

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6048980号
(P6048980)

(45) 発行日 平成28年12月21日 (2016.12.21)

(24) 登録日 平成28年12月2日 (2016.12.2)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 1/19 (2006.01)
 C 1 2 P 7/06 (2006.01)
 C 1 2 P 7/16 (2006.01)
 C 1 2 P 7/56 (2006.01)
 C 1 2 P 7/42 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 Z N A
 C 1 2 P 7/06
 C 1 2 P 7/16
 C 1 2 P 7/56
 C 1 2 P 7/42

請求項の数 17 (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-523327 (P2014-523327)
 (86) (22) 出願日 平成24年8月2日 (2012.8.2)
 (65) 公表番号 特表2014-521341 (P2014-521341A)
 (43) 公表日 平成26年8月28日 (2014.8.28)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2012/065088
 (87) 国際公開番号 W02013/017644
 (87) 国際公開日 平成25年2月7日 (2013.2.7)
 審査請求日 平成27年7月30日 (2015.7.30)
 (31) 優先権主張番号 11176601.0
 (32) 優先日 平成23年8月4日 (2011.8.4)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 61/515,014
 (32) 優先日 平成23年8月4日 (2011.8.4)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 503220392
 ディーエスエム アイビー アセツ ビ
 ー、ブイ、
 オランダ国、 6 4 1 1 ティーイー ヘ
 ーレン、 ヘット オーバールーン 1
 (74) 代理人 100107456
 弁理士 池田 成人
 (74) 代理人 100148596
 弁理士 山口 和弘
 (74) 代理人 100123995
 弁理士 野田 雅一
 (74) 代理人 100128381
 弁理士 清水 義憲

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ペントース糖発酵細胞

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

キシロースイソメラーゼをコードするヌクレオチド配列を含む細胞であって、前記キシロースイソメラーゼのアミノ酸配列が、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 90% の配列同一性を有し、且つ前記ヌクレオチド配列が前記宿主にとって異種である、細胞。

【請求項 2】

酵母細胞である、請求項 1 に記載の細胞。

【請求項 3】

前記キシロースイソメラーゼをコードするヌクレオチド配列が、クロストリジウム属 (Clostridium) の細胞から得られる、請求項 1 又は 2 に記載の細胞。

【請求項 4】

サッカロミセス属 (Saccharomyces)、クルイベロミセス属 (Kluyveromyces)、カンジダ属 (Candida)、ピキア属 (Pichia)、シゾサッカロミセス属 (Schizosaccharomyces)、ハンゼヌラ属 (Hansenula)、クロエケラ属 (Klockera)、シュワンニオミセス属 (Schwanniomycetes) 又はヤロウイア属 (Yarrowia) の酵母細胞である、請求項 2 又は 3 に記載の細胞。

【請求項 5】

前記酵母細胞が、S. セレビシエ (S. cerevisiae)、S. ブルデリ (S.

10

20

bulderi)、*S. バルネッチ* (*S. barnettii*)、*S. エクシグウス* (*S. exiguus*)、*S. ウバルム* (*S. uvarum*)、*S. ジアスタチカス* (*S. diastaticus*)、*K. ラクチス* (*K. lactis*)、*K. マルクシアヌス* (*K. marxianus*) 又は *K. フラギリス* (*K. fragilis*) の種である、請求項 4 に記載の細胞。

【請求項 6】

前記細胞が、

- a. キシルロースキナーゼ活性の増加；
- b. ペントースリン酸経路を通じる流束の増加；
- c. アルドースレダクターゼ活性の減少；又は
- d. カタボライト抑制に対する感受性の減少；

をもたらす 1 つ以上の遺伝子修飾を含む、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 7】

前記 1 つ以上の遺伝子修飾が、前記ペントースリン酸経路の非酸化的部分の酵素をコードする少なくとも 1 つの遺伝子の過剰発現をもたらす、請求項 6 に記載の細胞。

【請求項 8】

前記遺伝子が、リブロース - 5 - リン酸イソメラーゼ、リブロース - 5 - リン酸エピメラーゼ、トランスケトララーゼ又はトランスアルドラーゼをコードする遺伝子である、請求項 7 に記載の細胞。

【請求項 9】

前記 1 つ以上の遺伝子修飾が、キシルロースキナーゼをコードする遺伝子の過剰発現をもたらす、請求項 6 ～ 8 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 10】

前記 1 つ以上の遺伝子修飾が、前記細胞における非特異的アルドースレダクターゼ活性の減少をもたらす、請求項 6 ～ 9 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 11】

L - アラビノースを使用する能力を有する、請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の細胞であって、遺伝子 T A L 1、T K L 1、R P E 1 及び R K I 1 が過剰発現する、細胞。

【請求項 12】

G R E 3 遺伝子のコード領域が、前記コード領域を遺伝子 T A L 1、T K L 1、R P E 1 及び R K I 1 を含むヌクレオチド配列に置換することにより不活性化される、請求項 6 ～ 11 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 13】

ラクトバチルス・プランタルム (*Lactobacillus plantarum*) 由来の遺伝子 *araA*、*araB* 及び *araD* が発現する、請求項 6 ～ 12 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 14】

1 つ以上の構成的に発現した又は構成的に過剰発現した遺伝子が、前記細胞のゲノムに安定に組み込まれる、請求項 6 ～ 13 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 15】

発酵生成物の生成方法において、キシロース供給源を含有する培地を、請求項 1 ～ 14 のいずれか一項に記載の細胞で発酵させる工程であって、前記細胞によりキシロースが前記発酵生成物に発酵される工程を含む方法。

【請求項 16】

前記発酵生成物が、エタノール、ブタノール、乳酸、3 - ヒドロキシプロピオン酸、アクリル酸、酢酸、コハク酸、クエン酸、リンゴ酸、フマル酸、イタコン酸、アミノ酸、1, 3 - プロパンジオール、エチレン、グリセロール、 β - ラクタム系抗生物質及びセファロスポリンである、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

嫌氣的である、請求項 15 又は 16 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

[発明の分野]

本発明は、キシロースをキシルロースに異性化する能力を有する細胞に関する。本発明はまた、かかる細胞が発酵生成物、例えばエタノールの生成に用いられる方法にも関する。

【0002】

[発明の背景]

ここ数十年における従来の化石燃料（石油系燃料）の大量消費は、高レベルの汚染の一因となっている。これにより、世界の化石燃料資源には限りがあるという認識及び高まりつつある環境意識と相まって、エタノールなどの代替燃料の実現可能性を調査する新たな試みが活発化している。エタノールは、粒子状物質を生じない燃焼の燃料供給源であり、毎リットル基準で無鉛ガソリンと比べて放出するCO₂が少ない。

【0003】

バイオマス由来のエタノールは、多くの異なる供給源から得られるヘキソース糖類の発酵により製造し得るが、ショ糖及びコーンスターチなど、燃料アルコールを商業規模で製造するために典型的に用いられる基質は高価である。従って燃料エタノールの増産には、より低価な供給原料の使用が必要となり得る。

【0004】

現在、現行のエタノール製造に用いられる作物の代替とするのに十分な量で利用可能であるのは、植物バイオマス由来のリグノセルロース系の供給原料のみである。ほとんどのリグノセルロース系材料において、グルコースに次ぐ二番目に多い糖はキシロースである。従って、経済的に見合う燃料生産プロセスとするには、ヘキソース及びペントースの双方の糖を発酵させてエタノールを形成しなければならない。酵母*Saccharomyces cerevisiae*は口バストで、エタノール製造によく適合しているものの、キシロースを炭素源として使用してエタノールを生成することができない。また、高いエタノール収率並びに高いエタノール生産性でキシロースをエタノールに発酵することのできる天然に存在する生物は、知られていない。

【0005】

従って、リグノセルロース系供給原料からの商業的に実行可能なエタノール製造が可能となるように、これらの特性を備えた生物が必要とされている。

【0006】

[発明の概要]

本発明によれば、発酵能、例えばアルコール発酵能を有し、且つキシロースを炭素源として使用する能力を有する細胞が提供される。かかる細胞は、キシロースイソメラーゼをコードするヌクレオチド配列を含み、ここでキシロースイソメラーゼのアミノ酸配列は、配列番号2に示されるアミノ酸配列と少なくとも75%の配列同一性を有し、且つヌクレオチド配列は宿主にとって異種である。かかる細胞は、キシロースを炭素源として使用するとき、野生型糸状菌類と比較してより多量のエタノールを生成する。

【0007】

本発明はまた、以下も提供する：

- 発酵生成物の生成方法、この方法は、キシロース供給源を含有する培地を本発明の細胞で発酵させる工程であって、細胞によりキシロースが発酵生成物に発酵される工程を含む；

- 発酵生成物の生成方法、この方法は、少なくともキシロース供給源及びL-アラビノース供給源を含有する培地を、L-アラビノースの利用能もまた有する本発明の定義されたとおりの細胞で発酵させる工程であって、細胞によりキシロース及びL-アラビノースが発酵生成物に発酵される工程を含む；及び

- 発酵生成物の生成方法、この方法は、少なくともキシロース供給源及びL-アラビノース

10

20

30

40

50

ス供給源を含有する培地を、本発明の細胞及びL - アラビノースを使用する能力がある細胞で発酵させる工程であって、それにより各細胞がキシロース及び / 又はアラビノースを発酵生成物に発酵する工程を含む。

【0008】

ある実施形態では、細胞は、クロストリジウム属 (*Clostridium*) の細胞、例えばクロストリジウム・ベイジェリンキ (*Clostridium beijerinckii*) 細胞から得られるキシロースイソメラーゼをコードするヌクレオチド配列を含む。ある実施形態では、ヌクレオチドは野生型であってもよく、又はコドン最適化されていてもよく、又はコドンペア最適化されていてもよい。

【0009】

本発明はさらに、発酵生成物の生成方法における本発明の細胞の使用を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) における発現用のクロストリジウム・ベイジェリンキ (*Clostridium beijerinckii*) 由来のキシロースイソメラーゼをコードする p427 - TEF のプラスミドマップを示す。CpO は、コドンペア最適化されていることを意味する。

【図2】単一炭素源としての2%キシロース上における pPWT215 で形質転換した BIE104P1、及びプラスミドにおいてDNAなしに形質転換した参照株 (モック形質転換) の増殖曲線を示す。数字「1」及び「2」は、培養物のアリコートを新鮮培地に移し替えたことを示す。最後の一つ (2回目の移し替え後) を除き、全ての培養物は空気の下でインキュベートした。

【図3】実施例6からの、株BIE292XI (*C. beijerinckii*) (黒色の線) 及びモック株 (灰色の線) の増殖曲線を示す。

【0011】

[配列表の簡単な説明]

配列番号1は、クロストリジウム・ベイジェリンキ (*Clostridium beijerinckii*) 由来のコドンペア最適化キシロースイソメラーゼ配列を示す。

【0012】

配列番号2は、クロストリジウム・ベイジェリンキ (*Clostridium beijerinckii*) 由来のキシロースイソメラーゼのアミノ酸配列を示す。

【0013】

配列番号2は、フォワードプライマーの配列を示す。

【0014】

配列番号4は、リバースプライマーの配列を示す。

【0015】

[発明の詳細な説明]

本明細書及び添付の特許請求の範囲の全体を通して、語句「～を含む (comprise)」及び「～を包含する (include)」及び変化形、例えば「～を含む (comprises)」、「～を含んでいる (comprising)」、「～を包含する (includes)」及び「～を包含している (including)」は、包含的に解釈されるべきである。すなわちこれらの語句には、文脈上許容される場合に、具体的に記載されない他の要素又は完全体が包含される可能性があることを伝える意図がある。

【0016】

本発明は、キシロースイソメラーゼをコードするヌクレオチド配列を含む細胞に関し、ここでキシロースイソメラーゼのアミノ酸配列は、配列番号2に示されるアミノ酸配列と少なくとも75%の同一性を有し、且つヌクレオチド配列は宿主にとって異種である。

【0017】

キシロースイソメラーゼをコードするヌクレオチド配列の存在により、細胞に対し、キシロースをキシルロースに異性化する能力が付与される。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 8 】

