルボキシ

10

20

30

40

50

エチルホスフィン（4 mM）を用いて37℃で30分還元し、次いで、ヨードアセトアミド（15 mM）を用いて暗闇中、RTで30分アルキル化した。トリプシン5 μgを消化混合物に添加し、37℃で12時間にわたって完全に消化した。0.1%ギ酸を用いて反応をクエンチし、Ascentis Peptide express column（5 cm x 2.1 mm ID、粒子サイズ2.1 μm）に注射し、0.1%ギ酸を修飾因子として使用し、低アセトニトリルから高アセトニトリルまでの90分の勾配にわたって分離した。LCポンプは、Shimadzu CBM20A LC Controllerにより作動する2台のShimadzu LC20ADであった。

【0264】

質量分析パラメータ：

QTRAP 4000 ハイブリッドトリプル四重極リニアイオントラップ質量分析計を使用して、カラムから溶出するペプチドを同定した。IDAパラメータは以下の通りであった：選択イオン、350~1300 da；電荷の状態を決定するために使用するERスキュン；1+イオン拒絶、未知許容；回転衝突エネルギー：あり（qtrap4000のAB SCIEX標準）；各MS/MSの最大充填時間：950 ms。

【0265】

Mascotによるペプチド同定

Matrix ScienceによるMascotを使用し以下のパラメータを用いてCENPK2配列データベースからペプチドを同定した。固定修飾（Fixed modifications）：カルバミドメチル。可変修飾（Variable modifications）：脱アミド（NQ）、酸化（MW）。前駆体質量許容差（Precursor mass tolerance）：0.5 da。生成物質量許容差（Product mass tolerance）：1.0 da。切断ミス最大数（Missed cleavages allowed）：1。

【0266】

6.2.1.7 株の工学的操作

機能的URA3遺伝子を欠くY968のバージョンを、RHR2をロックアウトするためにms59858を用いて、またはHOR2をロックアウトするためにms59971を用いて形質転換した。構築物は米国特許第8,221,982号に記載の方法を使用して組み立てた。2%グルコースを伴うCSM-URAプレート上で形質転換体を選択し、PCR増幅によって確認した。この構築物中のURA3マーカは直接反復配列に挟まれており、それにより、当該マーカの再利用が容易になる。URA3マーカを再利用するために、細胞をYPD中で一晩成長させ、次いで、5'FOAにプレーティングした。URA3のループアウトをPCR増幅、およびCSM-URAプレートで成長できないことによって確認した。次いで、Y968、ms59858のuraバージョンをms59971で形質転換して、2重RHR2およびHOR2ロックアウトY968、ms59858、ms59971株を生成した。

【0267】

6.2.2 結果

6.2.2.1 アセチルホスフェートの加水分解は酵素により触媒され、熱および広範なスペクトルのホスファターゼ阻害剤により阻害される

図4に示されている通り、野生型S. cerevisiae Y967株由来の無細胞抽出物の添加により、アセチルホスフェートの加水分解が触媒され、加水分解の速度は、添加する無細胞抽出物の量に左右される。無細胞抽出物の量を増大することにより、加水分解の速度が上昇する。無細胞抽出物を煮沸すると、漸増量の無細胞抽出物を添加することによりもはやアセチルホスフェートの加水分解速度は影響を受けず、これにより、反応性成分が熱により失活したことが示される。同様に、30 mMの、広範なスペクトルのホスファターゼ阻害剤であるフッ化ナトリウムを添加することにより、アセチルホスフェートの加水分解時の無細胞抽出物の効力がなくなる。これらの結果により、ホスファターゼがアセチルホスフェート加水分解の触媒作用に関与する可能性があることが示唆される。

