

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2022-537214
(P2022-537214A)

(43)公表日 令和4年8月24日(2022.8.24)

(51)国際特許分類		F I	テーマコード(参考)	
C 12 N	15/53 (2006.01)	C 12 N	15/53	Z N A 4 B 0 5 0
C 12 N	1/15 (2006.01)	C 12 N	1/15	4 B 0 6 4
C 12 N	1/19 (2006.01)	C 12 N	1/19	4 B 0 6 5
C 12 N	1/21 (2006.01)	C 12 N	1/21	
C 12 N	5/10 (2006.01)	C 12 N	5/10	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全93頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2021-576258(P2021-576258)	(71)出願人	516286741 ギンゴー バイオワークス , インコーポ レイテッド アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 2 1 0 , ボストン , ドライドック ア ベニュー 2 7 , フロア 8
(86)(22)出願日	令和2年6月19日(2020.6.19)	(71)出願人	517196203 シンロジック オペレーティング カンパ ニー インコーポレイテッド アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 2 ケンブリッジ ビニー ストリ ート 3 0 1 ナンバー 4 0 2
(85)翻訳文提出日	令和4年2月8日(2022.2.8)	(74)代理人	100106518 弁理士 松谷 道子
(86)国際出願番号	PCT/US2020/038813	(74)代理人	100122301 最終頁に続く
(87)国際公開番号	WO2020/257707		最終頁に続く
(87)国際公開日	令和2年12月24日(2020.12.24)		
(31)優先権主張番号	62/864,875		
(32)優先日	令和1年6月21日(2019.6.21)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(31)優先権主張番号	62/865,129		
(32)優先日	令和1年6月21日(2019.6.21)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA 最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 メープルシロップ尿症 (MSUD) の処置における使用のための酵素の生合成

(57)【要約】

本開示において提供するものは、いくつかの実施形態において、メープルシロップ尿症 (MSUD) および過剰な分岐鎖アミノ酸を特徴とするその他の症状を処置するための方法および組成物である。



FIG. 9

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ロイシンデヒドロゲナーゼ(LeuDH)酵素をコードする異種ポリヌクレオチドを含む宿主細胞であって、ここで該LeuDH酵素が、配列番号2、4、6、8、10、および12から選択された配列に対して少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む、宿主細胞。

【請求項2】

該LeuDH酵素が、配列番号2に対して少なくとも90%同一なアミノ酸配列を含む、請求項1に記載の宿主細胞

【請求項3】

該LeuDH酵素が配列番号2を含む、請求項2に記載の宿主細胞。

【請求項4】

該LeuDH酵素が以下：

- a) 配列番号27の残基13に対応する残基におけるV；
- b) 配列番号27の残基16に対応する残基におけるW；
- c) 配列番号27の残基42に対応する残基におけるQ；
- d) 配列番号27の残基43に対応する残基におけるT、Y、F、E、またはW；
- e) 配列番号27の残基44に対応する残基におけるI、H、K、またはY；
- f) 配列番号27の残基67に対応する残基におけるT、E、A、S、またはK；
- g) 配列番号27の残基71に対応する残基におけるK；
- h) 配列番号27の残基73に対応する残基におけるS；
- i) 配列番号27の残基76に対応する残基におけるR、H、Y、S、K、またはW；
- j) 配列番号27の残基92に対応する残基におけるY；
- k) 配列番号27の残基93に対応する残基におけるH；
- l) 配列番号27の残基95に対応する残基におけるG；
- m) 配列番号27の残基100に対応する残基におけるG；
- n) 配列番号27の残基105に対応する残基におけるC；
- o) 配列番号27の残基111に対応する残基におけるG；
- p) 配列番号27の残基113に対応する残基におけるM；
- q) 配列番号27の残基115に対応する残基におけるNまたはV；
- r) 配列番号27の残基116に対応する残基におけるR、N、またはW；
- s) 配列番号27の残基120に対応する残基におけるA；
- t) 配列番号27の残基122に対応する残基におけるD；
- u) 配列番号27の残基136に対応する残基におけるE；
- v) 配列番号27の残基140に対応する残基におけるD；
- w) 配列番号27の残基141に対応する残基におけるM；
- x) 配列番号27の残基160に対応する残基におけるS；
- y) 配列番号27の残基185に対応する残基におけるF；
- z) 配列番号27の残基196に対応する残基におけるN；
- a a) 配列番号27の残基228に対応する残基におけるY；
- b b) 配列番号27の残基248に対応する残基におけるM；
- c c) 配列番号27の残基256に対応する残基におけるC；
- d d) 配列番号27の残基293に対応する残基におけるQまたはC；
- e e) 配列番号27の残基296に対応する残基におけるKまたはN；
- f f) 配列番号27の残基297に対応する残基におけるR、Q、またはK；
- g g) 配列番号27の残基300に対応する残基におけるCまたはD；
- h h) 配列番号27の残基302に対応する残基におけるTまたはS；
- i i) 配列番号27の残基305に対応する残基におけるC；
- j j) 配列番号27の残基319に対応する残基におけるF； および/または
- k k) 配列番号27の残基330に対応する残基におけるM、

10

20

30

40

50

を含む、請求項 1 または 2 に記載の宿主細胞。

【請求項 5】

該 L e u D H 酵素が (a) - (k k) の全てを含む、請求項 4 に記載の宿主細胞。

【請求項 6】

ロイシンデヒドロゲナーゼ (L e u D H) 酵素をコードする異種ポリヌクレオチドを含む宿主細胞であって、ここで、該 L e u D H 酵素が、配列番号 27 と比較して、アミノ酸残基 42、43、44、67、71、76、78、113、115、116、136、293、296、297 および / または 300 においてアミノ酸置換を含む、宿主細胞。

【請求項 7】

該 L e u D H 酵素が、以下：

- a) 残基 42 における A、Q、または T ;
- b) 残基 43 における E、F、T、W、または Y ;
- c) 残基 44 における H、I、K、または Y ;
- d) 残基 67 における A、E、K、Q、S、または T ;
- e) 残基 71 における C、D、H、K、M、または T ;
- f) 残基 76 における E、F、H、I、K、M、R、S、T、W、または Y ;
- g) 残基 78 における C、F、H、K、Q、V、または Y ;
- h) 残基 113 における F、M、Q、V、W、または Y ;
- i) 残基 115 における N、Q、S、T、または V ;
- j) 残基 116 における A、L、M、N、R、S、V、または W ;
- k) 残基 136 における E、F、L、R、S、または Y ;
- l) 残基 293 における A、C、Q、S、または T ;
- m) 残基 296 における A、C、E、I、K、L、N、S、または T ;
- n) 残基 297 における C、D、E、F、H、K、L、M、N、Q、R、T、W、または Y ; および / または
- o) 残基 300 における A、C、D、F、H、K、M、N、Q、R、S、T、W、または Y 、

を含む、請求項 6 に記載の宿主細胞。

【請求項 8】

配列番号 27 と比較して、アミノ酸残基 42、43、44、67、71、76、78、113、115、116、136、293、296、297 および / または 300 においてアミノ酸置換を含む、非天然 L e u D H 酵素。

【請求項 9】

該 L e u D H 酵素が以下：

- a) 残基 42 における A、Q、または T ;
- b) 残基 43 における E、F、T、W、または Y ;
- c) 残基 44 における H、I、K、または Y ;
- d) 残基 67 における A、E、K、Q、S、または T ;
- e) 残基 71 における C、D、H、K、M、または T ;
- f) 残基 76 における E、F、H、I、K、M、R、S、T、W、または Y ;
- g) 残基 78 における C、F、H、K、Q、V、または Y ;
- h) 残基 113 における F、M、Q、V、W、または Y ;
- i) 残基 115 における N、Q、S、T、または V ;
- j) 残基 116 における A、L、M、N、R、S、V、または W ;
- k) 残基 136 における E、F、L、R、S、または Y ;
- l) 残基 293 における A、C、Q、S、または T ;
- m) 残基 296 における A、C、E、I、K、L、N、S、または T ;
- n) 残基 297 における C、D、E、F、H、K、L、M、N、Q、R、T、W、または Y ; および / または
- o) 残基 300 における A、C、D、F、H、K、M、N、Q、R、S、T、W、また

10

20

20

30

40

50

は Y、

を含む、請求項 8 に記載の非天然 L e u D H 酵素。

【請求項 10】

分岐鎖 - ケト酸デカルボキシラーゼ (K i v D) 酵素をコードする異種ポリヌクレオチドを含む宿主細胞であって、ここで、該 K i v D 酵素が、配列番号 14、16、および 18 から選択された配列に対して少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含む、宿主細胞。

【請求項 11】

該 K i v D 酵素が、配列番号 18 に対して少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 10 に記載の宿主細胞。 10

【請求項 12】

該 K i v D 酵素が配列番号 18 を含む、請求項 11 に記載の宿主細胞。

【請求項 13】

該 K i v D 酵素が以下：

- a) 配列番号 29 の残基 33 に対応する残基における Y ;
- b) 配列番号 29 の残基 44 に対応する残基における Q ;
- c) 配列番号 29 の残基 117 に対応する残基における M ;
- d) 配列番号 29 の残基 129 に対応する残基における I ;
- e) 配列番号 29 の残基 185 に対応する残基における W ;
- f) 配列番号 29 の残基 190 に対応する残基における I ;
- g) 配列番号 29 の残基 225 に対応する残基における I ;
- h) 配列番号 29 の残基 227 に対応する残基における Y ;
- i) 配列番号 29 の残基 311 に対応する残基における L ;
- j) 配列番号 29 の残基 312 に対応する残基における G ;
- k) 配列番号 29 の残基 313 に対応する残基における T ;
- l) 配列番号 29 の残基 328 に対応する残基における P ;
- m) 配列番号 29 の残基 341 に対応する残基における W ;
- n) 配列番号 29 の残基 345 に対応する残基における H ;
- o) 配列番号 29 の残基 347 に対応する残基における C ;
- p) 配列番号 29 の残基 420 に対応する残基における R ;
- q) 配列番号 29 の残基 494 に対応する残基における D ;
- r) 配列番号 29 の残基 508 に対応する残基における C ; および / または
- s) 配列番号 29 の残基 550 に対応する残基における F 、

を含む、請求項 10 または 11 に記載の宿主細胞。

【請求項 14】

該 K i v D 酵素が (a) - (s) の全てを含む、請求項 13 に記載の宿主細胞。

【請求項 15】

アルコールデヒドロゲナーゼ (A d h) 酵素をコードする異種ポリヌクレオチドを含む宿主細胞であって、ここで、該 A d h 酵素が配列番号 20、22、および 24 から選択された配列に対して少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含む、宿主細胞。 40

【請求項 16】

該 A d h 酵素が、配列番号 24 に対して少なくとも 90 % 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 15 に記載の宿主細胞。

【請求項 17】

該 A d h 酵素が配列番号 24 を含む、請求項 16 に記載の宿主細胞。

【請求項 18】

該 A d h 酶素が以下：

- a) 配列番号 31 の残基 9 に対応する残基における P ;
- b) 配列番号 31 の残基 16 に対応する残基における G ;
- c) 配列番号 31 の残基 23 に対応する残基における Q ;

- d) 配列番号 3 1 の残基 2 8 に対応する残基における R ;
- e) 配列番号 3 1 の残基 3 0 に対応する残基における A ;
- f) 配列番号 3 1 の残基 9 3 に対応する残基における K ;
- g) 配列番号 3 1 の残基 9 8 に対応する残基における L ;
- h) 配列番号 3 1 の残基 9 9 に対応する残基における R ;
- i) 配列番号 3 1 の残基 1 1 4 に対応する残基における P ;
- j) 配列番号 3 1 の残基 1 1 5 に対応する残基における K ;
- k) 配列番号 3 1 の残基 1 1 9 に対応する残基における Y ;
- l) 配列番号 3 1 の残基 1 9 4 に対応する残基における Y ;
- m) 配列番号 3 1 の残基 2 4 2 に対応する残基における P ;
- n) 配列番号 3 1 の残基 2 4 9 に対応する残基における K ;
- o) 配列番号 3 1 の残基 2 5 5 に対応する残基における E ;
- p) 配列番号 3 1 の残基 2 6 0 に対応する残基における D ;
- q) 配列番号 3 1 の残基 2 6 9 に対応する残基における H ;
- r) 配列番号 3 1 の残基 2 8 1 に対応する残基における Q ;
- s) 配列番号 3 1 の残基 3 2 5 に対応する残基における L ;
- t) 配列番号 3 1 の残基 3 3 3 に対応する残基における M ;
- u) 配列番号 3 1 の残基 3 3 4 に対応する残基における P ; および / または
- v) 配列番号 3 1 の残基 3 4 8 に対応する残基における Q ,
を含む、請求項 1 5 または 1 6 に記載の宿主細胞。

10

20

30

40

50

【請求項 1 9】

該 A d h 酵素が (a) - (v) の全てを含む、請求項 1 8 に記載の宿主細胞。

【請求項 2 0】

該宿主細胞が、植物細胞、藻類細胞、酵母細胞、細菌細胞、または動物細胞である、請求項 1 - 7 および 1 0 - 1 9 のいずれか 1 項に記載の宿主細胞。

【請求項 2 1】

該宿主細胞が、酵母細胞である、請求項 2 0 に記載の宿主細胞。

【請求項 2 2】

該酵母細胞が、S a c c h a r o m y c e s 細胞、Y a r r o w i a 細胞または P i c h i a 細胞である、請求項 2 1 に記載の宿主細胞。

【請求項 2 3】

該宿主細胞が、細菌細胞である、請求項 2 0 に記載の宿主細胞。

【請求項 2 4】

該細菌細胞が、E . c o l i 細胞、または B a c i l l u s 細胞である、請求項 2 3 に記載の宿主細胞。

【請求項 2 5】

該宿主細胞が、分岐鎖アミノ酸輸送系 2 キャリアタンパク質 (B r n Q) をコードする異種ポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 1 - 7 、および 1 0 - 2 4 のいずれか 1 項に記載の宿主細胞。

【請求項 2 6】

該 B r n Q タンパク質が、配列番号 3 5 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 % 同一である、請求項 2 5 に記載の宿主細胞。

【請求項 2 7】

該異種ポリヌクレオチドが誘導性プロモーターと作動可能に連結する、請求項 1 - 7 および 1 0 - 2 6 のいずれか一項に記載の宿主細胞。

【請求項 2 8】

該異種ポリヌクレオチドがオペロンにおいて発現される、請求項 1 - 7 および 1 0 - 2 7 のいずれか一項に記載の宿主細胞。

【請求項 2 9】

該オペロンが 1 以上の異種ポリヌクレオチドを発現し、およびリボソーム結合部位が各

異種ポリヌクレオチド間に存在する、請求項 28 に記載の宿主細胞。

【請求項 30】

該宿主細胞が、*K i v D* 酵素をコードする異種ポリヌクレオチドおよび / または *A d h* 酵素をコードする異種ポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 1 - 7 のいずれか一項に記載の宿主細胞。

【請求項 31】

該宿主細胞が、*L e u D H* 酵素をコードする異種ポリヌクレオチドおよび / または *A d h* 酵素をコードする異種ポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 10 - 14 のいずれか一項に記載の宿主細胞。

【請求項 32】

該宿主細胞が、*L e u D H* 酵素をコードする異種ポリヌクレオチドおよび / または *K i v D* 酵素をコードする異種ポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 15 - 19 のいずれか一項に記載の宿主細胞。

【請求項 33】

該宿主細胞が、ロイシンからイソペントノールを産生できる、請求項 1 - 7 および 10 - 32 のいずれか一項に記載の宿主細胞。

【請求項 34】

該宿主細胞が、配列番号 27 の配列を含むコントロール *L e u D H* 酵素をコードする異種ポリヌクレオチド、配列番号 29 の配列を含むコントロール *K i v D* 酵素をコードする異種ポリヌクレオチド、配列番号 31 の配列を含むコントロール *A d h* 酵素をコードする異種ポリヌクレオチド、および配列番号 35 の配列を含むコントロール *B r n Q* タンパク質をコードする異種ポリヌクレオチド、を含むコントロール宿主細胞と比較して、少なくとも 2 倍以上のロイシンを消費する、請求項 33 に記載の宿主細胞。

【請求項 35】

請求項 1 - 7 および 10 - 34 のいずれか一項に記載の宿主細胞を培養する工程を含む方法。

【請求項 36】

ロイシンからイソペントノールを生産するための方法であって、請求項 1 - 7 および 10 - 34 のいずれか一項に記載の宿主細胞を培養する工程を含む、方法。

【請求項 37】

配列番号 1、3、5、7、9 および 11 から選択された核酸配列に対して少なくとも 90 % 同一である配列を含む非天然核酸。

【請求項 38】

配列番号 13、15、および 17 から選択された核酸配列に対して少なくとも 90 % 同一である配列を含む非天然核酸。

【請求項 39】

配列番号 19、21、および 23 から選択された核酸配列に対して少なくとも 90 % 同一である配列を含む非天然核酸。

【請求項 40】

配列番号 2、4、6、8、10、および 12 から選択された配列に対して少なくとも 90 % 同一である配列をコードする非天然核酸。

【請求項 41】

配列番号 14、16、および 18 から選択された配列に対して少なくとも 90 % 同一である配列をコードする非天然核酸。

【請求項 42】

配列番号 20、22、および 24 から選択された配列に対して少なくとも 90 % 同一である配列をコードする非天然核酸。

【請求項 43】

請求項 37 - 42 のいずれか一項に記載の非天然核酸を含むベクター。

【請求項 44】

10

20

30

40

50

請求項 3 7 - 4 2 のいずれか一項に記載の非天然核酸を含む発現カセット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本願は、米国特許法第 119 条(e)の下で、2019 年 6 月 21 日に出願された、「メープルシロップ尿症 (M S U D) の処置における使用のための酵素の生合成」と題する米国仮出願シリアル番号第 62 / 865、129 号、および 2019 年 6 月 21 日に出願された「ロイシン、イソロイシン、および / またはバリンの異化に関する疾患を処置するための操作された最適化細菌」と題する米国仮出願シリアル番号第 62 / 864、875 号の利益を主張するものであり、ここに本明細書の一部として参照によりその全体を援用する。

10

【0 0 0 2】

E S F - W E B を介してテキストファイルとして提出された配列表の参照

本願は、E F S - W e b を介して A S C I I 形式で提出された配列表を含み、およびここに本明細書の一部として参照によりその全体を援用する。この A S C I I コピーは、2020 年 6 月 19 日に作成され、名称が G 0 9 1 9 . 7 0 0 3 3 W O 0 0 - S E Q - O M J . t x t あり、およびサイズは 1 . 7 6 メガバイト (M B) である。

20

【0 0 0 3】

発明の分野

本開示は、ロイシンをイソペントノールに変換するために有用な酵素、核酸、および細胞に関する。

【背景技術】

【0 0 0 4】

背景

メープルシロップ尿症 (M S U D) は、分岐鎖アルファ - ケト酸デヒドロゲナーゼ複合体 (B C K D C) の欠損によって、分岐鎖アミノ酸 (ロイシン、イソロイシン、およびバリン) およびその有害副産物 (ケト酸) が血中および尿中に蓄積する代謝性疾患である。 M S U D は、特に診断前や急性疾患時において、罹患者の尿から特有の甘い匂いがする事からその名がついた。

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 5】

M S U D およびその他の過剰な分岐鎖アミノ酸を特徴とする症状に対する処置の改善が依然必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0 0 0 6】

概要

本開示は、少なくとも部分的に、例えばロイシンをイソペントノールに変換することによってロイシンを消費するための酵素を含む操作された細胞を生成する事に基づく。このような操作された細胞は、M S U D などのロイシンの蓄積に関連する疾患の処置のために有用である。

40

【0 0 0 7】

本開示の態様は、ロイシンデヒドロゲナーゼ (L e u D H) 酵素をコードする異種ポリヌクレオチドを含む宿主細胞に関し、ここで、L e u D H 酵素は配列番号 2、4、6、8、10 および 12 から選択された配列に対して少なくとも 90 % 同一なアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、この L e u D H 酵素は配列番号 2 に対して少なくとも 90 % 同一なアミノ酸配列を含む。をいくつかの実施形態では、この L e u D H 酵素は配列番号 2 を含む。いくつかの実施形態では、この L e u D H 酵素は；配列番号 27 の残基 1 3 に対応する残基における V ; 配列番号 27 の残基 1 6 に対応する残基における W ; 配列番

50

号 2 7 の残基 4 2 に対応する残基における Q ; 配列番号 2 7 の残基 4 3 に対応する残基における T、Y、F、E、または W ; 配列番号 2 7 の残基 4 4 に対応する残基における I、H、K、または Y ; 配列番号 2 7 の残基 6 7 に対応する残基における T、E、A、S、または K ; 配列番号 2 7 の残基 7 1 に対応する残基における K ; 配列番号 2 7 の残基 7 3 に対応する残基における S ; 配列番号 2 7 の残基 7 6 に対応する残基における R、H、Y、S、K、または W ; 配列番号 2 7 の残基 9 2 に対応する残基における Y ; 配列番号 2 7 の残基 9 3 に対応する残基における H ; 配列番号 2 7 の残基 9 5 に対応する残基における G ; 配列番号 2 7 の残基 1 0 0 に対応する残基における G ; 配列番号 2 7 の残基 1 0 5 に対応する残基における C ; 配列番号 2 7 の残基 1 1 1 に対応する残基における G ; 配列番号 2 7 の残基 1 1 3 に対応する残基における M ; 配列番号 2 7 の残基 1 1 5 に対応する残基における N、または V ; 配列番号 2 7 の残基 1 1 6 に対応する残基における R、N、または W ; 配列番号 2 7 の残基 1 2 0 に対応する残基における A ; 配列番号 2 7 の残基 1 2 2 に対応する残基における D ; 配列番号 2 7 の残基 1 3 6 に対応する残基における E ; 配列番号 2 7 の残基 1 4 0 に対応する残基における D ; 配列番号 2 7 の残基 1 4 1 に対応する残基における M ; 配列番号 2 7 の残基 1 6 0 に対応する残基における S ; 配列番号 2 7 の残基 1 8 5 に対応する残基における F ; 配列番号 2 7 の残基 1 9 6 に対応する残基における N ; 配列番号 2 7 の残基 2 2 8 に対応する残基における Y ; 配列番号 2 7 の残基 2 4 8 に対応する残基における M ; 配列番号 2 7 の残基 2 5 6 に対応する残基における C ; 配列番号 2 7 の残基 2 9 3 に対応する残基における Q または C ; 配列番号 2 7 の残基 2 9 6 に対応する残基における K または N ; 配列番号 2 7 の残基 2 9 7 に対応する残基における R、Q、または K ; 配列番号 2 7 の残基 3 0 0 に対応する残基における C または D ; 配列番号 2 7 の残基 3 0 2 に対応する残基における T または S ; 配列番号 2 7 の残基 3 0 5 に対応する残基における C ; 配列番号 2 7 の残基 3 1 9 に対応する残基における F ; および / または配列番号 2 7 の残基 3 3 0 に対応する残基における M、を含む。
【 0 0 0 8 】

本開示のさらなる態様は、ロイシンデヒドロゲナーゼ (LeuDH) 酵素をコードする異種ポリヌクレオチドを含む宿主細胞に関し、ここで、この LeuDH 酵素は、配列番号 2 7 の残基 1 3 に対応する残基における V ; 配列番号 2 7 の残基 1 6 に対応する残基における W ; 配列番号 2 7 の残基 4 2 に対応する残基における Q ; 配列番号 2 7 の残基 4 3 に対応する残基における T、Y、F、E、または W ; 配列番号 2 7 の残基 4 4 に対応する残基における I、H、K、または Y ; 配列番号 2 7 の残基 6 7 に対応する残基における T、E、A、S、または K ; 配列番号 2 7 の残基 7 1 に対応する残基における K ; 配列番号 2 7 の残基 7 3 に対応する残基における S ; 配列番号 2 7 の残基 7 6 に対応する残基における R、H、Y、S、K、または W ; 配列番号 2 7 の残基 9 2 に対応する残基における Y ; 配列番号 2 7 の残基 9 3 に対応する残基における H ; 配列番号 2 7 の残基 9 5 に対応する残基における G ; 配列番号 2 7 の残基 1 0 0 に対応する残基における G ; 配列番号 2 7 の残基 1 0 5 に対応する残基における C ; 配列番号 2 7 の残基 1 1 1 に対応する残基における G ; 配列番号 2 7 の残基 1 1 3 に対応する残基における M ; 配列番号 2 7 の残基 1 1 5 に対応する残基における N、または V ; 配列番号 2 7 の残基 1 1 6 に対応する残基における R、N、または W ; 配列番号 2 7 の残基 1 2 0 に対応する残基における A ; 配列番号 2 7 の残基 1 2 2 に対応する残基における D ; 配列番号 2 7 の残基 1 3 6 に対応する残基における E ; 配列番号 2 7 の残基 1 4 0 に対応する残基における D ; 配列番号 2 7 の残基 1 4 1 に対応する残基における M ; 配列番号 2 7 の残基 1 6 0 に対応する残基における S ; 配列番号 2 7 の残基 1 8 5 に対応する残基における F ; 配列番号 2 7 の残基 1 9 6 に対応する残基における N ; 配列番号 2 7 の残基 2 2 8 に対応する残基における Y ; 配列番号 2 7 の残基 2 4 8 に対応する残基における M ; 配列番号 2 7 の残基 2 5 6 に対応する残基における C ; 配列番号 2 7 の残基 2 9 3 に対応する残基における Q または C ; 配列番号 2 7 の残基 2 9 6 に対応する残基における K または N ; 配列番号 2 7 の残基 2 9 7 に対応する残基における R、Q、または K ; 配列番号 2 7 の残基 3 0 0 に対応する残基における C または D ; 配列番号 2 7 の残基 3 0 2 に対応する残基における T または S ; 配列番号 2 7 の

10

20

30

40

50

残基 305 に対応する残基における C；配列番号 27 の残基 319 に対応する残基における F；および配列番号 27 の残基 330 に対応する残基における M、を含む。

【0009】

本開示のさらなる態様は、ロイシンデヒドロゲナーゼ (LeuDH) 酵素をコードする異種ポリヌクレオチドを含む宿主細胞に関し、ここで、配列番号 27 と比較して、この LeuDH 酵素は、アミノ酸残基 42、43、44、67、71、76、78、113、115、116、116、136、293、296、297 および / または 300 においてアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、この LeuDH 酵素は、残基 42 における A、Q、または T；残基 43 における E、F、T、W、または Y；残基 44 における H、I、K、または Y；残基 67 における A、E、K、Q、S、または T；残基 71 における C、D、H、K、M、または T；残基 76 における E、F、H、I、K、M、R、S、T、W、または Y；残基 78 における C、F、H、K、Q、V、または Y；残基 113 における F、M、Q、V、W、または Y；残基 115 における N、Q、S、T、または V；残基 116 における A、L、M、N、R、S、V、または W；残基 136 における E、F、L、R、S、または Y；残基 293 における A、C、Q、S、または T；残基 296 における A、C、E、I、K、L、N、S、または T；残基 297 における C、D、E、F、H、K、L、M、N、Q、R、T、W、または Y；残基 300 におけるおよび / または A、C、D、F、H、K、M、N、Q、R、S、T、W、または Y、を含む。

【0010】

本開示のさらなる態様は、非天然 LeuDH 酵素に関し、ここで、配列番号 27 と比較して、この LeuDH 酵素はアミノ酸残基 42、43、44、67、71、76、78、113、115、116、136、293、296、297 および / または 300 においてアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、この LeuDH 酵素は以下：残基 42 における A、Q、または T；残基 43 における E、F、T、W、または Y；残基 44 における H、I、K、または Y；残基 67 における A、E、K、Q、S、または T；残基 71 における C、D、H、K、M、または T；残基 76 における E、F、H、I、K、M、R、S、T、W、または Y；残基 78 における C、F、H、K、Q、V、または Y；残基 113 における F、M、Q、V、W、または Y；残基 115 における N、Q、S、T、または V；残基 116 における A、L、M、N、R、S、V、または W；残基 136 における E、F、L、R、S、または Y；残基 293 における A、C、Q、S、または T；残基 296 における A、C、E、I、K、L、N、S、または T；残基 297 における C、D、E、F、H、K、L、M、N、Q、R、T、W、または Y；残基 300 におけるおよび / または A、C、D、F、H、K、M、N、Q、R、S、T、W、または Y、を含む。

【0011】

本開示のさらなる態様は、分岐鎖 - ケト酸デカルボキシラーゼ (KivD) 酵素をコードする異種ポリヌクレオチドを含む宿主細胞に関し、ここで、この KivD 酵素は配列番号 14、16、および 18 から選択された配列に対して少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、この KivD 酵素は配列番号 18 に対して少なくとも 90% 同一なアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、この KivD 酵素は配列番号 18 を含む。いくつかの実施形態では、この KivD 酵素は、以下：配列番号 29 の残基 33 に対応する残基における Y；配列番号 29 の残基 44 に対応する残基における Q；配列番号 29 の残基 117 に対応する残基における M；配列番号 29 の残基 129 に対応する残基における I；配列番号 29 の残基 185 に対応する残基における W；配列番号 29 の残基 190 に対応する残基における I；配列番号 29 の残基 225 に対応する残基における I；配列番号 29 の残基 227 に対応する残基における Y；配列番号 29 の残基 311 に対応する残基における L；配列番号 29 の残基 312 に対応する残基における G；配列番号 29 の残基 313 に対応する残基における T；配列番号 29 の残基 328 に対応する残基における P；配列番号 29 の残基 341 に対応する残基における W；配列番号 29 の残基 345 に対応する残基における H；配列番号 29 の残基 347 に対応する残基における C；配列番号 29 の残基 420 に対応する残基における R；配列番号 2

10

20

30

40

50

9 の残基 4 9 4 に対する残基における D ; 配列番号 2 9 の残基 5 0 8 に対する残基における C ; および / または配列番号 2 9 の残基 5 5 0 に対する残基における F 、を含む。