「キシロースイソメラーゼ」(E C 5 . 3 . 1 . 5) は、本明細書では、D - キシロースから D - キシルロースへの直接の異性化及び / 又はその逆を触媒する酵素として定義される。この酵素は、D - キシロースケトイソメラーゼとしても知られる。本明細書におけるキシロースイソメラーゼはまた、D - グルコースと D - フルクトースとの間の変換を触媒する能力も有し得る (それに伴い、故にグルコースイソメラーゼと称することができる) 。本明細書におけるキシロースイソメラーゼは、補因子として二価カチオン、例えばマグネシウム、マンガン又はコバルトを必要とし得る。

【 0 0 1 9 】

従って、本発明の細胞は、キシロースをキシシルロースに異性化する能力を有する。キシロースをキシシルロースに異性化する能力は、宿主細胞に対し、定義されたキシロースイソメラーゼをコードするヌクレオチド配列を含む核酸コンストラクトで宿主細胞を形質転換することにより付与される。本発明の細胞は、キシロースからキシシルロースへの直接の異性化によりキシロースをキシシルロースに異性化する。これは、キシロースからキシリトール中間体を介してキシシルロースに至る、それぞれキシロースレダクターゼ及びキシリトールデヒドロゲナーゼにより触媒されるとおりの二段階変換とは対照的に、キシロースイソメラーゼにより触媒される単一の反応でキシロースがキシシルロースに異性化されることを意味するものと理解される。

【 0 0 2 0 】

キシロースイソメラーゼ活性の単位 (U) は、本明細書では、K u y p e r s (2 0 0 3、F E M S Y e a s t R e s . 4 : 6 9 - 7 8) により記載されるとおりの条件下で毎分 1 n m o l のキシシルロースを生成する酵素の量として定義され得る。

【 0 0 2 1 】

本発明の細胞は、配列番号 2 のアミノ酸配列又はそれと少なくとも 7 4 % の配列同一性を有する配列を有するキシロースイソメラーゼに関連して定義される。同様に、本発明の細胞は、かかるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列であるキシロースイソメラーゼに関連して定義され得る。

【 0 0 2 2 】

配列番号 2 は、クロストリジウム・ベイジェリンキ (C l o s t r i d i u m b e i j e r i n c k i i) 由来のキシロースイソメラーゼのアミノ酸配列を示す。本発明の細胞は、配列番号 2 のアミノ酸又はそれと少なくとも 7 4 % の配列同一性を有するものを有するキシロースイソメラーゼをコードするヌクレオチド配列を含む。

【 0 0 2 3 】

好ましくは、本発明に係る細胞は、配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも約 7 5 %、好ましくは少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 3 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 % 又は少なくとも約 9 9 % 又は少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 % 又は少なくとも 9 9 % の配列同一性を有する配列を有するキシロースイソメラーゼをコードするヌクレオチド配列を含む細胞である。本発明に係る細胞は、配列番号 1 に示される核酸配列と少なくとも約 5 0 %、少なくとも約 5 5 %、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 7 5 %、好ましくは少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 2 %、少なくとも約 9 3 %、少なくとも約 9 4 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 % 又は少なくとも約 9 9 % 又は少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 % 又は少なくとも 9 9 % の配列同一性を有する配列を有する、キシロースイソメラーゼをコードするヌクレオチド配列を含み得る。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 4 】

配列同一性（又は配列類似性）は、本明細書では、2つ以上のアミノ酸（ポリペプチド又はタンパク質）配列間又は2つ以上の核酸（ポリヌクレオチド）配列間の、それらの配列を比較することにより決定されるときとの関係として定義される。通常、配列同一性又は類似性は比較され、典型的には配列の長さ全体にわたり比較される。しかしながら、配列は、より短い比較ウィンドウにわたり比較されてもよい。当該技術分野では、「同一性」はまた、アミノ酸配列間又は核酸配列間の、場合によってはかかる配列のストリング間を一致させることにより決定されるとおりの、配列関連性の程度も意味する。

【 0 0 2 5 】

同一性を決定するための好ましい方法は、試験配列間で最大の一致を得るように設計される。同一性及び類似性を決定するための方法は、公的に利用可能なコンピュータプログラムにコード化されている。2つの配列間の同一性及び類似性を決定するための好ましいコンピュータプログラム方法としては、例えば `BestFit`、`BLASTP`、`BLASTN`、及び `FASTA` が挙げられる（`Altschul, S. F. ら、J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)`）、`NCBI` 及び他の供給元から公的に利用可能（`BLAST Manual, Altschul, S. ら、NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894`）。`BLASTP` を用いたアミノ酸配列比較に好ましいパラメータは、ギャップ開始 `11.0`、ギャップ伸長 `1`、`Blosum62` 行列である。`BLASTP` を用いた核酸配列比較に好ましいパラメータは、ギャップ開始 `11.0`、ギャップ伸長 `1`、`DNA` 完全行列（`DNA full matrix`）（`DNA` 同一性行列（`DNA identity matrix`））である。

【 0 0 2 6 】

場合により、当業者はまた、アミノ酸類似性の程度を決定するにおいて、当業者には明らかであろうとおりの、いわゆる「保存的な」アミノ酸置換を考慮に入れてもよい。

【 0 0 2 7 】

保存的アミノ酸置換は、同様の側鎖を有する残基の互換性を指す。例えば、脂肪族側鎖を有する一群のアミノ酸は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、及びイソロイシンである；脂肪族ヒドロキシル側鎖を有する一群のアミノ酸は、セリン及びスレオニンである；アミド含有側鎖を有する一群のアミノ酸は、アスパラギン及びグルタミンである；芳香族側鎖を有する一群のアミノ酸は、フェニルアラニン、チロシン、及びトリプトファンである；塩基性側鎖を有する一群のアミノ酸は、リジン、アルギニン、及びヒスチジンである；及び硫黄含有側鎖を有する一群のアミノ酸は、システイン及びメチオニンである。

【 0 0 2 8 】

好ましい保存的アミノ酸置換群は、バリン - ロイシン - イソロイシン、フェニルアラニン - チロシン、リジン - アルギニン、アラニン - バリン、及びアスパラギン - グルタミンである。本明細書に開示されるアミノ酸配列の置換変異体は、開示される配列中の少なくとも1つの残基が取り除かれ、その代わりに異なる残基が挿入されているものである。好ましくは、アミノ酸変化は保存的である。天然に存在するアミノ酸の各々についての好ましい保存的置換は、以下のとおりである：`Ala` から `ser`；`Arg` から `lys`；`Asn` から `gln` 又は `his`；`Asp` から `glu`；`Cys` から `ser` 又は `ala`；`Gln` から `asn`；`Glu` から `asp`；`Gly` から `pro`；`His` から `asn` 又は `gln`；`He` から `leu` 又は `val`；`Leu` から `ile` 又は `val`；`Lys` から `arg`；`gln` 又は `glu`；`Met` から `leu` 又は `ile`；`Phe` から `met`、`leu` 又は `tyr`；`Ser` から `thr`；`Thr` から `ser`；`Trp` から `tyr`；`Tyr` から `trp` 又は `phe`；及び、`Val` から `ile` 又は `leu`。

【 0 0 2 9 】

本発明に係るキシロースからキシルロースへの変換を触媒する酵素をコードするヌクレオチド配列はまた、中程度の、又は好ましくはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下において配列番号2に示される配列又はそれと少なくとも74%の配列同一性を有する配列を有する酵素をコードするヌクレオチド配列とハイブリダイズするその能力に

よっても定義され得る。

【0030】

形式上、かかるヌクレオチド配列は、配列番号2に示される配列又はそれと少なくとも74%の配列同一性を有する配列を有する酵素をコードするヌクレオチド配列の逆相補体とハイブリダイズし、例えば配列番号1又は2の逆相補体とハイブリダイズする配列である。

【0031】

ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、本明細書では、少なくとも約25、好ましくは約50ヌクレオチド、75又は100及び最も好ましくは約200ヌクレオチド又はそれ以上の核酸配列のハイブリダイゼーションが、約1M塩、好ましくは6×SSC(塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウム)を含む溶液又は同等のイオン強度を有する任意の他の溶液において約65の温度で、及び約0.1M塩、又はそれ以下、好ましくは0.2×SSCを含む溶液又は同等のイオン強度を有する任意の他の溶液における65での洗浄で可能な条件として定義される。好ましくは、ハイブリダイゼーションは一晩、すなわち少なくとも10時間実施され、好ましくは洗浄は少なくとも1時間、少なくとも2回の洗浄溶液交換を伴い実施される。これらの条件により、通常、約90%又はそれ以上の配列同一性を有する配列の特異的なハイブリダイゼーションが可能となり得る。

【0032】

中程度の条件は、本明細書では、少なくとも50ヌクレオチド、好ましくは約200ヌクレオチド又はそれ以上の核酸配列のハイブリダイゼーションが、約1M塩、好ましくは6×SSCを含む溶液又は同等のイオン強度を有する任意の他の溶液において約45の温度で、及び約1M塩、好ましくは6×SSCを含む溶液又は同等のイオン強度を有する任意の他の溶液における室温での洗浄で可能な条件として定義される。好ましくは、ハイブリダイゼーションは一晩、すなわち少なくとも10時間実施され、好ましくは洗浄は少なくとも1時間、少なくとも2回の洗浄溶液交換を伴い実施される。これらの条件により、通常、最大50%の配列同一性を有する配列の特異的なハイブリダイゼーションが可能となり得る。当業者は、これらのハイブリダイゼーション条件を修正して、50%~90%の様々な同一性の配列を特異的に同定することができるであろう。

【0033】

導入された酵素が本発明の細胞において活性型で発現する可能性を高めるため、対応するコードヌクレオチド配列を、そのコドン使用が選択した酵母細胞のコドン使用に最適化されるように適合させてもよい。いくつかのコドン最適化方法が当該技術分野において公知である。ヌクレオチド配列のコドン使用を酵母のコドン使用に最適化する好ましい方法は、国際公開第2006/077258号パンフレット及び/又は国際公開第2008/000632号パンフレットに開示されるとおりのコドンペア最適化技法である。国際公開第2008/000632号パンフレットは、コドンペア最適化を取り上げている。コドンペア最適化は、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列をそのコドン使用、特に用いられるコドンペアに関して修飾することで、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の発現の向上及び/又はコードされるポリペプチドの産生の向上を達成する方法である。コドンペアは、あるコード配列における2つの続くトリプレット(コドン)として定義される。

【0034】

遺伝子発現及び翻訳効率の簡易尺度として、本明細書では、Xuhua Xia、Evolutionary Bioinformatics 2007:3 53-58に記載されるとおりのコドン適応指数(Codon Adaptation Index: CAI)を使用する。この指数は、ある種由来の高発現遺伝子の参照セットを使用して各コドンの相対的なメリットを評価するもので、遺伝子のスコアが、当該の遺伝子における全てのコドンの使用頻度から計算される。この指数は、コドン使用パターンの形成において選択が有効となった程度を評価する。その点で、これは遺伝子の発現レベルの予測、ウイルス遺伝子のその宿主に対する適応の評価、及び異なる生物におけるコドン使用頻度の比

10

20

30

40

50

較実施に有用である。この指数はまた、異種遺伝子発現が成功する可能性の近似的な指標も提供し得る。本発明に係るコドンペア最適化遺伝子では、C A I は 0.6 以上、0.7 以上、0.8 以上、0.85 以上、0.87 以上、0.90 以上、0.95 以上、又は約 1.0 である。

【0035】

本発明の細胞では、キシロースイソメラーゼは典型的には細胞にとって異種である。すなわち、キシロースイソメラーゼは、それが存在する生物、細胞、ゲノム DNA 又は RNA 配列の一部として当該の細胞に天然に存在することのない配列を有する。すなわち、キシロースイソメラーゼは細胞にとって外因性であり、又は細胞に天然には存在しない。従って、キシロースイソメラーゼをコードするヌクレオチド配列は、形質転換された宿主細胞において活性型で典型的に発現するか、又は発現する能力を有する。

10

【0036】

従って本発明の細胞は、上記に定義するとおりのキシロースイソメラーゼをコードするヌクレオチド配列を含む核酸コンストラクトを含む細胞、すなわちそのような核酸コンストラクトで形質転換された細胞である。キシロースイソメラーゼコード配列を含む核酸コンストラクトは、好ましくは宿主細胞においてキシロースイソメラーゼを発現する能力を有する。

【0037】

細胞において異種キシロースイソメラーゼ配列を発現させる方法は、当業者に公知である。

20

【0038】

従って、本発明の細胞は組換え細胞である。すなわち、本発明の細胞は、当該の細胞で天然には存在しないヌクレオチド配列を含むか、又はそれで形質転換されるか、又はそれで遺伝子修飾される。