【0268】

6. 2. 2. 2 タンパク質分画により、単一の富化された活性な画分が単離される

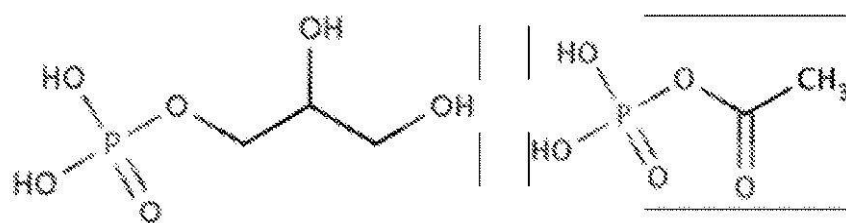
陰イオン交換クロマトグラフィーを使用して無細胞抽出物中の可溶性タンパク質を分離した。図5Aには、ホスファターゼ活性のほぼ全てが1つの画分に濃縮され、残りの活性がその画分の付近にあったことが示されている。これにより、無細胞抽出物中のこの活性に参与する酵素が、単一のタンパク質、または陰イオン交換クロマトグラフィーによって分離した際に一緒に溶出する、同様のイオン性相互作用を有するタンパク質のいずれかであることが示される。

【0269】

FPLC陰イオン交換精製からの活性な画分#10について、より浅い0~45%緩衝液Bの勾配を使用して2回目の精製を行った。図6Aに示されている通りこの精製による最も活性な画分であった#14を質量分析によって分析して、画分中のタンパク質の同一性を決定した。活性な画分において同定されたタンパク質のうち(図6B)、Rhr2と、著しい配列類似性に起因し質量分析によって区別することができないそのホモログであるHor2のみが、SGDデータベースによってホスファターゼと同定された一覧にあるタンパク質であった。Rhr2は、高レベルで構成的に発現されるグリセロール-1-ホスファターゼである。Hor2は、同一の反応を触媒するが、正常状態下では低レベルでのみ発現され、浸透ストレスによって誘導される(Norbeckら、Purification and Characterization of Two Isoenzymes of DL-Glycerol-3-phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*, J. Biol. Chem., 271巻、13875~13881頁(1996年))。アセチルホスフェートは酵母のネイティブな代謝産物ではなく、したがって、加水分解は同様の基質を標的とする酵素の無差別な反応によって引き起こされることが予想される。Rhr2/Hor2は、以下に示されている通りそれらのネイティブな基質であるグリセロール-1-ホスフェートもアセチルホスフェートと同様の低分子量のリン酸化化合物であるので、この反応の最上位の候補である。

【0270】

【化9】



グリセロール-1-ホスフェート

アセチルホスフェート

6. 2. 2. 3 RHR2および/またはHOR2の欠失によりホスファターゼ活性が低下する

Rhr2および/またはHor2が*S. cerevisiae*において観察されるホスファターゼ活性に参与するかどうかを決定するために、RHR2またはHOR2のいずれかを欠く新しい株、およびRHR2とHOR2を両方とも欠く1つの株を創出した。これらの株を以前に記載されている通り培養し、無細胞抽出物を調製し、アセチルホスファターゼ活性について試験した。図7に示されている通り、RHR2の欠失によりホスファターゼ活性が劇的に低下するが、HOR2の欠失にはアセチルホスフェートの加水分解の速度に対する効果はない。しかし、すでにRHR2が欠失している株ではHOR2の欠失によりアセチルホスフェートの加水分解が低下する。これは、RHR2の欠失後にHor2の発現が上方制御されることが示されている公開された研究と一致する(DeLunaら、Need-Based Up-Regulation of Protein Lev

els in Response to Deletion of Their Duplicate Genes、PLOS Biol.、8巻、e10000347頁(2010年))。図7に示されている通り、これらのホスファターゼを両方とも排除することにより、ほぼバックグラウンドレベルのアセチルホスフェート加水分解がもたらされる。これらの結果により、グリセロール-1-ホスファターゼであるRhr2およびHor2が*S. cerevisiae*における大多数のアセチルホスファターゼ活性に関与することが確認される。

【0271】

6.3 実施例3:

アセチルホスフェートホスファターゼの欠失により、アセテート分泌が低下し、アセチルCoAに由来する化合物の産生が改善される

10

6.3.1 材料および方法

6.3.1.1 株の構築

Y968、Y12869、およびY12746、機能的URA3遺伝子を欠くバージョンを、ファルネセン産生体に変換するために、ms63907またはms63909のいずれかを用いて、およびms64472を用いて形質転換した。

【0272】

ms63907組み込み構築物(i84022;配列番号33)が下に示されている。

【0273】

【化10】

20

HOUS	GAL4	DOWND	ITVD	pGAL10	ERG10	URA3	ERG13	OTVD	pGAL1	Sp.HMG	HOUS
------	------	-------	------	--------	-------	------	-------	------	-------	--------	------