【 0 0 1 2 】

本開示のさらなる態様は、分岐鎖 - ケト酸デカルボキシラーゼ (K i v D) 酵素をコードする異種ポリヌクレオチドを含む宿主細胞に関し、ここで、この K i v D 酵素は以下の配列番号 2 9 の残基 3 3 に対応する残基における Y ; 配列番号 2 9 の残基 4 4 に対応する残基における Q ; 配列番号 2 9 の残基 1 1 7 に対応する残基における M ; 配列番号 2 9 の残基 1 2 9 に対応する残基における I ; 配列番号 2 9 の残基 1 8 5 に対応する残基における W ; 配列番号 2 9 の残基 1 9 0 に対応する残基における I ; 配列番号 2 9 の残基 2 2 5 に対応する残基における I ; 配列番号 2 9 の残基 2 2 7 に対応する残基における Y ; 配列番号 2 9 の残基 3 1 1 に対応する残基における L ; 配列番号 2 9 の残基 3 1 2 に対応する残基における G ; 配列番号 2 9 の残基 3 1 3 に対応する残基における T ; 配列番号 2 9 の残基 3 2 8 に対応する残基における P ; 配列番号 2 9 の残基 3 4 1 に対応する残基における W ; 配列番号 2 9 の残基 3 4 5 に対応する残基における H ; 配列番号 2 9 の残基 3 4 7 に対応する残基における C ; 配列番号 2 9 の残基 4 2 0 に対応する残基における R ; 配列番号 2 9 の残基 4 9 4 に対応する残基における D ; 配列番号 2 9 の残基 5 0 8 に対応する残基における C ; および配列番号 2 9 の残基 5 5 0 に対応する残基における F 、を含む

[0 0 1 3]

本開示のさらなる態様は、アルコールデヒドロゲナーゼ（A d h）酵素をコードする異種ポリヌクレオチドを含む宿主細胞に関し、ここで、このA d h 酵素は配列番号20、22、および24から選択された配列に対して少なくとも90%同一なアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、このA d h 酵素は配列番号24に対して少なくとも90%同一なアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、このA d h 酵素は配列番号24を含む。いくつかの実施形態では、このA d h 酵素は以下：配列番号31の残基9に対応する残基におけるP；配列番号31の残基16に対応する残基におけるG；配列番号31の残基23に対応する残基におけるQ；配列番号31の残基28に対応する残基におけるR；配列番号31の残基30に対応する残基におけるA；配列番号31の残基93に対応する残基におけるK；配列番号31の残基98に対応する残基におけるL；配列番号31の残基99に対応する残基におけるR；配列番号31の残基114に対応する残基におけるP；配列番号31の残基115に対応する残基におけるK；配列番号31の残基119に対応する残基におけるY；配列番号31の残基194に対応する残基におけるY；配列番号31の残基242に対応する残基におけるP；配列番号31の残基249に対応する残基におけるK；配列番号31の残基255に対応する残基におけるE；配列番号31の残基260に対応する残基におけるD；配列番号31の残基269に対応する残基におけるH；配列番号31の残基281に対応する残基におけるQ；配列番号31の残基325に対応する残基におけるL；配列番号31の残基333に対応する残基におけるM；配列番号31の残基334に対応する残基におけるP；および／または配列番号31の残基348に対応する残基におけるQを含む。

【 0 0 1 4 】

本開示のさらなる態様は、アルコールデヒドロゲナーゼ（Adh）酵素をコードする異種ポリヌクレオチドを含む宿主細胞に関し、ここで、このAdh酵素は以下：配列番号31の残基9に対応する残基におけるP；配列番号31の残基16に対応する残基におけるG；配列番号31の残基23に対応する残基におけるQ；配列番号31の残基28に対応する残基におけるR；配列番号31の残基30に対応する残基におけるA；配列番号31の残基93に対応する残基におけるK；配列番号31の残基98に対応する残基におけるL；配列番号31の残基99に対応する残基におけるR；配列番号31の残基114に対応する残基におけるP；配列番号31の残基115に対応する残基におけるK；配列番号31の残基119に対応する残基におけるY；配列番号31の残基194に対応する残基

におけるY；配列番号31の残基242に対応する残基におけるP；配列番号31の残基249に対応する残基におけるK；配列番号31の残基255に対応する残基におけるE；配列番号31の残基260に対応する残基におけるD；配列番号31の残基269に対応する残基におけるH；配列番号31の残基281に対応する残基におけるQ；配列番号31の残基325に対応する残基におけるL；配列番号31の残基333に対応する残基におけるM；配列番号31の残基334に対応する残基におけるP；および配列番号31の残基348に対応する残基におけるQ、を含む。

【0015】

いくつかの実施形態では、宿主細胞は、植物細胞、藻類細胞、酵母細胞、細菌細胞、または動物細胞である。いくつかの実施形態では、宿主細胞は酵母細胞である。いくつかの実施形態では、この酵母細胞は、*Saccharomyces*細胞、*Yarrowia*細胞、または*Pichia*細胞である。いくつかの実施形態では、宿主細胞は細菌細胞である。いくつかの実施形態では、この細菌細胞は*E. coli*細胞または*Bacillus*細胞である。

10

【0016】

いくつかの実施形態では、宿主細胞は、分岐鎖アミノ酸輸送系2キャリアタンパク質(*BnnQ*)をコードする異種ポリヌクレオチドをさらに含む。いくつかの実施形態では、*BnnQ*タンパク質は、配列番号35のアミノ酸配列と少なくとも90%同一である。いくつかの実施形態では、*BnnQ*タンパク質は配列番号35のアミノ酸配列を含む。

20

【0017】

いくつかの実施形態では、異種ポリヌクレオチドは誘導性プロモーターと作動可能に連結される。いくつかの実施形態では、異種ポリヌクレオチドはオペロンにおいて発現する。いくつかの実施形態では、このオペロンは1以上の異種ポリヌクレオチドを発現し、および各異種ポリヌクレオチド間にはリボソーム結合部位が存在していてもよい。

20

【0018】

いくつかの実施形態では、宿主細胞は*KivD*酵素をコードする異種ポリヌクレオチドおよび/または*Adh*酵素をコードする異種ポリヌクレオチドをさらに含む。

30

【0019】

いくつかの実施形態では、宿主細胞は、*LeuD*酵素をコードする異種ポリヌクレオチドおよび/または*Adh*酵素をコードする異種ポリヌクレオチドをさらに含む。

30

【0020】

いくつかの実施形態では、宿主細胞は、*LeuD*酵素をコードする異種ポリヌクレオチドおよび/または*KivD*酵素をコードする異種ポリヌクレオチドをさらに含む。

40

【0021】

いくつかの実施形態では、宿主細胞はロイシンからイソペントノールを産生し得る。いくつかの実施形態では、配列番号27の配列を含むコントロール*LeuD*酵素をコードする異種ポリヌクレオチド、配列番号29の配列を含むコントロール*KivD*酵素をコードする異種ポリヌクレオチド、配列番号31の配列を含むコントロール*Adh*酵素をコードする異種ポリヌクレオチド、および配列番号35の配列を含むコントロール*BnnQ*をコードする異種ポリヌクレオチドを含むコントロール宿主細胞と比較して、宿主細胞は2倍以上のロイシンを消費する。

40

【0022】

本開示のさらなる態様は、本願に開示される任意の宿主細胞を培養する工程を含む、方法に関する。

【0023】

本開示のさらなる態様は、本願に開示される任意の宿主細胞を培養する工程を含む、ロイシンからイソペントノールを産生する方法に関する。

50

【0024】

本開示のさらなる態様は、配列番号1、3、5、7、9、および11から選択される核酸配列に対して少なくとも90%同一である配列を含む非天然核酸に関する。

50

【 0 0 2 5 】

本開示のさらなる態様は、配列番号 1 3、1 5、および 1 7 から選択される核酸配列に対して少なくとも 9 0 % 同一である配列を含む非天然核酸に関する。

【 0 0 2 6 】

本開示のさらなる態様は、配列番号 1 9、2 1、および 2 3 から選択される核酸配列に対して少なくとも 9 0 % 同一である配列を含む非天然核酸に関する。

【 0 0 2 7 】

本開示のさらなる態様は、配列番号 2、4、6、8、1 0、および 1 2 から選択される配列に対して少なくとも 9 0 % 同一な配列をコードする非天然核酸に関する。

【 0 0 2 8 】

本開示のさらなる態様は、配列番号 1 4、1 6、および 1 8 から選択される配列に対して少なくとも 9 0 % 同一な配列をコードする非天然核酸に関する。

【 0 0 2 9 】

本開示のさらなる態様は、配列番号 2 0、2 2、および 2 4 から選択される配列に対して少なくとも 9 0 % 同一な配列をコードする非天然核酸に関する。

【 0 0 3 0 】

本開示のさらなる態様は、本願に開示される任意の非天然核酸を含むベクターに関する。

【 0 0 3 1 】

本開示のさらなる態様は、本願に開示される任意の非天然核酸を含む発現カセットに関する。

【 0 0 3 2 】

本発明の各限定事項には、本発明の様々な実施形態を包含し得る。したがって、任意の 1 の要素または要素の組み合わせに関連する本発明の各限定事項は、本発明の各態様の中に含まれ得るものと予想される。本発明は、以下の記載または図の説明に記載される構成の詳細および要素の配置にその応用が限定されるものではない。本発明はその他の実施形態が可能であり、および様々な方法で実施または実行されることが可能である。

【 図面の簡単な説明 】**【 0 0 3 3 】****図面の簡単な説明**

添付の図面は、縮尺通りに描かれている事を意図していない。図面において、様々な図に図示されている同一またはほとんど同一の各構成要素は同じ数字で表される。明確さのために、すべての図面にすべての構成要素が表示されていない場合がある。図面において、以下を参照する。

【 0 0 3 4 】

【図 1 - 1】図 1 A - 1 C は配列類似性ネットワークを示す。個々の点は配列データベースから取得可能な单一のアミノ酸配列を示す。アミノ酸配列がより密接に相関しているほど、互いの点が接近する。個々の配列類似性ネットワークは、酵素のアノテーションまたはソースに関する情報を持つ対応するクラスターキーを有する。図 1 A はロイシンデヒドロゲナーゼ (L e u D H) についての配列類似性ネットワークを示す。このクラスターキーは酵素のアノテーションを示す。

【 0 0 3 5 】

【図 1 - 2】図 1 B はケトイソバレートデカルボキシラーゼ (K i v D) についての配列類似性ネットワークを示す。各点のアノテーションは、その酵素が由来する系統学的クレードを示す

【 0 0 3 6 】

【図 1 - 3】図 1 C はアルコールデヒドロゲナーゼ (A d h) についての配列類似性ネットワークを示す。各点のアノテーションは、その酵素が由来する系統学的クレードを示す。

【 0 0 3 7 】

10

20

30

40

50

【図2】図2 LeuDH酵素のスクリーニングから得られたデータを示すグラフである。220のLeuDH酵素を生物学的複製($n=4$)でスクリーニングし、酵素活性およびその順位を検証した。活性はB. cereusのLeuDH活性との相対値で報告される。

【0038】

【図3】図3はLeuDH酵素の活性および特異性の比較から得られたデータを示すグラフである。上位200のLeuDH酵素を、Leu、Val、およびIleに対する活性についてスクリーニングした。LeuDH酵素のLeuに対する活性は、B. cereusのLeuDH酵素の活性に対する相対値として報告される。特異性は、Val/Leuと比較した、Leuに対する活性の比として測定される。左側のパネルでは、Leuに対する酵素活性は、Leu/Val特異性との比較として示された。右側のパネルでは、酵素活性は、Leu/Ile特異性との比較として示された。合理的に操作された活性部位変異体を塗りつぶされない円で示した。元となったLeuDH酵素を塗りつぶされた実線の円で示した。ネガティブコントロールおよびポジティブコントロールのB. cereusのLeuDHについても示した。

【0039】

【図4】図4はLeuDH酵素について特異性の比較から得られたデータを示す。上位200のLeuDH酵素を、Leu、Val、およびIleに対する活性についてスクリーニングした。特異性はVal/Leuと比較した、Leuに対する活性の比として測定される。合理的に操作された活性部位変異体を塗りつぶされない円として示した。元となったLeuDH酵素を塗りつぶされた円で示した。ネガティブコントロールおよびポジティブコントロールのB. cereusのLeuDHを示した。

【0040】

【図5】図5は、KivD酵素のスクリーニングから得られたデータを示すグラフである。55種類のKivD酵素を生物学的複製($n=4$)で活性についてスクリーニングした。活性は、外因的に発現されたS. aureusのkivDを含む溶解液の活性に対して相対的に示された(S. aureusのkivD酵素の活性は、測定可能な溶解液のバックグラウンド活性と区別不能であったため、バックグラウンドと同等視した。)

【0041】

【図6】図6はAdh酵素のスクリーニングから得られたデータを示す。55種類のAdh酵素を生物学的複製($n=4$)でスクリーニングした。活性は、外因的に発現されるS. cerevisiaeのADH2を含む溶解液の活性に対して相対的に示された(S. cerevisiaeのADH2活性は、測定可能な溶解液のバックグラウンド活性と区別不能であったため、バックグラウンドと同等視した)。

【0042】

【図7】図7はLeuDH酵素の選択性のデータを示す。計21種類の候補LeuDH酵素を試験した。棒グラフの各セットは、左から右へ、消費されたLeu、消費されたIle、および消費されたValを示す。

【0043】

【図8】図8はLeu消費上位の株(5941、5942、および5943)および試作株(1980)間の経時的なLeu消費率の比較を示す。最小培地に8mMのロイシンを添加し、および嫌気培養後0、2、および4時間の時点サンプルを採取した。

【0044】

【図9】図9はロイシンをイソペンタノールに変換するMSUD経路を示したものである。

【0045】

【図10】図10は、Amb15生体反応器($n=2$)中でアッセイした、株5941のイソペンタノール経路中間体の細胞外プロファイルを示す。エラーバーは2連の生体反応間の標準偏差を反映する。「合計」に対応するデータは、示された中間体の濃度の総計を表す。Leu=ロイシン、酸=2-オキソイソカブロエート、アルデヒド=イソバレル

10

20

30

40

50

アルデヒド、アルコール＝イソペントノール。

【発明を実施するための形態】

【0046】

発明の詳細な説明

本開示は、いくつかの態様において、ロイシン消費のために操作した分岐鎖アミノ酸（BCAA）経路の細胞および酵素の組み合わせを提供する。これらのBCAA経路の酵素には、ロイシンデヒドロゲナーゼ（LeuDH）、ケトイソバレートデカルボキシラーゼ（KivD）、およびアルコールデヒドロゲナーゼ（Adh）を含む。このような酵素を含む開示された酵素および宿主細胞は、例えば、メープルシロップ尿症（MSUD）等のBCAA（例えばロイシン）の蓄積に関連する疾患を患う対象において、並びにその他の医療および工業的な環境において、ロイシン消費を促進するために使用され得る。

10

【0047】

ロイシンデヒドロゲナーゼ（LeuDH）

本開示で使用する場合、「ロイシンデヒドロゲナーゼ（LeuDH）」とは、分岐鎖-L-アミノ酸（例えば、L-ロイシン、L-バリン、L-イソロイシン）から、それらの2-オキソアナログへの可逆的な脱アミノ化を触媒する酵素を意味する。LeuDH酵素はL-ロイシンを基質として使用し得る。いくつかの実施形態では、LeuDHは、L-バリンおよび/またはL-イソロイシンと比較してL-ロイシンに対して特異性を示す。いくつかの実施形態では、LeuDHはL-ロイシンからケトイソカブロエート（2-オキソイソカブロエートとしても知られる）を産生する。

20

【0048】

いくつかの実施形態では、宿主細胞は、LeuDH酵素、およびこの酵素をコードする異種ポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、配列番号2、4、6、8、10、12、もしくは257-475のいずれか1つ、表3もしくは表4に記載のLeuDH酵素、またはその他の本開示に記載のLeuDH酵素、に対して少なくとも80%（例えば、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%）同一なアミノ酸配列を含むLeuDH酵素をコードする異種ポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、配列番号1、3、5、7、9、11、または37-255のいずれか1つ、または表3もしくは表4に記載のLeuDH酵素、またはその他の本開示に記載のLeuDH酵素をコードするポリヌクレオチド、に対して少なくとも90%（例えば、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%）同一な異種ポリヌクレオチドを含む。

30

【0049】

いくつかの実施形態では、宿主細胞は、Bacillus cereusに由来するLeuDHを含む。その他の実施形態では、宿主細胞はBacillus cereusに由来するLeuDHを含まない。

40

【0050】

Bacillus cereusに由来するLeuDHは以下のUniProtKB-POA392（配列番号27）のアミノ酸配列を含み得る：

M T L E I F E Y L E K Y D Y E Q V V F C Q D K E S G L K A I I A I H D T T L G P
A L G G T R M W T Y D S E E A A I E D A L R L A K G M T Y K N A A A G L N L G G
A K T V I I G D P R K D K S E A M F R A L G R Y I Q G L N G R Y I T A E D V G T
T V D D M D I I H E E T D F V T G I S P S F G S S G N P S P V T A Y G V Y R G M
K A A A K E A F G T D N L E G K V I A V Q G V G N V A Y H L C K H L H A E G A K
L I V T D I N K E A V Q R A V E E F G A S A V E P N E I Y G V E C D I Y A P C A
L G A T V N D E T I P Q L K A K V I A G S A N N Q L K E D R H G D I I H E M G I

50

V Y A P D Y V I N A G G V I N V A D E L Y G Y N R E R A L K R V E S I Y D T I A
K V I E I S K R D G I A T Y V A A D R L A E E R I A S L K N S R S T Y L R N G H
D I I S R R (配列番号 27)

【0051】

いくつかの実施形態では、配列番号27のアミノ酸配列は、以下の核酸配列によってコードされる：

ATGACCCCTTGAGATTGGAAATACCTCGAAAAATATGATT
ATGAGCAGGTCTGTTCTGTCAAGACAAAGGAATCAGGACT
GAAAGCGATCATTGCTATCCATGATACTACACTGGGGCCA
GCCTTAGGTGGCACCCGTATGTGGACGTACGACTCGGAAAG
AAGCGGCCAATTGAGGGATGCCCTTGAGGTTAGCTAAGGGCAT
GACGTATAAAAACGCGGCAGCCGGTTGAATCTGGGCGGT
GCGAAAACCGTGAATTATCGGGGATCCCCGCAAAGACAAAT
CTGAAGCAATGTTCGGGCGCTGGGCCGATACATACAGGG
ACTAAATGGTCGCTATATCACCGCTGAAGATGTAGGAAC
ACCGTGGATGATATGGACATAATTACAGAAGAACGGACT
TCGTCACGGGCATTAGCCCTAGTTTGGTAGCTCCGGGAA
CCCGTCTCCGGTTACCGCCTATGGCGTGTACCGTGGCATG
AAGGCAGCAGCGAAAGAGGCCCTTGGTACAGACAAACCTGG
AGGGGAAAGTGATCGCGGTTCAAGGGTAGGTAATGTGGC
GTATCATCTGTGCAAACACTTACATGCCGAGGGCGCCAAG
CTGATTGTCACGGATATCAAACAAGAAGCGGTACAGCGTG
CAGTCGAAGAATTGGCGCTTCCGCCGTTGAGGCCGAATGA
AATCTACGGCGTGGAAATGCGATATTACGCGCCGTGCT
CTTGGTGCAGACTCAACGATGAAACGATCCCTCAGCTGA
AAGCAAAGGTAATTGGGGTTCGGCTAATAACCAAGTTAAA
AGAAGACAGACATGGAGACATAATTACAGAGATGGGTATT
GTTTATGCACCAAGATTATGTAATCAATGCGGGCGGCGTTA
TTAACGTCGCAGATGAACTGTATGGCTACAAACCGCGAACG
CGCCCTCAAACGTTGGAGTCAATTATGACACCATTGCC
AAAGTGATCGAAATCAGCAAGCGCGATGGAATCGCCACTT
ATGTTGGCTGCCGATCGTCTGGCGGAAGAACGCATTGCAAG
TCTCAAAAATAGCCGTTCCACCTACCTTCGCAATGGCCAT
GATATTATAAGTCGGCGTTGA (配列番号28)

【0052】

いくつかの実施形態では、LeuDH酵素をコードする異種ポリヌクレオチドを発現する宿主細胞は、ロイシンからケトイソカブロエートへの変換を、コントロールと比較して、0.5倍、1倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、5.5倍、または6倍以上（例えば、2倍から6倍以上）増加させ得る。いくつかの実施形態では、コントロールは配列番号27をコードする異種ポリヌクレオチドを発現する宿主細胞である。いくつかの実施形態では、コントロールは、米国特許出願公開第20170232043号に記載されるような、E.coli Nissle株SYN1980 leuE、ilvC、lacZ:tetr-Ptet-livKHMGF、tetR-Ptet-leuDH(Bc)-kivD-adh2-brnQ-rrnB-ter(pSC101)である。

【0053】

いくつかの実施形態では、LeuDH酵素をコードする異種ポリヌクレオチドを発現する宿主細胞は、バリンに比して少なくとも0.5倍、1倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、5.5倍、または6倍以上（例えば、2倍から6倍以上）、ロイシンに対する活性を示し得る。いくつかの実施形態では、LeuDH酵

10

20

30

40

50

素をコードする異種ポリヌクレオチドを発現する宿主細胞は、イソロイシンに比して、少なくとも 0.5 倍、1 倍、1.5 倍、2 倍、2.5 倍、3 倍、3.5 倍、4 倍、4.5 倍、5 倍、5.5 倍、または 6 倍以上（例えば、2 倍から 6 倍以上）、ロイシンに対する活性を示し得る。

【 0 0 5 4 】

いくつかの実施形態では、LeuDH は、配列番号 27、配列番号 2、4、6、8、10、12 もしくは 257-475 のいずれか 1 つ、配列番号 1、3、5、7、9、11 もしくは 37-255 のいずれか 1 つ、または表 3 もしくは表 4 に記載の LeuDH 酵素、またはその他の本開示に記載の LeuDH 酵素のアミノ酸もしくはポリヌクレオチド配列、に対して少なくとも 5%、少なくとも 10%、少なくとも 15%、少なくとも 20%、少なくとも 25%、少なくとも 30%、少なくとも 35%、少なくとも 40%、少なくとも 45%、少なくとも 50%、少なくとも 55%、少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 71%、少なくとも 72%、少なくとも 73%、少なくとも 74%、少なくとも 75%、少なくとも 76%、少なくとも 77%、少なくとも 78%、少なくとも 79%、少なくとも 80%、少なくとも 81%、少なくとも 82%、少なくとも 83%、少なくとも 84%、少なくとも 85%、少なくとも 86%、少なくとも 87%、少なくとも 88%、少なくとも 89%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% 同一な配列を含む。10

【 0 0 5 5 】

いくつかの実施形態では、このような LeuDH 酵素は以下：配列番号 27 の残基 13 に対応する残基における V；配列番号 27 の残基 16 に対応する残基における W；配列番号 27 の残基 42 に対応する残基における Q；配列番号 27 の残基 43 に対応する残基における T、Y、F、E、または W；配列番号 27 の残基 44 に対応する残基における I、H、K、または Y；配列番号 27 の残基 67 に対応する残基における T、E、A、S、または K；配列番号 27 の残基 71 に対応する残基における K；配列番号 27 の残基 73 に対応する残基における S；配列番号 27 の残基 76 に対応する残基における R、H、Y、S、K、または W；配列番号 27 の残基 92 に対応する残基における Y；配列番号 27 の残基 93 に対応する残基における H；配列番号 27 の残基 95 に対応する残基における G；配列番号 27 の残基 100 に対応する残基における G；配列番号 27 の残基 105 に対応する残基における C；配列番号 27 の残基 111 に対応する残基における G；配列番号 27 の残基 113 に対応する残基における M；配列番号 27 の残基 115 に対応する残基における N、または V；配列番号 27 の残基 116 に対応する残基における R、N、または W；配列番号 27 の残基 120 に対応する残基における A；配列番号 27 の残基 122 に対応する残基における D；配列番号 27 の残基 136 に対応する残基における E；配列番号 27 の残基 140 に対応する残基における D；配列番号 27 の残基 141 に対応する残基における M；配列番号 27 の残基 160 に対応する残基における S；配列番号 27 の残基 185 に対応する残基における F；配列番号 27 の残基 196 に対応する残基における N；配列番号 27 の残基 228 に対応する残基における Y；配列番号 27 の残基 248 に対応する残基における M；配列番号 27 の残基 256 に対応する残基における C；配列番号 27 の残基 293 に対応する残基における Q または C；配列番号 27 の残基 296 に対応する残基における K または N；配列番号 27 の残基 297 に対応する残基における R、Q、または K；配列番号 27 の残基 300 に対応する残基における C または D；配列番号 27 の残基 302 に対応する残基における T または S；配列番号 27 の残基 305 に対応する残基における C；配列番号 27 の残基 319 に対応する残基における F；および/または配列番号 27 の残基 330 に対応する残基における M、を含む。30

【 0 0 5 6 】

いくつかの実施形態では、LeuDH 酵素は以下：配列番号 27 の残基 13 に対応する残基における V；配列番号 27 の残基 16 に対応する残基における W；配列番号 27 の残基40

10

20

30

40

50

基 4 2 に対応する残基における Q ; 配列番号 2 7 の残基 4 3 に対応する残基における T、Y、F、E、または W ; 配列番号 2 7 の残基 4 4 に対応する残基における I、H、K、または Y ; 配列番号 2 7 の残基 6 7 に対応する残基における T、E、A、S、または K ; 配列番号 2 7 の残基 7 1 に対応する残基における K ; 配列番号 2 7 の残基 7 3 に対応する残基における S ; 配列番号 2 7 の残基 7 6 に対応する残基における R、H、Y、S、K、または W ; 配列番号 2 7 の残基 9 2 に対応する残基における Y ; 配列番号 2 7 の残基 9 3 に対応する残基における H ; 配列番号 2 7 の残基 9 5 に対応する残基における G ; 配列番号 2 7 の残基 1 0 0 に対応する残基における G ; 配列番号 2 7 の残基 1 0 5 に対応する残基における C ; 配列番号 2 7 の残基 1 1 1 に対応する残基における G ; 配列番号 2 7 の残基 1 1 3 に対応する残基における M ; 配列番号 2 7 の残基 1 1 5 に対応する残基における N 10 、または V ; 配列番号 2 7 の残基 1 1 6 に対応する残基における R、N、または W ; 配列番号 2 7 の残基 1 2 0 に対応する残基における A ; 配列番号 2 7 の残基 1 2 2 に対応する残基における D ; 配列番号 2 7 の残基 1 3 6 に対応する残基における E ; 配列番号 2 7 の残基 1 4 0 に対応する残基における D ; 配列番号 2 7 の残基 1 4 1 に対応する残基における M ; 配列番号 2 7 の残基 1 6 0 に対応する残基における S ; 配列番号 2 7 の残基 1 8 5 20 に対応する残基における F ; 配列番号 2 7 の残基 1 9 6 に対応する残基における N ; 配列番号 2 7 の残基 2 2 8 に対応する残基における Y ; 配列番号 2 7 の残基 2 4 8 に対応する残基における M ; 配列番号 2 7 の残基 2 5 6 に対応する残基における C ; 配列番号 2 7 の残基 2 9 3 に対応する残基における Q または C ; 配列番号 2 7 の残基 2 9 6 に対応する残基における K または N ; 配列番号 2 7 の残基 2 9 7 に対応する残基における R、Q、または K ; 配列番号 2 7 の残基 3 0 0 に対応する残基における C または D ; 配列番号 2 7 の残基 3 0 2 30 に対応する残基における T または S ; 配列番号 2 7 の残基 3 0 5 に対応する残基における C ; 配列番号 2 7 の残基 3 1 9 に対応する残基における F ; および配列番号 2 7 の残基 3 3 0 に対応する残基における M 、を含む。

【 0 0 5 7 】

いくつかの実施形態では、LeuDH 酵素は、配列番号 2 7 、配列番号 2 、 4 、 6 、 8 、 1 0 、 1 2 、もしくは 2 5 7 - 4 7 5 のいずれか 1 つ、表 3 もしくは表 4 に記載の LeuDH 酵素、またはその他の本開示に記載の LeuDH 酵素、と比較して、少なくとも 1 、少なくとも 2 、少なくとも 3 、少なくとも 4 、少なくとも 5 、少なくとも 6 、少なくとも 7 、少なくとも 8 、少なくとも 9 、少なくとも 1 0 、少なくとも 1 1 、少なくとも 1 2 、少なくとも 1 3 、少なくとも 1 5 、少なくとも 1 6 、少なくとも 1 7 、少なくとも 1 8 、少なくとも 1 9 、少なくとも 2 0 、少なくとも 2 1 、少なくとも 2 2 、少なくとも 2 3 、少なくとも 2 4 、少なくとも 2 5 、少なくとも 2 6 、少なくとも 2 7 、少なくとも 2 8 、少なくとも 2 9 、少なくとも 3 0 、少なくとも 3 1 、少なくとも 3 2 、少なくとも 3 3 、少なくとも 3 4 、少なくとも 3 5 、少なくとも 3 6 、少なくとも 3 7 、少なくとも 3 8 、少なくとも 3 9 、少なくとも 4 0 、少なくとも 4 1 、少なくとも 4 2 、少なくとも 4 3 、少なくとも 4 4 、少なくとも 4 5 、少なくとも 4 6 、少なくとも 4 7 、少なくとも 4 8 、少なくとも 4 9 、少なくとも 5 0 、少なくとも 6 0 、少なくとも 7 0 、少なくとも 8 0 、少なくとも 9 0 、または少なくとも 1 0 0 アミノ酸の置換、欠失、挿入、または追加を含む。