【0039】

細胞におけるキシロースイソメラーゼの組換え発現技法、並びに本発明の細胞のさらなる遺伝子修飾技法は、当業者に公知である。典型的にかかる技法は、関連する配列を含む核酸コンストラクトによる細胞の形質転換を含む。かかる方法は、例えば、Sambrook and Russel (2001) 「Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第3版)、Cold Spring Harbor Laboratory Press、又は F. Ausubel ら編、「Current protocols in molecular biology」、Green Publishing and Wiley Interscience、ニューヨーク (1987) などの標準的なハンドブックから公知である。真菌宿主細胞の形質転換及び遺伝子修飾の方法は、例えば欧州特許出願公開第 0635 574 号明細書、国際公開第 98/46772 号パンフレット、国際公開第 99/60102 号パンフレット、国際公開第 00/37671 号パンフレット、国際公開第 90/14423 号パンフレット、欧州特許出願公開第 A-0481008 号明細書、欧州特許出願公開第 A-0635574 号明細書及び米国特許第 6,265,186 号明細書から公知である。

30

40

【0040】

多くのエピソームプラスミド又は 2 μ プラスミドは比較的不安定であり、世代を経る毎に約 10^{-2} 以上の細胞で失われる。選択的増殖条件下であっても、60% ~ 95% の細胞しかエピソームプラスミドを保持しない。多くのエピソームプラスミドのコピー数は、cir⁺ 宿主の細胞あたり 10 ~ 40 の範囲である。しかしながら、プラスミドは細胞間に均等に分布するわけではなく、集団における細胞あたりのコピー数には大きいばらつきがある。組込みプラスミドで形質転換された株は、選択圧がなくても極めて安定している。しかしながら、縦列反復 DNA 間の相同組換えにより、プラスミド損失は約 10^{-3} ~ 10^{-4} の頻度で起こることがあり、ベクター配列のループアウトが生じ得る。好ましくは、安定した組込みの場合のベクター設計は、このように、選択マーカー遺伝子の喪失時

50

に（これもまた分子内相同組換えにより起こる）組み込まれたコンストラクトのそうしたループアウトがもはや不可能なものである。好ましくは遺伝子はこのように安定に組み込まれる。安定な組込みは、本明細書では、組み込まれたコンストラクトのループアウトがもはや不可能な場合のゲノムへの組込みとして定義される。好ましくは選択マーカーは存在しない。

【0041】

典型的には、核酸コンストラクトはプラスミド、例えば低コピープラスミド又は高コピープラスミドであってもよい。本発明に係る細胞は、キシロースイソメラーゼをコードするヌクレオチド配列の単一コピー又は複数のコピーを、例えばヌクレオチドコンストラクトの複数のコピーによるか、若しくはキシロースイソメラーゼ配列の複数のコピーを有するコンストラクトの使用により、含み得る。

10

【0042】

核酸コンストラクトはエピソームに保持されてもよく、従って常染色体複製配列などの自己複製配列を含み得る。好適なエピソーム核酸コンストラクトは、例えば、酵母2 μ 又はpKD1プラスミド（Gleerら、1991、Biotechnology 9:968-975）、又はAMAプラスミド（Fierroら、1995、Curr Genet. 29:482-489）に基づき得る。或いは、各核酸コンストラクトが1つ以上のコピーで細胞のゲノムに組み込まれてもよい。細胞のゲノムへの組込みは非相同組換えによりランダムに起こってもよいが、好ましくは、核酸コンストラクトは、当該技術分野において公知の相同組換えによって細胞のゲノムに組み込まれ得る（例えば、国際公開第90/14423号パンフレット、欧州特許出願公開第A-0481008号明細書、欧州特許出願公開第A-0635574号明細書及び米国特許第6,265,186号明細書を参照のこと）。

20

【0043】

典型的には、キシロースイソメラーゼコード配列は、キシロースイソメラーゼ配列の転写及び/又は翻訳を提供又は補助する能力を有する1つ以上の核酸配列に作動可能に連結され得る。

【0044】

用語「作動可能に連結された」は、記載される構成要素が、それらのその意図された形での働きを可能にする関係で隣接して並んでいることを指す。例えば、プロモーター又はエンハンサーがコード配列に作動可能に連結され、前記プロモーター又はエンハンサーはコード配列の転写に影響を及ぼす。

30

【0045】

本明細書で使用されるとき、用語「プロモーター」は、遺伝子の転写開始部位の転写方向に対して上流に位置して1つ以上の遺伝子の転写を制御する働きをする核酸断片を指し、DNA依存性RNAポリメラーゼの結合部位、転写開始部位及び当業者に周知されている任意の他のDNA配列の存在により構造的に同定される。「構成的」プロモーターは、多くの環境及び発生条件下で活性なプロモーターである。「誘導性」プロモーターは、環境及び発生調節下で活性なプロモーターである。

【0046】

本発明に係る酵素をコードするヌクレオチド配列の発現を実現するために用いることのできるプロモーターは、その発現させる酵素をコードするヌクレオチド配列にとって天然でなくてもよく、すなわちそのプロモーターが作動可能に連結されるヌクレオチド配列（コード配列）にとって異種のプロモーターであってもよい。しかしながら、プロモーターは、宿主細胞にとって同種、すなわち内因性であってもよい。

40

【0047】

これに関連して好適なプロモーターとしては、構成的及び誘導性天然プロモーター並びに操作されたプロモーターのいずれも含まれ、それらは当業者に周知されている。真核生物宿主細胞において好適なプロモーターは、GAL7、GAL10、又はGAL1、CYC1、HIS3、ADH1、PGL、PHO5、GAPDH、ADC1、TRP1、UR

50

A 3、LEU 2、ENO 1、TPI 1、及びAOX 1であり得る。他の好適なプロモーターには、PDC 1、GPD 1、PGK 1、TEF 1、及びTDH 3が含まれる。

【0048】

本発明の細胞において、キシロースイソメラーゼをコードするヌクレオチド酸配列の3'末端は、好ましくは転写ターミネーター配列に作動可能に連結されている。好ましくはターミネーター配列は、選択の宿主細胞、例えば選択の酵母種において作動可能である。いずれの場合にも、ターミネーターの選択は決定的に重要なものではない；それは、例えば任意の酵母遺伝子由来であってよく、しかしながらターミネーターはときに、非酵母の真核生物遺伝子由来の場合に機能し得る。通常、キシロースイソメラーゼをコードするヌクレオチド配列はターミネーターを含む。好ましくは、かかるターミネーターは、本発明の宿主細胞におけるナンセンス媒介性mRNA分解を阻止する突然変異と組み合わせされる（例えば、Shirleyら、2002、Genetics 161:1465-1482を参照のこと）。

【0049】

転写終結配列は、さらに好ましくはポリアデニル化シグナルを含む。

【0050】

場合により、本発明での使用に好適な核酸コンストラクトには、選択可能なマーカーが存在し得る。本明細書で使用されるとき、用語「マーカー」は、そのマーカーを含む宿主細胞の選択又はスクリーニングを可能にする形質又は表現型をコードする遺伝子を指す。マーカー遺伝子は抗生物質耐性遺伝子であってよく、それにより適切な抗生物質を使用して、形質転換されていない細胞の中から形質転換された細胞を選択することができる。好適な抗生物質耐性マーカーの例としては、例えばジヒドロ葉酸レダクターゼ、ハイグロマイシン-B-ホスホトランスフェラーゼ、3'-O-ホスホトランスフェラーゼII（カナマイシン、ネオマイシン及びG418耐性）が挙げられる。抗生物質耐性マーカーは倍数体宿主細胞の形質転換に最も好都合であり得るが、しかしながら好ましくは、栄養要求マーカー（URA 3、TRPI、LEU 2）又はS. ポンベ（S. pombe）TPI遺伝子（Russell P R、1985、Gene 40:125-130により記載される）などの非抗生物質耐性マーカーが使用される。好ましい実施形態において、核酸コンストラクトで形質転換された宿主細胞は、マーカー遺伝子を含まない。組換えマーカー遺伝子を含まない微生物宿主細胞を構築する方法は、欧州特許出願公開第A-0635574号明細書に開示され、A. ニデュランス（A. nidulans）amdS（アセトアミダーゼ）遺伝子又は酵母URA 3及びLYS 2遺伝子などの双方向性マーカーの使用に基づく。或いは、緑色蛍光タンパク質、lacL、ルシフェラーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、β-グルクロニダーゼなどのスクリーニング可能なマーカーを本発明の核酸コンストラクトに組み込み、形質転換細胞の選別を可能にしてもよい。

【0051】

本発明での使用に好適な核酸コンストラクトに存在し得る任意選択のさらなる要素としては、限定はされないが、1つ以上のリーダー配列、エンハンサー、組込み因子、及び/又はレポーター遺伝子、イントロン配列、セントロメア、テロメア及び/又はマトリックス結合（MAR）配列が挙げられる。本発明の核酸コンストラクトは、ARS配列などの自己複製配列をさらに含み得る。

【0052】

好ましくは、キシロースイソメラーゼは細胞質で発現する。細胞質発現は、ミトコンドリア又はペルオキシソーム標的シグナルの欠失又は修飾により実現され得る。

【0053】

本発明の細胞は、任意の好適な細胞、例えば原核細胞、例えば細菌、又は真核細胞であってよい。典型的には、細胞は真核細胞、例えば酵母又は糸状菌類であり得る。

【0054】

酵母は、本明細書では真核微生物として定義され、主に単細胞形態で増殖する真菌植物

10

20

30

40

50

亜門 (Eumycotina) のあらゆる種 (Alexopoulos, C. J., 1962, *Introductory Mycology*, John Wiley & Sons, Inc., ニューヨーク) が含まれる。

【0055】

酵母は、単細胞葉状体の出芽により増殖し得るか、或いは生物の分裂により増殖し得る。本発明の細胞として好ましい酵母は、サッカロミセス属 (*Saccharomyces*)、クルイペロミセス属 (*Kluyveromyces*)、カンジダ属 (*Candida*)、ピキア属 (*Pichia*)、シゾサッカロミセス属 (*Schizosaccharomyces*)、ハンゼヌラ属 (*Hansenula*)、クロエケラ属 (*Kloeckera*)、シュワンニオミセス属 (*Schwanniomyces*) 又はヤロウイア属 (*Yarrowia*) に属し得る。好ましくは酵母は、嫌氣的発酵能を有するもの、より好ましくは嫌氣的アルコール発酵能を有するものである。

10

【0056】

糸状菌類は、本明細書では、全ての糸状形態の真菌植物亜門 (Eumycotina) を包含する真核微生物として定義される。これらの真菌類は、キチン、セルロース、及び他の複合多糖類から構成される栄養菌糸により特徴付けられる。

【0057】

本発明の細胞としての使用に好適な糸状菌類は、酵母とは形態学的、生理学的、及び遺伝的に異なる。多くの糸状菌類が繁殖に無菌条件を必要とせず、且つバクテリオファージ感染に対して非感受性であるため、糸状菌細胞は有利に用いられ得る。糸状菌類による栄養増殖は菌糸伸長により、ほとんどの糸状菌類の炭素異化が偏性好気性である。本発明の宿主細胞として好ましい糸状菌類は、アスペルギルス属 (*Aspergillus*)、トリコデルマ属 (*Trichoderma*)、フミコラ属 (*Humicola*)、アクレモニウラ属 (*Acremonium*)、フザリウム属 (*Fusarium*) 又はペニシリウム属 (*Penicillium*) に属し得る。より好ましくは、糸状菌細胞は、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*)、ペニシリウム・クリソゲナム (*Penicillium chrysogenum*)、又はリゾプス・オリゼ (*Rhizopus oryzae*) 細胞であってもよい。

20

【0058】

長年にわたり、作物砂糖からバイオエタノールを生産するための様々な生物の導入が提案されてきた。しかしながら実際には、主要なバイオエタノール生産プロセスは全て、エタノール産生株としてサッカロミセス属 (*Saccharomyces*) の酵母を使用し続けている。これは、サッカロミセス属 (*Saccharomyces*) の種に、工業プロセスに魅力的な多くの特徴、すなわち、強酸耐性、エタノール耐性及び浸透圧耐性、嫌氣的増殖能、及び当然ながらその高いアルコール発酵能があるためである。宿主細胞として好ましい酵母種には、*S. cerevisiae*、*S. bulderi*、*S. barnettii*、*S. exiguus*、*S. uvarum*、*S. diastaticus*、*K. lactis*、*K. marxianus* 又は *K. fragilis* が含まれる。