この構築物は、*S. cerevisiae* HOエンドヌクレアーゼ遺伝子座の上流のヌクレオチド配列からなる相同配列と下流のヌクレオチド配列からなる相同配列で挟まれた、全てガラクトース誘導性プロモーター(*S. cerevisiae*遺伝子GAL1およびGAL10のプロモーター)の下にある、選択マーカー(URA3);それ自体のプロモーターの下にあるネイティブな酵母GAL4転写因子のコピー;2つのネイティブな酵母のメバロン酸経路の酵素(アセトアセチルCoAチオラーゼをコードするERG10、およびHMG-CoAシターゼをコードするERG13)、ならびに*Silicibacter pomeroyi* HMG-CoAレダクターゼの酵母コドン最適化バージョンの2つのコピーをコードするヌクレオチド配列を含む。宿主細胞に導入されると、ms63907構築物は相同組み込みによって宿主細胞のゲノムに組み込まれ、その組み込み配列でHOコード配列が置き換えられることによってHOが機能的に破壊される。構築物は米国特許第8,221,982号に記載の方法を使用して組み立てた。2%グルコースを伴うCSM-URAプレート上で形質転換体を選択し、PCR増幅によって確認した。この構築物中のURA3マーカーは直接反復配列に挟まれており、それにより、当該マーカーの再利用が容易になる。URA3マーカーを再利用するために、細胞をYPD中で一晩成長させ、次いで、5'FOAにプレティングした。URA3のループアウトをPCR増幅、およびCSM-URAプレートで成長できないことによって確認した。ms63909組み込み構築物(i84026;配列番号34)は、*S. pomeroyi* HMG-CoAレダクターゼをコードする配列が、ネイティブな*S. cerevisiae* HMG-CoAレダクターゼをコードする切断型HMG1コード配列であるtHMGで置き換えられていることを1つの例外として、ms63907と同一である。

30

40

【0274】

ms64472組み込み構築物(i85207;配列番号35)が下に示されている。

【0275】

【化 1 1】

GAL80 US	pGAL7	ID11	SJFV	TYD4	pGAL10	ERG10	URA3	80N3	CTV9d	G10N3	CTV9d	pGAL1	ERG12	GAL80 DS
-------------	-------	------	------	------	--------	-------	------	------	-------	-------	-------	-------	-------	-------------

この構築物は、全てガラクトース誘導性プロモーター（*S. cerevisiae* 遺伝子 GAL1、GAL10、および GAL7 のプロモーター）の下にある、選択マーカー（URA3）；5つのネイティブな酵母のエルゴステロール経路の酵素（メバロン酸キナーゼをコードする ERG12、ホスホメバロン酸キナーゼをコードする ERG8、メバロン酸ピロリン酸デカルボキシラーゼをコードする ERG19、ジメチルアリルニリン酸イソメラーゼをコードする IDI1、およびファルネシルピロホスフェートシンターゼをコードする ERG20）、ならびに進化した、*Artemisia annua* ファルネセンシンターゼの酵母コドン最適化バージョンをコードするヌクレオチド配列を含む。これらの配列は、GAL80の上流のヌクレオチド配列からなる相同配列と下流のヌクレオチド配列からなる相同配列で挟まれている。宿主細胞に導入されると、ms64472構築物は相同組込みによって宿主細胞のゲノムに組み込まれ、その組み込み配列で GAL80コード配列が置き換えられることによって GAL80が機能的に破壊される。構築物は米国特許第8,221,982号に記載の方法を使用して組み立てた。2%グルコースを伴う CSM-URA プレート上で形質転換体を選択し、PCR増幅によって確認した。この構築物中の URA3マーカーは直接反復配列に挟まれており、それにより、当該マーカーの再利用が容易になる。URA3マーカーを再利用するために、細胞をYPD中で一晩成長させ、次いで、5'FOAにプレーティングした。URA3のループアウトをPCR増幅、および CSM-URA プレートで成長できないことによって確認した。