【 0 0 5 8 】

いくつかの実施形態では、LeuDH 酵素は配列番号 2 7 と比較して 1 以上の残基におけるアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、LeuDH 酵素は配列番号 2 7 の 4 2 位に対応する残基、配列番号 2 7 の 4 3 位に対応する残基、配列番号 2 7 の 4 4 位に対応する残基、配列番号 2 7 の 6 7 位に対応する残基、配列番号 2 7 の 7 1 位に対応する残基、配列番号 2 7 の 7 6 位に対応する残基、配列番号 2 7 の 7 8 位に対応する残基、配列番号 2 7 の 1 1 3 位に対応する残基、配列番号 2 7 の 1 1 5 位に対応する残基、配列番号 2 7 の 1 1 6 位に対応する残基、配列番号 2 7 の 1 3 6 位に対応する残基、配列番号 2 7 の 2 9 3 位に対応する残基、配列番号 2 7 の 2 9 6 位に対応する残基、配列番号 2 7 の 2 9 7 位に対応する残基、および / または配列番号 2 7 の 3 0 0 位に対応する残基において 40

アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、LeuDH酵素は以下：配列番号27の42位に対応する残基におけるA、Q、またはT；配列番号27の43位に対応する残基におけるE、F、T、W、またはY；配列番号27の44位に対応する残基におけるH、I、K、またはY；配列番号27の67位に対応する残基におけるA、E、K、Q、S、またはT；配列番号27の71位に対応する残基におけるC、D、H、K、M、またはT；配列番号27の76位に対応する残基におけるE、F、H、I、K、M、R、S、T、W、またはY；配列番号27の78位に対応する残基におけるC、F、H、K、Q、V、またはY；配列番号27の113位に対応する残基におけるF、M、Q、V、W、またはY；配列番号27の115位に対応する残基におけるN、Q、S、T、またはV；配列番号27の116位に対応する残基におけるA、L、M、N、R、S、V、またはW；配列番号27の136位に対応する残基におけるE、F、L、R、S、またはY；配列番号27の293位に対応する残基におけるA、C、Q、S、またはT；配列番号27の296位に対応する残基におけるA、C、E、I、K、L、N、S、またはT；配列番号27の297位に対応する残基におけるC、D、E、F、H、K、L、M、N、Q、R、T、W、またはY；および／または配列番号27の300位に対応する残基におけるA、C、D、F、H、K、M、N、Q、R、S、T、W、またはY、を含む。
10

【0059】

いくつかの実施形態では、配列番号27と比較して、LeuDH酵素は以下のアミノ酸残基においてアミノ酸置換を含む：残基42、43、44、67、71、76、78、113、115、116、136、293、296、297および／または300。いくつかの実施形態では、LeuDH酵素は、残基42におけるA、Q、またはT；残基43におけるE、F、T、W、またはY；残基44におけるH、I、K、またはY；残基67におけるA、E、K、Q、S、またはT；残基71におけるC、D、H、K、M、またはT；残基76におけるE、F、H、I、K、M、R、S、T、W、またはY；残基78におけるC、F、H、K、Q、V、またはY；残基113におけるF、M、Q、V、W、またはY；残基115におけるN、Q、S、T、またはV；残基116におけるA、L、M、N、R、S、V、またはW；残基136におけるE、F、L、R、S、またはY；残基293におけるA、C、Q、S、またはT；残基296におけるA、C、E、I、K、L、N、S、またはT；残基297におけるC、D、E、F、H、K、L、M、N、Q、R、T、W、またはYおよび／または；残基300におけるA、C、D、F、H、K、M、N、Q、R、S、T、W、またはYを含む。
20

【0060】

ケトイソバレレートデカルボキシラーゼ(KivD)

本明細書で使用する場合、「ケトイソバレレートデカルボキシラーゼ(KivD)」とは、アミノ酸のアミノ基転移によって得られるアルファ-ケト酸のアルデヒドへの脱カルボキシル化を触媒する酵素を意味する。KivDはケトイソカブロエートを基質として使い得る。いくつかの実施形態では、KivDはケトイソカブロエートからイソバレルアルデヒドを產生する。

【0061】

いくつかの実施形態では、宿主細胞はKivD酵素および／またはこの酵素をコードする異種ポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、配列番号14、16、18、もしくは533-588のいずれか1つ、表3もしくは表5に記載のKivD酵素、またはその他の本開示に記載のKivD酵素、に対して少なくとも80%（例えば、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%）同一なアミノ酸配列を含むKivD酵素をコードする異種ポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、配列番号13、15、17もしくは477-532のいずれか1つ、または表3もしくは表5に記載のKivD酵素、またはその他の本開示に記載のKivD酵素をコードするポリヌクレオチド、に対して、少なくとも90%（例えば、
40

10

20

30

40

50

少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100%) 同一な異種ポリヌクレオチドを含む。

【0062】

いくつかの実施形態では、宿主細胞は、*Lactococcus lactis* 由来する KivD を含む。その他の実施形態では、宿主細胞は、*Lactococcus lactis* に由来する KivD を含まない。

【0063】

Lactococcus lactis に由来する KivD は以下の UniProtKB-B-Q684J7 (配列番号 29) の配列を含み得る :

MYTVG DYLLDR LHE LGIE EEIF GVP GDY NLQ FLD QII SHKD
MKWVGNANE LNASYMADGYARTKKA AAFLTTFGVGELSAV
NGLAGSYAENLPVVEIVGSPTSKVQNEGKFVHHTLADGDF
KHF MKMHEPVTAARTLLTAENATVEIDRVLSALLKERKPV
YINLPV DVAAAKAEKPSLPLKKENSTSNTSDQEILNKIQE
SLKNAKKPIVITGHEIISFGL EKT V TQF ISKTKLPI TTN
FGKSSVDEALPSFLGIYNGTLSEPNLKEFVESADFILMLG
VKLTDSSTGAFTHHLNENKMISLNIDEGKIFNERIQNFD
ESLISSLLDLSEIEYKGKYIDKKQEDFVPSNALLSQDRLW
QAVENLTQSNETIVAEQGTSFFGASSIFLKS KSHFIGQPL
WGSIGYT FPA ALGSQIADKESRHL LFIGDGSLQLTVQELG
LAIREKINPICFIINNDGYTVEREIHGPNQSYNDIPMWNY
SKLPESFGATEDRVVS KIVRTENEFVSVVMKEAQADPNRMY
WIELILAKEGAPKV LKKMGKLFAEQNK S (配列番号 29)

【0064】

いくつかの実施形態では、配列番号 29 のアミノ酸配列は、以下の核酸配列によってコードされる :

ATGTACACAGTCGGTGATTATCTTTAGACCGACTGCACG
AACTCGGAATCGAGGAAATT TTTGGCGTGC CCGGGGATT
TAAC TTGCAGTTCTGGACCAAATAATT TCCCATAAGGAT
ATGAAATGGGTAGGC AATGCTAACGA ACTGAATGCGTCTT
ACATGGCCGATGGTTATGCACGGACCAAAAAAGCGGCAGC
CTTCTGACGACTTTGGCGTTGGT GAGTTAACGCGCGGTG
AACGGCCTGGCGGGGTCATACGCCGAAAATCTACCAAGTTG
TCGAAATCGTGGCTCGCCGACCGAGCAAAGTTCAAGAACGA
GGGTAAGTTGTGCATCACACCCCTTGCTGACGGAGATT
AAACATTTCATGAAAATGCACGAACCTGTAACGGCAGCGC
GCACACTGTTGACTGCGGAGAACGCCACCGTCGAAATTGA
TCGCGTCCCTGAGTGCTCTCTGAAGGAACGTA AACCGGTG
TATATCAATCTCCGGTTGACGTGGCGGGCAGCTAAAGCCG
AAAAAACCGAGTTGCCCTTAAAGAAAAGAGAAATAGCACGTC
TAACACGTCTGACCAAGAAATTCTGAACAAATTCAAGGAA
TCCCTCAAAAATGCGAAAAAACCTATCGTCATCACCGGT
ATGAAATAATTTCATTGGACTGGAGAAAACCGTTACACA
GTTCATCTCAAAGACGAAACTGCCAATTACCAACCGTAAAT
TTTGGCAAATCGTCCGTAGACGAAGGCCCTGCCGAGCTTCT
TGGGGATCTATAACGGCACTTTAAGCGAACCGAAATTAAA
GGAATTGTGGAGAGCGGCCGATTTCATTCTCATGCTGGT
GTTAAGCTGACAGATTCCAGTACGGGGCGCTTCACTCATC
ACCTGAACGAGAACAAAATGATCTCGTTGAACATATTGATGA

10

20

30

40

50

A G G A A A A A T A T T T A A T G A A C G T A T T C A A A A C T T C G A T T T
 G A A T C G C T G A T T T C T T C C C T A C T G G A C C T C A G C G A G A T C G
 A A T A C A A A G G T A A A T A T T G A T A A A A A C A G G A A G A C T T
 T G T G C C G A G T A A C G C A C T G T T G T C T C A G G A T C G C C T G T G G
 C A A G C T G T G G A A A A T C T G A C C C A G A G T A A C G A A A C G A T T G
 T C G C G G A A C A G G G G A C C T C T T C T T G G T G C T T C G T C A A T
 C T T T T T A A A G T C A A A A T C A C A T T T A T T G G C C A A C C A C T T
 T G G G G T A G T A T C G G C T A C A C T T C C C T G C G G C A C T G G G T A
 G T C A G A T T G C C G A T A A A G A G T C G C G T C A C C T T T G T T A T
 T G G G G A T G G C T C G C T A C A A T T G A C C G T T C A G G A G T T A G G T
 C T T G C T A T A C G C G A A A A A T C A A T C C G A T C T G T T T C A T T A
 T C A A T A A T G A C G G C T A T A C C G T G G A G C G C G A A A T C C A T G G
 T C C G A A T C A G A G C T A T A A C G A T A T A C C G A T G T G G A A T T A C
 A G C A A A C T C C C C G A G A G C T T T G G C G C A A C A G A A G A T A G G G
 T T G T C T C C A A G A T C G T G C G T A C G G A A A A C G A A T T T G T A A G
 T G T A A T G A A A G A A G C G C A A G C G G A C C C T A A T C G A A T G T A C
 T G G A T T G A A C T T A T T C T G G C A A A A G A A G G G G C C C T A A A G
 T C C T C A A G A A A A T G G G G A A G T T G T T C G C C G A A C A A A A C A A
 A A G C T G A (配列番号 30)

【0065】

いくつかの実施形態では、K i v D 酵素をコードする異種ポリヌクレオチドを発現する宿主細胞は、ケトイソカプロエートからイソバレルアルデヒドへの変換を、コントロールと比較して 0 . 5 倍、 1 倍、 1 . 5 倍、 2 倍、 2 . 5 倍、 3 倍、 3 . 5 倍、 4 倍、 4 . 5 倍、 5 倍、 5 . 5 倍、または 6 倍以上（例えば、 2 倍から 6 倍以上）増加させ得る。いくつかの実施形態では、コントロールは、配列番号 29 をコードする異種ポリヌクレオチドを発現する宿主細胞である。いくつかの実施形態では、コントロールは、米国出願公開第 20170232043 号に記載されるよう、 E . c o l i N i s s l e 株 S Y N 1980 leuE 、 i l v C 、 l a c Z : t e t R - P t e t - l i v K H M G F 、 t e t R - P t e t - l e u D H (B c) - k i v D - a d h 2 - b r n Q - r r n B t e r (p S C 101) である。

【0066】

いくつかの実施形態では、K i v D 酵素は、配列番号 29 、配列番号 14 、 16 、 18 、もしくは 533-588 のいずれか 1 つ、配列番号 13 、 15 、 17 、もしくは 477-532 の何れか 1 つ、または表 3 もしくは表 5 に記載の K i v D 酵素、またはその他の本開示に記載の K i v D 酵素をコードするアミノ酸またはポリヌクレオチド配列、に対して少なくとも 5 % 、少なくとも 10 % 、少なくとも 15 % 、少なくとも 20 % 、少なくとも 25 % 、少なくとも 30 % 、少なくとも 35 % 、少なくとも 40 % 、少なくとも 45 % 、少なくとも 50 % 、少なくとも 55 % 、少なくとも 60 % 、少なくとも 65 % 、少なくとも 70 % 、少なくとも 71 % 、少なくとも 72 % 、少なくとも 73 % 、少なくとも 74 % 、少なくとも 75 % 、少なくとも 76 % 、少なくとも 77 % 、少なくとも 78 % 、少なくとも 79 % 、少なくとも 80 % 、少なくとも 81 % 、少なくとも 82 % 、少なくとも 83 % 、少なくとも 84 % 、少なくとも 85 % 、少なくとも 86 % 、少なくとも 87 % 、少なくとも 88 % 、少なくとも 89 % 、少なくとも 90 % 、少なくとも 91 % 、少なくとも 92 % 、少なくとも 93 % 、少なくとも 94 % 、少なくとも 95 % 、少なくとも 96 % 、少なくとも 97 % 、少なくとも 98 % 、少なくとも 99 % 、または 100 % 同一である配列を含む。

【0067】

いくつかの実施形態では、K i v D 酵素は、配列番号 29 、配列番号 14 、 16 、 18 、もしくは 533-588 のいずれか 1 つ、表 3 もしくは表 5 に記載の K i v D 酵素、またはその他の本開示に記載の K i v D 酵素、と比較して少なくとも 1 、少なくとも 2 、少

10

20

30

40

50

なくとも 3、少なくとも 4、少なくとも 5、少なくとも 6、少なくとも 7、少なくとも 8、少なくとも 9、少なくとも 10、少なくとも 11、少なくとも 12、少なくとも 13、少なくとも、少なくとも 15、少なくとも 16、少なくとも 17、少なくとも 18、少なくとも 19、少なくとも 20、少なくとも 21、少なくとも 22、少なくとも 23、少なくとも 24、少なくとも 25、少なくとも 26、少なくとも 27、少なくとも 28、少なくとも 29、少なくとも 30、少なくとも 31、少なくとも 32、少なくとも 33、少なくとも 34、少なくとも 35、少なくとも 36、少なくとも 37、少なくとも 38、少なくとも 39、少なくとも 40、少なくとも 41、少なくとも 42、少なくとも 43、少なくとも 44、少なくとも 45、少なくとも 46、少なくとも 47、少なくとも 48、少なくとも 49、少なくとも 50、少なくとも 60、少なくとも 70、少なくとも 80、少なくとも 90、または少なくとも 100 アミノ酸の置換、欠失、挿入、または追加を含む。
10

【 0 0 6 8 】

いくつかの実施形態では、K i v D 酵素は以下：配列番号 2 9 の残基 3 3 に対応する残基における Y；配列番号 2 9 の残基 4 4 に対応する残基における Q；配列番号 2 9 の残基 1 1 7 に対応する残基における M；配列番号 2 9 の残基 1 2 9 に対応する残基における I；配列番号 2 9 の残基 1 8 5 に対応する残基における W；配列番号 2 9 の残基 1 9 0 に対応する残基における I；配列番号 2 9 の残基 2 2 5 に対応する残基における I；配列番号 2 9 の残基 2 2 7 に対応する残基における Y；配列番号 2 9 の残基 3 1 1 に対応する残基における L；配列番号 2 9 の残基 3 1 2 に対応する残基における G；配列番号 2 9 の残基 3 1 3 に対応する残基における T；配列番号 2 9 の残基 3 2 8 に対応する残基における P；配列番号 2 9 の残基 3 4 1 に対応する残基における W；配列番号 2 9 の残基 3 4 5 に対応する残基における H；配列番号 2 9 の残基 3 4 7 に対応する残基における C；配列番号 2 9 の残基 4 2 0 に対応する残基における R；配列番号 2 9 の残基 4 9 4 に対応する残基における D；配列番号 2 9 の残基 5 0 8 に対応する残基における C；および / または配列番号 2 9 の残基 5 5 0 に対応する残基における F、を含む。
20

【 0 0 6 9 】

いくつかの実施形態では、K i v D 酵素は以下：配列番号 2 9 の残基 3 3 に対応する残基における Y；配列番号 2 9 の残基 4 4 に対応する残基における Q；配列番号 2 9 の残基 1 1 7 に対応する残基における M；配列番号 2 9 の残基 1 2 9 に対応する残基における I；配列番号 2 9 の残基 1 8 5 に対応する残基における W；配列番号 2 9 の残基 1 9 0 に対応する残基における I；配列番号 2 9 の残基 2 2 5 に対応する残基における I；配列番号 2 9 の残基 2 2 7 に対応する残基における Y；配列番号 2 9 の残基 3 1 1 に対応する残基における L；配列番号 2 9 の残基 3 1 2 に対応する残基における G；配列番号 2 9 の残基 3 1 3 に対応する残基における T；配列番号 2 9 の残基 3 2 8 に対応する残基における P；配列番号 2 9 の残基 3 4 1 に対応する残基における W；配列番号 2 9 の残基 3 4 5 に対応する残基における H；配列番号 2 9 の残基 3 4 7 に対応する残基における C；配列番号 2 9 の残基 4 2 0 に対応する残基における R；配列番号 2 9 の残基 4 9 4 に対応する残基における D；配列番号 2 9 の残基 5 0 8 に対応する残基における C；および配列番号 2 9 の残基 5 5 0 に対応する残基における F、を含む。
30

【 0 0 7 0 】

アルコールデヒドロゲナーゼ A d h)

本明細書で使用される場合、「アルコールデヒドロゲナーゼ (A d h)」とは、エタノールからアセトアルデヒドへの変換を触媒する酵素を意味する。A d h はイソバレルアルデヒドを基質として使用し得る。いくつかの実施形態では、A d h はイソバレルアルデヒドからイソペンタノールを產生する。

【 0 0 7 1 】

いくつかの実施形態では、宿主細胞は A d h 酵素および / またはこの酵素をコードする異種ポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、配列番号 2 0、2 2、2 4、もしくは 6 4 5 - 7 0 0 のいずれか 1 つ、表 3 もしくは表 6 に記載の A d h 酵素、またはその他の本開示に記載の A d h 酵素、に対して、少なくとも 8 0 % (例えは、
40

少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100%) 同一なアミノ酸配列を含む Adh 酵素をコードする異種ポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、配列番号 19、21、23 もしくは 589-644 のいずれか 1 つ、または表 3 もしくは表 6 に記載の Adh 酵素、またはその他の本開示に記載の Adh 酵素をコードするポリヌクレオチド、に対して少なくとも 90% (例えば、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100%) 同一な異種ポリヌクレオチドを含む。

10

【 0072 】

いくつかの実施形態では、宿主細胞は、*Saccharomyces cerevisiae* に由来する Adh を含む、その他の実施形態では、宿主細胞は、*Saccharomyces cerevisiae* に由来する Adh を含まない。

【 0073 】

Saccharomyces cerevisiae に由来する Adh は、以下の UniProtKB-P00331 (配列番号 31) のアミノ酸配列を含み得る :

M S I P E T Q K A I I F Y E S N G K L E H K D I P V P K P K P N E L L I N V K Y
S G V C H T D L H A W H G D W P L P T K L P L V G G H E G A G V V V G M G E N V
K G W K I G D Y A G I K W L N G S C M A C E Y C E L G N E S N C P H A D L S G Y 20
T H D G S F Q E Y A T A D A V Q A A H I P Q G T D L A E V A P I L C A G I T V Y
K A L K S A N L R A G H W A A I S G A A G G L G S L A V Q Y A K A M G Y R V L G
I D G G P G K E E L F T S L G G E V F I D F T K E K D I V S A V V K A T N G G A
H G I I N V S V S E A A I E A S T R Y C R A N G T V V L V G L P A G A K C S S D
V F N H V V K S I S I V G S Y V G N R A D T R E A L D F F A R G L V K S P I K V
V G L S S L P E I Y E K M E K G Q I A G R Y V V D T S K (配列番号 31)

【 0074 】

いくつかの実施形態では、配列番号 31 のアミノ酸配列は、以下の核酸配列によってコードされる :

A T G T C G A T C C C A G A A A C T C A G A A G G C T A T T A T A T T T A T G 30
A G T C A A A C G G C A A A C T C G A A C A T A A A G A C A T T C C C G T G C C
T A A A C C G A A A C C G A A T G A A C T T C T G A T T A A C G T A A A G T A C
A G C G G A G T C T G C C A C A C G G A T T T G C A T G C C T G G C A C G G G G
A T T G G C C G T T A C C G A C C A A A C T G C C T C T G G T G G G T G G T C A
T G A G G G C G C G G G C G T T G T G G G T A T G G G A G A A A A T G T C
A A A G G C T G G A A A A T C G G C G A C T A T G C A G G G A T C A A G T G G C
T G A A C G G G T C T T G T A T G G C G T G C G A G T A C T G T G A A T T A G G
T A A T G A A T C C A A C T G C C C A C A C G C A G A T C T G A G T G G T T A T
A C C C A T G A C G G C A G C T T C C A A G A A T A C G C C A C A G C G G A T G
C C G T G C A G G C A G C T C A C A T T C C G C A A G G A A C T G A T C T T G C 40
G G A A G T A G C C C C A A T T C T G T G C G C G G G C A T C A C G G T A T A T
A A A G C T C T C A A A A G T G C A A A C T T G C G C G C C G G T C A T T G G G
C T G C G A T T T C G G G T G C C G C G G G C G G G C T G G G A T C A T T A G C
T G T T C A G T A C G C G A A G G C A A T G G G T T A T C G A G T T C T G G G C
A T C G A C G G C G G G C C C G G T A A A G A A G A G G C T A T T T A C C A G C C
T C G G C G G T G A G G T C T T C A T C G A T T T A C C A A A G A A A A A G A
T A T C G T G T C C G C A G T C G T G A A A G C A A C C A A T G G C G G C G C T
C A C G G A A T T A T A A A T G T G T C T G T A T C A G A A G C G G C A C A G T G G T
A A G G C A G C A C G C G T T A T T G T C G C G C G A A C G G C A C A G T G G T
T C T G G T A G G C C T G C C C G C C G G T G C G A A A T G T A G C T C G G A C 50

G T G T T C A A T C A T G T G G T G A A G A G T A T T T C C A T T G T T G G A T
 C T T A C G T A G G G A A C C G T G C G G A T A C G C G G G A G G C A C T G G A
 T T T T T T G C A A G G G G C T T G G T T A A A A G C C C G A T C A A A G T C
 G T G G G T C T G T C G T C T A C C T G A A A T A T A T G A G A A A A T G G
 A A A A G G G A C A G A T C G C C G G A C G C T A C G T C G T C G A C A C C T C
 A A A G T G A (配列番号 3 2)

【 0 0 7 5 】

いくつかの実施形態では、A d h 酵素をコードする異種ポリヌクレオチドを発現する宿主細胞は、イソバレルアルデヒドからイソペンタノールへの変換を、コントロールと比較して 0 . 5 倍、 1 倍、 1 . 5 倍、 2 倍、 2 . 5 倍、 3 倍、 3 . 5 倍、 4 倍、 4 . 5 倍、 5 倍、 5 . 5 倍、または 6 倍以上（例えば、 2 倍から 6 倍以上）増加させ得る。いくつかの実施形態では、コントロールは、配列番号 3 1 をコードする異種ポリヌクレオチドを発現する宿主細胞である。いくつかの実施形態では、コントロールは、配列番号 3 1 をコードする異種ポリヌクレオチドを発現する宿主細胞である。いくつかの実施形態では、コントロールは、配列番号 3 1 をコードする異種ポリヌクレオチドを発現する宿主細胞である。E . c o l i N i s s l e 株 S Y N 1 9 8 0 l e u E 、 i l v C 、 l a c Z : t e t R - P t e t - l i v K H M G F 、 t e t R - P t e t - l e u D H (B c) - k i v D - a d h 2 - b r n Q - r r n B t e r (p S C 1 0 1) である。

【 0 0 7 6 】

いくつかの実施形態では、A d h は、配列番号 3 1 、配列番号 2 0 、 2 2 、 2 4 、もしくは 6 4 5 - 7 0 0 のいずれか 1 つ、配列番号 1 9 、 2 1 、 2 3 もしくは 5 8 9 - 6 4 4 のいずれか 1 つ、または表 3 もしくは表 6 に記載の A d h 酵素、またはその他の本開示に記載の A d h 酵素、をコードするアミノ酸またはポリヌクレオチド配列、に対して少なくとも 5 % 、少なくとも 1 0 % 、少なくとも 1 5 % 、少なくとも 2 0 % 、少なくとも 2 5 % 、少なくとも 3 0 % 、少なくとも 3 5 % 、少なくとも 4 0 % 、少なくとも 4 5 % 、少なくとも 5 0 % 、少なくとも 5 5 % 、少なくとも 6 0 % 、少なくとも 6 5 % 、少なくとも 7 0 % 、少なくとも 7 1 % 、少なくとも 7 2 % 、少なくとも 7 3 % 、少なくとも 7 4 % 、少なくとも 7 5 % 、少なくとも 7 6 % 、少なくとも 7 7 % 、少なくとも 7 8 % 、少なくとも 7 9 % 、少なくとも 8 0 % 、少なくとも 8 1 % 、少なくとも 8 2 % 、少なくとも 8 3 % 、少なくとも 8 4 % 、少なくとも 8 5 % 、少なくとも 8 6 % 、少なくとも 8 7 % 、少なくとも 8 8 % 、少なくとも 8 9 % 、少なくとも 9 0 % 、少なくとも 9 1 % 、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 % 、少なくとも 9 9 % 、または 1 0 0 % 同一な配列を含む。

【 0 0 7 7 】

いくつかの実施形態では、A d h は、配列番号 3 1 、配列番号 2 0 、 2 2 、 2 4 、もしくは 6 4 5 - 7 0 0 のいずれか 1 つ、表 3 もしくは表 6 に記載の A d h 酵素、またはその他の本開示に記載の A d h 酵素、と比較して少なくとも 1 、少なくとも 2 、少なくとも 3 、少なくとも 4 、少なくとも 5 、少なくとも 6 、少なくとも 7 、少なくとも 8 、少なくとも 9 、少なくとも 1 0 、少なくとも 1 1 、少なくとも 1 2 、少なくとも 1 3 、少なくとも 1 4 、少なくとも 1 5 、少なくとも 1 6 、少なくとも 1 7 、少なくとも 1 8 、少なくとも 1 9 、少なくとも 2 0 、少なくとも 2 1 、少なくとも 2 2 、少なくとも 2 3 、少なくとも 2 4 、少なくとも 2 5 、少なくとも 2 6 、少なくとも 2 7 、少なくとも 2 8 、少なくとも 2 9 、少なくとも 3 0 、少なくとも 3 1 、少なくとも 3 2 、少なくとも 3 3 、少なくとも 3 4 、少なくとも 3 5 、少なくとも 3 6 、少なくとも 3 7 、少なくとも 3 8 、少なくとも 3 9 、少なくとも 4 0 、少なくとも 4 1 、少なくとも 4 2 、少なくとも 4 3 、少なくとも 4 4 、少なくとも 4 5 、少なくとも 4 6 、少なくとも 4 7 、少なくとも 4 8 、少なくとも 4 9 、少なくとも 5 0 、少なくとも 6 0 、少なくとも 7 0 、少なくとも 8 0 、少なくとも 9 0 、または少なくとも 1 0 0 のアミノ酸の置換、欠失、挿入、または追加を含む。

【 0 0 7 8 】

いくつかの実施形態では、A d h は以下；配列番号 3 1 の残基 9 に対応する残基における

る P ; 配列番号 3 1 の残基 1 6 に対応する残基における G ; 配列番号 3 1 の残基 2 3 に対応する残基における Q ; 配列番号 3 1 の残基 2 8 に対応する残基における R ; 配列番号 3 1 の残基 3 0 に対応する残基における A ; 配列番号 3 1 の残基 9 3 に対応する残基における K ; 配列番号 3 1 の残基 9 8 に対応する残基における L ; 配列番号 3 1 の残基 9 9 に対応する残基における R ; 配列番号 3 1 の残基 1 1 4 に対応する残基における P ; 配列番号 3 1 の残基 1 1 5 に対応する残基における K ; 配列番号 3 1 の残基 1 1 9 に対応する残基における Y ; 配列番号 3 1 の残基 1 9 4 に対応する残基における Y ; 配列番号 3 1 の残基 2 4 2 に対応する残基における P ; 配列番号 3 1 の残基 2 4 9 に対応する残基における K ; 配列番号 3 1 の残基 2 5 5 に対応する残基における E ; 配列番号 3 1 の残基 2 6 0 に対応する残基における D ; 配列番号 3 1 の残基 2 6 9 に対応する残基における H ; 配列番号 3 1 の残基 2 8 1 に対応する残基における Q ; 配列番号 3 1 の残基 3 2 5 に対応する残基における L ; 配列番号 3 1 の残基 3 3 3 に対応する残基における M ; 配列番号 3 1 の残基 3 3 4 に対応する残基における P ; および / または配列番号 3 1 の残基 3 4 8 に対応する残基における Q 、を含む。

10

【 0 0 7 9 】

いくつかの実施形態では、A d h は以下 ; 配列番号 3 1 の残基 9 に対応する残基における P ; 配列番号 3 1 の残基 1 6 に対応する残基における G ; 配列番号 3 1 の残基 2 3 に対応する残基における Q ; 配列番号 3 1 の残基 2 8 に対応する残基における R ; 配列番号 3 1 の残基 3 0 に対応する残基における A ; 配列番号 3 1 の残基 9 3 に対応する残基における K ; 配列番号 3 1 の残基 9 8 に対応する残基における L ; 配列番号 3 1 の残基 9 9 に対応する残基における R ; 配列番号 3 1 の残基 1 1 4 に対応する残基における P ; 配列番号 3 1 の残基 1 1 5 に対応する残基における K ; 配列番号 3 1 の残基 1 1 9 に対応する残基における Y ; 配列番号 3 1 の残基 1 9 4 に対応する残基における Y ; 配列番号 3 1 の残基 2 4 2 に対応する残基における P ; 配列番号 3 1 の残基 2 4 9 に対応する残基における K ; 配列番号 3 1 の残基 2 5 5 に対応する残基における E ; 配列番号 3 1 の残基 2 6 0 に対応する残基における D ; 配列番号 3 1 の残基 2 6 9 に対応する残基における H ; 配列番号 3 1 の残基 2 8 1 に対応する残基における Q ; 配列番号 3 1 の残基 3 2 5 に対応する残基における L ; 配列番号 3 1 の残基 3 3 3 に対応する残基における M ; 配列番号 3 1 の残基 3 3 4 に対応する残基における P ; および配列番号 3 1 の残基 3 4 8 に対応する残基における Q 、を含む。