30

40

【0059】

本発明の細胞は、植物バイオマス、セルロース、ヘミセルロース、ペクチン、ラムノース、ガラクトース、フコース、マルトース、マルトデキストリン、リボース、リブロース、又はデンプン、デンプン誘導体、スクロース、ラクトース及びグリセロールを、例えば発酵性糖類に変換する能力があってよい。従って、本発明の細胞は、セルロースからグルコース単量体への変換、及びヘミセルロースからキシロース及びアラビノース単量体への変換に必須のセルラーゼ (エンドセルラーゼ又はエキソセルラーゼ)、ヘミセルラーゼ (エンド又はエキソキシラーゼ又はアラビナーゼ)、ペクチンからグルクロン酸及びガラクツロン酸への変換能力があるペクチナーゼ、又はデンプンをグルコース単量体に変換す

50

るアミラーゼなどの１つ以上の酵素を発現し得る。

【００６０】

本発明の細胞は、好ましくは細胞への能動的又は受動的キシロース輸送能を有する宿主である。

【００６１】

好ましくは、本発明の細胞は：
能動的解糖能を有し；及び／又は
ペントースリン酸経路を経る流束を示し；及び／又は
キシロースから異性化されたキシルロースがピルビン酸塩に代謝され得るようなキシルロースキナーゼ活性を呈する。

10

【００６２】

細胞は、さらに好ましくは、ピルビン酸塩を所望の発酵生成物、例えば、エタノール、ブタノール、乳酸、３-ヒドロキシプロピオン酸、アクリル酸、酢酸、コハク酸、クエン酸、フマル酸、リンゴ酸、イタコン酸、アミノ酸、１，３-プロパンジオール、エチレン、グリセロール、 β -ラクタム系抗生物質又はセファロスポリンに変換するのに必要な酵素活性を含む。

【００６３】

本発明の好ましい細胞は、アルコール発酵能、好ましくは嫌氣的アルコール発酵能を天然で有する細胞である。本発明の細胞は、好ましくは高いエタノール耐性、高い低pH耐性（すなわち約５、約４、約３、又は約２．５より低いpHでの増殖能）並びに乳酸、酢酸又はギ酸などの有機酸及び／又はフルフラール及びヒドロキシメチルフルフラールなどの糖分解産物に対する耐性、及び／又は高い高温耐性を有する。

20

【００６４】

本発明の細胞の上記特性又は活性のいずれも、細胞に天然に存在してもよく、又は遺伝子修飾によって導入若しくは修飾されてもよい。

【００６５】

キシロースイソメラーゼをコードするヌクレオチド配列は、形質転換宿主細胞において活性型で典型的に発現するか、又は発現する能力を有する。従って、宿主細胞におけるヌクレオチド配列の発現により、典型的には約３０でタンパク質１mgあたり少なくとも約１０U、好ましくは約３０で１mgあたり少なくとも約２０、少なくとも約２５、少なくとも約３０、少なくとも約５０、少なくとも約１００、少なくとも約２００、少なくとも約３００、少なくとも約５００、少なくとも約７５０又は少なくとも約１０００Uのキシロースイソメラーゼ活性の比活性を有する活性なキシロースイソメラーゼが生成される。形質転換宿主細胞において発現するキシロースイソメラーゼの比活性は、本明細書では、宿主細胞の無細胞ライセート、例えば無酵母細胞ライセートのタンパク質１mgあたりのキシロースイソメラーゼ活性単位の量として定義される。キシロースイソメラーゼ活性、タンパク質の量の測定及び無細胞ライセートの調製は、本明細書に記載されるとおりである。好ましくは、宿主細胞におけるキシロースイソメラーゼをコードするヌクレオチド配列の発現により、キシロースに対する K_m が５０、４０、３０又は２５mM未満であるキシロースイソメラーゼが生成され、より好ましくは、キシロースに対する K_m は約２０mM以下である。

30

40

【００６６】

本発明の細胞は、ペントースリン酸経路の流束を増加させる１つ又は複数の遺伝子修飾を含み得る。特に、このような１つ又は複数の遺伝子修飾は、非酸化的部分のペントースリン酸経路の流束増加をもたらす。ペントースリン酸経路の非酸化的部分の流束増加を生じさせる遺伝子修飾とは、本明細書では、流束の増加を生じさせる遺伝子修飾を除き遺伝学的に同一の株における流束と比較したとき、流束を少なくとも約１．１倍、約１．２倍、約１．５倍、約２倍、約５倍、約１０倍又は約２０倍に増加させる修飾を意味するものと理解される。ペントースリン酸経路の非酸化的部分の流束は、キシロースを単一炭素源として修飾宿主を増殖させ、キシロース比消費速度を決定し、且つ任意のキシリトール

50

ルが生成される場合、キシリトール比生産速度をキシロース比消費速度から減じることにより計測され得る。しかしながら、ペントースリン酸経路の非酸化的部分の流束は、キシロースを単一炭素源とした増殖速度、好ましくはキシロースを単一炭素源とした嫌氣的増殖速度に比例する。キシロースを単一炭素源とした増殖速度 (μ_{max}) とペントースリン酸経路の非酸化的部分の流束との間には、直線関係がある。糖上でのバイオマス収率は一定であるため、キシロース比消費速度 (Q_s) は、増殖速度 (μ) を糖上でのバイオマス収率 (Y_{xs}) で除したものに等しい (所与の条件: 嫌気性、増殖培地、pH、株の遺伝的背景等の下で; すなわち $Q_s = \mu / Y_{xs}$)。従ってペントースリン酸経路の非酸化的部分の流束増加は、輸送の場合を除き (取り込みが限定的である) これらの条件下における最大増殖速度の増加から推定されてもよい。

10

【0067】

ペントースリン酸経路の流束を増加させる1つ以上の遺伝子修飾は、様々な方法で宿主細胞に導入され得る。それらには、例えば、キシロースキナーゼ及び/又は非酸化的部分のペントースリン酸経路の酵素のうち1つ以上の定常状態活性レベルの上昇、及び/又は非特異的アルドースレダクターゼ活性の定常状態レベルの低下を達成することが含まれる。定常状態活性レベルのこれらの変化は、突然変異体 (自発的なもの、又は化学物質若しくは放射線により誘導されるもの) の選択によるか、及び/又は例えば酵素をコードする遺伝子又はそれらの遺伝子を調節する因子の、それぞれ過剰発現又は不活性化による組換えDNA技術により、もたらすことができる。

【0068】

20

好ましい宿主細胞では、遺伝子修飾は、(非酸化的部分の) ペントースリン酸経路の少なくとも1つの酵素の過剰発現を含む。好ましくは酵素は、リブロース-5-リン酸イソメラーゼ、リブロース-5-リン酸エピメラーゼ、トランスケトララーゼ及びトランスアルドラーゼをコードする酵素からなる群から選択される。(非酸化的部分の) ペントースリン酸経路の酵素の様々な組み合わせを過剰発現させてもよい。例えば過剰発現させる酵素は、少なくとも酵素リブロース-5-リン酸イソメラーゼ及びリブロース-5-リン酸エピメラーゼ; 又は少なくとも酵素リブロース-5-リン酸イソメラーゼ及びトランスケトララーゼ; 又は少なくとも酵素リブロース-5-リン酸イソメラーゼ及びトランスアルドラーゼ; 又は少なくとも酵素リブロース-5-リン酸エピメラーゼ及びトランスケトララーゼ; 又は少なくとも酵素リブロース-5-リン酸エピメラーゼ及びトランスアルドラーゼ; 又は少なくとも酵素トランスケトララーゼ及びトランスアルドラーゼ; 又は少なくとも酵素リブロース-5-リン酸エピメラーゼ、トランスケトララーゼ及びトランスアルドラーゼ; 又は少なくとも酵素リブロース-5-リン酸イソメラーゼ、トランスケトララーゼ及びトランスアルドラーゼ; 又は少なくとも酵素リブロース-5-リン酸イソメラーゼ、リブロース-5-リン酸エピメラーゼ、及びトランスアルドラーゼ; 又は少なくとも酵素リブロース-5-リン酸イソメラーゼ、リブロース-5-リン酸エピメラーゼ、及びトランスケトララーゼであってもよい。本発明の一実施形態において、酵素リブロース-5-リン酸イソメラーゼ、リブロース-5-リン酸エピメラーゼ、トランスケトララーゼ及びトランスアルドラーゼの各々が、宿主細胞において過剰発現する。より好ましくは、遺伝子修飾が少なくとも酵素トランスケトララーゼ及びトランスアルドラーゼの両方の過剰発現を含む宿主細胞であって、従って宿主細胞が既にキシロースでの嫌氣的増殖能を有する宿主細胞である。実際、一部の条件下では、トランスケトララーゼ及びトランスアルドラーゼのみを過剰発現する宿主細胞は、これらの酵素の4つ全て、すなわちリブロース-5-リン酸イソメラーゼ、リブロース-5-リン酸エピメラーゼ、トランスケトララーゼ及びトランスアルドラーゼを過剰発現する宿主細胞と同じキシロースにおける嫌氣的増殖速度を既に有する。さらに、酵素リブロース-5-リン酸イソメラーゼ及びリブロース-5-リン酸エピメラーゼの両方を過剰発現する宿主細胞は、イソメラーゼのみ又はエピメラーゼのみを過剰発現する宿主細胞と比べると、これらの酵素の一方のみの過剰発現は代謝不均衡を生じ得るため、好ましい。

30

40

【0069】

50

酵素「リブロース 5 - リン酸エピメラーゼ」(E C 5 . 1 . 3 . 1) は、本明細書では、D - キシルロース 5 - リン酸から D - リブロース 5 - リン酸への、及びその逆のエピマー化を触媒する酵素として定義される。この酵素は、ホスホリブロースエピメラーゼ；エリトロース - 4 - リン酸イソメラーゼ；ホスホケトペントース 3 - エピメラーゼ；キシルロースリン酸 3 - エピメラーゼ；ホスホケトペントースエピメラーゼ；リブロース 5 - リン酸 3 - エピメラーゼ；D - リブロースリン酸 - 3 - エピメラーゼ；D - リブロース 5 - リン酸エピメラーゼ；D - リブロース - 5 - P 3 - エピメラーゼ；D - キシルロース - 5 - リン酸 3 - エピメラーゼ；ペントース - 5 - リン酸 3 - エピメラーゼ；又は D - リブロース - 5 - リン酸 3 - エピメラーゼとしても知られる。リブロース 5 - リン酸エピメラーゼは、そのアミノ酸配列によってさらに定義され得る。同様にリブロース 5 - リン酸エピメラーゼは、この酵素をコードするヌクレオチド配列によっても、並びにリブロース 5 - リン酸エピメラーゼをコードする基準ヌクレオチド配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列によっても定義され得る。リブロース 5 - リン酸エピメラーゼをコードするヌクレオチド配列は、本明細書では R P E 1 と命名される。

10

【 0 0 7 0 】

酵素「リブロース 5 - リン酸イソメラーゼ」(E C 5 . 3 . 1 . 6) は、本明細書では、D - リボース 5 - リン酸から D - リブロース 5 - リン酸への、及びその逆の直接の異性化を触媒する酵素として定義される。この酵素は、ホスホペントースイソメラーゼ (p h o s p h o p e n t o s i s o m e r a s e) ；ホスホリボイソメラーゼ；リボースリン酸イソメラーゼ；5 - ホスホリボースイソメラーゼ；D - リボース 5 - リン酸イソメラーゼ；D - リボース - 5 - リン酸ケトール - イソメラーゼ；又は D - リボース - 5 - リン酸アルドース - ケトース - イソメラーゼとしても知られる。リブロース 5 - リン酸イソメラーゼは、そのアミノ酸配列によってさらに定義され得る。同様にリブロース 5 - リン酸イソメラーゼは、この酵素をコードするヌクレオチド配列によっても、並びにリブロース 5 - リン酸イソメラーゼをコードする基準ヌクレオチド配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列によっても定義され得る。リブロース 5 - リン酸イソメラーゼをコードするヌクレオチド配列は、本明細書では R P I 1 と命名される。