【0276】

次に、Y968.ms63907.ms64472、Y12869.ms63907.ms64472、および Y12747.ms63907.ms64472 の ura-バージョンを、RHR2 ORFをノックアウトするために ms59858で形質転換した。この組み込み構築物は、それ自体のプロモーターおよびターミネーターの下にある、RHR2の上流のヌクレオチド配列と下流のヌクレオチド配列に挟まれたネイティブな *S. cerevisiae* URA3遺伝子からなる。形質転換体を、2%グルコースを唯一の炭素源として含有する CSM-his プレートにプレーティングし、PCR増幅によって確認した。

【0277】

6.3.1.2 培養条件

単一のコロニーを96ウェルプレートのウェル中のシード培地（実施例1に記載されている）360μlに接種し、34℃で3日間、1000rpmで振とうすることにより成長させた。次いで、培養物14.4μlを50mMのコハク酸pH5.0および40g/Lガラクトースを伴うシード培地360μl中に継代培養し、34℃で2日間、1000rpmで振とうすることによって成長させた。

【0278】

6.3.1.3 アセテートおよびグリセロールの定量化

アセテートおよびグリセロールを定量化した 全細胞ブロス1mlを1.5mlのエッペンドルフチューブに移し、卓上遠心分離機を使用して13,000RPMで1分回転させて上清を清澄化することによって。次いで、上清を8mMの硫酸で希釈し（1:1v/v）、ボルテックスし、再度遠心分離した後に、1.8mlのバイアルに移した。BioRad Aminex HPLC-87H 300mm×7.8mmカラムを使用して、可変性の波長および屈折率検出を伴うAgilent 1200 HPLCを用いて試料を分析した。移動相移動相は4mMの硫酸であり、カラム温度は40℃であり、流速は毎分0.5mlであった。

【0279】

6.3.1.4 ファルネセンの定量化

10

20

30

40

50

34℃で2日間のインキュベーションの最後に、全細胞ブロス98 μlをナイルレッド溶液(DMSO中100 μg/ml) 2 μlと混合して平底96ウェルアッセイプレート(Costar 3916)に入れ、96ウェルプレート振とう機で30秒混合した。次いでプレートをBeckman M5プレートリーダーにおいて500 nmにおける励起および550 nmにおける放出を用いて読み取った。

【0280】

6. 3. 1. 5 光学濃度の定量化

96ウェルアッセイプレートにおいて、培養物8 μlと希釈剤(20%PEG200、20%エタノール、2%トリトンX-114) 92 μlを混合し、室温で30分インキュベートした。アッセイプレートをボルテックスした後、Beckman M5プレートリーダーでOD₆₀₀を測定した。

【0281】

6. 3. 2 結果

図8Aには、PDH-バイパスの欠失(*acs1Δ acs2Δ ald6Δ*)を含み、アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼアセチル化(*Dz. eutE*)ならびにホスホクエラターゼ(*Lm. PK*)およびホスホトランスアセチラーゼ(*Ck. PTA*)を異種発現し、かつファルネセン産生経路内の遺伝子を過剰発現するY12746. ms63909. ms64472株により、RHR2遺伝子が欠失したY12746. ms63909. ms64472バージョンよりも多くのアセテートが分泌されることが示されている。図8Bに示されている通り、Y12746. ms63909. ms64472 *rhr2* ΔのグリセロールレベルはY12746. ms63909. ms64472と比較して大きく変化しないので、RHR2の欠失によるグリセロール産生に対する影響はない。図8Cに示されている通り、Y12746. ms63909. ms64472 *rhr2* Δにおけるアセテートの実質的なレベルの低下は、細胞密度はRHR2+集団と*rhr2* Δ集団のどちらについても同様であるので、細胞の成長の低下に起因するものではない。これらの結果により、無細胞抽出物におけるアセチルホスフェートホスファターゼ活性に関与するRhr2が、*in vivo*におけるアセチルホスフェートのアセテートへの加水分解の主な原因でもあることが実証される。