20

【 0 0 8 0 】

分岐鎖アミノ酸輸送系 2 キャリアタンパク質 (B r n Q)

本明細書で使用場合、「分岐鎖アミノ酸輸送系 2 キャリアタンパク質 (B r n Q) 」とは、分岐鎖アミノ酸にかかる L I V - I I 輸送系の成分を意味する。B r n Q は分岐鎖アミノ酸、例えばロイシンを細胞、例えば宿主細胞へ輸送するために使用され得る。

30

【 0 0 8 1 】

いくつかの実施形態では、宿主細胞は B r n Q タンパク質および / またはこのタンパク質をコードする異種ポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、本願に記載の、例えば配列番号 3 5 の、B r n Q タンパク質に対して、少なくとも 8 0 % (例えば、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 1 % 、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 % 、少なくとも 9 9 % 、または 1 0 0 %) 同一なアミノ酸配列を含む B r n Q タンパク質をコードする異種ポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、B r n Q タンパク質は UniProtKB - B7MD59 に記載のアミノ酸配列を含む。UniProtKB - B7MD59 は以下のアミノ酸配列を有する :

40

M T H Q L R S R D I I A L G F M T F A L F V G A G N I I F P P M V G L Q A G E H
V W T A A F G F L I T A V G L P V L T V V A L A K V G G G V D S L S T P I G K V
A G V L L A T V C Y L A V G P L F A T P R T A T V S F E V G I A P L T G D S A L
P L F I Y S L V Y F A I V I L V S L Y P G K L L D T V G N F L A P L K I I A L V

50

I L S V A A I I W P A G S I S T A T E A Y Q N A A F S N G F V N G Y L T M D T L
 G A M V F G I V I V N A A R S R G V T E A R L L T R Y T V W A G L M A G V G L T
 L L Y L A L F R L G S D S A S L V D Q S A N G A A I L H A Y V Q H T F G G G G S
 F L L A A L I F I A C L V T A V G L T C A C A E F F A Q Y V P L S Y R T L V F I
 L G G F S M V V S N L G L S Q L I Q I S V P V L T A I Y P P C I A L V V L S F T
 R S W W H N S S R V I A P P M F I S L L F G I L D G I K A S A F S D I L P S W A
 Q R L P L A E Q G L A W L M P T V V M V V L A I I W D R A A G R Q V T S S A H
 (配列番号 35)

【 0 0 8 2 】

いくつかの実施形態では、配列番号 35 は以下の核酸配列によってコードされる：

AT G A C C C A T C A A T T A A G A T C G C G C A T A T C A T C G C T C T G G 10
 G C T T T A T G A C A T T T G C G T T G T T C G T C G G C G C A G G T A A C A T
 T A T T T T C C C T C C A A T G G T C G G C T T G C A G G C A G G C G A A C A C
 G T C T G G A C T G C G G C A T T C G G C T T C C T C A T T A C T G C C G T T G
 G C C T A C C G G T A T T A A C G G T A G T G G C G C T G G C A A A A G T T G G
 C G G C G G T G T T G A C A G T C T C A G C A C G C C A A T T G G T A A A G T C
 G C T G G C G T A C T G C T G G C A A C A G T T T G T T A C C T G G C G G T G G
 G G C C G C T T T T G C T A C G C C G C G T A C A G C T A C C G T T T C T T T
 T G A A G T G G G C A T T G C G C C G C T G A C G G G T G A T T C C G C G C T G
 C C G C T G T T T A T T T A C A G C C T G G T C T A T T T C G C T A T C G T T A 20
 T T C T G G T T T C G C T C T A T C C G G G C A A G C T G C T G G A T A C C G T
 G G G C A A C T T C C T T G C G C C G C T G A A A A T T A T C G C G C T G G T C
 A T C C T G T C T G T T G C C G C A A T T A T C T G G C C G G G T T C T A
 T C A G T A C G G C G A C T G A G G G C T T A T C A A A A C G C T G C G T T T C
 T A A C G G C T T C G T C A A C G G C T A T C T G A C C A T G G A T A C G C T G
 G G C G C A A T G G T G T T G G T A T C G T T A T T G T T A A C G C G G C G C
 G T T C T C G T G G C G T T A C C G A A G C G C G T C T G C T G A C C C G T T A
 T A C C G T C T G G G C T G G C C T G A T G G C G G G T G T T G G T C T G A C T
 C T G C T G T A C C T G G C G C T G T T C C G T C T G G G T T C A G A C A G C G
 C G T C G C T G G T C G A T C A G T C T G C A A A C G G T G C G G G C G A T C C T 30
 G C A T G C T T A C G T T C A G C A T A C C T T G G C G G C G G C G G T A G C
 T T C C T G C T G G C G G C G T T A A T C T T C A T C G C C T G C C T G G T C A
 C G G C G G T T G G C C T G A C C T G T G C T T G T G C A G A A T T C T T C G C
 C C A G T A C G T A C C G C T C T C T T A T C G T A C G C T G G T G T T T A T C
 C T C G G C G G C T T C T C G A T G G T G G T G T C T A A C C T C G G C T T G A
 G C C A G C T G A T T C A G A T C T C T G T A C C G G T G C T G A C C G C C A T
 T T A T C C G C C G T G T A T C G C A C T G G T T G T A T T A A G T T T A C A
 C G C T C A T G G T G G C A T A A T T C G T C C C G C G T G A T T G C T C C G C
 C G A T G T T T A T C A G C C T G C T T T T G G T A T T C T C G A C G G G A T 40
 C A A G G C A T C T G C A T T C A G C G A T A T C T T A C C G T C C T G G G C G
 C A G C G T T T A C C G C T G G C C G A A C A A G G T C T G G C G T G G T T A A
 T G C C A A C A G T G G T G A T G G T G G T T C T G G C C A T T A T C T G G G A
 T C G T G C G G C A G G T C G T C A G G T G A C C C T C C A G C G C T C A C T A A
 (配列番号 36)

【 0 0 8 3 】

変異体

本開示に記載の酵素およびタンパク質の変異体（例えば、LeuDH、KivD、またはAdhであり、核酸およびアミノ酸配列の変異体を含む）は本開示に包含される。変異体は、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも4

5%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも71%、少なくとも72%、少なくとも73%、少なくとも74%、少なくとも75%、少なくとも76%、少なくとも77%、少なくとも78%、少なくとも79%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%、その間の全ての数値を含めて、参照配列と配列同一性を共有する。

【0084】

10

特段の記載が無い限り、当技術分野で公知の用語「配列同一性」とは配列比較（アライメント）によって決定される、2つのポリペプチドまたはポリヌクレオチドの配列間の関係を意味する。いくつかの実施形態では、配列同一性は、配列の全長にわたって決定される（例えば、LeuDH、KivD、またはAdh配列）。いくつかの実施形態では、配列同一性は配列（例えば、LeuDH、KivD、またはAdh配列）の領域にわたって決定される（例えば、アミノ酸または核酸のストレッチ、例えば、活性部位にわたる配列）。

【0085】

20

同一性はまた、2つまたはそれ以上の残基（例えば、核酸またはアミノ酸残基）の文字列間の一致数によって決定される2つの配列間の配列関連性の程度を意味し得る。同一性は、特定の数学モデルまたはコンピュータプログラム（例えば、「アルゴリズム」）によって指定されたギャップアライメント（もしあれば）を有する2以上の配列間の一致の割合を計測する。

【0086】

30

関連するポリペプチドまたは核酸配列の同一性は、当業者に公知の何れかの方法によって容易に計算する事ができる。2つの配列（例えば、核酸またはアミノ酸配列）の“同一性パーセント”は、例えば、Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77, 1993に記載のように改変された、Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68, 1990のアルゴリズムを用いて決定され得る。このようなアルゴリズムは、Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990に記載のNB LAST（登録商標）およびXBLAST（登録商標）プログラム（バージョン2.0）に組み込まれている。BLAST（登録商標）タンパク質検索は、例えば、XBLASTプログラム、スコア=50、ワード長=3を用いて実施して、本願に記載のタンパク質に相同なアミノ酸配列を得ることができる。2つの配列の間にギャップが存在する場合、例えば、Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402, 1997に記載されている、ギャップ付き（Gapped）BLAST（登録商標）を利用することができる。BLAST（登録商標）プログラムおよびギャップ付きBLAST（登録商標）プログラムを利用すると、各プログラムのデフォルトパラメーター（例えば、XBLAST（登録商標）およびNB LAST（登録商標））を用いることができるか、またはパラメーターは、当業者によって理解されるであろうように適切に調整することができる。

【0087】

40

使用され得る他の局所的なアライメント技術は、例えば、Smith-Watermanアルゴリズム（Smith, T. F. & Waterman, M. S. (1981) "Identification of common molecular subsequences." J. Mol. Biol. 147:195-197）に基づく。使用され得る一般的でグローバルなアライメント技術は、例えば、Needleman-Wunschアルゴリズム（Needleman, S. B. & Wunsch, C. D. (1970

50

) "A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequences of two proteins." J. Mol. Biol. 48 : 443 - 453) であり、それは動的プログラミングに基づいている。

【0088】

より最近では、Needleman-Wunschアルゴリズムを含む他の最適なグローバルアライメント法よりも高速に核酸およびアミノ酸配列のグローバルアライメントを生成すると称される、高速最適グローバル配列決定アライメントアルゴリズム (FOGSAA) が開発された。いくつかの実施形態では、2つのポリペプチドの同一性は、2つのアミノ酸配列をアライメントし、同一アミノ酸の数を計算し、および1つのアミノ酸配列の長さで除算することによって決定される。いくつかの実施形態では、2つの核酸配列の同一性は、2つの核酸配列をアライメントし、および同一ヌクレオチドの数を計算し、および一方の核酸配列の長さで除算することによって決定される。

【0089】

複数配列のアライメントについて、Clustal Omega (Sievers et al., Mol Syst Biol. 2011 Oct 11; 7: 539) を含むコンピュータプログラムが使用され得る。

【0090】

好ましい実施形態では、配列同一性がKarin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873 - 77, 1993に記載のように改変された、Karin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264 - 68, 1990、のアルゴリズム(例えば、各プログラムのデフォルトのパラメーターを用いて、BLAST(登録商標)、NBLAST(登録商標)、XBLAST(登録商標)、またはギャップ付き(Gapped)BLAST(登録商標)プログラム)を使用して決定された際に、核酸またはアミノ酸配列を含む配列は、本願に開示されるおよび/または請求項に記載される配列などの参照配列に対して特定の同一性パーセントを有する事が判明している

【0091】

いくつかの実施形態では、配列同一性がデフォルトのパラメーターを用いて、Smith-Watermannアルゴリズム(Smith, T. F. & Waterman, M. S. (1981) "Identification of common molecular subsequences." J. Mol. Biol. 147: 195 - 197)、または、Needleman-Wunschアルゴリズム(Needleman, S. B. & Wunsch, C. D. (1970) "A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequences of two proteins." J. Mol. Biol. 48: 443 - 453)を使用して決定された際に、核酸またはアミノ酸配列を含む配列は、本願に開示されるおよび/または請求項に記載される配列などの参照配列に対して特定の同一性パーセントを有する事が判明している。

【0092】

いくつかの実施形態では、配列同一性がデフォルトのパラメーターを用いて、高速最適グローバル配列決定アライメントアルゴリズム (FOGSAA) を使用して決定された際に、核酸またはアミノ酸配列を含む配列は、本願に開示されるおよび/または請求項に記載される配列などの参照配列に対して特定の同一性パーセントを有する事が判明している。

【0093】

いくつかの実施形態では、配列同一性が、デフォルトのパラメーターを用いて、Clustal Omega (Sievers et al., Mol Syst Biol. 2011 Oct 11; 7: 539) を使用して決定された際に、核酸またはアミノ酸配列を含む配列は、本願に開示されるおよび/または請求項に記載される配列などの参

10

20

30

40

50

照配列に対して特定の同一性パーセントを有する事が判明している。

【0094】

本開示で使用する場合、配列「X」中の残基（例えば核酸残基またはアミノ酸残基）は、配列XおよびYが当技術分野で公知のアミノ酸配列アライメントツール、例えばClustal OmegaまたはBLAST（登録商標）を使用してアライメントされた際に、配列「X」中の残基が配列「Y」中の「Z」に対応する位置にある場合、異なる配列「Y」中の「Z」位または残基「Z」（例えば核酸残基またはアミノ酸残基）に対応する事を意味する。

【0095】

本開示で使用される場合、変異体の配列はホモログの配列であってもよい。本開示で使用される場合、ホモログの配列は所定の同一性パーセンテージ（例えば、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも71%、少なくとも72%、少なくとも73%、少なくとも74%、少なくとも75%、少なくとも76%、少なくとも77%、少なくとも78%、少なくとも79%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の同一性パーセンテージであり、その間の全ての数値を含む）を共有する配列（例えば、核酸またはアミノ酸配列）である。ホモログの配列には、非限定的にパラログまたはオルソログの配列を含む。パラログの配列は、ある種のゲノム内で遺伝子の重複から生じ、一方オルソログの配列は種の分化の後に分岐する。

【0096】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドの変異体（例えば、LeuDH、KivD、またはAdh酵素の変異体）は参照ポリペプチド（例えば、参照LeuDH、KivD、またはAdh酵素）と二次構造（例えば、アルファヘリックス、ベータシート）を共有するドメインを含む。いくつかの実施形態では、ポリペプチドの変異体（例えば、LeuDH、KivD、またはAdh酵素の変異体）は参照ポリペプチド（例えば、参照LeuDH、KivD、またはAdh酵素）と三次構造を共有する。非限定的な例として、変異体ポリペプチド（例えば、LeuDH、KivD、またはAdh酵素の変異体）は、参照ポリペプチドと比較して、低い一次配列の同一性（例えば、80%以下、75%以下、70%以下、65%以下、60%以下、55%以下、50%以下、45%以下、40%以下、35%以下、30%以下、25%以下、20%以下、15%以下、10%以下、または5%以下の配列同一性）を有し得るが、しかし1以上の二次構造（例えば、ループ、アルファヘリックス、またはベータシートを含むがこれに限定されない）を共有するか、または参照ポリペプチドと同じ三次構造を有する。例えば、ループはベータシートおよびアルファヘリックス間、2つのアルファヘリックス間、または2つのベータシート間に位置し得る。2以上の三次構造を比較するために相同性モデリングが使用され得る。

【0097】

循環置換(circular permutation) (Yu and Lutz, Trends Biotechnol. 2011 Jan; 29(1): 18-25) を含む好適な方法を、このような変異体の製造のために用いることができる。循環置換では、ポリペプチドの線形一次配列を環化し（例えば、配列のN末端およびC末端を連結することにより）、ポリペプチドを別の位置で切断する（「切断(broken)」）し得る。したがって、新規ポリペプチドの線形一次配列は、線形配列アライメント法（例えば、Clustal OmegaまたはBLAST）により決定される、低い配列同一性（例えば、80%未満、75%未満、70%未満、65%未満、60%未満、55%未満、50%

%未満、45%未満、40%未満、35%未満、30%未満、25%未満、20%未満、15%未満、10%未満、5%以下または5%未満、その間の全ての値を含む)を有し得る。しかしながら、2つのタンパク質のトポロジー分析は、2つのポリペプチドの三次構造が類似することを明らかにし得る。特定の理論に拘束されるものではないが、参照ポリペプチドの循環置換によって作製され、参照ポリペプチドと同様の三次構造を有する変異ポリペプチドは、類似の機能特性(例えば、酵素活性、酵素動態、基質特異性または生成物特異性)を共有し得る。ある例において、循環置換は、二次構造、三次構造または四次構造を変化させ、異なる機能特性(例えば、増加または減少した酵素活性、異なる基質特異性または異なる生成物特異性)を有する酵素を生成し得る。例えば、Yu and Lutz, Trends Biotechnol. 2011 Jan; 29(1): 18-25を参照のこと。10

【0098】

循環置換されたタンパク質では、そのタンパク質のアミノ酸配列は、循環置換されていない参照タンパク質とは異なることが理解されるべきである。しかしながら、当業者であれば、例えば配列をアライメントし、保存されたモチーフを検出し、および/または例えば相同性モデリングによりタンパク質の構造または予測された構造を比較することにより、循環置換されたタンパク質中のどの残基が、循環置換されていない参照タンパク質中の残基に対応しているかを容易に決定することができる。本願に記載される変異体には、本願に記載される配列の循環置換による変異体を含む。

【0099】

いくつかの実施形態では、目的の配列と本開示に記載の参照配列間の同一性パーセンテージを決定するアルゴリズムによって、配列間の循環置換の存在が説明される。循環置換の存在は、例えば、RASPODOM (Weiner et al., Bioinformatics. 2005 Apr 1; 21(7): 932-7) を含む、任意の当技術分野で公知の方法を用いて検出され得る。いくつかの実施形態では、本願に記載の配列と目的の配列間の同一性パーセンテージを計算する前に、循環置換の存在が補正される(例えば、少なくとも1つの配列中のドメインが再配置される)。本願の請求項に係る発明は、配列の潜在的な循環置換を考慮した後に参照配列に対する同一性パーセンテージが計算される配列を包含するものと理解されるべきである。20

【0100】

本願に開示される組み換えLeuDH、KivD、またはAdh酵素の機能性変異体もまた、本開示に包含される。例えば、機能性変異体は1以上の同じ基質に結合し得るか、または以上の同じ産物を产生し得る。機能性変異体は当分野で公知の任意の方法を用いて同定される。例えば、上記に記載のKarl1nおよびAltenschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-68、1990のアルゴリズムは公知の機能を持つタンパク質のホモログを同定するために使用される。30

【0101】

推定の機能性変異体もまた、機能がアノテーションされたドメインを持つポリペプチドを調べる事によって同定される。Pfam (Sonhammer et al., Proteins. 1997 Jul; 28(3): 405-20) を含むデータベースが、特定のドメインを持つポリペプチドを同定するために使用され得る。40

【0102】

相同性モデリングもまた、機能に影響する事なく変異しやすいアミノ酸残基を同定するために使用され得る。このような方法の非限定的な例には、位置特異的スコア行列(PSM)およびエネルギー最小化プロトコルの使用が含まれ得る。

【0103】

位置特異的スコア行列(PSM)は位置重み行列を使用してコンセンサス配列(例えば、モチーフ)を同定する。PSMは核酸またはアミノ酸に対して使用し得る。配列はアライメントされ、この方法は、特定の位置における特定の残基(例えば、アミノ酸またはヌクレオチド)の観測頻度および解析された配列数を考慮する。例えば、Stormo

et al., Nucleic Acids Res. 1982 May 11; 10 (9): 2997-3011を参照のこと。所定の位置で特定の残基が観測される尤度を計算し得る。特定の理論に拘束されるものではないが、変動度の高い配列内の位置は、機能性ホモログを生成するための変異（例えば、PSSMスコア 0）を生じやすい可能性がある。

【0104】

PSSMは、Rosettaエネルギー関数の計算と対になっていてよく、これは野生型と一点変異体間の差を決定する。Rosettaエネルギー関数は、この差を、(Gcalc)として算出する。このRosetta関数では、変異した残基と周囲の原子間の結合相互作用から、変異がタンパク質の安定性を増加させるか、または減少させるかを決定する。例えば、PSSMスコア（例えば、PSSMスコア 0）から有利と判定された変異は、その後タンパク質の安定性における当該変異の潜在的な影響を決定するためにRosettaエネルギー関数を用いて解析される。特定の理論に拘束されるものではないが、潜在的に安定化する変異はタンパク質工学（例えば、機能性ホモログの生産）において望ましい。いくつかの実施形態では、潜在的に安定化する変異は、-0.1 Rosettaエネルギー単位以下（例えば、-0.2以下、-0.3以下、-0.35以下、-0.4以下、-0.45以下、-0.5以下、-0.55以下、-0.6以下、-0.65以下、-0.7以下、-0.75以下、-0.8以下、-0.85以下、-0.9以下、-0.95以下、または-1.0以下）のGcalc値を有する。例えば、Goldenzweig et al., Mol Cell. 2016 Jul 21; 63(2): 337-346. DOI: 10.1016/j.molcel.2016.06.012を参照のこと。

【0105】

いくつかの実施形態では、LeuDH、KivD、またはAdh酵素をコードする配列は、参照（例えば、LeuDH、KivD、またはAdh酵素）をコードする配列に対応する1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100または100以上の位置において変異を含む。いくつかの実施形態では、LeuDH、KivD、またはAdh酵素をコードする配列は、コード配列の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100またはそれ以上のコドンにおいて、参照（例えば、LeuDH、KivD、またはAdh酵素）をコードする配列と比較して変異を含む。当業者に理解されるように、コドン内の変異は、遺伝暗号の縮退によって、当該コドンにコードされるアミノ酸を変更する事もあり、変更しないこともある。いくつかの実施形態では、コード配列内の1以上の変異は、参照ポリペプチド（例えば、LeuDH、KivD、またはAdh酵素）のアミノ酸配列と比較して、当該コード配列（例えば、LeuDH、KivD、またはAdh酵素）のアミノ酸配列を変更しない。

【0106】

いくつかの実施形態では、組み換えLeuDH、KivD、またはAdh酵素配列内の

10

20

30

40

50

1 以上の変異は、ポリペプチド（例えば、LeuDH、KivD、またはAdh酵素）のアミノ酸配列を、参照ポリペプチド（例えば、LeuDH、KivD、またはAdh酵素）のアミノ酸配列と比較して、変更する。いくつかの実施形態では、1 以上の変異は、組み換えポリペプチド（例えば、LeuDH、KivD、またはAdh酵素）のアミノ酸配列を、参照ポリペプチド（例えば、LeuDH、KivD、またはAdh酵素）のアミノ酸配列と比較して、変更し、および参照ポリペプチドと比較して、当該ポリペプチドの活性を変化（増強または減少）させる。

【0107】

本開示に記載の任意の組み換えポリペプチド（例えば、LeuDH、KivD、またはAdh酵素）の活性（例えば、比活性）は常套の方法を用いて測定され得る。非限定的な例として、組み換えポリペプチドの活性は、その基質特異性、生産された産物、生産された産物の濃度、またはその任意の組み合わせ、を測定することで決定され得る。本明細書で使用する場合、組み換えポリペプチドの「比活性」とは、所定の量（例えば、濃度）の組み換えポリペプチドによって単位時間あたりに生産された特定の産物の量（例えば、濃度）を意味する。

10

【0108】

組み換えポリペプチド（例えば、LeuDH、KivD、またはAdh酵素）をコードする配列における変異は保存的アミノ酸置換をもたらし、前記ポリペプチドと機能的に等価な変異体、例えば、当該ポリペプチドの活性を保持する変異体を提供し得ることを、当業者はまた理解するはずである。本開示において使用する場合、「保存的アミノ酸置換」とは、当該アミノ酸置換が行われるタンパク質の相対電荷またはサイズ特性または機能的活性を変化させないアミノ酸置換を意味する。

20

【0109】

いくつかの例では、アミノ酸は、そのR基によって特徴付けられる（例えば、表1参照）。例えば、アミノ酸は、非極性脂肪族R基、正電荷をもつR基、負電荷をもつR基、非極性芳香族R基、または極性非荷電R基を含み得る。非極性脂肪族R基を含むアミノ酸の非限定的な例としては、アラニン、グリシン、バリン、ロイシン、メチオニンおよびイソロイシンが挙げられる。正電荷をもつR基を含むアミノ酸の非限定的な例としては、リシン、アルギニンおよびヒスチジンが挙げられる。負電荷をもつR基を含むアミノ酸の非限定的な例としては、アスパラギン酸およびグルタミン酸が挙げられる。非極性、芳香族性R基を含むアミノ酸の非限定的な例としては、フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファンが挙げられる。極性非荷電R基を含むアミノ酸の非限定的な例としては、セリン、スレオニン、システイン、プロリン、アスパラギンおよびグルタミンが挙げられる。

30

【0110】

変異体は、ポリペプチド配列を改変するための方法をまとめた文献、例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、J. Sambrook、et al.、eds.、Fourth Edition、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、New York、2012、またはCurrent Protocols in Molecular Biology、F. M. Ausubel、et al.、eds.、John Wiley & Sons, Inc.、New York、2010に記載のような、当業者に公知のポリペプチド配列を改変するための方法に従って製造することができる。

40

【0111】

ポリペプチドの機能的に等価な変異体の非限定的な例には、本願に開示されるタンパク質のアミノ酸配列における保存的アミノ酸置換を含み得る。本開示で使用する場合、「保存的置換」とは「保存的アミノ酸置換」と互換的に用いられ、および表1に記載のアミノ酸置換の任意の1つを指す。

【0112】

いくつかの実施形態では、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、

50

13、14、15、16、17、18、19、20または20以上の残基が、変異体ポリペプチドを調製する際に変更され得る。いくつかの実施形態では、アミノ酸は保存的アミノ酸置換によって置換される。

【0113】

【表1】

表1：保存的アミノ酸置換

元の残基	R基の種類	保存的アミノ酸置換
Ala	非極性脂肪族R基	Cys, Gly, Ser
Arg	正電荷をもつR基	His, Lys
Asn	極性非荷電R基	Asp, Gln, Glu
Asp	負電荷をもつR基	Asn, Gln, Glu
Cys	極性非荷電R基	Ala, Ser
Gln	極性非荷電R基	Asn, Asp, Glu
Glu	負電荷をもつR基	Asn, Asp, Gln
Gly	非極性脂肪族R基	Ala, Ser
His	正電荷をもつR基	Arg, Tyr, Trp
Ile	非極性脂肪族R基	Leu, Met, Val
Leu	非極性脂肪族R基	Ile, Met, Val
Lys	正電荷をもつR基	Arg, His
Met	非極性脂肪族R基	Ile, Leu, Phe, Val
Pro	極性非荷電R基	
Phe	非極性芳香族R基	Met, Trp, Tyr
Ser	極性非荷電R基	Ala, Gly, Thr
Thr	極性非荷電R基	Ala, Asn, Ser
Trp	非極性芳香族R基	His, Phe, Tyr, Met
Tyr	非極性芳香族R基	His, Phe, Trp
Val	非極性脂肪族R基	Ile, Leu, Met, Thr

【0114】

望ましい性質および/または活性を有する組み換えポリペプチド（例えば、LeuDH、KiVD、またはAdh酵素）変異体を生産するための、ポリペプチドのアミノ酸配列におけるアミノ酸置換は、当該ポリペプチド（例えば、LeuDH、KiVD、またはAdh酵素）のコード配列の変更によって行われる。同様に、ポリペプチドの機能的に等価な変異体を生産するための、ポリペプチドのアミノ酸配列における保存的アミノ酸置換は、典型的には、組み換えポリペプチド（例えば、LeuDH、KiVD、またはAdh酵素）のコード配列の変更によって行われる。

【0115】

変異（例えば、置換）は、当業者に知られた種々の方法によりスクレオチド配列中において行われ得る。例えば、変異は、Kunkel (Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82: 488 - 492, 1985) の方法に従うPCR特

10

20

30

40

50

異的変異導入、部位特異的変異導入、ポリペプチドをコードする遺伝子の化学合成、遺伝子編集技術、または挿入、例えばタグ（例えばHISタグまたはGFPタグ）の挿入によって行われ得る。

【0116】

分岐鎖アミノ酸（BCAA）経路の酵素をコードする核酸

本開示の態様は組み換え酵素、機能的な改変およびその変異体、およびそれらに関する使用、に関する。例えば、本願に記載の酵素および細胞は、例えばロイシンからイソペニタノールへの変換によるロイシンの消費を促進するために使用され得る。方法には、本願に記載の1以上の酵素を含む宿主細胞、細胞溶解液、単離酵素、またはその任意の組み合わせ、の使用を含み得る。本願に記載の酵素をコードするポリヌクレオチドの、宿主細胞における組み換え発現を含む方法は、本開示に包含される。少なくとも1つのBCAA経路酵素（例えば、LeuDH、KivD、またはAdh酵素）を含む宿主細胞を、それを必要とする対象に投与する工程を含む方法は、本開示に包含される。1以上の分岐鎖アミノ酸（BCAA）を、本願に開示されるBCAA経路の酵素と反応混合液中で反応させる工程を含むin vitro方法もまた、本開示に包含される。いくつかの実施形態では、BCAA経路の酵素はLeuDH、KivD、またはAdh酵素、またはその組み合わせである。

10

【0117】

任意の1以上の組み換えポリペプチド（例えば、LeuDH、KivD、Adh、および/またはBnnQ）をコードする核酸は本開示に包含され、および宿主細胞に含まれてもよい。いくつかの実施形態では、この核酸はオペロンの形態である。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのリボソーム結合部位が、この核酸中に存在する1以上のコード配列の間に存在する

20

【0118】

いくつかの実施形態では、本開示に包含されるLeuDH、KivD、Adh、および/またはBnnQの核酸配列は、本開示において供されるLeuDH、KivD、Adh、および/またはBnnQ核酸配列に対して、高度または中程度に厳しい条件下でハイブリダイズする核酸であり、かつ生物学的に活性な核酸である。例えば、LeuDH、KivD、Adhおよび/またはBnnQをコードする核酸に対して、0.2~1×SSC、65°であり、その後0.2×SSC、65°で洗浄する、高度に厳しい条件下でハイブリダイズする核酸を使用し得る。LeuDH、KivD、Adhおよび/またはBnnQをコードする核酸に対して、6×SSC、室温であり、その後2×SSC、室温で洗浄する、低度に厳しい条件下でハイブリダイズする核酸を使用し得る。その他のハイブリダイゼーション条件には、3×SSC、40°または50°、その後1または2×SSC、20°、30°、40°、50°、60°、または65°を含む。