20

【 0 0 7 1 】

酵素「トランスケトララーゼ」(E C 2 . 2 . 1 . 1) は、本明細書では、反応：D - リボース 5 - リン酸 + D - キシルロース 5 - リン酸 < - > セドヘプツロース 7 - リン酸 + D - グリセルアルデヒド 3 - リン酸及びその逆を触媒する酵素として定義される。この酵素は、グリコールアルデヒドトランスフェラーゼ又はセドヘプツロース - 7 - リン酸：D - グリセルアルデヒド - 3 - リン酸グリコールアルデヒドトランスフェラーゼとしても知られる。トランスケトララーゼは、そのアミノ酸によってさらに定義され得る。同様にトランスケトララーゼは、この酵素をコードするヌクレオチド配列によっても、並びにトランスケトララーゼをコードする基準ヌクレオチド配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列によっても定義され得る。トランスケトララーゼをコードするヌクレオチド配列は、本明細書では T K L 1 と命名される。

30

【 0 0 7 2 】

酵素「トランスアルドラーゼ」(E C 2 . 2 . 1 . 2) は、本明細書では、反応：セドヘプツロース 7 - リン酸 + D - グリセルアルデヒド 3 - リン酸 < - > D - エリトロース 4 - リン酸 + D - フルクトース 6 - リン酸及びその逆を触媒する酵素として定義される。この酵素は、ジヒドロキシアセトントランスフェラーゼ；ジヒドロキシアセトンシンターゼ；ホルムアルデヒドトランスケトララーゼ；又はセドヘプツロース - 7 - リン酸：D - グリセルアルデヒド - 3 - リン酸グリセロントランスフェラーゼとしても知られる。トランスアルドラーゼは、そのアミノ酸配列によってさらに定義され得る。同様にトランスアルドラーゼは、この酵素をコードするヌクレオチド配列によっても、並びにトランスアルドラーゼをコードする基準ヌクレオチド配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列によっても定義され得る。トランスケトララーゼをコードするヌクレオチド配列は、本明細書では T A L 1 と命名される。

40

50

【 0 0 7 3 】

本発明の細胞における酵素の発現及び過剰発現には、様々な手段が当業者に公知である。特に、例えば、宿主細胞のゲノムに遺伝子のさらなるコピーを組み込むことによるか、エピソーム多コピー発現ベクターから遺伝子を発現させることによるか、又は遺伝子の複数のコピーを含むエピソーム発現ベクターを導入することによって、宿主細胞におけるその酵素をコードする遺伝子のコピー数を増加させることにより、酵素を過剰発現させてもよい。

【 0 0 7 4 】

或いは、本発明の宿主細胞における酵素の過剰発現は、過剰発現させる酵素をコードする配列にとって天然でないプロモーター、すなわちそれが作動可能に連結されるコード配列 10
にとって異種のプロモーターを用いることにより実現してもよい。プロモーターは好ましくは、それが作動可能に連結されるコード配列にとって異種であるが、プロモーターが宿主細胞にとって同種である、すなわち内因性であることもまた好ましい。好ましくは異種プロモーターは、好ましくはキシロース又はキシロース及びグルコースを炭素源として、より好ましくは主要な炭素源として（すなわち利用可能な炭素源の 50 % 超がキシロース又はキシロース及びグルコースからなる）、最も好ましくは単一炭素源として利用可能な条件下で、コード配列にとって天然のプロモーターと比べて、コード配列を含む転写物のより高い定常状態レベルを生じさせる能力を有する（又は単位時間あたりより多い転写物分子、すなわち mRNA 分子を産生する能力を有する）。これに関連して好適なプロモーターには、構成的及び誘導性天然プロモーター並びに操作されたプロモーターのいずれ 20
も含まれる。本発明での使用に好ましいプロモーターは、さらにカタボライト（グルコース）抑制に対して非感受性であり、及び／又は好ましくは誘導にキシロースを必要としない。これらの特徴を備えるプロモーターは広く利用可能であり、当業者に周知されている。かかるプロモーターの好適な例には、例えば、ホスホフルクトキナーゼ（PFK）、トリオースリン酸イソメラーゼ（TPI）、グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ（GPD、TDH3 又は GAPDH）、ピルビン酸キナーゼ（PYK）、ホスホグリセリン酸キナーゼ（PGK）などの解糖系遺伝子由来のプロモーター、酵母又は糸状菌類由来のプロモーターが含まれる；酵母由来のかかるプロモーターに関するさらなる詳細は、（国際公開第 93 / 03159 号パンフレット）に見出すことができる。他の有用なプロモーターは、リボソームタンパク質をコードする遺伝子プロモーター、ラクターゼ遺伝 30
子プロモーター（LAC4）、アルコールデヒドロゲナーゼプロモーター（ADHI、ADH4 など）、及びエノラーゼプロモーター（ENO）である。構成的及び誘導性の双方の他のプロモーター、及びエンハンサー又は上流活性化配列が、当業者に周知されているであろう。本発明の宿主細胞に用いられるプロモーターは、必要であれば、その制御特性に影響を及ぼすように修飾されてもよい。

【 0 0 7 5 】

上述の酵素の過剰発現に用いられるコード配列は、好ましくは本発明の宿主細胞にとって同種であり得る。しかしながら、本発明の宿主細胞にとって異種のコード配列が用いられてもよい。

【 0 0 7 6 】

酵素の過剰発現とは、遺伝子修飾された宿主細胞における酵素の生成に関連するとき、同じ条件下の非修飾宿主細胞と比較して、その酵素が高い比酵素活性レベルで生成されることを意味する。通常これは、同じ条件下の非修飾宿主細胞と比較して、酵素的に活性なタンパク質（又はマルチサブユニット酵素の場合、複数のタンパク質）がより多量に生成される、又はむしろより高い定常状態レベルで生成されることを意味する。同様にこれは、通常、同じ条件下の非修飾宿主細胞と比較して、酵素的に活性なタンパク質をコードする mRNA がより多量に産生される、又はここでもむしろより高い定常状態レベルで産生されることを意味する。従って酵素の過剰発現は、好ましくは、本明細書に記載されたとおりの適切な酵素アッセイを用いて宿主細胞における酵素の比活性レベルを計測することにより決定される。

【 0 0 7 7 】

或いは、酵素の過剰発現は、酵素タンパク質の特異的な定常状態レベルを、例えばその酵素に特異的な抗体を用いて定量化することによるか、又は酵素をコードする mRNA の特異的な定常レベルを定量化することにより、間接的に決定されてもよい。後者は、酵素に対する基質が市販されていないために酵素的アッセイを容易に実行できないペントースリン酸経路の酵素に特に好適であり得る。好ましくは本発明の宿主細胞において、過剰発現させる酵素は、過剰発現を生じさせる遺伝子修飾を除いては遺伝的に同一である株と比較したとき、少なくとも約 1 . 1 倍、約 1 . 2 倍、約 1 . 5 倍、約 2 倍、約 5 倍、約 1 0 倍又は約 2 0 倍過剰発現する。これらの過剰発現レベルは、酵素の活性の定常状態レベル、酵素のタンパク質の定常状態レベル並びに酵素をコードする転写物の定常状態レベルに適用され得ることが理解されるべきである。

10

【 0 0 7 8 】

本発明の細胞は、特異的キシルロースキナーゼ活性を増加させる 1 つ以上の遺伝子修飾を含み得る。好ましくは 1 つ又は複数の遺伝子修飾は、例えばキシルロースキナーゼをコードするヌクレオチド配列の過剰発現により、キシルロースキナーゼの過剰発現を生じさせる。キシルロースキナーゼをコードする遺伝子は、宿主細胞にとって内因性であってもよく、又は宿主細胞にとって異種のキシルロースキナーゼであってもよい。本発明の宿主細胞におけるキシルロースキナーゼの過剰発現に用いられるヌクレオチド配列は、キシルロースキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列である。

【 0 0 7 9 】

20

酵素「キシルロースキナーゼ」(E C 2 . 7 . 1 . 1 7) は、本明細書では、反応 $A T P + D - \text{キシルロース} = A D P + D - \text{キシルロース} 5 - \text{リン酸}$ を触媒する酵素として定義される。この酵素は、リン酸化キシルロースキナーゼ、D - キシルロースキナーゼ又は $A T P : D - \text{キシルロース} 5 - \text{ホスホトランスフェラーゼ}$ としても知られる。本発明のキシルロースキナーゼは、そのアミノ酸配列によってさらに定義され得る。同様にキシルロースキナーゼは、この酵素をコードするヌクレオチド配列によっても、並びにキシルロースキナーゼをコードする基準ヌクレオチド配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列によっても定義され得る。

【 0 0 8 0 】

本発明の細胞では、特異的キシルロースキナーゼ活性を増加させる 1 つ又は複数の遺伝子修飾が、上記に記載したとおりのペントースリン酸経路の流束を増加させる修飾のいずれかと組み合わせられてもよい。しかしながら、これは必須ではない。

30

【 0 0 8 1 】

従って、本発明の宿主細胞は、特異的キシルロースキナーゼ活性を増加させる 1 つ又は複数の遺伝子修飾のみを含み得る。本発明の宿主細胞におけるキシルロースキナーゼの過剰発現を実現及び分析する当該技術分野において利用可能な様々な手段は、上記にペントースリン酸経路の酵素について記載したものと同じである。好ましくは本発明の宿主細胞において、過剰発現させるキシルロースキナーゼは、過剰発現を生じさせる 1 つ又は複数の遺伝子修飾を除いては遺伝的に同一である株と比較したとき、少なくとも約 1 . 1 倍、約 1 . 2 倍、約 1 . 5 倍、約 2 倍、約 5 倍、約 1 0 倍又は約 2 0 倍過剰発現する。これらの過剰発現レベルは、酵素の活性の定常状態レベル、酵素のタンパク質の定常状態レベル並びに酵素をコードする転写物の定常状態レベルに適用され得ることが理解されるべきである。

40

【 0 0 8 2 】

本発明の細胞は、宿主細胞における非特異的アルドースレダクターゼ活性を低下させる 1 つ以上の遺伝子修飾を含み得る。好ましくは、非特異的アルドースレダクターゼ活性は、宿主細胞において、非特異的アルドースレダクターゼをコードする遺伝子の発現を低下させるか、又はそれを不活性化する 1 つ以上の遺伝子修飾によって低下する。好ましくは、1 つ又は複数の遺伝子修飾は、宿主細胞における非特異的アルドースレダクターゼをコードする遺伝子の各内因性コピーの発現を低下させ、又は不活性化する。宿主細胞は、二

50

倍性、多倍数性又は異数性の結果として、非特異的アルドースレダクターゼをコードする遺伝子の複数のコピーを含むことができ、及び／又は宿主細胞は、アミノ酸配列が異なり、且つ各々が異なる遺伝子によりコードされる、アルドースレダクターゼ活性を有するいくつかの異なる（イソ）酵素を含み得る。また、かかる例では、好ましくは非特異的アルドースレダクターゼをコードする各遺伝子の発現は低下し、又は不活性化される。好ましくは、遺伝子は、遺伝子の少なくとも一部の欠失によるか、又は遺伝子の破壊により不活性化され、ここでこれに関連して用語の遺伝子には、コード配列の上流又は下流の任意の非コード配列も含まれ、その（部分的）欠失又は不活性化により、宿主細胞における非特異的アルドースレダクターゼ活性の発現の低下が得られる。

【0083】

10

本発明の宿主細胞においてその活性を低下させるべきアルドースレダクターゼをコードするヌクレオチド配列は、アルドースレダクターゼ活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列である。

【0084】

本発明の宿主細胞において、宿主細胞における非特異的アルドースレダクターゼ活性を低下させる遺伝子修飾は、上記に記載したとおり宿主細胞においてペントースリン酸経路の流束を増加させる修飾のいずれか、及び／又は特異的キシロースキナーゼ活性を増加させる修飾のいずれかと組み合わせられてもよい。しかしながら、これは必須ではない。

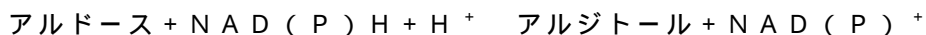
【0085】

従って、宿主細胞における非特異的アルドースレダクターゼ活性を低下させる１つ又は複数の遺伝子修飾のみを含む本発明の宿主細胞は、明確に本発明に包含される。

20

【0086】

酵素「アルドースレダクターゼ」（EC 1.1.1.21）は、本明細書では、キシロース又はキシロースをキシリトールに還元する能力を有する任意の酵素として定義される。本発明の文脈ではアルドースレダクターゼは、本発明の宿主細胞にとって天然の（内因性の）、且つキシロース又はキシロースをキシリトールに還元する能力を有する任意の非特異的アルドースレダクターゼであってよい。非特異的アルドースレダクターゼは、以下の反応を触媒する：