【0282】

RHR2が欠失すると観察されるアセテートの減少がファルネセン産生とは独立して起こるかどうかを決定するために、12746株のRHR2遺伝子がインタクトであるまたは欠失しているがファルネセン産生経路内の遺伝子を発現しないバージョンにおけるアセテート産生を測定した。図8Dには、PDH-バイパスの欠失(*acs1Δ acs2Δ ald6Δ*)を含み、アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼアセチル化(*Dz. eutE*)ならびにホスホクエラターゼ(*Lm. PK*)およびホスホトランスアセチラーゼ(*Ck. PTA*)を異種発現するY12746株により、Y12746のRHR2遺伝子が欠失したバージョンよりも多くのアセテート分泌されることが示されている。図8Eに示されている通り、Y12746. ms63909. ms64472 *rhr2* Δにおけるアセテートの実質的なレベルの低下は、細胞密度はRHR2+集団および*rhr2* Δ集団のどちらについても同様であるので、細胞の成長の低下に起因するものではない。これらのデータにより、アセテートの減少が過剰発現したファルネセン産生経路の存在にかかわらず起こることが例証される。

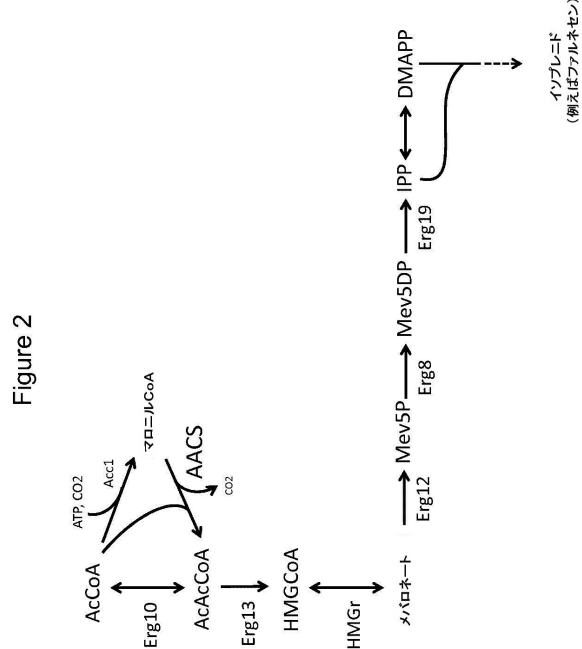
【0283】

図9には、*rhr2* Δの欠失により、ファルネセン産生がY12746. ms63907. ms64472では2.1倍改善され、Y12745. ms63907. ms64472では1.4倍改善されることが示されている(各株バックグラウンドにおいて、RHR2+親を1に正規化)。さらに、*rhr2* Δの欠失により、Y12746. ms63907. ms64472の炭素消耗時の最終的な光学濃度が改善される。Y12745. ms63907. 64472とY12746. ms63907. ms64472はどちらも、ファルネセンの合成に使用される細胞質ゾル内アセチルCoAを産生するためにホスホク