30

【0119】

ハイブリダイゼーションは、ホルムアルデヒドの存在下で、例えば、10%、20%、30%40%または50%で、行うことができ、ハイブリダイゼーションの厳しさをさらに向上させ得る。核酸ハイブリダイゼーションの理論および実施は、例えば、S. Agarawal (ed.) *Methods in Molecular Biology*, volume 20; and Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in biochemistry and molecular biology - hybridization with nucleic acid probes*に記載されており、例えば、part I chapter 2 “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays” Elsevier, New Yorkは核酸ハイブリダイゼーションの基本的なガイドを提供する。例示的なタンパク質は、LeuDH、KivD、またはAdhタンパク質またはそのドメイン、例えば触媒ドメイン、に対して少なくとも約50%、70%、80%、90%、好ましくは少なくとも約95%、さらに好ましくは少なくとも約98%、お

40

50

より最も好ましくは少なくとも 99% の相同性または同一性を有する。その他の例示的なタンパク質は、LeuDH、KivD、またはAdh の核酸、例えば本願に記載のもの、に対して少なくとも約 90%、好ましくは少なくとも約 95%、さらに好ましくは少なくとも約 98%、および最も好ましくは少なくとも 99% の相同性または同一性を有する核酸によってコードされ得る。

【0120】

本開示に記載の組み換えポリペプチド（例えば、LeuDH、KivD、Adh および / または BnQ）のいずれか 1 つ以上をコードする核酸は、当分野で公知の任意の方法によって任意の適当なベクターに組み込まれてもよい。例えば、ベクターは発現ベクターであってよく、ウイルスベクター（例えば、レンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルスまたはアデノ隨伴ウイルスベクター）、一過性発現に好適な任意のベクター、構成的発現に好適な任意のベクター、または誘導性発現に好適な任意のベクター（例えば、ガラクトース誘導性ベクターもしくはドキシサイクリン誘導性ベクター）を含むが、これらに限定されない。

【0121】

いくつかの実施形態では、ベクターは、細胞内で自律的に複製される。いくつかの実施形態では、ベクターは細胞内の染色体に統合される。ベクターは、制限エンドヌクレアーゼによって切断される 1 以上のエンドヌクレアーゼ制限部位を含み、本願に記載の遺伝子を含む核酸を挿入および連結して、細胞内で複製できる組換えベクターを生産することができる。ベクターは典型的には DNA から構成されるが、RNA ベクターも利用可能である。クローニングベクターとしては、プラスミド、フォスマジド、ファージミド、ウイルスゲノム、人工染色体が挙げられるが、これらに限定されない。本願で使用される場合、“発現ベクター”または“発現構築物”とは、酵母細胞などの宿主細胞（例えば、微生物）、における特定の核酸の転写を可能にする一連の特定の核酸要素を有する、組換え的または合成的に生成された核酸構築物を意味する。いくつかの実施形態では、本願に記載の遺伝子の核酸配列は、作動可能に調節配列と連結されるようにクローニングベクターに挿入され、いくつかの実施形態では、RNA 転写物として発現される。いくつかの実施形態では、ベクターは、組換えベクターで形質転換またはトランسفェクトされた細胞を同定するために、本願に記載の選択可能マーカーなどの 1 以上のマーカーを含む。いくつかの実施形態では、本願に記載の遺伝子の核酸配列はコドン最適化される。コドン最適化は、コドン最適化されない参照配列と比較して、少なくとも 10%、少なくとも 15%、少なくとも 20%、少なくとも 25%、少なくとも 30%、少なくとも 35%、少なくとも 40%、少なくとも 45%、少なくとも 50%、少なくとも 55%、少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、または 100%（その間の全ての数値を含む）、遺伝子産物の生産を増加し得る。

【0122】

いくつかの実施形態では、本願に記載の核酸配列はプラスミドで発現され得る。例えば、本願に記載の核酸配列はクローニングプラスミドで発現され得る。本願に記載の核酸配列は一過性発現のためにプラスミドで発現され得る。本願に記載の核酸配列はまた、核酸配列のゲノム DNA への組み込みのためにプラスミドで発現され得る。

【0123】

コード配列および調節配列が共有結合し、コード配列の発現または転写が調節配列の影響下または制御下にあるとき、このコード配列と調節配列は“作動可能に結合された”または“作動可能に連結された”と言われる。コード配列が機能性タンパク質に翻訳されるべき場合において、5' 調節配列のプロモーターの誘導がコード配列の転写を許し、そしてコード配列と調節配列の間の結合の性質が、（1）フレームシフト変異の導入をもたらさない、（2）コード配列の転写を指示するプロモーター領域の能力を妨害しない、または（3）対応する RNA 転写物がタンパク質に翻訳される能力を妨害しない場合、該コード配列および調節配列は、作動可能に結合されていると言われる。

10

20

30

40

50

【0124】

いくつかの実施形態では、本願に記載のタンパク質のいずれか1つ以上をコードする核酸は、調節配列（例えば、エンハンサー配列）の制御下にある。いくつかの実施形態では、核酸はプロモーターの制御下で発現される。プロモーターは、天然のプロモーター、例えば、遺伝子のその内因性の状況におけるプロモーターであって、当該遺伝子の発現の通常の調節を供するプロモーターであり得る。あるいは、プロモーターは遺伝子の天然プロモーターとは異なるプロモーターであってもよい、例えば、プロモーターは遺伝子のその内因性の状況におけるプロモーターとは異なる。

【0125】

いくつかの実施形態では、プロモーターは真核生物プロモーターである。真核生物プロモーターの非限定的な例には、当業者には公知であるような（例えば、Addgene website : blog.addgene.org/plasmids-101-the-promoter-region参照）、TDH3、PGK1、PKC1、PDC1、TEF1、TEF2、RPL18B、SSA1、TDH2、PYK1、TPI1、GAL1、GAL10、GAL7、GAL3、GAL2、MET3、MET25、HXT3、HXT7、ACT1、ADH1、ADH2、CUP1-1、ENO2、およびSOD1が挙げられる。いくつかの実施形態では、プロモーターは原核生物プロモーター（例えば、バクテリオファージまたは細菌プロモーター）である。バクテリオファージプロモーターの非限定的な例には、P1s1con、T3、T7、SP6およびPLが挙げられる。細菌プロモーターの非限定的な例には、Pbad、PmgRB、Ptrc2、PCI857、Plac/ara、Plac/fnr、Ptac、Ptet、Pcm1t、およびPmが挙げられる。

【0126】

いくつかの実施形態では、プロモーターは誘導性プロモーターである。本願で使用する場合、「誘導性プロモーター」は、ある分子の存在または不存在によって制御されるプロモーターである。これは、例えば、酵素の発現を制御可能に誘導するために使用されてよい。いくつかの実施形態では、誘導性プロモーターは、LeuDh、KivDおよび/またはAdhと連結され、LeuDh、KivDおよび/またはAdhの発現は、ある時点において誘導されてよく、または誘導されなくてもよい。例えば、いくつかの実施形態では、ロイシン消費を制限するため、ある時点での発現は誘導されなくてよい（例えば、細胞の増殖期）。誘導性プロモーターの非限定的な例には、化学的に調節されたプロモーターおよび物理的に調節されたプロモーターが含まれる。化学的に調節されたプロモーターの場合、転写活性は、アルコール、テトラサイクリン、ガラクトース、ステロイド、金属または他の化合物などの1以上の化合物によって調節することができる。物理的に調節されるプロモーターの場合、転写活性は光または温度などの現象によって調節できる。テトラサイクリン調節型プロモーターの非限定的な例には、アンヒドロテトラサイクリン（aTc）応答性プロモーターおよび他のテトラサイクリン応答性プロモーター系（例えば、テトラサイクリン抑制性タンパク質（tetR）、テトラサイクリンオペレーター配列（tetO）およびテトラサイクリントランスクレベーター融合タンパク質（tTA））が含まれる。ステロイド調節型プロモーターの非限定的な例には、ラットのグルココルチコイド受容体、ヒトのエストロゲン受容体、ガのエクジソン受容体に基づくプロモーター、およびステロイド/レチノイド/甲状腺受容体スーパーファミリー由来のプロモーターが含まれる。金属調節型プロモーターの非限定的な例には、メタロチオネイン（金属イオンを結合および隔離するタンパク質）遺伝子に由来するプロモーターが含まれる。病因調節型（pathogenesis-regulated）プロモーターの非限定的な例には、サリチル酸、エチレンまたはベンゾチアジアゾール（BTH）によって誘導されるプロモーターが含まれる。温度/熱誘導性プロモーターの非限定的な例には、熱ショックプロモーターが含まれる。光調節型プロモーターの非限定的な例には、植物細胞由来の光応答性プロモーターが含まれる。特定の実施形態では、誘導性プロモーターはガラクトース誘導性プロモーターである。いくつかの実施形態では、誘導性プロモーターは、1以上

10

20

30

40

50

の生理学的条件（例えば、pH、温度、放射線、浸透圧、生理食塩水濃度勾配、細胞表面結合、または1以上の外因性もしくは内因性誘導剤の濃度）によって誘導される。外因性誘導物質または誘導剤の非限定的な例には、アミノ酸およびアミノ酸アナログ、糖類および多糖類、核酸、タンパク質転写活性化因子および抑制因子、サイトカイン、毒素、石油ベースの化合物、金属含有化合物、塩、イオン、酵素基質アナログ、ホルモンまたはそれらの任意の組み合わせが含まれる。

【0127】

いくつかの実施形態では、プロモーターは構成的プロモーターである。本願で使用される場合、「構成的プロモーター」とは、遺伝子の連続的な転写を可能にする調節されないプロモーターを意味する。構成的プロモーターの非限定的な例には、TDH3、PGK1、PKC1、PDC1、TEF1、TEF2、RPL18B、SSA1、TDH2、PYK1、TPI1、HXT3、HXT7、ACT1、ADH1、ADH2、ENO2、およびSOD1が含まれる。
10

【0128】

当業者に公知の他の誘導性プロモーターまたは構成的プロモーターもまた、本願において企図される。

【0129】

遺伝子発現に必要な調節配列の細かな性質は、種または細胞タイプ間で異なるが、一般に、必要に応じて、TATAボックス、キャッピング配列、CAAT配列などの、転写および翻訳の開始にそれぞれ関与する5'非転写配列および5'非翻訳配列が含まれる。特に20、そのような5'非転写調節配列は、作動可能に結合された遺伝子の転写制御のためのプロモーター配列を含むプロモーター領域を含み得る。調節配列はまた、エンハンサー配列または上流アクチベーター配列を含み得る。本願に開示されるベクターは、5'リーダー配列またはシグナル配列を含み得る。調節配列はまた、ターミネーター配列を含み得る。いくつかの実施形態では、ターミネーター配列は、転写過程におけるDNA内の遺伝子の終端を示す。異種生物において本願に記載の1以上の遺伝子の発現を誘導するのに好適な1以上の適切なベクターの選択および設計は、当業者の能力および裁量の範囲内である。

【0130】

発現に必要な要素を含む発現ベクターは市販されており、当業者に知られている（例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Fourth Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012を参照のこと）。
30

【0131】

宿主細胞

開示の方法および組成物および宿主細胞はE.coli細胞（例えば、E.coli Nissle 1917）を用いて例示されるが、いくつかの実施形態では、他の宿主細胞にも適用可能である。

【0132】

好適な宿主細胞には以下を含むが、これに限定されない：酵母細胞、細菌細胞、藻類細胞、植物細胞、真菌細胞、昆虫細胞、および動物細胞（哺乳類細胞を含む）。1つの例示的な実施形態では、好適な宿主細胞にはE.coliを含む（例えばNew England Biolabs in Ipswich, Massから入手可能なShuffle商標competent E.coli、またはGerman Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ Braunschweig)から入手可能なE.coli Nissle 1917 (E.coli DSM 6601)）。
40

【0133】

好適な酵母宿主細胞には、以下を含むがこれに限定されない：Candida、Hansenula、Saccharomyces、Schizosaccharomyces、Pichia、Kluyveromyces、およびYarrowia。いくつかの実
50

施形態では、酵母細胞は *Hansenula polymorpha*、*Saccharomyces cerevisiae*、*Saccharomyces carlsbergensis*、*Saccharomyces diastaticus*、*Saccharomyces norbensis*、*Saccharomyces kluyveri*、*Schizosaccharomyces pombe*、*Pichia pastoris*、*Pichia finlandica*、*Pichia trehalophila*、*Pichia kodamiae*、*Pichia membranae faciens*、*Pichia opuntiae*、*Pichia thermotolerans*、*Pichia salictaria*、*Pichia quercuum*、*Pichia piperi*、*Pichia stipitis*、*Pichia methanolica*、*Pichia angusta*、*Kluyveromyces lactis*、*Candida albicans*、または *Yarrowia lipolytica*である。
10

【0134】

いくつかの実施形態では、酵母株は工業用倍数体酵母株である。真菌細胞のその他の非限定的な例には *Aspergillus spp.*、*Penicillium spp.*、*Fusarium spp.*、*Rhizopus spp.*、*Acremonium spp.*、*Neurospora spp.*、*Sordaria spp.*、*Magnaporthe spp.*、*Allomyces spp.*、*Ustilago spp.*、*Botrytis spp.*、および *Trichoderma spp.* から取得された細胞を含む。
20

【0135】

特定の実施形態では、宿主細胞は *Chlamydomonas* (例えば、*C. Reinhardtii*) および *Phormidium* (*P. sp. ATCC29409*) などの藻類細胞である。

【0136】

他の実施形態では、宿主細胞は原核細胞である。好適な原核細胞には、グラム陽性、グラム陰性及びグラム可変性細菌細胞を含む。宿主細胞は以下の種であり得るが、これに限定されない：*Agrobacterium*、*Alicyclobacterillus*、*Anabaena*、*Anacystis*、*Acinetobacter*、*Acidothrix*、*Arthrobacter*、*Azobacter*、*Bacillus*、*Bifidobacterium*、*Brevibacterium*、*Butyrivibrio*、*Buchnera*、*Campestris*、*Campylobacter*、*Clostridium*、*Corynebacterium*、*Chromatium*、*Coprococcus*、*Escherichia*、*Enterococcus*、*Enterobacter*、*Erwinia*、*Fusobacterium*、*Faecalibacterium*、*Francisella*、*Flavobacterium*、*Geobacillus*、*Haemophilus*、*Helicobacter*、*Klebsiella*、*Lactobacillus*、*Lactococcus*、*Ilyobacter*、*Micrococcus*、*Microbacterium*、*Mesorhizobium*、*Methyllobacterium*、*Methylobacterium*、*Mycobacterium*、*Neisseria*、*Pantoea*、*Pseudomonas*、*Prochlorococcus*、*Rhodobacter*、*Rhodopseudomonas*、*Rhodopseudomonas*、*Roseburia*、*Rhodospirillum*、*Rhodococcus*、*Scenedesmus*、*Streptomyces*、*Streptococcus*、*Synechococcus*、*Saccharomonospora*、*Saccharopolyspora*、*Staphylococcus*、*Serratia*、*Salmonella*、*Shigella*、*Thermoanaerobacterium*、*Tropheryma*、*Tularensis*、*Temecula*、*Thermosynechococcus*、*Thermococcus*、*Ureaplasma*、*Xanthomonas*、*Xylella*、*Yersinia*、および *Zymomonas*
30
40
50

S_o

【 0 1 3 7 】

いくつかの実施形態では、細菌宿主株は工業用菌株である。多数の細菌の工業用菌株が知られており、本願に記載の方法および組成物に適している。

【 0 1 3 8 】

いくつかの実施形態では、細菌宿主細胞は、*Agrobacterium*種（例えば、*A. radiobacter*、*A. rhizogenes*、*A. rubi*）、*Arthrobacter*種（例えば、*A. aurescens*、*A. citreus*、*A. globiformis*、*A. hydrocarboglutamicus*、*A. mysorensis*、*A. nicotianae*、*A. paraffineus*、*A. protophonniae*、*A. roseoparaffinus*、*A. sulfureus*、*A. ureafaciens*）、*Bacillus*種（例えば、*B. thuringiensis*、*B. anthracis*、*B. megaterium*、*B. subtilis*、*B. lentus*、*B. circulans*、*B. pumilus*、*B. lautus*、*B. coagulans*、*B. brevis*、*B. firmus*、*B. alkaophilus*、*B. licheniformis*、*B. clausii*、*B. stearothermophilus*、*B. halodurans*および*B. amylolyquefaciens*）である。特定の実施形態では、宿主細胞は工業用*Bacillus*株であり、*B. subtilis*、*B. pumilus*、*B. licheniformis*、*B. megaterium*、*B. clausii*、*B. stearothermophilus*および*B. amylolyquefaciens*を含むがこれに限定されない。いくつかの実施形態では、宿主細胞は工業用*Clostridium*種（例えば、*C. acetobutylicum*、*C. tetani* E88、*C. lituseburense*、*C. saccharobutylicum*、*C. perfringens*、*C. beijerincki*）である。いくつかの実施形態では、宿主細胞は工業用*Corynebacterium*種（例えば、*C. glutamicum*、*C. acetoacidophilum*）である。いくつかの実施形態では、宿主細胞は工業用*Escherichia*種（例えば、*E. coli*）である。いくつかの実施形態では、宿主細胞は工業用*Erwinia*種（例えば、*E. uredovora*、*E. carotovora*、*E. ananas*、*E. herbicola*、*E. punctata*、*E. terreus*）である。いくつかの実施形態では、宿主細胞は工業用*Pantoea*種（例えば、*P. citrea*、*P. agglomerans*）である。いくつかの実施形態では、宿主細胞は工業用*Pseudomonas*種、（例えば、*P. putida*、*P. aeruginosa*、*P. mephalonii*）である。いくつかの実施形態では、宿主細胞は工業用*Streptococcus*種（例えば、*S. equisimilis*、*S. pyogenes*、*S. uberis*）である。いくつかの実施形態では、宿主細胞は工業用*Streptomyces*種（例えば、*S. ambofaciens*、*S. aachromogenes*、*S. avermitilis*、*S. coelicolor*、*S. aureofaciens*、*S. aureus*、*S. fungicidicus*、*S. griseus*、*S. lividans*）である。いくつかの実施形態では、宿主細胞は工業用*Zymomonas*種（例えば、*Z. mobilis*、*Z. lipolytica*）、などである。

【 0 1 3 9 】

本開示はまた、哺乳類細胞、例えば、ヒト（293、HeLa、WI38、PER.C6およびBowes黒色腫細胞を含む）、マウス（3T3、NS0、NS1、Sp2/0を含む）、ハムスター（CHO、BHK）、サル（COS、FRHL、Vero）、およびハイブリドーマ細胞株を含む種々の動物細胞タイプでの使用に適している。

[0 1 4 0]

様々な実施形態では、本開示の実施に使用され得る株は、原核および真核細胞株の両者を含み、および American Type Culture Collection (ATCC)、Deutsche Sammlung von Mikroorganismen 50

s m e n a n d Z e l l k u l t u r e n G m b H (D S M) 、 C e n t r a a l b u r e a u V o o r S c h i m m e l c u l t u r e s (C B S) 、 お よ び A g r i c u l t u r a l R e s e a r c h S e r v i c e P a t e n t C u l t u r e C o l l e c t i o n 、 N o r t h e r n R e g i o n a l R e s e a r c h C e n t e r (N R R L) な ど の 多 数 の 培 養 コ レク シ オン か ら 容 易 に 一 般 に 入 手 で き る。 本 開 示 は ま た 、 様 々 な 植 物 細 胞 タ イ プ で の 使 用 に も 適 し て い る。

【 0 1 4 1 】

本願で用いる用語「細胞」は、同じ細胞株または系統に属する細胞の集団などの単一の細胞または細胞集団を意味し得る。单数形の用語「細胞」の使用が、細胞の集団ではなく単一の細胞を明示的に意味すると解釈されるべきではない。宿主細胞には、野生型ものと比較して、遺伝子の改変を含んでいてもよい。10

【 0 1 4 2 】

本願に記載の組み換えポリペプチド（例えば、L e u D H、K i v D、A d h 酵素および／またはB r n Q）のいずれか1つをコードするベクターは当分野で公知の任意の方法を用いて、好適な宿主細胞に導入され得る。宿主細胞は、当業者に理解されるような任意の適切な条件下で培養され得る。例えば、当分野で公知の任意の培地、温度およびインキュベート条件が使用され得る。誘導性ベクターを含む宿主細胞については、細胞は、発現を促進するための適切な誘導剤と共に培養されてよい。

【 0 1 4 3 】

本願に記載の細胞のいずれも、核酸の接触および／または挿入の、前、その途中、および／またはその後において、任意のタイプ（リッチまたはミニマム）および任意の組成の培地中で培養することができる。培養または培養プロセスの条件は、当業者によって理解されるような常套の試験によって最適化され得る。いくつかの実施形態では、選択された培地には、様々な成分が補充される。いくつかの実施形態では、補充成分の濃度および量が最適化される。いくつかの実施形態では、培地および増殖条件のそのほかの態様（例えば、p H、温度など）は、常套の試験により最適化される。いくつかの実施形態では、培地に1以上の補充成分が添加される頻度、および細胞の培養時間の長さが最適化される。20

【 0 1 4 4 】

本願に記載の細胞の培養は、当分野で知られかつ用いられている培養器で行うことができる。いくつかの実施形態では、細胞を培養するために、曝気反応器（例えば、攪拌槽反応器）が用いられる。いくつかの実施形態では、細胞を培養するために、バイオリアクターまたは発酵槽が用いられる。したがって、いくつかの実施形態では、細胞は発酵に用いられる。本願において使用される場合、用語「バイオリアクター」および「発酵槽」は互換的に用いられ、生物または生物の一部を含み、生物学的、生化学的および／または化学反応が行われる限定空間または部分的限定空間を意味する。「大規模バイオリアクター」または「工業規模バイオリアクター」は、商業規模または準商業規模で製品を产生するために用いられるバイオリアクターである。大規模バイオリアクターは、典型的には、数リットル、数百リットル、数千リットルまたはそれ以上の容量である。30

【 0 1 4 5 】

いくつかの実施形態では、バイオリアクターは、本明細書に記載の細胞または細胞培養物などの、細胞（例えば、細菌細胞）または細胞培養物（例えば、細菌細胞培養物）を含む。ある態様において、バイオリアクターは、単離された微生物の芽胞（s p o r e）および／または休眠細胞型（例えば、乾燥状態の休眠細胞）を含む。40

【 0 1 4 6 】

バイオリアクターの非限定的な例には、攪拌タンク発酵槽、回転混合装置によって攪拌されるバイオリアクター、ケモスタッフ、振とう装置によって攪拌されるバイオリアクター、エアリフト発酵槽、充填床リアクター、固定床リアクター、流動床バイオリアクター、波動攪拌を採用するバイオリアクター、遠心バイオリアクター、ローラーボトル、および中空糸バイオリアクター、ローラー装置（例えば、ベンチトップ、カート搭載型および／または自動化型など）、垂直に積み重ねられたプレート、スピナーフラスコ、攪拌フラ50

スコまたは振動（rocking）フラスコ、振盪マルチウェルプレート、MDボトル、Tフラスコ、ルーボトル、多表面（multiple-surface）組織培養増殖器、改変型発酵槽およびコーティングされたビーズ（例えば、細胞の付着を防ぐために血清タンパク質、ニトロセルロースまたはカルボキシメチルセルロースでコーティングされたビーズ）が含まれる。

【0147】

いくつかの実施形態では、バイオリアクターは、移動する液体および／または気泡と細胞（例えば、細菌細胞）が接触している細胞培養系を含む。いくつかの実施形態では、細胞または細胞培養物は、懸濁液中で増殖する。その他の実施形態では、細胞または細胞培養物は、固相キャリアに付着する。キャリア系の非限定的な例には、マイクロキャリア（例えば、ポリマー球体、マイクロビーズ、および多孔性または非多孔性であり得るマイクロディスク）、特定の化学基（例えば、第三級アミン）で荷電された架橋ビーズ（例えば、デキストラン）、非多孔質ポリマー纖維内に捕捉された細胞を含む2Dマイクロキャリア、3Dキャリア（例えば、キャリア纖維、中空纖維、マルチカートリッジ反応器、および多孔性纖維を含み得る半透膜）、低減されたイオン交換能を有するマイクロキャリア、カプセル化細胞、キャピラリーおよび凝集体が挙げられる。いくつかの実施形態では、キャリアは、デキストラン、ゼラチン、ガラスまたはセルロースなどの材料から作製される。

【0148】

いくつかの実施形態では、工業規模のプロセスは、連続、半連続または非連続モードで操作される。操作モードの非限定的な例は、バッチ、供給バッチ、拡張バッチ、反復バッチ、ドロー／フィル、回転壁、回転フラスコ、および／または灌流操作モードである。いくつかの実施形態では、バイオリアクターは、基質ストック、例えば、炭水化物源の連続的または半連続的補充および／またはバイオリアクターからの生成物の連続的または半連続的分離を可能にする。

【0149】

いくつかの実施形態では、バイオリアクターまたは発酵槽は、反応パラメーターを測定および／または調整するためのセンサーおよび／または制御系を含む。反応パラメーターの非限定的な例には、生物学的パラメーター（例えば、増殖速度、細胞サイズ、細胞数、細胞密度、細胞タイプまたは細胞状態など）、化学的パラメーター（例えば、pH、酸化還元電位、反応基質および／または生成物の濃度、酸素濃度およびCO₂濃度などの溶存ガスの濃度、栄養素濃度、代謝産物濃度、オリゴペプチド濃度、アミノ酸濃度、ビタミン濃度、ホルモン濃度、添加剤濃度、血清濃度、イオン強度、イオン濃度、相対湿度、モル濃度、浸透圧、他の化学物質、例えば緩衝剤、アジュvantまたは反応副産物の濃度）、物理的／機械的パラメーター（例えば、密度、導電率、攪拌の程度、圧力、および流量、せん断応力、せん断速度、粘度、色、濁度、光吸収、混合速度、変換速度ならびに光の強度／質などの熱力学的パラメーター）が含まれる。本願に記載のパラメーターを測定するためのセンサーは、関連する機械および電子技術分野の当業者によく知られている。本願に記載のセンサーからの入力に基づいてバイオリアクター内のパラメーターを調整するための制御系は、バイオリアクター工学分野における当業者によく知られている。

【0150】

いくつかの実施形態では、方法はバッチ発酵（例えばフラスコ振とう発酵）に関する。バッチ発酵（例えばフラスコ振とう発酵）について的一般的な考慮事項には、酸素およびグルコースの量を含む。例えば、バッチ発酵（例えばフラスコ振とう発酵）では酸素およびグルコースが限定されている、そのためいくつかの実施形態では、十分に設計された供給バッチ発酵における細胞株の実行能力は過小評価される。また、最終生産物は、溶解性、毒性、細胞蓄積及び分泌の点で基質と何らかの違いを示す可能性があり、いくつかの実施形態では、異なる発酵動態を有し得る。

【0151】

いくつかの実施形態では、本開示の細胞は、in vivoにおいてロイシンを消費す

10

20

30

40

50

るようすに適合される。いくつかの実施形態では、細胞はイソペンタノールへの転換を通じてロイシンを消費するための 1 以上の酵素（例えば、LeuDH、KivD、および / または Adh）を產生するようすに適合される。このような実施形態では、酵素は in vitro または ex vivo のプロセスにおいて、バイオコンバージョンによるロイシンの消費のための反応を触媒することができる。

【0152】

本開示の任意のタンパク質または酵素は、宿主細胞によって発現されてよい。本願において使用する場合、宿主細胞は少なくとも 1 つの異種ポリヌクレオチド（例えば、本願に記載のタンパク質または酵素をコードする）を発現するために使用され得る細胞である。遺伝子を含むポリヌクレオチドなどのポリヌクレオチドについての用語「異種」は、用語「外因性」および用語「組み換え」と互換的に用いられ、以下を意味する：生物系に人工的に供給されたポリヌクレオチド；生物系内で改変されたポリヌクレオチド；または生物系内でその発現または制御が操作されたポリヌクレオチド。宿主細胞に導入されるかまたは宿主細胞において発現される異種ポリヌクレオチドは、宿主細胞とは異なる生物または種に由来するポリヌクレオチドであり得る、または合成ポリヌクレオチドであり得る、または宿主細胞と同じ生物または種において内因的に発現されるポリヌクレオチドでもあり得る。宿主細胞内で内因的に発現されるポリヌクレオチドは、例えば、宿主細胞において非天然の位置にある場合；宿主細胞において安定的または一過性に組み替え発現される場合；宿主細胞内で修飾をうける場合；宿主細胞内で選択的に編集される場合；宿主細胞で天然に生じるコピー数とは異なるコピー数で発現される場合；または、例えばポリヌクレオチドの発現を制御する調節領域を操作する事によって、宿主細胞内で非天然の経路で発現される場合、においては、異種ポリヌクレオチドと考えられる。いくつかの実施形態では、異種ポリヌクレオチドは宿主細胞において内因的に発現されるポリヌクレオチドであるが、その発現はポリヌクレオチドの発現を天然には制御しないプロモーターによって駆動される。その他の実施形態では、異種ポリヌクレオチドは宿主細胞において内因的に発現されるポリヌクレオチドであり、その発現はポリヌクレオチドの発現を天然に制御するプロモーターによって駆動されるが、このプロモーターまたは別の調節領域が改変されている。いくつかの実施形態では、プロモーターは組み換えにより亢進または抑制されている。例えば、遺伝子編集に基づく技術を使用して、内因性プロモーターはを含むプロモーターから発現される、内因性ポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドの発現を制御し得る。例えば、Chavez et al., Nat Methods. 2016 Jul; 13(7): 563-567 を参照のこと。異種ポリヌクレオチドは、参照ポリペプチド配列と比較して、野生型配列または変異配列を含んでいてよい。