【0087】

30

この酵素は広い特異性を有し、アルドースレダクターゼ；ポリオールデヒドロゲナーゼ（ NADP^+ ）；アルジトール： NADP オキシドレダクターゼ；アルジトール： NADP^+ 1-オキシドレダクターゼ； NADPH -アルドペントースレダクターゼ；又は NADPH -アルドースレダクターゼとしても知られる。

【0088】

S. cerevisiae（*S. cerevisiae*）にとって内因性であり、且つGRE3遺伝子によりコードされるかかる非特異的アルドースレダクターゼの詳細な例（Traffら、2001、Appl. Environ. Microbiol. 67: 5668-74）。従って、本発明のアルドースレダクターゼは、そのアミノ酸配列によってさらに定義され得る。同様にアルドースレダクターゼは、この酵素をコードするヌクレオチド配列によっても、並びにアルドースレダクターゼをコードする基準ヌクレオチド配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列によっても定義され得る。

40

【0089】

本発明の細胞は、キシロース上、好ましくは単一炭素源としてのキシロース上での、且つより好ましくは嫌氣的条件下での増殖に関して、自然突然変異体か、或いは（例えば放射線若しくは化学物質による）誘導突然変異体を選択することにより、キシロース利用に適合され得る。突然変異体の選択は、例えばKuyperら（2004、FEMS Yeast Res. 4: 655-664）により記載されるとおりの培養物の連続継代を含む技法によるか、又は選択圧下におけるケモスタット培養での培養により実施されてもよい。本発明の好ましい宿主細胞では、突然変異体の選択により得られる修飾を含め、上記

50

に記載される遺伝子修飾の少なくとも1つが、炭素源としての、好ましくは単一炭素源としてのキシロース上で、且つ好ましくは嫌氣的条件下で増殖する能力を宿主細胞に付与する。好ましくは、修飾された宿主細胞は本質的にキシリトールを生成せず、例えば生成されるキシリトールは検出限界未満、又は例えばモル基準で消費炭素の約5、約2、約1、約0.5、又は約0.3%未満である。

【0090】

本発明の細胞は、単一炭素源としてのキシロース上で好氣的条件下において少なくとも約0.05、約0.1、約0.2、約0.25又は約0.3 h⁻¹の速度、又は該当する場合、嫌氣的条件下において少なくとも約0.03、約0.05、約0.07、約0.08、約0.09、約0.1、約0.12、約0.15又は約0.2 h⁻¹の速度で増殖する能力を有し得る。好ましくは修飾宿主細胞は、単一炭素源としてのグルコース及びキシロース(1:1重量比)の混合物上で好氣的条件下において少なくとも約0.05、約0.1、約0.2、約0.25又は約0.3 h⁻¹の速度、又は該当する場合、嫌氣的条件下において少なくとも約0.03、約0.05、約0.1、約0.12、約0.15、又は約0.2 h⁻¹の速度で増殖する能力を有し得る。

【0091】

本発明の細胞は、少なくとも約200、約250、約300、約346、約350、約400、約500、約600、約750、又は約1000 mg キシロース / g 細胞 / h のキシロース比消費速度を有し得る。本発明の細胞は、キシロース上での発酵生成物(エタノールなど)の収率が、その宿主細胞のグルコース上での発酵生成物(エタノールなど)の収率の少なくとも約40、約50、約55、約60、約70、約80、約85、約90、約95、約98又は約99%である。より好ましくは、キシロース上での本発明の細胞の発酵生成物(エタノールなど)の収率は、その細胞のグルコース上での発酵生成物(エタノールなど)の収率と同程度であり得る。同様に、細胞のキシロース上でのバイオマス収率は、宿主細胞のグルコース上でのバイオマス収率の少なくとも約40、約50、約55、約60、約70、約80、約85、約90、約95、約98又は約99%であり得る。より好ましくは、細胞のキシロース上でのバイオマス収率は、宿主細胞のグルコース上でのバイオマス収率と同程度であり得る。グルコース上及びキシロース上の収率比較では、いずれの収率も、好氣的条件下で比較されるか、又はいずれも嫌氣的条件下で比較されることが理解される。

【0092】

本発明の細胞は、アラビノースを使用する能力を有し得る。従って、本発明の細胞は、L-アラビノースをL-リブロース及び/又はキシロース5-リン酸に変換する、及び/又は所望の発酵生成物、例えば本明細書で言及されるうちの一つに変換する能力を有し得る。

【0093】

L-アラビノースからエタノールを生成する能力がある生物、例えば*S. cerevisiae*株は、好適な供給源由来のaraA(L-アラビノースイソメラーゼ)、araB(L-リブロキナーゼ)及びaraD(L-リブロース-5-P4-エピメラーゼ)遺伝子を導入して細胞を修飾することにより生成されてもよい。かかる遺伝子は、本発明の細胞に、それがアラビノースを使用する能力を有するようにするため導入され得る。かかる手法は国際公開第2003/095627号パンフレットに記載されている。

【0094】

本発明の細胞は、エタノールの生成に好適な細胞であってよい。しかしながら本発明の細胞は、エタノール以外の発酵生成物の生成に好適であってよい。かかる非エタノール発酵生成物には、原則的に、酵母又は糸状菌類などの真核微生物により生成可能な任意のバルク化学品又はファインケミカルが含まれる。

【0095】

かかる発酵生成物は、例えば、ブタノール、乳酸、3-ヒドロキシプロピオン酸、アク

リル酸、酢酸、コハク酸、クエン酸、リンゴ酸、フマル酸、イタコン酸、アミノ酸、1, 3 - プロパンジオール、エチレン、グリセロール、 β - ラクタム系抗生物質又はセファロスポリンであってよい。非エタノール発酵生成物の生成に好ましい本発明の修飾宿主細胞は、アルコールデヒドロゲナーゼ活性の減少をもたらす遺伝子修飾を含む宿主細胞である。

【0096】

さらなる態様において、本発明は、キシロースなどの、キシロース供給源を含む炭素源の発酵に本発明の修飾宿主細胞が用いられる発酵方法に関する。キシロース供給源に加えて、発酵培地中の炭素源はグルコース供給源も含み得る。キシロース又はグルコースの供給源は、キシロース又はグルコースそれ自体であってもよく、或いはキシロース又はグルコース単位を含む任意の炭水化物オリゴポリマー又はポリマー、例えばリグノセルロース、キシラン、セルロース、デンプンなどであってもよい。かかる炭水化物からキシロース又はグルコース単位を遊離させるため、適切なカルボヒドラーゼ（キシラナーゼ、グルカナーゼ、アミラーゼなど）が発酵培地に添加されてもよく、又は修飾宿主細胞によって生成されてもよい。後者の場合、修飾宿主細胞は、かかるカルボヒドラーゼを生成して分泌するように遺伝子操作され得る。オリゴポリマー又はポリマーのグルコース供給源を使用するさらなる利点は、例えば律速量のカルボヒドラーゼを使用することにより、発酵中における遊離グルコースの低い（より低い）濃度の維持が可能になることである。これにより、ひいては、キシロースなどの非グルコース糖類の代謝及び輸送に必要な系の抑制が回避され得る。

【0097】

好ましい方法では、修飾宿主細胞がキシロース及びグルコースの双方を、好ましくは同時に発酵し、同時に発酵する場合には好ましくは、ジオーキシー増殖を回避するため、グルコース抑制に対して非感受性の修飾宿主細胞が用いられる。炭素源としてのキシロース（及びグルコース）の供給源に加えて、発酵培地は、修飾宿主細胞の増殖に必要とされる適切な成分をさらに含み得る。

【0098】

酵母などの微生物を増殖させる発酵培地の組成は、当該技術分野において周知されている。発酵方法は、例えばエタノール、ブタノール、乳酸、3 - ヒドロキシプロピオン酸、アクリル酸、酢酸、コハク酸、クエン酸、リンゴ酸、フマル酸、イタコン酸、アミノ酸、1, 3 - プロパンジオール、エチレン、グリセロール、 β - ラクタム系抗生物質、例えばペニシリンG又はペニシリンV及びそれらの発酵性誘導体、及びセファロスポリンなどの発酵生成物の生成方法である。

【0099】

発酵方法は、好氣的又は嫌氣的発酵方法であってよい。嫌氣的発酵方法は、本明細書では、酸素の非存在下で実行される発酵方法、又は実質的に酸素が消費されない、好ましくは約5、約2.5又は約1 mmol / L / h未満、より好ましくは0 mmol / L / hが消費される（すなわち酸素消費が検出不能である）発酵方法として定義され、ここでは有機分子が電子供与体及び電子受容体の双方として働く。酸素の非存在下では、解糖及びバイオマス形成において生じるNADHは、酸化リン酸化によっては酸化されることができない。この問題を解決するため、多くの微生物がピルビン酸塩又はその誘導体のうちの一つを電子及び水素受容体として使用し、それによりNAD⁺を再生する。

【0100】

従って、好ましい嫌氣的発酵方法では、ピルビン酸塩が電子（及び水素受容体）として使用され、エタノール、ブタノール、乳酸、3 - ヒドロキシプロピオン酸、アクリル酸、酢酸、コハク酸、クエン酸、リンゴ酸、フマル酸、アミノ酸、1, 3 - プロパンジオール、エチレン、グリセロール、 β - ラクタム系抗生物質及びセファロスポリンなどの発酵生成物に還元される。

【0101】

発酵方法は、好ましくは修飾宿主細胞に最適な温度で実行される。従って、ほとんどの

酵母又は真菌宿主細胞について、発酵方法は約 4 2 未満、好ましくは約 3 8 未満の温度で実施される。酵母又は糸状菌宿主細胞について、発酵方法は、好ましくは、約 3 5、約 3 3、約 3 0 又は約 2 8 未満の温度、且つ約 2 0、約 2 2、又は約 2 5 より高い温度で実施される。

【 0 1 0 2 】

好ましい方法は、エタノールの生成方法において、(a) キシロース供給源を含有する培地を上記に定義するとおりの修飾宿主細胞で発酵させる工程であって、それにより宿主細胞がキシロースをエタノールに発酵する工程；及び場合により、(b) エタノールを回収する工程を含む方法である。発酵培地はまた、同様にエタノールに発酵されるグルコースの供給源も含み得る。本方法において、エタノール容積生産性は、好ましくは少なくとも約 0 . 5、約 1 . 0、約 1 . 5、約 2 . 0、約 2 . 5、約 3 . 0、約 5 . 0 又は約 1 0 . 0 g エタノール毎リットル毎時である。本方法におけるキシロース及び / 又はグルコース上でのエタノール収率は、好ましくは少なくとも約 5 0、約 6 0、約 7 0、約 8 0、約 9 0、約 9 5 又は約 9 8 % である。エタノール収率は、本明細書では、理論上の最大収率に対する割合として定義される。

10

【 0 1 0 3 】

本発明はまた、ブタノール、乳酸、3 - ヒドロキシプロピオン酸、アクリル酸、酢酸、コハク酸、クエン酸、リンゴ酸、フマル酸、イタコン酸、アミノ酸、1 , 3 - プロパンジオール、エチレン、グリセロール、β - ラクタム系抗生物質及びセファロsporin からなる群から選択される生成物などの発酵生成物の生成方法にも関する。本方法は、好ましくは、キシロース供給源を含有する培地を、本明細書において上記に定義するとおりの修飾宿主細胞で発酵させる工程であって、それにより宿主細胞がキシロースを発酵生成物に発酵する工程を含む。

20

【 0 1 0 4 】

本発明はまた、エタノール、ブタノール、乳酸、3 - ヒドロキシプロピオン酸、アクリル酸、酢酸、コハク酸、クエン酸、リンゴ酸、フマル酸、イタコン酸、アミノ酸、1 , 3 - プロパンジオール、エチレン、グリセロール、β - ラクタム系抗生物質及びセファロsporin からなる群から選択される生成物などの発酵生成物の生成方法も提供する。本方法は、好ましくは、少なくともキシロース供給源及び L - アラビノース供給源を含有する培地を、キシロース及び L - アラビノースの両方を使用する能力がある上記に定義するとおりの細胞で発酵させる工程であって、細胞によりキシロース及び L - アラビノースが発酵生成物に発酵される工程を含む。