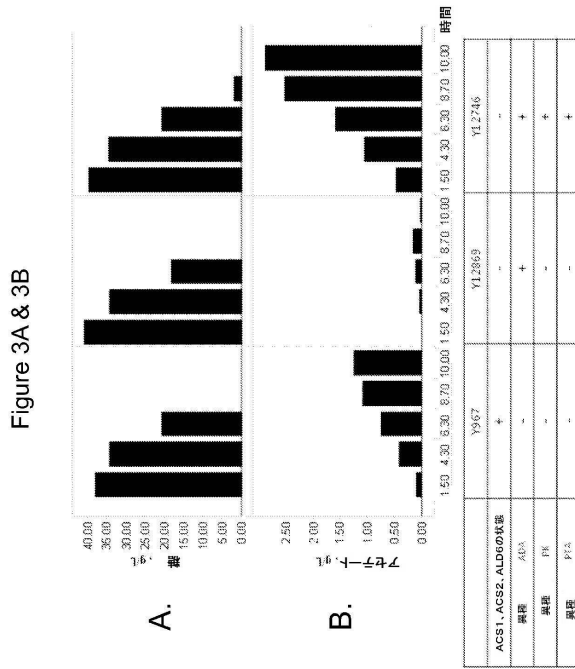
【 0 2 8 4 】

10

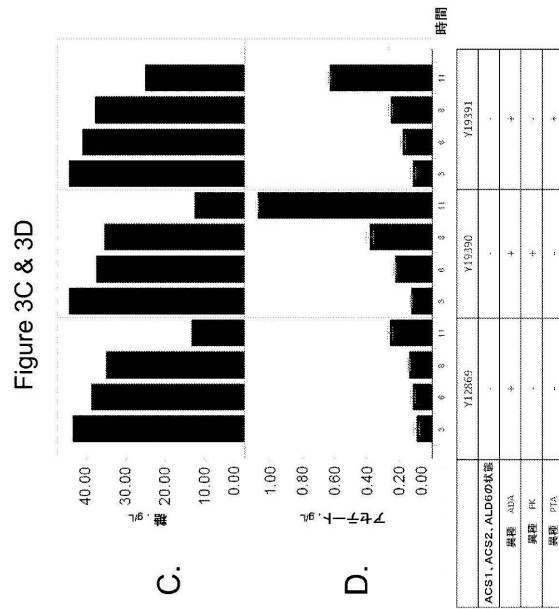
【図 2】



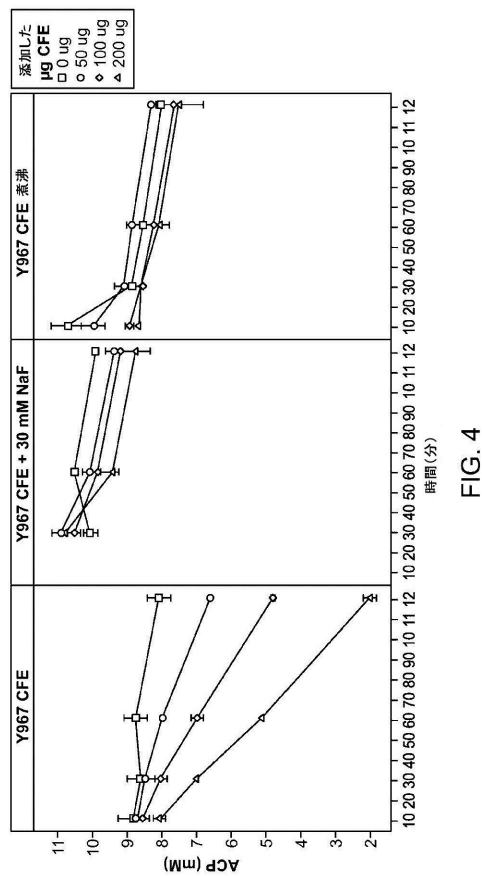
【図 3 - 1】



【図 3 - 2】



【図 4】



【図 5】

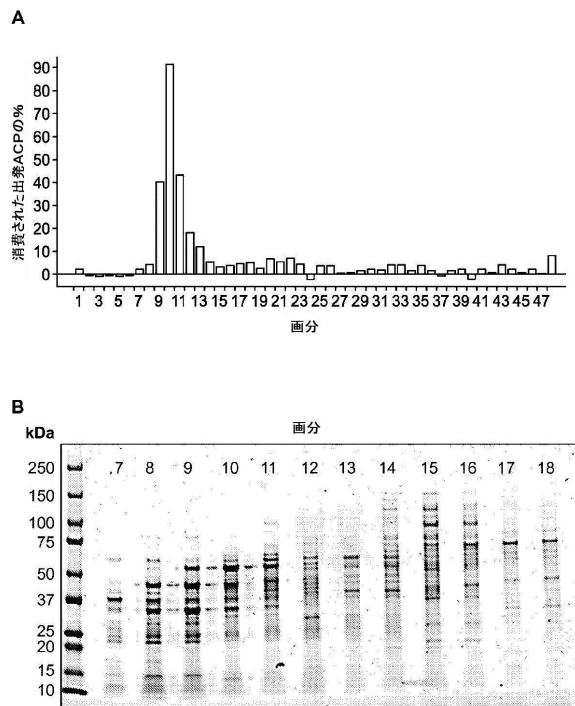
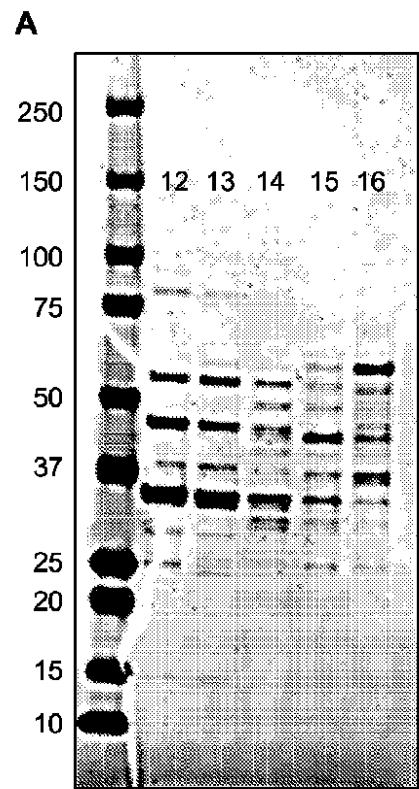