【0153】

本願に開示される組み換えポリペプチド（例えば、LeuDH、KivD、および / または Adh）のいずれかを产生するために、任意の好適な宿主細胞が使用されてよく、これには真核細胞または原核細胞を含む。

【0154】

組成物

本開示は、本願に記載の宿主細胞（例えば、LeuDH、KivD、および Adh からなる群より選択される少なくとも 1 つの酵素をコードする異種ポリヌクレオチドを含む宿主細胞）、または本願に記載される 1 つ以上の酵素（例えば、LeuDH、KivD、および / または Adh）、および任意には薬学的に許容される賦形剤、を含む組成物であって、医薬組成物を含む、組成物を提供する。

【0155】

特定の実施形態では、本願に記載される宿主細胞は、医薬組成物などの組成物中に有効量で提供される。特定の実施形態では、本願に記載される 1 つ以上の酵素は、医薬組成物などの組成物中に有効量で提供される。特定の実施形態では、有効量は治療有効量である。特定の実施形態では、有効量は予防的に有効な量である。いくつかの実施形態では、有効量は、1 つ以上のMSUD の症状を処置または改善するために十分な量である。

10

20

30

40

50

【 0 1 5 6 】

特定の実施形態では、対象は動物である。特定の実施形態では、対象は人である。その他の実施形態では、体象は非ヒトの動物である。特定の実施形態では、対象は哺乳類である。特定の実施形態では、対象は非ヒトの哺乳類である。いくつかの実施形態では、対象は非哺乳類である。特定の実施形態では、対象はイヌ、ネコ、ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ニワトリ、またはヤギなどの家畜化動物である。特定の実施形態では、対象はイヌまたはネコなどの伴侶動物 (companion animal) である。特定の実施形態では、対象はウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ニワトリ、またはヤギなどの家畜である。特定の実施形態では、対象は動物園の動物である。別の実施形態では、対象は、げっ歯類（例えば、マウス、ラット）、イヌ、ブタ、または非ヒトの霊長類などの、研究動物である。

10

【 0 1 5 7 】

本願に記載の、医薬組成物などの組成物は、当分野で公知の任意の方法によって調製され得る。一般に、かかる調製方法には、本願に記載される化合物（例えば、「有効成分」）をキャリアまたは賦形剤、および／または1つ以上のその他の付属成分と混合する工程、およびその後、必要であれば、および／または望ましい場合には、産物を望ましい単回または複数回投与単位に成形、および／または包装する工程を含む。

【 0 1 5 8 】**方法**

いくつかの態様では、本開示は宿主細胞を使用する方法を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は本願に記載の宿主細胞（例えば、LeuDH、KiVD、およびAdhからなる群より選択される少なくとも1つの酵素をコードする異種ポリヌクレオチドを含む宿主細胞）を培養する工程を含む方法を提供する。細胞培養のための方法は、本願の別の部分に記載されている。いくつかの実施形態では、本開示はロイシンからイソペンタノールを生産する方法であって、本願に記載の宿主細胞（例えば、LeuDH、KiVD、およびAdhをコードする異種ポリヌクレオチドを含む宿主細胞）を培養する工程を含む方法、を提供する。いくつかの実施形態では、この生産と培養は *in vivo* で生じる、例えば、宿主細胞を投与されたヒト対象において生じる。いくつかの実施形態では、この生産は *ex vivo* で生じる、例えば *in vitro* 細胞培養環境において生じる。本願に記載される組成物、細胞、酵素、および方法はまた、分岐鎖アミノ酸（例えば、ロイシン、イソロイシン、およびバリン）蓄積が生じている可能性があるような任意の用途を含む、工業的環境にも適用可能である。

20

30

40

【 0 1 5 9 】

本発明は、以下の実施例によってさらに説明されるが、これは決して限定的であると解釈されるべきではない。本願を通して引用された全ての文献（参考文献、発行済み特許、公開特許出願および共同係属中の特許出願を含む）の内容全体は、引用により本願に明示的に包含させる。本願に組み込まれた参考文献が、ある用語の定義が、本開示で定義された同じ用語の定義と不調和であるか互換性のない用語を含む場合、本開示においてその用語に付与された意味が適用されるものとする。ただし、本願で引用した任意の参考文献、論文、出版物、特許、特許公開、および特許出願の記載は、それらが有効な先行技術であること、または世界の任意の国における一般的な一般知識の一部を形成していることを認めるものでも、いかなる形でも示唆するものでもなく、またそのように解釈されるべきでもない。

【 実施例 】**【 0 1 6 0 】****実施例**

本願に記載される発明がより十分に理解され得るために以下の実施例は記載される。本願に記載の実施例は本願に提供される系および方法を説明するために提示され、および決してこれらの範囲を限定するように解釈されるものではない。

【 0 1 6 1 】

実施例 1：酵素ライブラリーの設計および合成

50

材料と方法

メタゲノム解析による酵素の探索

機械学習に基づくバイオインフォマティクスツールを用いて、公共の配列データベース（SwissProtおよびTrEMBL、合わせてUniProtとして知られる）から、3つの望ましい活性（ロイシンデヒドロゲナーゼ、1.4.1.9；ケトイソバレートデカルボキシラーゼ、4.1.1.1；およびアルコールデヒドロゲナーゼ1.1.1.1）それぞれについて、酵素の候補を同定した。LeuDHおよびAdhについて、先行して開発されたアルゴリズムを用いて配列多様性を最大化した。KivDについては層化抽出法を使用した。酵素候補の総数は、1175個のLeuDH配列、1296個のKivD配列、および1177個のAdh配列であった。

10

【0162】

合理的酵素設計

LeuDHおよびAdhについて、Rosettaソフトウェアを用いて、酵素-遷移状態複合体の分子モデルを構築し、および活性部位の残基の規則的な変異を、20個のアミノ酸それぞれについて設計した。

【0163】

ライブラリーの合成

全てのLeuDH、KivDおよびAdh酵素のDNA配列をE.coliにおける発現のためにコドン最適化した。コード配列を、誘導性E.coli発現ベクター中に合成し、T7プロモーターの制御下において。

20

【0164】

結果

ロイシン消費型分岐鎖アミノ酸（BCAA）経路を改善するために、実験を行い、試作株（SYN1980としても知られる1980）において親株の酵素に比して優れた活性を持つLeuDH、KivD、およびAdh酵素を同定した、ここで親株はBacillus cereusのLeuDH、Lactococcus lactisのKivD、およびSaccharomyces cerevisiaeのADH2を含む。試作株はまた、ロイシンなどの分岐鎖アミノ酸を細胞に輸送できる分岐鎖アミノ酸輸送体である、E.coli由来のBlnQを含む。親株のLeuDH酵素はロイシンに加え、バリンおよびイソロイシンを脱アミノ化する、基質の乱雑さ(promiscuity)を示した。BCAA経路による特異的なロイシン消費を向上させるための、経路設計のさらなる目的はバリン(Val)およびイソロイシン(Ile)に比してロイシン(Leu)への特異性が増したLeuDH酵素を同定する事である。

30

【0165】

各酵素ファミリー（LeuDH、KivD、およびAdh）のライブラリーを設計するために2つの相補的なアプローチを用いた：メタゲノムソーシングおよび合理的設計（表2）。各酵素について、配列データベースにおいて入手可能な完全なメタゲノム配列空間をサンプリングするために>1000個の酵素のメタゲノムライブラリーを設計した（図1A-1C）。LeuDHおよびAdhライブラリーについて、入手可能な構造データをB.cereusのLeuDHおよびS.cerevisiaeのAdh酵素の合理的設計のために使用した。全ライブラリーの酵素配列はE.coliにおける発現のためにコドン最適化され、および誘導性E.coli発現ベクター中に合成され、およびハイスクロットスクリーニングのために、E.coliに形質転換された。

40

【0166】

50

【表2】

表2：酵素ライブラリーの構成

ライブラリー	細菌	菌類	動物	植物	合理的設計	設計の総数
LeuDH	1129	11	23	12	270	1445
KivD	783	508	1	4	0	1296
Adh	654	273	128	122	140	1317

10

【0167】

実施例2：経路酵素ライブラリーの特徴づけ

材料と方法

細胞の増殖および酵素の調製

スクリーニングした各酵素ライブラリーについて、ライブラリープラスミドを保持する株を *E. coli* T7 発現宿主細胞に形質転換した。5 μL / ウェルの冷凍のグリセロールストックを、半分の高さのディープウェルプレート中の 500 μL / ウェルの LB + 100 μg / mL Carbenicillin (LB-Carb100) 中に入れ、および Aeraseal を用いて密封した。サンプルを 37 °C でインキュベートし、および 80 % 湿度中、1000 RPM で一晩振とうした。50 μL / ウェルの得られた前培養物を、半分の高さのディープウェルプレート中の 450 μL / ウェルの LB-Carb100 + 1 mM IPTG 中に入れ、および Aeraseal を用いて密封した。サンプルを 30 °C でインキュベートし、および 80 % 湿度中、1000 RPM で一晩振とうした。250 μL / ウェルの得られた培養産物を、500 μL のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を入れたディープウェルプレートに入れ、4000 G で 10 分間遠心分離した。上清を取り除き、得られた細胞のペレットを 200 μL の Bug Buster タンパク質抽出試薬 + 1 μL / mL の精製 Benzonaase + 1 μL / 6 mL の精製リゾチームに再懸濁した。サンプルを室温で 10 分間インキュベートし、in vitro 酵素アッセイに使用する細胞溶解液を生成した。

20

30

【0168】

LeuDH 活性アッセイ

LeuDH ライブラリー株の溶解液 10 μL を、90 μL / ウェルのアッセイ緩衝液 (20 mM アミノ酸 [L-ロイシン、L-バリン、または L-イソロイシン]、200 mM グリシン、200 mM KCl、0.4 mM NAD、pH 10.5) を入れた半面積の平底プレートに移した。光学測定はプレートリーダーで行い、吸光度は 340 nm で 10 分間測定した。得られた反応動態データを使用し、LeuDH 活性の代わりとして NAD+ 還元の最大速度を算出した。

40

【0169】

KivD 活性アッセイ

KivD ライブラリー株の溶解液 10 μL を、90 μL / ウェルのアッセイ緩衝液 (100 mM PIPES-KOH、100 mM グルタミン酸カリウム、1 mM ジチオトレイトール、0.4 mM NAD、1.5 mM チアミンピロリン酸、10 mM グルタミン酸マグネシウム、20 mM ケトイソカブロエート (KIC)、pH 7.5) を入れた半面積の平底プレートに移した、KIC に対する KivD 活性を間接的に測定するため、カップリング酵素を使用した。光学吸光度を 10 分間測定した。得られた反応動態データを使用して、KivD 活性を決定した。

【0170】

Adh 活性アッセイ

Adh ライブラリー株の溶解液 10 μL を、90 μL / ウェルのアッセイ緩衝液 (50

50

mM MOPS 緩衝液、0.4 mM NADH、および30 mM イソバレルアルデヒド、pH 7.0)を入れた半面積の平底プレートに移した。光学吸光度を340 nmで10分間測定した。得られた反応動態データを使用し、ADH活性の代わりとしてNADH酸化の最大速度を算出した。

【0171】

LeuD H 選択性アッセイ

LeuD Hの選択性(L-IleおよびL-Valの存在下における特異的なL-Leuの脱アミノ化)を測定するために、溶解液を溶解緩衝液で4倍に希釈し、この新しく希釈した溶解液10 μL / ウェルを、90 μL / ウェルのアッセイ緩衝液(上記から調整し、特に0.5 mMの各アミノ酸(L-ロイシン、L-イソロイシン、L-バリン)、200 mM グリシン、200 mM 塩化カリウム、および4 mM NADを含む)、に入れられた。反応は異なる時点で停止され、かつLC-MSによるロイシン、イソロイシンおよびバリンの定量に供された。
10

【0172】

結果

3 × ~ 1300 個の酵素ライブラリーをスクリーニングするために、E. coli 細胞溶解液中の LeuD H、KivD、および Adh 酵素活性をスクリーニングするために、ハイスループット(HTP)な方法を開発した。簡単に説明すると、96 ディープウェルプレートで株を培養し、タンパク質産生を誘導した、ここで各プレートにはポジティブコントロールおよびネガティブコントロールを含む。細胞を溶解し、本明細書に記載の酵素特異的な分光高度法アッセイを用いて細胞溶解液中の酵素活性を測定した。酵素アッセイは完全に自動化されたロボット型ワークセル上で行われた。各酵素ファミリーについて、完全なライブラリー(各 ~ 1300 個)を2連の生物学的複製で測定し、および各酵素ファミリーにおいて最も高い活性を持つ 50 ~ 200 個の酵素をそのファミリーの一次「ヒット」として選出した。酵素の順位を検証するために、さらに複製(4連の生物学的複製)を加えて、二次スクリーニングにおいて一次ヒットを再度スクリーニングした。
20

【0173】

ロイシンデヒドロゲナーゼ(LeuD H)

計 1378 個の LeuD H 酵素を、Leu を脱アミノ化する能力について一次スクリーニングした。初回のスクリーニングによって、B. subtillis 由来の親株の LeuD H 酵素と同程度か、よりよい活性もつ 220 個の酵素が同定された(表 4)。これらの一次ヒットを二次スクリーニングによってさらに解析した(図 2)。二次スクリーニングでは、最大 1.8 倍の上昇した Leu に対する LeuD H 活性をもつ LeuD H 酵素が確認された。
30

【0174】

活性は以下のようにして算出された:(酵素活性 / バックグラウンド酵素活性) - 1 コントロールは 0 と設定し、および値が > 0 の株を潜在的なヒットとみなした。値はコントロールに対する向上の割合を表す。非限定的な例として、50% 向上した株は表 4 において値が 0.5 として示される。

【0175】

いずれの一次 LeuD H ヒットも、Ile および Val よりも Leu に対しての上昇した特異性を示すのかを決定するために、220 個全ての一次ヒットを、Val および Ile に対する活性についてもスクリーニングした。特異性は、Leu に対する活性と Ile または Val に対する活性の比として測定された。図 3 に示すように、一次スクリーニングでヒットした酵素は Val よりも Leu に対して最大で 2.7 倍の嗜好性を示し、Ile よりも Leu に対して最大で 5 倍の嗜好性を示した。このアッセイでは、コントロールの B. cereus の LeuD H は Leu、Val、および Ile に対して同程度の嗜好性を示した。
40

【0176】

このライブラリーにおいて、Leu 活性に対する Leu 特異性のトレードオフが観察さ

50

れ、最も特異的な L e u D H 酵素は最も活性のある L e u D H 酵素ではなかった。L e u / I l e に対する特性を L e u / V a l と比較することにより、L e u および V a l の両者に対してよりも L e u に対して向上した特異性をもつヒットが同定された（図 4）。コントロールの *B. cereus* の L e u D H は L e u 、 V a l 、および I l e に対しておよそ同程度の嗜好性を示した。

【 0 1 7 7 】

ケトイソバレレートデカルボキシラーゼ (K i v D)

計 1 2 4 8 個の K i v D 酵素を、ケトイソカブロエートに対する脱カルボキシル化活性についてスクリーニングした。初回のスクリーニングによって、S. aureus 由来の親株の K i v D 酵素よりも高い活性を持つ 5 5 個の酵素が同定され（表 5）、親株の K i v D 酵素は、このアッセイではバックグラウンド溶解液中のデカルボキシラーゼ活性よりも高い活性を示さず、0 ではない計測可能なバックグラウンド活性と同じとみなした。これらの一次 K i v D ヒットを二次スクリーニングによってさらに解析した（図 5）（表 5）。二次スクリーニングでは、このアッセイにおいてバックグラウンド溶解液の活性と比較して、少なくとも 6 から 8 倍上昇した K i v D 活性を持つ酵素が > 4 0 個同定された。K i v D 活性は以下のようにして算出した：（酵素活性 / バックグラウンド酵素活性） - 1

【 0 1 7 8 】

アルコールデヒドロゲナーゼ (A d h)

計 1 2 1 5 個の A d h 酵素を、イソバレルアルデヒドをイソペンタノールへと還元する能力についてスクリーニングした。初回のスクリーニングによって、S. cerevisiae 由来の親株の A D H 2 酵素よりも高い活性を持つ 5 5 個の酵素が同定され（表 6）、親株の A D H 2 酵素は、このアッセイではバックグラウンド溶解液中のアルコールデヒドロゲナーゼ活性よりも高い活性を示さず、0 ではない計測可能なバックグラウンド活性と同じとみなした。S. cerevisiae の A D H 2 の活性は、溶解液のバックグラウンド活性と差が無いため、バックグラウンド活性よりも高い活性を持つ、E quus caballus の A d h をスクリーニングのポジティブコントロールとして用いた。これらの一次ヒットを二次スクリーニングによってさらに解析した（図 6）（表 6）。二次スクリーニングでは、バックグラウンド溶解液の活性と比較して少なくとも 2 0 倍上昇した A d h 活性を持つ 5 つの酵素が同定された。S. cerevisiae の A D H 2 酵素を二次スクリーニングのコントロールとして用いた。A d h 活性は以下のようにして算出した：（酵素活性 / バックグラウンド酵素活性） - 1

【 0 1 7 9 】

実施例 3：上位の L e u D H 候補酵素の選択性

材料と方法

L e u D H 選択性アッセイ

L e u D H の選択性 (L - I l e および L - V a l の存在下における特異的な L - L e u の脱アミノ化) を測定するために、溶解液を溶解緩衝液で 4 倍に希釈し、この新しく希釈した溶解液 1 0 μ L / ウエルを、9 0 μ L / ウエルのアッセイ緩衝液（上記から調整し、特に 0 . 5 mM の各アミノ酸 (L - ロイシン、L - イソロイシン、L - バリン) 、2 0 0 mM グリシン、2 0 0 mM 塩化カリウム、および 4 mM N A D を含む) 、入れた。反応は異なる時点で停止され、かつ L C - M S によるロイシン、イソロイシンおよびバリンの定量に供された。

【 0 1 8 0 】

結果

L e u D H は L e u 、 V a l 、および I l e の脱アミノ化を触媒し、およびその結果、基質プールが混合されている *i n v i v o* 環境では、全ての基質が競合物質として作用する可能性がある。混合基質プールに対しての、上位の L e u D H ヒットの性能をよりよく予測するために、L e u D H 酵素の L e u に対する選択性（すなわち、反応液中に L e u 、 V a l 、および I l e の全てが存在する場合における、L e u D H の L e u 嗜好性）

を測定した。反応混合液が Leu、Val、Ile を 1 : 1 : 1 のモル比で含む事を除いて HTPスクリーニングと似た細胞溶解液アッセイにおいて、計 21 個の LeuDH 酵素をスクリーニングした。反応溶液中の Leu、Val、Ile の減少速度を計測した。図 7 は各 LeuDH 酵素の、反応混合液中での Leu、Ile および Val の消費を示す。親の B. subtilis の LeuDH と比較した際に、少なくとも 10 個の LeuDH 酵素が Val および Ile よりも Leu に対して向上した嗜好性を示した。ほとんど全ての LeuDH 酵素がバリンについては最小の嗜好性を示した。

【0181】

実施例 4：経路酵素ヒットの選択およびオペロンの組み立て。

BCAA 経路の全体的なロイシン消費を向上させるため、各段階について親株の酵素よりも優れた性能を示した複数の酵素を選択した。LeuDH について、以下の 2 つの基準に基づいて 6 個のヒットを選出した：Leuに対する酵素活性、および Val および Ile に比した Leuに対する特異性。LeuDH 選択性解析はオペロンの組み立てと並行して行ったため、選択性のデータセットはこの LeuDH 選出の要素としていない。KivD および Adh について、in vitro の酵素活性に基づいて、各酵素ファミリーについて 3 個のヒットを選出した。合計して 12 個の酵素を最終的なオペロンの設計に進めた（表 3）。オペロンは 4 つの酵素のコード配列から以下の順番で構成される：LeuDH - KivD - Adh - BrnQ。以下に記載するように、Leu 消費に好ましいオペロンを選出し、以下に記載するようにさらに試験した。

【表 3】

10

20

表 3：オペロン設計に進めるために選択された酵素

酵素	識別子	ソース	配列番号 (核酸)	配列番号 (アミノ酸)
LeuDH	t160946	<i>Cetobacterium ceti</i>	1	2
LeuDH	t160389	<i>Hymenobacter daecheongensis</i>	3	4
LeuDH	t160283	<i>Hymenobacter</i> sp. CRA2	5	6
LeuDH	t160434	<i>Arenimonas</i> sp SCN 70-307	7	8
LeuDH	t160048	<i>Candidatus kapabacteria</i> sp. 59-99	9	10
LeuDH	t160141	<i>Peptococcaceae bacterium</i> CEB3	11	12
KivD	t163988	<i>Candida auris</i>	13	14
KivD	t164076	<i>Bacillus</i> sp. FJ AT-1801	15	16
KivD	t163842	<i>Erwinia injecta</i>	17	18
Adh	t159319	<i>Tortispora caseinolytica</i> NRRL Y-17797	19	20
Adh	t159028	<i>Rhizobiales</i> bacterium NRL2	21	22
Adh	t158538	<i>Alcanivorax dieselolei</i>	23	24

30

40

【0182】

実施例 5：オペロンの試験

50

材料と方法

細胞調製

分岐鎖アミノ酸（BCAA）経路のオペロンプラスミドを、German Collection of MicroorganismsおよびCell Cultures (DSMZ Braunschweig, E. coli DSM 6601)から購入したE. coli Nissle株1917に形質転換した。形質転換した細胞を氷上で解凍し、および細胞密度を600 nmにおける吸光度(OD₆₀₀)で測定した。この方法では、OD₆₀₀の値1.0を10⁹細胞/mLと等しいとみなした。2 × 10⁹細胞/mLの細胞懸濁液の1 mLを目標として容量を計算し、この細胞を96-ディープウェルプレートに移し、および冷やしたPBSで一度洗浄した。遠心分離(4000 rpm、4 10分)の後、PBSを捨て、細胞のペレットを1 mLの1 × M9 + 50 mM MOPS + 0.5% グルコース(MMG)緩衝液で懸濁させた。800 μLの各サンプルを新しい96-ディープウェルプレートに移し、16 mMのロイシンを含む800 μLのMMGを加え、ピベッティングしてよく混合した。時間0として割り当てられたサンプル(200 μL)をこの時点で回収した。プレートを通気性のある膜で覆い、嫌気チャンバーに移し、37 でインキュベートした。嫌気チャンバーでのインキュベート中にサンプルを2時間および4時間の時点についても回収した。回収直後にサンプルを4000 rpm、4 で10分間遠心分離した。上清100 μLを新しい96ウェルプレートに移し、さらなる解析のために-80 で保存した。

【0183】 20

ロイシン活性アッセイ

Ultimate 3000 UHPLC-TSQ Quantum または Vanquish UHPLC-TSQ Altiisシステムをそれぞれ用いた、液体クロマトグラフィーおよび共役したタンデム質量分析(LC-MS/MS)によって、細菌上清中のロイシンを定量した。サンプルは、1 μg/mLのロイシン-d₃を内部標準として含む、9部の2:1アセトニトリル:水で抽出し、ボルテックスし、および遠心分離した。上清を9部の0.1%ギ酸で希釈し、0.8から1000 μg/mLまで上記のように処理した標準品と同時に分析した。サンプルを、Phenominex Synergia 4 um Hydro-RP 80A、75 × 2 mm上で、0.1%ギ酸(A)、0.1%ギ酸/アセトニトリル(B)を用いて、0.3 mL/min、および50 で分離した。2 μL注入後、初めに5%Bで0から0.5分間保持し、分析物は、5から90%のBで0.5から1.5分間にわたってグラジエント溶出し、続けて高濃度有機洗浄と水系平衡化の工程を行った。エレクトロスプレーイオノンモードで化合物特異的衝突誘導フラグメントの選択的反応モニタリング(SRM)により分析物を検出した(ロイシン:132 > 86、イソロイシン:ロイシン-d₃:135 > 89)。SRMクロマトグラムを積算し、未知/内部標準のピーク面積比を用いて、標準曲線に対する濃度を算出した。

【0184】

結果

HTPスクリーニングから同定された上位のLeu消費オペロンをE. coli Nissle 1917に形質転換し(および株5941、株5942、株5943とラベルした)、試作株1980と比較した。株5941は、Cetobacterium cettiのLeuD_H酵素、Erwinia iniectaのKivD酵素、およびAlcanivorax dieseloleiのAdh酵素を含む。株5942は、Cetobacterium cettiのLeuD_H酵素、Erwinia iniectaのKivD酵素、およびRhizobiales bacterium NRL2のAdh酵素を含む。株5943は、Cetobacterium cettiのLeuD_H酵素、Erwinia iniectaのKivD酵素、およびRhizobiales bacterium NRL2のAdh酵素を含む。オペロンはE. coliのBrnQをさらに含む。試作株は、Bacillus cereusのLeuD_H、Lactococcus lactisのKivD、Saccharomyces cerevisiaeの 40

A D H 2、およびE. coliのB r n Qを含む。

【0185】

上位のLeu消費オペロンおよび試作株からのサンプルをLeu消費について解析した(図8)。上位のLeu消費オペロンを含む株(5941、5942および5943)は、試作株(1980)と比べて、著しく早い速度でLeuを消費する事が見出された。

【0186】

実施例6：LeuDH酵素工学および活性なLeuDH酵素のバイオインフォマティクス解析

表4に示すように、*Bacillus cereus*由来のUniProt P0A392(配列番号27)の変異体を生成し、およびこれらの変異体がUniProt P0A392(配列番号27)と比較して向上した活性または酵素発現を示すのかを決定するために試験を行った。実施例2に記載のLeuDH活性アッセイを用いた。以下の固有の位置における点変異が、活性または酵素発現のいずれかを向上させることが観察された：42、43、44、67、71、76、78、113、115、116、136、293、296、297、および300。

【0187】

UniProt P0A392(配列番号27)における以下の点変異は、活性またはタンパク質の発現のいずれかを向上させることが観察された：A115N、A115Q、A115S、A115T、A115V、A297C、A297D、A297E、A297F、A297H、A297K、A297L、A297M、A297N、A297Q、A297R、A297T、A297W、A297Y、E116A、E116L、E116M、E116N、E116R、E116S、E116V、E116W、G43E、G43F、G43T、G43W、G43Y、G44H、G44I、G44K、G44Y、I113F、I113M、I113Q、I113V、I113W、I113Y、L300A、L300C、L300D、L300F、L300H、L300K、L300M、L300N、L300Q、L300R、L300S、L300T、L300W、L300Y、L42A、L42Q、L42T、L76E、L76F、L76H、L76I、L76K、L76M、L76R、L76S、L76T、L76W、L76Y、L78C、L78F、L78H、L78K、L78Q、L78V、L78Y、M67A、M67E、M67K、M67Q、M67S、M67T、N71C、N71D、N71H、N71K、N71M、N71T、T136E、T136F、T136L、T136R、T136S、T136Y、V293A、V293C、V293Q、V293S、V293T、V296A、V296C、V296E、V296I、V296K、V296L、V296N、V296S、およびV296T。

【0188】

配列番号27の変異体およびメタゲノムライブラリーからヒットした配列についてバイオインフォマティクス解析を実施した。ヒットに見られた固有の残基のリストを以下の表7に示す。配列番号27における対応する位置を示す。ヒットは、配列番号27と比較して活性が上昇(0より大きい)したLeuDHである。多重配列アライメントの各位置について、個々の残基の同一性をヒットと非ヒットにビン化し、セット差を算出した。これらは、規則的な点変異ライブラリーまたはメタゲノム配列のいずれを介して、ヒットセットに固有である残基である。

【0189】

実施例7：活性なKivD酵素のバイオインフォマティクス解析

配列番号29と比較して上昇した活性を示すヒットKivD酵素についてバイオインフォマティクス解析を行った。ヒットに見られた固有の残基のリストを表8に示した。多重配列アライメントの各位置について、個々の残基の同一性をヒットと非ヒットにビン化し、セット差を算出した。これらは、ヒットセットに固有である残基である。配列番号29における対応する位置を表8に示した。

【0190】

10

20

30

40

50

Lactococcus lactis に由来する UniProt Q684J7 は、バターミルクおよびチーズの生産に広く用いられている微生物である。天然酵素に名付けられた反応ではないが、KiVD は、4-メチル-2-オキソペンタン酸の脱カルボキシル化を触媒し、イソペントノールを生成する。KiVD 酵素ライブラリーのヒットは、その天然の基質、ケトイソバレートを超えた広い基質特異性を有する事が見出された。

【0191】

実施例8：活性なADH酵素のバイオインフォマティクス解析

配列番号31と比較して上昇した活性を示すヒットAdh酵素についてバイオインフォマティクス解析を行った。ヒットに見られた固有の残基のリストを表9に示した。多重配列アライメントの各位置について、個々の残基の同一性をヒットと非ヒットにビン化し、セット差を算出した。これらは、ヒットセットに固有の残基である。配列番号31における対応する位置を表9に示した。

10

【0192】

実施例9：イソペントノール経路のモルバランスの閉鎖

株5941におけるイソペントノール経路の性能およびモルバランスの閉鎖を、AMB R（登録商標）15バイオリアクターで評価した。株5941は配列番号2のLeuD H酵素、配列番号18のKiVD酵素、および配列番号24のAdh酵素を含む。リアクターを、0.5%グルコース、10 mM Leu、10 mM Val、および5 mM Ile を含む17 mLのM9培地で満たした。条件は、溶存酸素0%、pH 7.0に調整した。活性化したバイオマスをOD600が1となるように植菌し、および上清サンプルを経時に採取し、代謝産物の濃度を監視した。