30

【 0 1 0 5 】

本発明はまた、エタノール、ブタノール、乳酸、3 - ヒドロキシプロピオン酸、アクリル酸、酢酸、コハク酸、クエン酸、リンゴ酸、フマル酸、イタコン酸、アミノ酸、1 , 3 - プロパンジオール、エチレン、グリセロール、β - ラクタム系抗生物質及びセファロsporin からなる群から選択される生成物などの発酵生成物の生成方法も提供する。本方法は、好ましくは、少なくともキシロース供給源及び L - アラビノース供給源を含有する培地を、上記に定義するとおりの細胞及び L - アラビノースを使用する能力がある細胞で発酵させる工程であって、それにより各細胞がキシロース及び / 又はアラビノースを発酵生成物に発酵する工程を含む。

40

【 0 1 0 6 】

本発明の方法はまた、発酵生成物の回収も含み得る。本方法が実施される培地はまた、グルコース供給源も含含有し得る。

【 0 1 0 7 】

本発明に係る方法は、好氣的及び嫌氣的条件下で実行され得る。好ましくは、本方法は、微好氣的条件下又は酸素制限条件下で実施される。

【 0 1 0 8 】

嫌氣的発酵方法は、本明細書では、酸素の非存在下で実行される発酵方法、又は実質的に酸素が消費されない、好ましくは約 5、約 2 . 5 又は約 1 m m o l / L / h 未満しか消

50

費されない発酵方法として定義され、ここでは有機分子が電子供与体及び電子受容体の双方として働く。

【0109】

酸素制限発酵方法は、気体から液体への酸素移動により酸素消費が制限される方法である。酸素制限の程度は、流入ガスフローの量及び組成並びに使用される発酵機器の実際の混合/物質移動特性により決定される。好ましくは、酸素制限条件下の方法において、酸素消費速度は少なくとも約5.5、より好ましくは少なくとも約6、例えば少なくとも7 mmol/L/hである。

【0110】

以下の実施例は、本発明を例示する。

10

【0111】

[実施例]

[一般的な分子生物学技法]

特に指示がない限り、用いられる方法は標準の生化学的技法である。好適な一般的手法のテキストブックの例としては、Sambrookら、Molecular Cloning, a Laboratory Manual (1989) 及び Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology (1995)、John Wiley & Sons, Inc. が挙げられる。

【0112】

本例に示すとおり糖類を補足したVerduyn培地(Verduyn、1992)又はYEPH培地(10g/l酵母エキス、20g/lフィトン(phytone))のいずれかを使用して、増殖実験を実施した。固形YEPH培地については、滅菌前に液体培地に20g/l寒天を加えた。

20

【0113】

[環状DNAでの酵母細胞の形質転換]

プラスミドDNAの場合、Chenら(Current Genetics (1992)、第21巻、第1号、83~84頁)により記載される方法により、酵母形質転換を行った。

【0114】

[電気穿孔による線状DNA断片での酵母細胞の形質転換]

30

2%グルコースを含有する25mlのYEPH培地に単一酵母コロニーを接種することにより、酵母細胞を培養した。フラスコを30、280rpmで一晩インキュベートした。

【0115】

600nmの光学濃度を決定し、0.2の光学濃度を達成するのに必要な量を100mlの2%グルコース含有YEPH培地に移した。細胞を、約1.2~1.3の光学濃度に達するまで(これは2~3世代に相当する)、30、280rpmで4~5時間増殖させた。遠心により細胞を回収し、28mlのTE(10mM トリス・HCl、1mM EDTA、pH7.5)に再懸濁した。3mlの1M LiAC溶液(希HAcでpH7.5に設定)を添加した。細胞を回転式インキュベーター(150rpm、30)において45分間、穏やかに振盪した。500μlの1M DTT(ジチオスレイトール)溶液を添加した後、これらの条件下で細胞をもう1回、15分間インキュベートした。容積を滅菌氷冷ミリQ(milliQ)水で100mlに構成した。遠心により細胞を回収した。

40

【0116】

上清を廃棄し、ペレット状の細胞を50mlの滅菌氷冷ミリQ水で洗浄し、遠心により回収した。続く洗浄処理を、30mlの氷冷1Mソルビトール溶液で行った。遠心後、上清を廃棄し、細胞ペレットを4mlの氷冷1Mソルビトール溶液に再懸濁した。遠心後、上清を廃棄し、細胞ペレットを300μlの氷冷1Mソルビトール溶液に再懸濁した。

【0117】

50

形質転換毎に、 $40\ \mu\text{l}$ の細胞懸濁液を氷冷エッペンドルフ管に移し替えた。形質転換DNA及び $5\ \mu\text{g}$ のサケ精子DNA（担体DNAとして）を、合わせて最大容積 $20\ \mu\text{l}$ で添加した。DNAはTEに溶解しなければならない。エッペンドルフ管を慎重に軽く叩いて、内容物を穏やかに混合した。続いて、内容物を予め（氷上で）冷却した $0.2\ \text{cm}$ 間隔の電気穿孔キュベットに移し替え、 $1.5\ \text{kV}$ 、 $200\ \Omega$ 及び $25\ \mu\text{F}$ のパルス（例えばBioRad電気穿孔装置を使用して）印加した。パルス時間は約 $5\ \text{ms}$ でなければならない。

【0118】

細胞を直ちに $200\ \mu\text{l}$ の $1\ \text{M}$ ソルビトールに移し替えた。続いて、 $4\ \text{ml}$ のYEPH 2%グルコースを添加し、細胞懸濁液を 30°C で1時間インキュベートした。この時間の後、遠心により細胞を回収し、上清を廃棄し、ペレットを $4\ \text{ml}$ の $1\ \text{M}$ ソルビトールに再懸濁した。細胞を再び遠心により回収し、上清を廃棄し、ペレットを $300\ \mu\text{l}$ の $1\ \text{M}$ ソルビトールに再懸濁した。細胞を適宜希釈し、選択培地で使用した。

10

【0119】

[エタノール生成]

$100\ \text{ml}$ 振盪フラスコ中の2%グルコースを補足した $25\ \text{ml}$ のVerduyn培地（Verduynら、Yeast 8:501-517、1992）に、凍結ストック培養物又は寒天プレートからの単一コロニーを接種することにより、前培養物を調製した。オービタルシェーカー（ $280\ \text{rpm}$ ）において 30°C で約24時間インキュベートした後、この培養物を収集し、二酸化炭素発生の測定及びエタノール生成実験に使用した。

20

【0120】

エタノール生成用の培養は、BAM（バイオロジカル・アクティビティ・モニタ（Biological Activity Monitor）、Halotec、オランダ）において $100\ \text{ml}$ の合成モデル培地（5%グルコース、5%キシロース、3.5%アラビノース、1%ガラクトース及び0.5%マンノースを含むVerduyn培地（Verduynら、Yeast 8:501-517、1992））中、 30°C で実施した。培地のpHを $2\ \text{M}\ \text{NaOH}/\text{H}_2\text{SO}_4$ で4.2に調整した後、滅菌した。嫌気性培養用の合成培地は、エタノールに溶解した $0.01\ \text{g/l}$ エルゴステロール及び $0.42\ \text{g/l}$ ツイーン80を補足した（Andreassen and Stier, J. Cell Physiol. 41:23-36、1953；及びAndreassen and Stier, J. Cell Physiol. 43:271-281、1954）。培地は約2の初期OD₆₀₀で接種した。培養物はマグネチックスターラで攪拌した。培養物は曝気しなかったため、発酵中、嫌気的条件が急速に生じた。二酸化炭素の生成を常に観測した。糖変換及び生成物形成（エタノール、グリセロール）をNMRにより分析した。LKB Ultrospec K分光光度計で $600\ \text{nm}$ の培養物光学濃度を追跡することにより増殖を観測した。

30

【0121】

[実施例1]

[キシロースイソメラーゼ発現ベクターの構築]

一次アミノ酸配列に基づき合成コドンペア最適化xy1A遺伝子を設計し、GeneArt（Regensburg、ドイツ）によって合成した。コドンペア最適化は過去に記載されているとおり実施した（国際公開第2008000632号パンフレット）。ヌクレオチド配列はここに配列番号1として含まれ、対応するアミノ酸配列は配列番号2として含まれる。

40

【0122】

制限酵素SpeI及びXmaIを使用して、オープンリーディングフレームを酵母シャトルベクターp427-TEF（図1；Dual Systems Biotech、Schlieren、スイス）にクローニングした。

【0123】

プラスミドをpPWT215と命名した。

50

【 0 1 2 4 】

[実施例 2]

[p P W T 2 1 5 による B I E 1 0 4 P 1 の形質転換]

G R E 3 遺伝子がペントースリン酸経路の非酸化的部分の遺伝子に置き換えられた国際公開第 2 0 0 9 1 0 9 6 3 3 号パンフレットに開示されるとおりの *S. cerevisiae* (*S. cerevisiae*) 株、B I E 1 0 4 P 1 (M A T a U R A 3 H I S 3 L E U 2 T R P 1 M A L 2 - 8 S U C 2 G R E 3 : : [T P I 1 p - T A L 1 _ A D H 1 p - T K L 1 _ P G I 1 p - R P E 1 _ E N O 1 p - R K I 1]) を、C h e n ら (1 9 9 2) により記載されるワンステップ酵母形質転換方法を用いてプラスミド p P W T 2 1 5 で形質転換した。陰性対照としてミリ Q を使用した。形質転換手順の最終的なペレットを 1 m l の Y E P h 2 % グルコース (上記参照) に再懸濁した。この形質転換混合物のうち 5 0 μ l を、2 % グルコース及び 2 0 0 μ g の G 4 1 8 / m l を補足した Y E P h 寒天プレートに播いた。残りの 9 5 0 μ l は、2 % キシロース、1 0 μ g の G 4 1 8 / m l 及び 2 5 0 μ l のペニシリン - ストレプトマイシン (P e n - S t r e p) 溶液 (G i b c o / l n v i t r o g e n) を補足した 2 5 m l の V e r d u y n 培地が入った 1 0 0 m l 振盪フラスコに移し替えた。接種したフラスコ (モック形質転換及びプラスミド形質転換) を、回転式振盪機において 3 0 及び 2 8 0 r p m でインキュベートした。光学濃度を経時的に追跡した。

10

【 0 1 2 5 】

[実施例 3]

[増殖実験]

形質転換後の増殖実験の進行を図 2 に示す。

20

【 0 1 2 6 】

増殖実験の最初の 1 0 日間、培養物の 6 0 0 n m の光学濃度はほとんど増加しなかった。2 0 日後 (図 2 において「 1 」で示される)、プラスミド形質転換細胞培養物の光学濃度は 2 0 より大きい値に達した。続いて、所定量の培養物を、2 % キシロース、1 0 μ g の G 4 1 8 / m l 及び 2 5 0 μ l のペニシリン - ストレプトマイシン (P e n - S t r e p) を含有する 2 5 m l の V e r d u y n 培地の新鮮なアリコートに移し替えた。図 2 から明らかとなおり、移し替えは 4 回行った。この増殖実験は、4 回目の移し替え後の最後の培養を除いて空気の下で実施し、最後の培養は、ウォーターロックを備える振盪フラスコ (嫌気的条件) で実施した。

30

【 0 1 2 7 】

図 2 から、p P W T 2 1 5 で形質転換した株 B I E 1 0 4 P 1 の酵母細胞が単一の炭素及びエネルギー源としてのキシロースの利用能を獲得した一方、同じ株のモック形質転換の酵母細胞は、光学濃度の増加を示さなかったことから、キシロース上では増殖することができないと結論付けることができる。

【 0 1 2 8 】

[実施例 4]

[ペントース発酵細胞の構築]

S. cerevisiae (*S. cerevisiae*) 株 B I E 2 9 2 は、株 B I E 2 0 1 の誘導体である。この株の構築は、P C T / E P 2 0 1 1 / 0 5 6 2 4 2 号明細書の実施例 7 に開示されている。これは、形質転換及び適応進化によって効率的なアラビノース発酵に最適化された株である株 B I E 2 0 1 と、適応進化前の、その親である株 B I E 1 0 4 A 2 P 1 a との戻し交雑の結果である。株 B I E 2 9 2 は、ラクトバチルス・プランタルム (*Lactobacillus plantarum*) 由来の遺伝子 *araA*、*araB* 及び *araD*、並びに非酸化的ペントースリン酸経路遺伝子 *TAL1*、*TKL1*、*RPE1* 及び *RKI1* を構成的に発現し、アルドースレダクターゼをコードする G R E 3 遺伝子が欠失している。加えて、B I E 2 9 2 は、染色体 V I I 上でのこのアラビノースカセットの増幅及び G A L 8 0 遺伝子における S N P (ヌクレオチド変化 A 4 3 6 C、ここでは開始コドン A T G の A が 1 である) を有する。