FIG. 5

【図 6 A】



【図 6 B】

B

prot_acc	prot_desc	MW	pI
YGR192C	TDH3	35.7	6.96
YHR174W	ENO2	46.9	5.88
YGR254W	ENO1	46.8	6.6
YJL052W	TDH1	35.7	8.59
YJR123W	RPS5	25	9.11
YGL076C	RPL7A	27.6	10.97
YPL198W	RPL7B		
YDL124W	YDL124W	35.5	6.1
YFR044C	DUG1	52.9	5.43
YIL053W	RHR2	28	5.31
YGR244C	LSC2	46.9	7.49
YBL030C	PET9	34.4	10.61
YMR099C	YMR099C	33.9	6.07
YHR183W	GND1	53.5	6.6
YLR058C	SHM2	52.2	7.44
YOR142W	LSC1	35	8.73
YBR011C	IPP1	32.3	5.33
YML126C	ERG13	55	8.23
YMR217W	GUA1	58.4	6.47
YMR226C	YMR226C	29.1	6.81
YJL167W	ERG20	40.4	5.21
YPL262W	FUM1	53.1	8.26
YOR209C	NPT1	49	6.92
YPR080W	TEF1	50	9.72
YBR118W	TEF2	50	9.72
YHR087W	RTC3	12	4.86
YOL086C	ADH1	36.8	6.66
YMR303C	ADH2	36.7	6.72
YKL085W	MDH1	35.6	8.99
YGR037C	ACB1	10	4.67
YOR265W	RBL2	12.4	4.82
YOR116C	RPO31	162.3	8.22
YLR044C	PDC1	61.4	6.12
YLR134W	PDC5	61.9	6.41
YNL095C	YNL095C	71.1	7.51
YNL327W	EGT2	108	4.43
YJL159W	HSP150	41	4.876
YBR208C	DUR1,2	201	5.39