20

【0193】

経路中間体の細胞外濃度のグラフを図10に示す。180分の間に、4.1±0.3 mMのロイシンが消費され、および4.4±0.5 mMのイソペントノールが培地中に蓄積された。ケト酸（2-オキソイソカプロエート）およびアルデヒド（イソバレルアルデヒド）は上清中に観察されなかった。よって、経路の流量は釣り合っており、そのことが確認された。これはまた経路中間体の合計モル量が保存されていることからも示される（図10の「合計」に対応するデータ）。

20

【0194】

方法 - 発酵

30

このアッセイは、AMB R 15 f、Sartorius社製のマイクロバイオリアクターシステムで行われた。容器には、2.0 mM MgSO₄、0.1 mM CaCl₂、5% グルコース、10 mM L-ロイシン、5 mM L-イソロイシン、および10 mM バリンを添加した、17 mLの1×M9塩類培地を満たした。容器は、pHおよびDOの光学式検出デバイス(optode)の両者を水和させるために、植菌の18時間前に満たしておいた。リアクターの温度は37℃を保ち、2 N NaOHを用いてpHを7で維持し、および0.14 vvm N₂の流量で溶存酸素を0に保った。500 RPMで攪拌を設定し、実験中は十分に攪拌されるようにした。バイオリアクターにOD600が1となるようにSynlogic社から供された活性なバイオマスを植菌した。バイオリアクターは、植菌から0、30、90、150、および180分後にサンプリングした。サンプルはすぐに15000×gで30秒間、微量遠心機で遠心分離し、および上清を取り除き解析に供した。上清は解析の準備ができるまで-20℃で保存した。

40

【0195】

方法 - 解析法

40

2つの方法についての解析法を開発した。1つの方法はロイシン(Leu)、ケトイソカプロン酸(Leu酸)、およびイソバレルアルデヒト(Leuアルデヒド)の定量のための液体クロマトグラフィー質量分析(LCMS)に関するものである。この方法はまた、バリンおよびイソロイシン(およびそれらの酸およびアルデヒド産物)の定量のためにも有効であり、使用された。2つ目の方法は、イソペントノールの定量のためのガスクロマトグラフィー質量分析(GCMS)に関するものである。合わせて、これらの分析方法

50

により株 5 9 4 1 の全ての経路中間体の定量が可能であった。G C M S 法はまた、バリンおよびイソロイシンのアルコール産物の定量のためにも有効であり、使用された。

【 0 1 9 6 】

L C M S 解析は、Thermo Ultimate 3000 U P L C システムと、Thermo Q - Exactive quadrupole - orbitrap mass detector、および Thermo Accucore P F P カラム (2.1 × 100 mm、2.6 μm パッキング) で、以下の溶出溶媒を用いて行われた：A = 0.1% ギ酸および 0.1% T F A (水中)；B = 0.1% ギ酸 (アセトニトリル中)。グラジエントは 0.5 mL / min で A に対して 1% の B で 60 秒間、その後 270 秒間で A に対して 1% から 40% の B まで直線的に上昇させた。その後、カラムに A に対して 95% の B を 60 秒間流し、A に対して 1% の B で 180 秒間再平衡化した。M S の取得時間は 0.8 分から 5.3 分であった。

【 0 1 9 7 】

カラムの流出液は、Thermo 社の標準的な E S I ソースを介して質量分析計に導入され、ポジティブモードイオン化電圧 + 3800 V、気化器温度 400、およびイオン伝導管温度 375 の条件であった。Thermo 社は、ガス流量を任意単位で報告しているが、おそらく S T P で L / min に近似したものである。設定値は以下であった：シースガス 60、補助ガス 30、スイープガス 1。データ取得速度を上げるために、orbitrap の分解能を 17500 に設定。四重極の分解能は 1 m / z であった。

【 0 1 9 8 】

この方法ではまた、アルデヒドおよびケト酸の両者を誘導体化し、これらの分析物の安定性を向上させる。多数の誘導体化剤が検討され、メタノール中の 2-(ジメチルアミノ)エチルヒドラジンが、ポジティブモードで最もよい感度をもたらす事が見出された。メタノール中の 0.5 M 酢酸および 0.5 M 酢酸ナトリウム緩衝液は、L E U 酸および L E U アルデヒドの定量に使用されるとともに、非誘導体化 L E U の測定にも使用された。

【 0 1 9 9 】

G C - M S 分析は、Agilent GCMS / MSD と Gerstel autosampler を使用し、J & W DB - WAX GC カラム (15 m) と抽出溶媒としてクロロホルムを用いて実施した。フロントインジェクターは 250、および流速 1 mL / 分に設定した。オープンの温度を 40 で 1 分間保持した後、130 まで上昇 (15 / 分) させ、その後 200 まで急上昇 (65 / 分) させた。M s の取得スキャンウィンドウは 40 - 150 m z で、M S ソースと M S クワッドはそれぞれ 250 と 200 に設定した。

【 0 2 0 0 】

ハイスループットおよび自動化を促進するために、Gerstel autosampler を用いて、抽出した底部クロロホルム層を 96 ウェルプレートの形式に注入し、その上に水性 amb r 15 培養マトリックスを覆いとして機能させ、産物の蒸発を防止した。その他の潜在的なアルコール産物の蒸発を考慮して、内側の覆いとして 2 - ヘプタノールを添加した。

【 0 2 0 1 】

表 3 に記載の酵素の配列

LeuDH (識別子 : t 1 6 0 9 4 6 ; アクセッション番号 : A 0 A 1 T 4 P G G 9)
AT G A A C A T C T T C A A G A A A A T G G A G G A A T T T A A T T A T G A A C
A A C T G G T C T A C T T C T A C G A C A G C G A A A C G G A A C T C A A A G G
T A T T A C C T G T A T A C A C A A C A C A A C T T T A G G G G C C G G C A T T G
G G C G G T A C C C G C C T T G G A A C T A T A A C T C T G G C T C G G G G C A T G A C T T A
C C G T T G A A G A C G T A A T C C G T C T G G C T C G G G G C A T G A C T T A
C A A A G C G G C T T G C G C C G G T C T G A A T C T G G G C G G C G G T A A A
A C C G T G C T G A T C G G T G A T G C T A A A A A G A T T A A A T C A G A G T
C C T A C T T C C G T G G A C T G G G G G C G C T A C G T T C A G T C G C T G A A

10

20

30

40

50

CGGCAGATATATCACCGCGGAAGACGTAATACTTCTACG
 AAGGATATGGCATACTGTTGCTATGGAAACTGACTATGTGG
 TAGGCCCTGGGAGGTAATCCGGCAACCCTAGTCCAGTTAC
 TGCTTACGGTGCACTTATGGTATCAAAGCGGCGCTGATG
 AAAAATTTGAGGATAGCTCTATTGAAGGGCGAACCTTCG
 CAGTGCAGGGTGCTGGGCAGACGGTTACTATCTTATCGA
 TTACCTCCTAGGCAACAAACAAGTTCAAAGAAAAGGCTAAA
 AAAATTACTTCACCGAAATTAAACGAGAGCTATATCGAGC
 GTATGAACAAAGAACATCCGGAAGTTGAATTATTATTC
 GGACAAAAATCTACTCGCTGGAAAGTAGACGTTCTCGTGC
 TGCGCCCTGGGCAAAATCGTTAATGACAAAACATATCGATG
 AATTTAAGTGTCCGATCATCGCAGGTACTGCAAAACAAACGT
 ACTGGAAAGGGAAAGCGCAGGGCAACATGCTTAAAGAACGT
 GGCATTCTTACGCCCGGACTATGTGATCAAATGCTGTTG
 GGCTGATCAACGTTTACCAACAGCTGAACGGTTACAATAA
 AGAGAACGCTATTCTGGAAGTGGATTAAATTATGATCGC
 CTACTGGAAATATTCAACATCGCTGATTCTCTGAACATCA
 GCACCAATATCGCTGCCAACGAGTTCGCGGAAAAACGTAT
 CAAGCAAATTAGTCCTTGA AAAACAAACTTCATTAAACGC
 (配列番号1)

MNIFKKMEEFNYEQLVYFYDSETELKGITCIHNTTLGPAL
 GGTRLWNYNSEEDAVEDVIRLARGMTYKAACAGLNLGGK
 TVLIGDAKKIKSESYFRGLGRYVQSLNNGRYITAEDVN
 KDMAYVAMETDYVVGLGGKSGNPSPVTAYGAFMG
 KKFEDESSIEGRTFAVQGAGQTGYYLIDYLLGN
 NKFKEKAKKIYFTEINESYIERMNKEHPEVEFISPD
 KIYSLEVDVFVP CALGKIVNDKTIDEFKCPIIAGT
 ANNVLEREAHGNMLKER GILYAPPDYVINAGGLIN
 VYHELNGYNKENAILEVELIYDR LLEIFNIADSLN
 I STNIAANEFAEKRIKQIKSLKNNFIKR
 (配列番号2)

LeuDH(識別子:t160389;アクセッション番号:A0A1M6BE59)
 ATGGTAGAGATCAAGGCTTTGACGGACACTTCCGT
 GGCAAAATTGCAAGAACACCAGCATGAACAGG
 TCGTATTCCACGATCACGAAACCGGCC
 TCCGTGCATCGTATT
 CATAACACAGTTCTTGGCCCGCCTTA
 GGTGGCACTATGCTTCTGACGCAGAGGG
 GCTGAATGATGTTCTGCGTCTGCG
 CGTACTATGCTGCGGGTATGACCT
 ACAAGCTGCTATAAGTGGCCTGA
 AACCTGGGTGGCAGGGTGGCGGT
 TAAAGCAGTGAATGGTAAATACATC
 ACTGCTGAAGATGTCAACATGACT
 ACACAAAGCAGCTTGCTGGCTTAC
 CCTGAATGGGTGGAAAGCAGGGT
 GATCCGGTCACTCTGGCTGGCA
 AAACGTATCGCTGT
 TTTGGTACGTATATGGGCAT
 GAAAGCGGGCGGCC
 AAAAGCGTTCTGGCTGGCA
 AAACGTATCGCTGT
 TCAGGGTGTAGGT
 CATGTCGGC
 ACTTACCTGTTGGAGTAT
 TTGCAGAAGGAAGGTGCT
 TAAGCTGGTACTGACT
 GACTACTATGAAG
 AGATCGTGC
 CCTGGAGGCAG
 GCAACGCG
 TTTTGGCGC
 AAAAATGG
 TGGCCTGG
 GACGAAATT
 TACGATCAAG
 GACGTT
 GATATCT
 ACAGTCC
 ATGTGCT
 CTTGGAG
 CTACCCATT
 AACG

10

20

30

40

50

A T G A C A C T A T C G G T C G C C T G A A A T G C C A G G T T A T C G C T G G
 T T G C G C A A A C A A C C A G C T G C A A A A C G A A A A T G T G C A T G G C
 C C G G C C C T C G T G G A G C G C G G G A T T G T G T A C G C T C C G G A T T
 T C C T G A T C A A C G C C G G C G C T G A T C A A C G T T T A C T C G G A
 A G T A G T G G G T A G C T C C C G T C A G G G T G C T T T G A A C C A G A C C
 G A A A A A A T T T C G A C A T C A C C A C T C A G G T T C T A A A C A A A G
 C G G A A C A A G A G G G T T C T C A C C C G C A G G C G G C A G C T A C T A A
 G C A G G C T G A A G A G C G T A T T G C A A G C C T G G G C A A A G T T A A G
 A G C A C C T A C (配列番号3)

M V E I K A L T D T S V F G Q I A E H Q H E Q V V F C H D H E T G L R A I I G I 10
 H N T V L G P A L G G T R M W H Y A S D A E A L N D V L R L S R G M T Y K A A I
 S G L N L G G G K A V I I G D A K T L K T E A L L R K F G R F V K N L N G K Y I
 T A E D V N M T T K D M E Y I R M E T K H V A G L P E S M G G S G D P S P V T A
 F G T Y M G M K A A A K K A F G S D S L A G K R I A V Q G V G H V G T Y L L E Y
 L Q K E G A K L V L T D Y Y E D R A L E A A T R F G A K M V G L D E I Y D Q D V
 D I Y S P C A L G A T I N D D T I G R L K C Q V I A G C A N N Q L Q N E N V H G
 P A L V E R G I V Y A P D F L I N A G G L I N V Y S E V V G S S R Q G A L N Q T
 E K I F D I T T Q V L N K A E Q E G S H P Q A A A T K Q A E E R I A S L G K V K
 S T Y (配列番号4)

LeuDH(識別子:t160283;アクセッション番号:A0A1S9B636) 20

A T G G T A G A G A T C C A G G C T T T G C C G G A A A C T T C C A T T T T G
 G G C A A A T C G C A G A C C A C C A G C A T G A A C A G G T G G T C T T C T G
 C C A C G A T C A C G A A A C C G G C C T C C G T G C G A T A A T C G G T A T T
 C A T A A C A C G G T T C T T G G C C C C G C C T T A G G T G G A A C T C G C A
 T G T G G C A C T A T G C T A C C G A G G C A G A A G C G C T G A A T G A C G T
 T C T G C G T C T G T C T C G C G G T A T G A C C T A C A A G G C T G C T A T C
 T C G G G C C T G A A C C T G G G T G G C G G T A A A G C A G T A A T C A T T G
 G G G A T G C C A A A A C A A T C A A A A C C G A A G G C G C T G C T G C G G A A
 A T T C G G C A G A T T C G T G C A G A A C C T G A A T G G T A A A T A C A T C
 A C T G C T G A A G A C G T T A A C A T G A C T A C A A A G G A T A T G G A G T 30
 A C A T T A G G A T G G A A A C C A A A C A C G T C G C T G G C T T A C C T G A
 A A G T A T G G G T G G A A G C G G G T G A C C C G T C A C C G G T A A C T G C A
 T A T G G T A C G T A C A T G G G C A T G A A A G C G G G C G G C C A A A A A G G
 C G T T T G G C T C T G A T T C C C T G G C T G G C A A A C G T A T C G C T G T
 T C A A G G T G T G G G T C A T G T T G G C A C T T A T C T G C T T G A G C A T
 T T G A C C A A A G A A G G T G C T C A G A T T G T G C T G A C T G A C T A C T
 A T A A G G A A C G T G C C G A G G A A G C A G G C G C G C G T T T G G C G C
 A C A G G T T G T T G G C C T G G A C G A T A T C T A C G A T C A A G A G G T C
 G A C A T T T A C T C T C C A T G T G C T C T C G G T G C T A C C A T C A A C G
 A T G A C A C T A T C G A T C G C C T G C G T T G C G C T G T T G T A G C C G G 40
 T T G C G C A A A C A A C C A G C T G A A A G A A G A A A A C G T C C A C G G T
 C C G G C G C T G G T T G A G C G C G G G A T A G T A T A C G C C C C A G A C T
 T C C T G A T C A A T G C A G G T G G C C T G A T T A A C G T G T A T A G C G A
 A G T T A C A G G G T C T A C C C G T C A G G G G G C T T T A A C T C A G A C C
 G A A A A A A T C T A T G A C T A C A C A C T C C A A G T T C T G G A A A A A G
 C C G C G G C T G A A G G T C T G C A C C C G C A G C A G G C T G C G A T C C G
 T C A G G C G G A A C A A C G C A T C G C T G C A A T T G G T A A G G T G A A A
 A G C A C C T A C (配列番号5)

M V E I Q A L P E T S I F G Q I A D H Q H E Q V V F C H D H E T G L R A I I G I
 H N T V L G P A L G G T R M W H Y A T E A E A L N D V L R L S R G M T Y K A A I 50

S G L N L G G G K A V I I G D A K T I K T E A L L R K F G R F V Q N L N G K Y I
 T A E D V N M T T K D M E Y I R M E T K H V A G L P E S M G G S G D P S P V T A
 Y G T Y M G M K A A A K K A F G S D S L A G K R I A V Q G V G H V G T Y L L E H
 L T K E G A Q I V L T D Y Y K E R A E E A G A R F G A Q V V G L D D I Y D Q E V
 D I Y S P C A L G A T I N D D T I D R L R C A V V A G C A N N Q L K E E N V H G
 P A L V E R G I V Y A P D F L I N A G G L I N V Y S E V T G S T R Q G A L T Q T
 E K I Y D Y T L Q V L E K A A A E G L H P Q Q A A I R Q A E Q R I A A I G K V K
 S T Y (配列番号6)

LeuDH (識別子 : t 1 6 0 4 3 4 ; アクセッショント番号 : A 0 A 1 D 2 R X B 2)

AT G A T C T T C G A G A C A A T T T C T A C G T C G A A T C A C G A A G A A G 10
 T T G T G T A T T G C C A T A A C A A G G A C G G C C G G C T T G A A A G C A A T
 C A T C G C G A T T C A C A A C A C T G T A C T C G G T C C G G C T C T G G G T
 G G C A C T C G C A T G T G G C C C T A C G C T A G C G A A G A G G A A G C A C
 T G A A A G A T G T C C T T C G T T T A T C C C G T G G G A T G A C C T A C A A
 A G C T G C G G T T T C A G G T C T A A A C C T G G G C G G C G G T A A A G C T
 G T G A T C T G G G G T G A T C C G A A T A A A G A C A A G T C T G A A G C G C
 T G T T T A G A G C C T T C G G A C G G T T T G T A A A C A G C C T G G G C G G
 A C G C T A C A T T A C C G C G G A G G A C G T T G G C A T T G A T G T T A A C
 G A C A T G G A A T A T G T G C T G C G T G A A A C T G A T T A C G T C A C C G
 G T G T A C A T C A G G T T C A C G G T G G G A G T G G T G A T C C T T C T C C 20
 A T T C A C C G C A T A T G G C A C T C T G C A A G G C C T G A T G G C C G C T
 C T G C A A G T G A A A T T C G G T A A C G A A G A C G T A G G C A A T T A C A
 G C T A C G C T G T T C A G G G T G T G G G T C A C G T T G G C A T G G A A T T
 T G T T A A A C T G C T G C G T G A G C G C G G T G C A A A G G T T T C G T C
 A C T G A C A T C A A C A A A G A T G C G G T C C A G C G T G C T G T G G A C G
 A A T T T G G T T G T G A G G G C A G T A G C C C T G G A T G A A A T C T A T G A
 C G T T G A T T G C G A C G T G T A C T C C C C G A C C G C T C T G G G C G G C
 A C C G T G A A C G A T A A A A C T T T A C C G C G T C T G A A A T G T A A G G
 T A A T C T G C G G T G C G G C A A A C A A C C A G T T A G C T A A T G A T G A
 G A T A G G C G T G G A A C T G G A A A A A A A A A G G C A T C C T C T A T G C T 30
 C C G G A C T A C G C G G T C A A C G C G G G T G G G C T G A T G A A C G T T A
 G C C T G G A A A T C G A T G G A T A C A A C C G C G A A C G T G C G A T G C G
 T A T G A T G C G T A C C A T T T A T T A C A A T T T G G G T C G C A T T T C
 G A A A T C T C T A A G C G C G A C G G C A T C C C T A C A T T C C G A G C C G
 C C G A T C G T A T G G C T G A A G A A C G C A T A A C G G C C A T C G G T A A
 A C T G C G T T T A C C G C A T T T G G G C G T C G C G G C A C C G C G C T T C
 C A G G G C C G A C G T G G C A A C (配列番号7)

M I F E T I S T S N H E E V V Y C H N K D A G L K A I I A I H N T V L G P A L G
 G T R M W P Y A S E E E A L K D V L R L S R G M T Y K A A V S G L N L G G G K A
 V I W G D P N K D K S E A L F R A F G R F V N S L G G R Y I T A E D V G I D V N 40
 D M E Y V L R E T D Y V T G V H Q V H G G S G D P S P F T A Y G T L Q G L M A A
 L Q V K F G N E D V G N Y S Y A V Q G V G H V G M E F V K L L R E R G A K V F V
 T D I N K D A V Q R A V D E F G C E A V A L D E I Y D V D C D V Y S P T A L G G
 T V N D K T L P R L K C K V I C G A A N N Q L A N D E I G V E L E K K G I L Y A
 P D Y A V N A G G L M N V S L E I D G Y N R E R A M R M M R T I Y Y N L G R I F
 E I S K R D G I P T F R A A D R M A E E R I T A I G K L R L P H L G A A A P R F
 Q G R R G N (配列番号8)

LeuDH (識別子 : t 1 6 0 0 4 8)

A T G C A G A T C T T C G A C A C T T T G C A A T C A A T G G G C C A T G A G C
 A G G T G G T C C T A T G T A G C G A T A A G A C C A C G G G T C T G C G C G C 50

CATTATCGCTATAACACGATAACATCCTTAGGGGCCGGCGCTT
 GGTGGTACCCGTATGTGGCAGTATGCAACTGACGACGATG
 CTATTACTGACGCACCTCCGTCTGTCCTCGGGCATGACCTA
 CAAAGCTGCGGTTCTGGCGTAAATCTGGCGGTGGTAAAG
 GCCGTTATCATCGGAAACCCCTCACAGTGATAAAAAGCGAAG
 CGCTGTTTCGCGCTTACGGCAGAATGGTGGAAATCCCAGCG
 TGGGCGTTACATCACCGCCGAAGACGTTGGTACTAGCGTA
 CGTGATATGGAGTGGATTCGCATGGAAACCAAATATGTAA
 CGGGCGTGGTGGCAACGGAGGCTCTGGTGACCCCTCTCC
 AGTTACCGCTCTGGTGTAACTCGGGCATGAAAGGCATGC 10
 GCTAAATCAGTCTATGGTACTGATGCGCTGAGCGGTAAAG
 GGATCGTGGTTCAAGGGCGCGGGTAAACGTTGCATCCCAC
 GTGGTCAAGTCTGGTAAAGAAGGGCCTAACAGCATTAGCGGCTG
 ACTGACATCTACGAAGAAAAGGCCAACAGCATTAGCGGCTG
 AAACGGGCGCTACCGTGATTCGCACCGACGAGGTTTTAC
 TACACAATGCGATATCTTCTCTCCGAACGCTCTGGGGCC
 GTCCCTGAACGATGAAACTATTCCGCAGCTCACATGCGCTA
 TCGTAGCTGGTGGTGAAACAAATCAGCTTAAAGATCGAAC
 ACGTCACGCCACGGCTCTGCAAGAGAAAGGCATTCTGTAT
 CGGCCGGATTACGTAATCAACGCCGGGGCCTCATGAATG 20
 TGGCGAGCGAAAGTTGACGGCTACAACCGTGAAGAAGGTTAT
 CGGCCAGGTGAAAGGTATTTACGATATTACTATGAACATC
 CTAATACCGCGCGTGAAGCGTAACATCCTGACCATCGAAC
 CATCCAACGCGATTGCTGAAGAGAGCGGATCAACAAAGTTCG
 CCATGTTCACGGGAACCTTCATCGGTTCCCCGTCTATTGCG
 GGAGTA (配列番号9)
 MQIFDTLQSMGHEQVVLCSDKTTGLRAIIIAIHDTSLGPAL
 GGTRMWQYATDDDAITDALRLSRGMTYKAAVSGVNLGGGK
 AVIIGNPHSDKSEALFRAYGRMVESQRGRYITAE DVGTSV
 RDMEWIRMETKYVTGVGGNGGSGDPSPVTLGKVYSGMKAC 30
 AKSVYGTDA LSGKRIVVQGAGNVASHLVHSLVKEGAVV
 FVTDIYE EKAKALAAETGATVIRTDEVFTTQCDIFSPNALGA
 VLNDETIPQLTCAIVAGGANNQLKIEQRHATALQEKGILY
 APDYVINAGGLMNVA SEVDGYNREKVMRQAEGIYDITMNI
 LNTARERNILTIEASNAIAEERINKVRHVHGNFIGSPSIR
 GV (配列番号10)
 LeuDH (識別子 : t160141 ; アクセッション番号 : A0A0J1FEE3)
 ATGACAAACGTTCGAGTATATGGAAAAGTACGACTACGAAC
 AACTGGTCCTTGTCAAGGATAACACTTCTGGCCTCAAAGC
 AGTAATTTCGATCCATGACACCACTCTGGGGGCCAGCTTTG 40
 GGTGGCACCCGTATGTGGAAATTACGCCAGTGAAGAAGATG
 CTATCCTGGATGCGTTACGCCCTGGCGAGGTATGACTTA
 TAAAAACGCTGCCGCAGGTCTGAACCTGGCGGCGGTAAAG
 GCTGTTATTATGGGGCGACAGCCGTACCCAGAAATCAGAGG
 AACCTGTTTCGCGCGTTGGTACGTGCAAGGCGCTGAA
 CGGCCGTTATATCACCGCTGAGGACGTTGGTACTAACGTA
 CAAGATATGGACTGGATACACATGGAAACAAAGTTGTGA
 CGGGGATCTCCCTTCTGACGGTACGGTGCCTAGCGGAGATCCGTC
 CCCTCTGACCCGCACTGGCGTTAACCGCGGTTATGAAAGGCC
 GCCGCAAAAGAAGCGTTGGCAGCGACCTTTAGAGGGTA 50

A A A C T G T T G C T A T T C A G G G T C T T G G C C A C G T C G G C T A T T A
 C C T G G C A A A A C A C C T C A C T G A T G A A G G G C G C T A A A C T G A T C
 G T G A C G G A T A T C A A T T C T G A A G C C G T T A A G A G G G T A G C G C
 G T G A G T T C G T T G C T A C C G C A G T C C G T A C C G A A G A A A T T T T
 C G G C G T T A A A T G C G A C A T C T T G C G C C C T G T G C T C T G G G T
 G C A G T T A T C A A C G A T G A A A C C A T T C C G C A G C T G A A G T G C C
 A G G T A G T T G C C G G T G C T G C G A A C A A T G T G T T G A A A G A G G A
 T C G C C A T G G T G A C G A A C T A T A C G A A A A A G G A A T C C T G T A C
 G C T C C G G A C T A T G T A A T T A A C G C G G G C G G C G T T A T C A A C G
 T G G C C G A C G A A C T G G A A G G T T A C A A C G C T G A A C G T G C T C T 10
 G A A A A A G T T G A G A T G G T A T A T G A T A A T G T G G C A C G C G T C
 A T C G C T A T T G C C A A G C G T G A C C A T A T C C C G A C T T A T A A A G
 C A G C G G A C C G A A T G G C T G A G G A A C G T A T T G C G A A A A T T G G
 C A A A G T T T C C A A C A C T T T C C T G C G C (配列番号 11)
 M T T F E Y M E K Y D Y E Q L V L C Q D N T S G L K A V I C I H D T T L G P A L
 G G T R M W N Y A S E E D A I L D A L R L A R G M T Y K N A A A G L N L G G G K
 A V I M G D S R T Q K S E E L F R A F G R Y V Q A L N G R Y I T A E D V G T N V
 Q D M D W I H M E T K F V T G I S S S Y G A S G D P S P L T A L G V Y R G M K A
 A A K E A F G S D S L E G K T V A I Q G L G H V G Y Y L A K H L T D E G A K L I
 V T D I N S E A V K R V A R E F V A T A V R T E E I F G V K C D I F A P C A L G 20
 A V I N D E T I P Q L K C Q V V A G A A N N V L K E D R H G D E L Y E K G I L Y
 A P D Y V I N A G G V I N V A D E L E G Y N A E R A L K K V E M V Y D N V A R V
 I A I A K R D H I P T Y K A A D R M A E E R I A K I G K V S N T F L R (配列番号
 12)
 K i v D (識別子 : t 1 6 3 9 8 8 ; アクセッショ n 番号 : A 0 A 0 L 0 P 8 D 8)
 A T G T C G G A G A T C A C A T T G G G T A G A T A C C T T T C G A A C G C T
 T A A A C C A A C T G C A A G T G C A G A C T A T T T T G G G C T G C C C G G
 C G A C T T C A A T C T G T C C C T G C T G G A T A A G A T C T A T G A A G T T
 G A T G G C A T G C G T T G G G C A G G T A A C G C T A A C G A A C T C A A C G
 C C G C T T A C G C G G C T G A C G G T T A T A G C C G T G T C A A A G G C C T 30
 C G C A T G T C T G G T T A C C A C T T T T G G T G T A G G G C G A G C T A A G T
 G C G C T G A A T G G T G T G G G T G G G C G C T T A C G C A G A A C A C G T T G
 G G C T G C T G C A T G T A G T G G G C G T C C C A T C A A T C T C T A G C C A
 G G C G A A A C A G C T G C T G C A C C A T A C C C T G G G T A A C G G A
 G A T T T C A C G G T T T T C C A C C G C A T G T C C A A C A A C A T T T C T C
 A G A C C A C G G C T T T T A T C A G C G A C A T T A A T T C T G C T C C T G G
 T G A A A T C G A T A G G T G C A T C C G T G A G G G C T G G G T A C A T C A G
 C G T C C G G T T T A C G T C G G C C T G C C G G C G A A C C T A G T T G A C C
 T G A C T G T G C C G G C G T C T C T G T T A G A C A C T C C G A T C G A T C T
 G T C C T T G A A A A A A C G A C C C G G A T G C C C A G G A A A G A A G T T 40
 A T T G A A A C C G T C C C T T G A T C T G G T A G A C A A G T C T A A A A A C C
 C T A T A A T C T T A G T T G A C G C A T G C G C T A G C C G T C A C T C A T G
 C C G C G A T G A A G T A C G C C G G T T G G T G G A C T C C A C C A G C T T C
 C C G G T T T C G T T A C T C C A A T G G G T A A A T C T G C T G T A A A T G
 A G A G T C A C C C G C G T T T G G C G G T G T T A C G T G G G C A G C C T
 C A G C G A G C C A A A C G T A A A A G A A G C C G T T G A A A A C G C T G A C
 C T G G T G C T G T C C A T A G G C G C C C T G T T G A G C G A C T T C A A C A
 C T G G A T C G T T C T C T T A T T C C T A C A A A A C T A A G A A C A T T G T
 T G A A T T T C A C T C T G A T T A T A C C A A A A T C C G T C A A G C A A C G
 T T C C C G G G T G T T C A G A T G A A A G A A G C A C T G A A T G T C C T G T 50