40

50

【 0 1 2 9 】

続いて、株 B I E 2 9 2 を、ゲノムにおける T y 1 配列に対する 1 0 0 b p の重複領域が隣接する、プロモーター配列及びターミネーター配列を含むコドンペア最適化 x y l A 遺伝子の P C R 断片で形質転換した。x y l A 発現カセットを、p P W T 2 1 5 を鋳型として使用して P C R 増幅した。P C R 反応は、プライマー配列の配列番号 3 及び配列番号 4 により、P h u s i o n DNA ポリメラーゼ (F i n n z y m e s) を使用して供給者の指示を用いて実施した。増幅した発現カセットをエタノール沈殿し、使用まで - 2 0 で保存した。

【 0 1 3 0 】

沈殿した DNA を遠心により回収し、DNA ペレットを 7 0 % エタノールで洗浄し、続いて風乾した。DNA を、T E 緩衝液中約 1 μ g DNA / μ l の濃度で溶解した。

10

【 0 1 3 1 】

2 % グルコースを含有する Y E P h 培地で酵母株 B I E 2 9 2 を増殖させた。上記に記載したとおり、電気穿孔用にコンピテント細胞を調製した。エレクトロコンピテント細胞を 2 0 μ g の P C R 産物で形質転換した。陰性対照としてミリ Q 水を使用した。

【 0 1 3 2 】

x y l A 形質転換及びモック形質転換の両方の形質転換混合物を、2 % キシロース及び 2 5 0 μ l のペニシリン - ストレプトマイシン (p e n / s t r e p) を補足した 2 5 m l の V e r d u y n 培地が各々入った 4 つの異なる振盪フラスコに直接移し替えた。優勢な選択マーカーを使用しないため、形質転換後のプレート上での正しい形質転換体の選択は実施しなかった。

20

【 0 1 3 3 】

8 つの振盪フラスコを回転式振盪機において 3 0 及び 2 8 0 r p m でインキュベートした。6 0 0 n m の光学濃度を高頻度で計測することにより、増殖を観測した。

【 0 1 3 4 】

[実施例 5]

[ペントース発酵酵母株の選択及び特性決定]

実施例 4 に記載される培養物が 1 5 より大きい 6 0 0 n m の光学濃度に達した場合、2 % キシロースを補足した V e r d u y n 培地が入ったフラスコに、2 5 0 μ l のアリコートをし替える。6 0 0 n m の光学濃度を高頻度で観測する。光学濃度データを使用して増殖速度を決定する。

30

【 0 1 3 5 】

キシロース含有培地での数サイクルの接種後、アラビノース利用に対する選択圧を保つため、炭素源として 2 % アラビノースを含有する V e r d u y n 培地が使用される。同様に、ヘキソース (すなわちグルコース、ガラクトース及び / 又はマンノース) とペントース (すなわちアラビノース及び / 又はキシロース) との混合物を補足した V e r d u y n 培地が入ったフラスコを使用する。培養実験は、アラビノース及びキシロースの双方に関して、初めは好氣的条件下で実施するが、続いて、例えば増殖速度が毎時約 0 . 0 7 以上の値を超えたとき、嫌氣的条件下で実施する。

【 0 1 3 6 】

40

嫌氣的条件下での数サイクルの増殖及び再接種の後、培養物のアリコートをミリリットルあたり約 1 0 0 ~ 1 0 0 0 コロニー形成単位 (C F U) に希釈し、続いて 1 0 ~ 1 0 0 μ l のアリコートを、2 % グルコースを含有する Y E P h 寒天プレートに播き広げる。プレートを 3 0 で少なくとも 4 8 時間、又は単一コロニーが認められるまで、インキュベートする。

【 0 1 3 7 】

単一コロニー単離物を B A M (上記参照) で試験する。単一コロニー単離物は、二酸化炭素プロファイル並びに糖類、エタノール及び副生成物の N M R データから推定されたとおりの、5 つ全ての糖類を効率的に発酵する能力に基づき選択する。

【 0 1 3 8 】

50

PCR、サザンブロット、F I G E 及びリシーケンシングなどの当業者に公知の遺伝学的及び分子生物学的技法により、最良の株を特徴付ける。

【 0 1 3 9 】

[実施例 6]

[ペントース発酵酵母株の選択及び特性決定]

実施例 4 に記載される培養物が 1 0 より大きい 6 0 0 n m の光学濃度に達したとき、2 %キシロースを補足した V e r d u y n 培地が入った振盪フラスコに、2 5 μ l のアリコートをし替えた。光学濃度を高頻度で観測し、それらのデータを使用して増殖速度を決定した。培養物が 1 5 より大きい 6 0 0 n m の光学濃度に達したとき、培養物のアリコートを 2 %キシロースを補足した V e r d u y n 培地が入った振盪フラスコに移し替え、振盪フラスコをウォーターロックで閉鎖し、嫌気性培養を可能にした。ここから、オービタルシェーカーにおいて 3 0 及び 1 0 0 r p m でインキュベーションを実施した。6 0 0 n m の光学濃度を計測することにより培養物の増殖を観測し、それらのデータに基づき増殖速度を計算した。培養物の 6 0 0 n m の光学濃度が 3 . 7 5 より大きい値に達したとき、培養物のアリコートを、2 %アラビノースを補足した V e r d u y n 培地が入った振盪フラスコに移し替えた。振盪フラスコをウォーターロックで閉鎖した。培養物が 5 より大きい値の 6 0 0 n m の光学濃度に達した場合、培養物のアリコートを、2 %キシロースを補足した V e r d u y n 培地が入った振盪フラスコに再び移し替え、この振盪フラスコをウォーターロックで閉鎖した。この増殖実験の典型的な結果を図 3 に提供する。

10

【 0 1 4 0 】

20

図 3 から明らかとなおり、クロストリジウム・ペイジェリンキ (C l o s t r i d i u m b e y e r i n c k i i) 由来の X y l A で B 1 E 2 9 2 を形質転換すると、この株はキシロース消費表現型を速やかに獲得することが可能であった一方、モック形質転換はキシロース消費細胞をもたらさなかった。

【 0 1 4 1 】

表 1 は、いくつかの生物のキシロースイソメラーゼ遺伝子で形質転換した S . セレビシエ (S . c e r e v i s i a e) 株の増殖速度を提供する。株 B I E 2 9 2 X I (C . ペイジェリンキ (C . b e y e r i n c k i i)) は、形質転換後における単一炭素源としてのキシロース上での増殖時、好氣的条件下で最も高い増殖速度を実証した。加えて、B I E 2 9 2 X I (C . ペイジェリンキ (C . b e y e r i n c k i i)) は、広範な進化操作を行うことなく嫌氣的条件下においてキシロース上で増殖できる唯一の株であった。

30

【 0 1 4 2 】

【表 1】

表 1: キシロース上での初期増殖時における BIE292XI(C. ベイジェリンキ (C. beyerinckii)) の増殖速度、並びにクロストリジウム・フィトフェルメンタンス (Clostridium phytofermentans) (参照 1)、オルピノミセス属 (Orpinomyces)(参照 2)、ピロミセス属 (Piromyces)(RWB202) (参照 3)、及びサーマス・サーモフィルス (Thermus thermophilus)(参照 4) の XI で形質転換したサッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) 株の公的に利用可能なデータ

キシロースイソメラーゼ	好気性	嫌気性
C. ベイジェリンキ (C. beyerincki)	0.061h ⁻¹	0.056h ⁻¹
C. フィトフェルメンタンス (C. phytofermentans)	0.039h ⁻¹	--
オルピノミセス属 (Orpinomyces)	0.01h ⁻¹	--
ピロミセス属 (Piromyces)	0.005h ⁻¹	--
T. サーモフィルス (T. thermophilus)	--	--

10

20

【 0 1 4 3 】

上記の表に提供するデータは、全て異なる株バックグラウンドから得られている。- は未計測又は未試験を示す。T. サーモフィルス (T. Thermophilus) 由来の XI を有する S. セレビシエ (S. cerevisiae) 株については、キシロースの消費は観察されたものの、増殖を支えるには消費レベルが低過ぎたことが注記される。

【図 1】

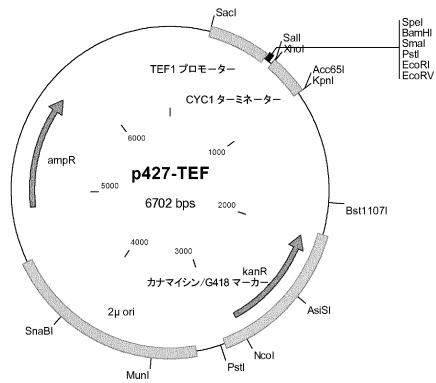


図 1

【図 2】

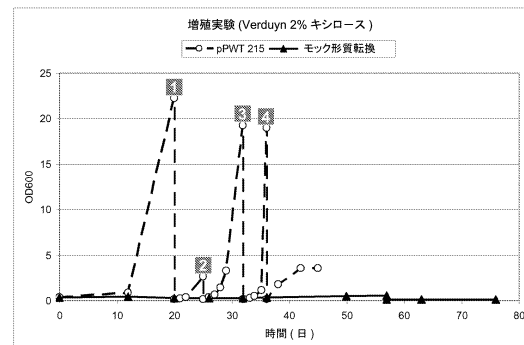


図 2

【図 3】

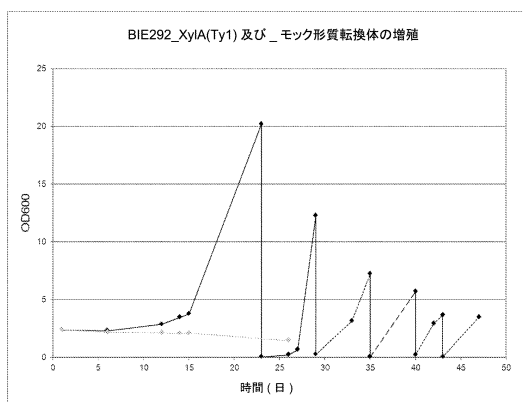


図 3

【配列表】

0006048980000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
C 1 2 P	7/40	(2006.01)	C 1 2 P	7/40	
C 1 2 P	7/54	(2006.01)	C 1 2 P	7/54	
C 1 2 P	7/46	(2006.01)	C 1 2 P	7/46	
C 1 2 P	7/48	(2006.01)	C 1 2 P	7/48	
C 1 2 P	13/04	(2006.01)	C 1 2 P	13/04	
C 1 2 P	7/18	(2006.01)	C 1 2 P	7/18	
C 1 2 P	5/02	(2006.01)	C 1 2 P	5/02	
C 1 2 P	7/20	(2006.01)	C 1 2 P	7/20	
C 1 2 P	1/06	(2006.01)	C 1 2 P	1/06	A
C 1 2 P	35/00	(2006.01)	C 1 2 P	35/00	Z
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A

- (72)発明者 クラーセン, ポール
 オランダ, エヌエル - 6 1 0 0 エーシー エヒト, ポスト オフィス ボックス 1 3 0
- (72)発明者 デ ヨング, ルネ マルセル
 オランダ, エヌエル - 6 1 0 0 エーシー エヒト, ポスト オフィス ボックス 1 3 0
- (72)発明者 ヴァン サイレコム, ギースベルディナ ピーターネラ
 オランダ, エヌエル - 6 1 0 0 エーシー エヒト, ポスト オフィス ボックス 1 3 0

審査官 飯室 里美

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 1 0 / 0 7 4 5 7 7 (WO, A 1)
 特表 2 0 1 1 - 5 1 2 8 3 2 (JP, A)
 Uniprot[online], 2 0 1 1 年 7 月 2 7 日, 検索日 2 0 1 6 年 4 月 2 2 日, URL, <http://www.uniprot.org/uniprot/A6LW13.txt?version=31>

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
- C 1 2 P 1 / 0 0 - 4 1 / 0 0
 C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8
 C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C A p l u s / M E D L I N E / W P I D S / B I O S I S (S T N)
 U n i P r o t / G e n e S e q