【図 7】

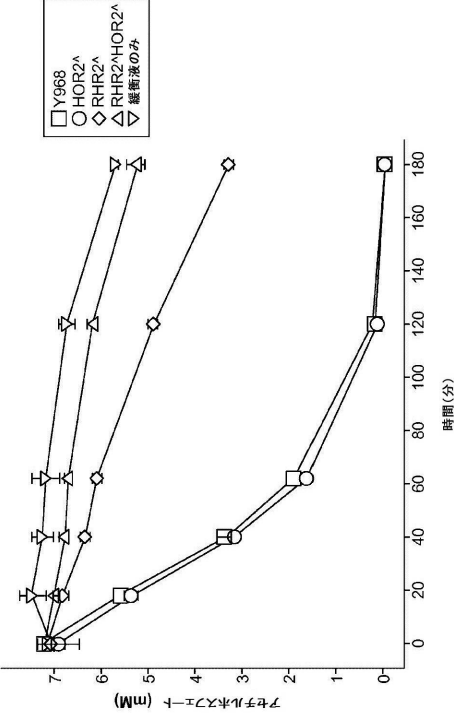


FIG. 7

【図 8 - 1】

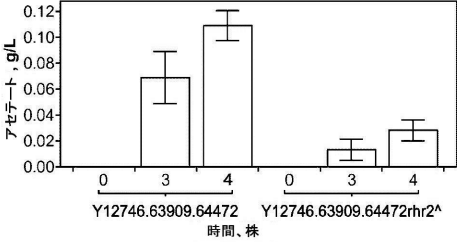


FIG. 8A

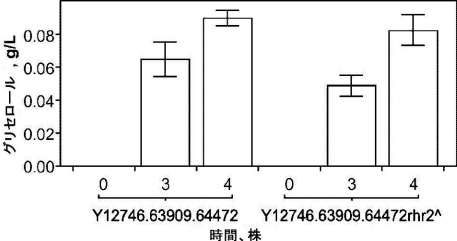


FIG. 8B

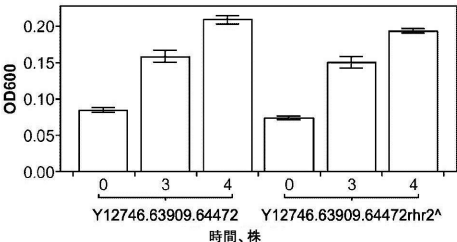


FIG. 8C

【図 8－2】

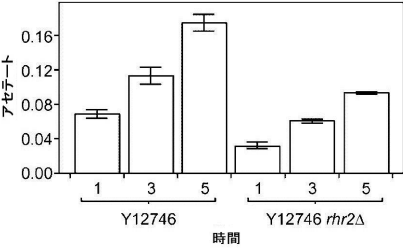


FIG. 8D

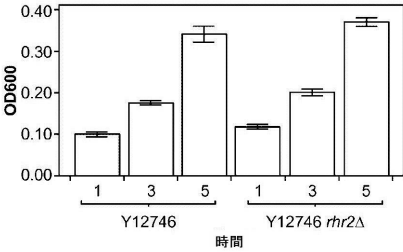


FIG. 8E

【図 9】

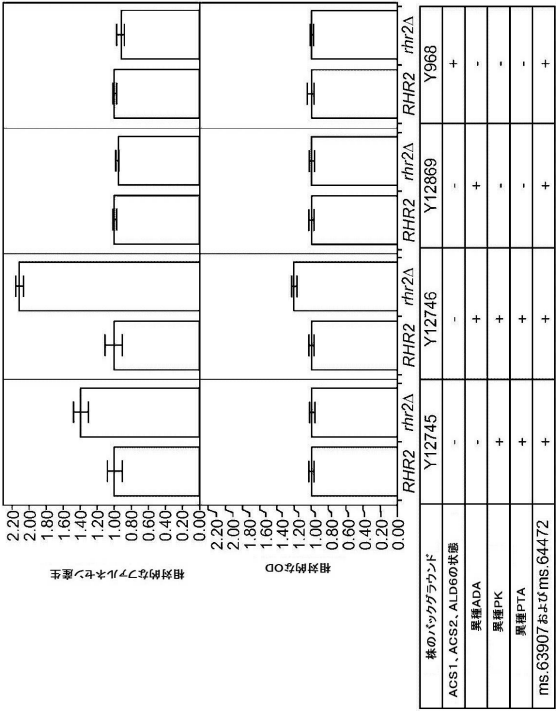


FIG. 9

【配列表】

0006595449000001.app

フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 9/88 (2006.01) C 1 2 N 9/88
C 1 2 N 9/10 (2006.01) C 1 2 N 9/10
- (74)代理人 100117189
弁理士 江口 昭彦
- (74)代理人 100134120
弁理士 内藤 和彦
- (72)発明者 ホーキンス, クリスティー ミシェル
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94608, エミリービル, ホリス ストリート 588
5, スイート 100
- (72)発明者 マハトデジクールメドウズ, ティナ ティパワン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94608, エミリービル, ホリス ストリート 588
5, スイート 100
- (72)発明者 メドウズ, アダム レオン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94608, エミリービル, ホリス ストリート 588
5, スイート 100
- (72)発明者 ピッケンズ, ローレン バーバラ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94608, エミリービル, ホリス ストリート 588
5, スイート 100
- (72)発明者 タイ, アナ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94608, エミリービル, ホリス ストリート 588
5, スイート 100
- (72)発明者 ソン, アニー エニング
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94608, エミリービル, ホリス ストリート 588
5, スイート 100

審査官 牧野 晃久

- (56)参考文献 国際公開第2012/098662 (WO, A1)
米国特許出願公開第2012/0276587 (US, A1)
欧州特許出願公開第02546336 (EP, A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 N 15/00- 15/90
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)