T G G A A A A A A T C C C G A G C C A T G T C G C T A A C T A C A A A C C T C T
 G C C G G T T C C G C A G C G T C G C G T T A T T C C G A G G C C A G G G G A T
 A A G G C T G C G A T C T C T C A G G A G T G G C T G T G G T C G C G T C T G T
 C T A G C T G G T T C C G C G A G G G C G A C A T C G T C A T T A C A G A A A C
 C G G T A C C A G T G C G T T T G G A A T T G T A C A G T C C T A T T C C C A
 G A T A A C T G C A T C G G C A T C A G T C A G G T G C T G T G G G G T T C G A
 T C G G C T T C A C C G T A G G T G C A A C G C T G G G C G C G G T G A T G G C
 T G C A C A A G A A A T C G A T C C G A A A A A C G T G T G A T T T A T T T
 G T C G G T G A C G G T T C T C T G C A A C T T A C T G T A C A G G A A A T T T
 C T A C C A T G G T T A A G T G G G A A A C C A C T C C C T A C C T G T T T G T 10
 G C T G A A C A A C G A T G G G T A C A C T A T C G A A C G C C T T A T C C A T
 G G C G A G A C T G C T A C G T A T A A C G A T A T T C A G G C G T G G G A T A
 A T C T G G G T C T G T T G C C G C T G T T C A A A G C T C G T G A C T A C G A
 A A C C A A C C G A G T T G C G A C T G T A G G C G A A A T T G A A G C G C T A
 T T C A A C A A T T C A G C T T T C A A T G A G A A T A C A A A G A T C C G T A
 T G G T G G A G G T C A T G C T G C C G C G A T G G A T G C A C C A C A G A A
 C C T G G T T A A A C A G G C T G A A T T T C C T C C A A G A C C A A C A G C
 G A A A A C (配列番号13)
 M S E I T L G R Y L F E R L N Q L Q V Q T I F G L P G D F N L S L L D K I Y E V
 D G M R W A G N A N E L N A A Y A A D G Y S R V K G L A C L V T T F G V G E L S 20
 A L N G V G G A Y A E H V G L L H V V G V P S I S S Q A K Q L L L H H T L G N G
 D F T V F H R M S N N I S Q T T A F I S D I N S A P G E I D R C I R E A W V H Q
 R P V Y V G L P A N L V D L T V P A S L L D T P I D L S L K K N D P D A Q E E V
 I E T V L D L V D K S K N P I I L V D A C A S R H S C R D E V R R L V D S T S F
 P V F V T P M G K S A V N E S H P R F G G V Y V G S L S E P N V K E A V E N A D
 L V L S I G A L L S D F N T G S F S Y S Y K T K N I V E F H S D Y T K I R Q A T
 F P G V Q M K E A L N V L L E K I P S H V A N Y K P L P V P Q R R V I P S P G D
 K A A I S Q E W L W S R L L S S W F R E G D I V I T E T G T S A F G I V Q S Y F P
 D N C I G I S Q V L W G S I G F T V G A T L G A V M A A Q E I D P K K R V I L F
 V G D G S L Q L T V Q E I S T M V K W E T T P Y L F V L N N D G Y T I E R L I H 30
 G E T A T Y N D I Q P W D N L G L L P L F K A R D Y E T N R V A T V G E I E A L
 F N N S A F N E N T K I R M V E V M L P R M D A P Q N L V K Q A E F S S K T N S
 E N (配列番号14)
 K i v D (識別子 : t 1 6 4 0 7 6 ; アクセッション番号 : A 0 A 0 M 5 J J Z 2)
 A T G A C A A G C A T G G A C A A T T C T A G T C A G C A A A T C C C C A T G G
 G T C A G A A A A C C G T C G G G G A G T A C T T G T T C G A T T G C C T C A A
 G C A G G A A G G C A T A A C G G A A A T C T T G G T G T G C C G G G C G A T
 T A T A A C T T C A C C T T A C T G G A C G C C C T G C A A G A A T A C A A C G
 G T A T T C G T T T C T A T A A C G G C C G C A A C G A G G C T G A A T G C T G G
 C T A C G C A G C T G A C G G T T A C G C G C G T A T T A A A G G A A T C T C C 40
 G C G C T A A T C A C T A C T T T G G T G T T G G T G A A C T G T C A G C A A
 C T A A C G C T A T T G C C G G C G C A A C A G C G A A C A C G T A C C T A T
 C A T C C A T A T T G T T G G G T C C C C A C C G G A A A A A G C T C A G A A G
 G A G C G C A A A C T G A T G C A C C A T A C C C T G A T G G A T G G C A A C T
 T C G A C G T A T T C C G T A A A G T T A C G A A C C G C T T A C C G C T T A
 T A C T A C C A T C G T C A C G G C A G A T A A C G C G C G G A T G G G A G A T C
 C C G G C T G C T A T C C G T A T T G C C A A A G A A C G A A G A A A G C C A G
 T G T A C C T G G T T G T T G C G G A T G A C G T A G T G G C T A A A C C G A T
 T A C T G G T C G T G A A G T C C C G G C A T C T C C T C T G C C G G C T A G C
 A A T C A G G A C A A A C T G C T T G C T G C G G T T G A G C A C G T T A G G C 50

GTCTTCTGGAACCTGCACGCCAGCCGGTAATATTGGTTGA
 TGTGAAAGCCATGCGCTTGGATTACAGACCGCCGTCAGG
 GAACCTGGCAAAACACTATGAATGTTCCAGTGGCTACAATGA
 TGTATGGCAAAAGGCACCTTCGACGAAACCCATCCAAACTA
 CATCAGGGTATATGCGGGTACGTTCGGTTCTGAAGGTT
 CAATCTATCGTAGAAAACCTGGACTGTTATCGCCGTTG
 GTTTGGTGTGGAGCGATACTAACACCGCAAACACTTTACTGC
 GAAATTAAACCGCACAAATACCATTGAGGTTCAAGCCGACA
 AAAGTGAACATCGCTGAGTCCCAGTACCCCCGATGTCCTG
 CCGCAGACATCCTGCAAGAAATGCAAGAGCTGGATTATCG 10
 TAGCCAGTCTAAACCGGAAAGAAATCTCATTTCGTACGAA
 GAGATAACCGGGTCCAGTGAACCGCTCCGCGAGAAA
 ACTACTTCCCTCGTTTCAGCGCATGCTGAAGGAAACGA
 TATTGTTATCGCTGAGACCGGCACGTTCTACTACGGTATG
 AGTCAAGTTAAACTGCCCGCAACACTACGTACATCATGC
 AGGGCGGCTGGCAGAGCATTGGTTATGCCACCCGGCGGC
 ATACCGGCGGTCTATCGCTGCTCCGGACCGTCTCGCGTCTTA
 CTGTTCACTGGTGATGGCTCCATGCAGCTGACCGCACAGG
 AAATCTCTTCTATGCTTTATTACGGTTGCAAGCCGATTAT
 CTTTGTACTGAACAAATGACGGGTACACCATTGAGCGGTAT 20
 CTGAATGTAGAAATCTCCCTGACGAAACAAACTATAACG
 ATATTCCGAACCTGGTCTTATACTAAACCTGGCTGAGGCGTT
 CGGTGGTGAACTGTTCACTAAACAGTGCCTACCAATGAA
 GAATTGGATGAAGCGATCACACAGGCTGAGCAAGAGTACG
 CCGAAAAACTGTGCCCTGATCGAGATGATTGCTGCTGATCC
 AATGGACGCAACCGGAATACATGCAACCGTATCCGTAACCAT
 AAGCAGGAACAGAAAAAG (配列番号15)
 MTSMDNSSQIIPMGQKTVGEYLFDCALKQEGLITEIFGVPGD
 YNFTEYNGIRFYNGRNELNAGYAADGYARIKGIS 30
 ALITTFGVGELSATNAIAGANSEHVPIDIHVGSPPPEKAQK
 ERKLMHHHTLMDGNFDVFRKVYEPLTAYTTIVTADNARMEI
 PAAIRIAKERRKPVYLVVADDVVAKPIITGREVPASPLPAS
 NQDKLLAAVEHVRRRLLEPARQPVILVDVKAMRFGLQTAVR
 ELANTMNVPVATMMYKGTFDETHPNYIGVYAGTFGSSEV
 QSIVENSDCVIAVGLVWSDTNTANFTAKLNPHNTIEVQPT
 KVKIAESQYPDVRAADIQLQEMQKLDYRSQSKEKISFPYE
 EITGSSDEPLRAENYFPRFQRMLKENDIVIAETGTFYYGM
 SQVKLPANTTYIMQGGWQSIGYATPAAYGASIAAPDRRVL
 LFTGDGSMQLTAQEISSMLYYGCKPIIFVVLNNNDGYTIERY
 LNVEISPDEQNYNDIPNWSYTKLAEAFGGELFTKTVRTNE 40
 ELDEAITQAEEQEYAEKLCLIEMIAADPMDAPEYMHRIRNH
 KQEQQKK (配列番号16)
 KivD (識別子: t163842; アクセッショントリニティ番号: A0A0L7TB96)
 ATGTCGACGACAACCGTTGGTGACTACTTGCTGTATCGCT
 TAAACGAAATCGGCATTGAGCACCTCTTCGGAGTGCAGG
 TGATTACAATCTGCAATTCTGGATCATGTAATCGACAC
 CCTCAGCTGACTTGGCTGGCTGCACTAACGAACTTAACG
 CTGCCTACGCAGCTGATGGTTATGCGCGTTGTCGTCGGC
 TGCAGGCACTGCTGACCAACCTTCGGGGTTGGCGAACTGAGC
 GCTATTAAATGGCATTGCAAGGTTCTACGGAGTATCTGC 50

CGGTAATAACATATCGTTGGTGCACCGAGTCCTATCAGCCCC
 GCAGCAGGGCGACCTGATTCAACCACCTCTCTTGGCGAAGGT
 GATTTTCCAGCTTCCCTGAGGGATGTCCTCAACCGGTGTCCTG
 TTGCGCAGGCTGCTCTGACTCCTGATAACGCATGCAAGGA
 AATCGACCGCGTACTGGCGGAAGTCCTCATTCAGCGTCGT
 CCCGGCTACCTGCTGCTGTCCTACCGACGTTGGCTGCTGCGC
 CGGCGGCTCTGCCACAAAGCACTCTTCTTTGCCAACCGC
 CCCGGATCATCGCGCAGTTCTGGCTGCTTCAAGCAGCAGCT
 GCTGAGCAGATGCTGGCTCAGGCCAAAAGCGTCTCTCTAC
 TGGCGGACTTTCTGGCTGATCGTTTGGTGTACTCGAGC 10
 ACTGGCCCGGTGGCTTCAGCAGGTTCCGCTACCGCACGCC
 ACTCTGTTAATGGGTAAGGGCTTCTGAGTGAACAGCAAC
 CAGGGTTCGTGGGTACCTACGCTGGTGCAGGATCTATCGA
 TTCGACGCGTGGCGCAATCGAAGAAGCTGGGTAATTATC
 GGAGTGGGAGTTAGATTTCGACACTATCACAGCAGGCT
 TCTCGCAGCAGATCGACGCCCGCTTTATAGACATTCA
 ACCCTTCTCTCGTATTGGCGATCGCCAGTTGATCAC
 CTGCCGATGCAGGCTGCCGTCGAGCCCTGCATCAACTGT
 GTCTTCGTTATCAGCAGTGGCTATCACCGCTCTAG
 CCCGCCCTGCAC TGCCGCCGGCTGCTGGTAGCGAGCTGTCC 20
 CAGAACGCATTCTGGCAGGCGATGCAGAACCTCATCCGCC
 CTGGGGACCTGTTGGTGGCCGACCAAGGTACTGCGGGCGTT
 CGGCGCAGCGGCGCTGCGCTTACCGCAGAATTGCCAGCTG
 CTTGTGCAGCCGCTGTTGGGCTCAATCGTTACAGTCTGC
 CGGCCACCTTGGTGCTCAGACGGCAGATAACAGAGCGTCG
 TGTAACTCTAAATCATTGGCGATGGTTCAAGCAGCAATTAACT
 ATTCAAGGAACCTTCCAGTATGATGCGTGACGGCTTGAAAC 30
 CTATCATCTTCTCCCTGAACAAACAGGTTACACCGTTGA
 ACGGGCGATTCA CGGCCGGAGCAACGTTATAACGATATC
 GCTGCTTGGAAATTGGACCCAACTGCCCAAGGGCGCTGAGTG
 TTCAATTGCCCAAGCGCAGAGCTGGCGAGTCGTTGAAACGGT
 GCAGCTGACCGACGTAATGAAAGTCATCGCTGCTTCTCCG
 CGTCTGAGCTTGGTAGAAAGTTGTTCTGCCCTGCAATGGATG
 TCCCACCGCTGCTGCAAGCAGTGAAGTGGCTCTGAACCCA
 CGGCAACTCCTCT (配列番号17)
 MSTTTVGDYLLYRLNEIGIEHLFGVPGDYNLQFLDHVIDH
 PQLTWVGCTNELNAAYAADGYARCRPAAALLTTFGVGELS
 AINGIAGSYAEYLPVIHVIGAPSLSAQQQGDLIHHSLGEG
 DFSSFLRMSQPVSVAQAAALTPDNACKEIDRVLAEVLIQRR
 PGYLLLSTDVAAAPAAPALPQSTLSSLPTAPDHRRAVLAAFSDA 40
 AEQMLAQAKSVSLLADFLADRFGVTRALAAWLQQVPLPHAT
 LLMGKGVLSEQQPGFVGTYAGAASIDSTRGAIIEEEAGVII
 GVGVRFSDTITAGFSQQIDARRFIDIQPFFSRIGDRQFDH
 LPMQAAVAALHQCLCLRYQQQWSITAPSPPALPPAAGSELS
 QNAFWQAMQNFIRPGDLLVADQGTAAFGAAALRLPQNQNCQL
 LVQPLWGSIGYSLPATFGAQATADTERRVILIIIGDGSAQLT
 IQUELSSMMRDGLKPIIFLLNNNGYTVERAIHGAEQRYN
 AAWNWTQLPQALSVHCPAQSWRVVETVQLTDVMKVIAASP
 RLSLVEVVLPAMDVPPLLQAVSAALNQRNSS (配列番号18)
 Adh (識別子: t159319; アクセッション番号: A0A1E4TMA4) 50

ATGCAGACGGCGTTCTTGTATAAGCCAGGTACGAAAAC
 TAGTGCCTCGGAGATCCCAGATACCTAAAGCTGGCGTG
 CGAAGTCGTTCTGGAAATTAAAGCCGCTGGCATGTGCCAT
 TCCGATCTGCACGTTCTCGACGGTGGAAATCCCCCTGCCGG
 GTCAATTGTAATTGGGCCATGAAATCGTTGGTACTATTCA
 CGAGATCGGCCAGGGACGTGACCGGTTCAAACAGGGCGAT
 CTGTACGCAGTCCACGGCCGAATCCGTGTGGTATTGCA
 CCTGTGCAGAGAAGGATTGATAAACGACTGCACACTACAGT
 GGCAGAAAACCGGTCAGGGTTCTGGACTGGGTCTTGACGGC
 GGCTACCAAGTATATCCGTATCCGAACGTAAGGTCTA 10
 TCGTTAAAGTTCCAGAAGGTGTTCAAGCTGAGGCCAGCTGC
 GAGCTGTACTGATGCAGTACTGACCCCCGTACCGTGCACTA
 AACAGGGCTGGCGCCAGCAACTCTACTCGGGTACTGATT
 TGGGCTGGGCTTAGGTCTGAATGCCCTTAAACTGGC
 TAAGACCTTCGGCAGTTACGTTACGCATCTGACCTGAAA
 CCTTCTGCGGTGAAGCTGCTAACGGCCGCTGGGGCGGATG
 AAGTGCCTGGAGTCCCTGCCGAAGACCCGCTGGGTGTTGA
 TATCGTGTAGACGTCGTTGGCGTGCAGAGCACCTTCAAC
 CTCGCTCAAAACACGTTGGCCCGCTGGCATCATTGTAC
 CTGTAGGCCCTGGCATCCCCACAGCTTCTGTTAACCTAAC 20
 GGATCTGGCGCTCCCGGAAATTCTGTTCAAGGGCACTTT
 TGGGGCACGAGCAATGAGCTGGCTGAATGTTCTGCGCCTGT
 GCCAGCTGGGCCTGATCAACCCGAAATATACTGTGGTGCC
 TCTTGAAGAAGCGCCGAAATATAATGGAAGCAATGGCTCAT
 GGGAAAGTAGAAGGTGTTCCACCCG (配列番号 19)
)
 MQTAFLYKPGHENLVRSEIPIPKAGRGEVVLEIKAAGMCH
 SDLKVLDGGIPLPGQFVMGHEIVGTTIHEIGQDVTFKQGD
 LYAVHGPNPCTCGICLCREGFDDNDCTTVAKTGQWFGLGLDG
 GYQKYIRIPNVR SIVKVP EGVS AEEAASCTDAVLTPYRAL 30
 KQAGASNSTRVLILGLGGLGLNALKLAKTFGSYYASDLK
 PSAREAAKAAGADEVLES L P E D P L G V D I V L D V V G V Q S T F N
 LAQKHVGPRGIIVPVGLASPQLSFNLTDLALREIRVQGTF
 WGTTSNE LAECLRLCQLGLINPKYT VVPLEEAPKYM EAMAH
 GKVEGRIVFHP (配列番号 20)
 Adh (識別子 : t159028 ; アクセッション番号 : A0A192IDS9)
 ATGCGCAGCATGCAGTTGATGAGTACGGTGCACCCCTGA
 AAGCGTTCTCATATGAAGACCCGACCCCGCAAGGGAGG
 AGTAGTCGTTAGGATCGAACGCCCTGTGGTGTGCACACT
 GATATTCATCTCACGAGGGCTACTTCGACATGGGGCGGTG 40
 GCAATAAAGCTGATGTTACTCGTGCCTCGCGAACCTCC
 TACATTGGGTCATGAAATCGTTGGCGAAGTGGTAGCAACT
 GGACCAGGTGTCACCGGCGCTAACCCGGCGACAAACGTA
 TTGTGTACCCGTGGATCGGGTGC GGCGACTGCCCGAAATG
 CAACAGTGGTAGGGATCAGTCCCTGTGCACGTCCACGTAAC
 CTGGGTGTTCACGTTGACGGTGGCTATTGACGACGTAA
 AGATACCGGACGAAAAATTCTCTGTTCGCCCTACGATGGTAT
 TCCTACTGAGTTAGCGGGAACCTATGCTTGCAGCGGCATC
 ACCGCTTATGGTGCAC TGATGAAAGCAAAGGAAGCGGGCTG
 AAAGATCTGGCTACATCGGTCTGATTGGCGCTGGTGGCGT 50

T G G C A T G G C T G G T C T G A T G C T G G C C A A A G C A G C G A T C G G G
 G C T A A A A C T G T A G T C T T G A T A T C G A C G A C G C A A A A C T G G
 A A G C T G C G A C C C G T G C C G G G G C G G A T T A C G T G T T C A A C T C
 C G G T G C A A A A G A A A C A C G C A A G G A A G T T A T G A A A C T A A C G
 A A T G G T G G C C T G T C T G G T G C T G T T G A T T T C G T T G G C A G C G
 A T A A A A G C G C T C T G T T G G A A T C A A C G C C T T G G G T C A G A A
 C G G C G T G C T G G T C A T A A T T G G A C T G T T C G G T G G C G C T A T G
 A C T G T T C C G G T A C C C C T G T T C C C G C T G C A A G A G A T G A G T G A
 T A T G A T G G A G T T A G T T C G C G C T G G G A A A G T T C C T C C G A T G 10
 C C G G T A A A A A C T C G G C C A C T G G A C G G C T G C C T G G G A A A C C C
 T T G A G G A T C T A C G C C A T G G T A A A A T C G T G G G C C G T G T T G T
 T C T G A C C C C A (配列番号 21)
 M R S M Q F D E Y G A P L K A F S Y E D P T P Q G K E V V V R I E A C G V C H S
 D I H L H E G Y F D M G G G N K A D V T R A R E L P F T L G H E I V G E V V A T
 G P G V T G A K P G D K R I V Y P W I G C G D C P K C N S G E D Q S C A R P R N
 L G V H V D G G Y S T H V K I P D E K F L F A Y D G I P T E L A G T Y A C S G I
 T A Y G A L M K A K E A A E R S G Y I G L I G A G G V G M A G L M L A K A A I G
 A K T V V F D I D D A K L E A A T R A G A D Y V F N S G A K E T R K E V M K L T
 N G G L S G A V D F V G S D K S A L F G I N A L G Q N G V L V I I G L F G G A M 20
 T V P V P L F P L K G I T V R G S Y V G S L Q E M S D M M E L V R A G K V P P M
 P V K T R P L D A A W E T L E D L R H G K I V G R V V L T P (配列番号 22)
 A d h (識別子 : t 1 5 8 5 3 8 ; アクセッション番号 : A 0 A 0 P 1 J 1 W 4)
 A T G A C A G C G G A G C A G C A A A A T G G G G T A T C C G A C T C A C G C C
 G T T T C G A A T T T C A G G A A T T T G G T G G C C C T A T C G C C C C A C A
 G A C C T A T C A G C T C C C C G C A C C G G C T A G C G A T G A A G T T T G
 T T A A A G G T G A A C T A C T G C G G T G T C T G T C A C A G T G A T G T T C
 A T C T T C A C G A C G G C T A C T T C G A G C T G G G T G G C G A T A A A C G
 T C T G A A C T T C G C T A T G C C G C T G C C G C T G A C G C T G G G T C A C
 G A A G T A A T T G G C A C C G T T G T G G C T G T C G G C G A C C A G G T T A 30
 C T G G T G T A A A A C C G G G G A C C A G C G A C T G A T C T A T C C G T G
 G A T A G G T T G C G G A A A A T G C G G C G C G T G T C A A A A A G G A G A A
 G A A A A C C T G T G C G T T A C T C C T G C A C A T C T G G G C G T G A A C A
 A G C C G G G C G G T T A C G C T G A T C A C A T C G T T G T A C C C C A T T C
 T C G C T A C C C T C G C G T G C T C C G G C C T G A C C A C T T T C A G C G
 C G A T C A A C A A A G T G T T G C C G C T T G C A G A T G A C C A G T G G A T
 T G T T G T T A T C G G T T G T G G G C C T C G G C C A G A T G G C G C T G
 C G T A T C C T G C A A G C T A T G G G A A T T G G C A A T G T T A T C G G T A
 T T G A C C T G T C T G A A G A G A A A C G G A A A C T G G C T C A T G A A A G 40
 C G G T G C A C G T C A C T C C T T C G A T C C A A A C A C T C C G A A G C T G
 A A C C G C G T G G T C G C C G A A A C C T G C C C G G G T A C G G T A C A G G
 C C G C G T T A G A C T T T G T G G G C A A T G A G C A A A C T G C T C A G C T
 G G C A C T G T C T C T G C T T G G A A A A G G T G G C A A A T A T G T T C C T
 G T C G G G C T G C A C G G C G G C G A G C T G C G T T A C C C A T T G C C G A
 T C A T C A C G A A C A A A G C T G T A A G T A T C A T C G G T T C T T A C G T
 T G G T A C C C T G A A A G A A C T G G A A G A C T T A G T T G C T T T C G C C
 A A G G A A A A A A A T C T G C C G C C A A T T C A T A T T G A A C A C C G C C
 C G C T G G A A T C G G C G G C T C A G G C C G T A G A G G A C C T G G A A A A
 A G G A C A G G T T G C T G G G C G T G T T A T C C T G G A T G C A G G T A A C 50

(配列番号 23)

M T A E Q Q N G V S D S R R F E F Q E F G G P I A P Q T Y Q L P A P A S D E V L
 L K V N Y C G V C H S D V H L H D G Y F E L G G D K R L N F A M P L P L T L G H
 E V I G T V V A V G D Q V T G V K P G D Q R L I Y P W I G C G K C G A C Q K G E
 E N L C V T P A H L G V N K P G G Y A D H I V V P H S R Y L L D I S G L N P G D
 A A T L A C S G L T T F S A I N K V L P L A D D Q W I V V I G C G G L G Q M A L
 R I L Q A M G I G N V I G I D L S E E K R K L A H E S G A R H S F D P N T P K L
 N R V V A E T C P G T V Q A A L D F V G N E Q T A Q L A L S L L G K G G K Y V P
 V G L H G G E L R Y P L P I I T N K A V S I I G S Y V G T L K E L E D L V A F A
 K E K N L P P I H I E H R P L E S A A Q A V E D L E K G Q V A G R V I L D A G N 10

(配列番号 24)

G F P (ネガティブコントロール)

A T G A C C G C A C T T A C G G A A G G G G C A A A A A C T G T T T G A G A A A G
 A G A T A C C G T A T A T A A C C G A A C T G G A A G G G C G A C G T A G A A G G
 G A T G A A A T T T A T A A T T A A A G G G C G A G G G G A C C G G G G A C G C G
 A C C A C G G G G A C C A T T A A A G C G A A A T A C A T A T G C A C T A C G G
 G C G A C C T G C C G G T A C C G T G G G C A A C C C T G G T G A G C A C C C T
 G A G C T A C G G G G T C C A G T G T T T C G C C A A G T A C C C G A G C C A C
 A T A A A G G A T T T C T T T A A G A G G C C A T G C C G G A A G G G T A T A
 C C C A A G A G C G T A C C A T A A G C T T C G A A G G C G A C G G G C G T G T A 20
 C A A G A C G C G T G C T A T G G T C A C C T A C G A A C G C G G G T C T A T A
 T A C A A T C G T G T A A C G C T G A C T G G G G A G A A C T T T A A G A A A G
 A C G G G C A C A T T C T G C G T A A G A A C G T C G C A T T C C A A T G C C C
 G C C A A G C A T T C T G T A T A T T C T G C C T G A C A C C G T C A A C A A T
 G G C A T A C G C G T C G A G T T C A A C C A G G C G T A C G A T A T T G A A G
 G G G T G A C C G A A A A A C T G G T C A C C A A A T G C A G C C A A A T G A A
 T C G T C C G C T T G C G G G C A G T G C G G C A G T G C A T A T A C C G C G T
 T A T C A T C A C A T T A C C T A C C A C A C C A A A C T G A G C A A A G A C C
 G C G A C G G G C C G T G A T C A C A T G T G T C T G G T T G A G G T A G T 30
 G A A A G C G G G T C G A T C T G G A C A C G T A T C A G T G A (配列番号 25)

M T A L T E G A K L F E K E I P Y I T E L E G D V E G M K F I I K G E G T G D A
 T T G T I K A K Y I C T T G D L P V P W A T L V S T L S Y G V Q C F A K Y P S H
 I K D F F K S A M P E G Y T Q E R T I S F E G D G V Y K T R A M V T Y E R G S I
 Y N R V T L T G E N F K K D G H I L R K N V A F Q C P P S I L Y I L P D T V N N
 G I R V E F N Q A Y D I E G V T E K L V T K C S Q M N R P L A G S A A V H I P R
 Y H H I T Y H T K L S K D R D E R R D H M C L V E V V K A V D L D T Y Q (配列番号 26)

【 0 2 0 2 】

酵素のスクリーニングデータ

【表4 - 1】

表4 : LeuDH酵素およびコントロールと比較した活性

アクセシション番号	タンパク質の変異	株	コントロールと比較して向上した倍率	核酸配列番号	タンパク質配列番号
P0A392	wt	コントロール	0	37	257
A0A1T4PGG9	wt	t160946	2.846	38	258
A4CBM3	wt	t161014	2.188	39	259
A0A0C1US13	wt	t160854	2.178	40	260
A0A1M6BE59	wt	t160389	2.166	41	261
K2M7H0	wt	t160943	2.027	42	262
A0A1Q6ZIF7	wt	t160092	2.005	43	263
A0A075JPW8	wt	t160267	2.002	44	264
A0A0B5AS65	wt	t160288	1.910	45	265
A0A0V8JFL2	wt	t160337	1.826	46	266
A0A1S2LUY1	wt	t160524	1.804	47	267
A0A0A8UN70	wt	t161111	1.792	48	268
P0A392	G43T	t159984	1.775	49	269
A0A1E7PTP0	wt	t161162	1.751	50	270
A0A1S9B636	wt	t160283	1.741	51	271
P0A392	E116V	t160562	1.553	52	272
A0A1D2RXB2	wt	t160434	1.550	53	273
K4KRS4	wt	t160706	1.548	54	274
P0A392	L76F	t160502	1.538	55	275
P0A392	T136R	t160559	1.521	56	276
P0A392	A297C	t160202	1.509	57	277
A0A1I1NGX1	wt	t160947	1.501	58	278
A0A142ITE6	wt	t161198	1.401	59	279
I1DTY5	wt	t160169	1.364	60	280
P0A392	A297Y	t160199	1.364	61	281
A0A0A0EMPO	wt	t160499	1.359	62	282
W4PY11	wt	t160682	1.359	63	283
R8B531	wt	t161210	1.359	64	284
A0A1Q2KY34	wt	t160573	1.340	65	285
L1QQC1	wt	t161091	1.333	66	286
D6XVM2	wt	t160162	1.301	67	287
P0A392	L78V	t160587	1.281	68	288
A0A1G8KLY7	wt	t160351	1.267	69	289
A0A0J6CNT2	wt	t160438	1.254	70	290
P0A392	L300K	t160181	1.196	71	291
U3HCY1	wt	t161117	1.191	72	292
A0A1K1TVW4	wt	t160461	1.188	73	293
A0A1Y6CWJ6	wt	t160154	1.186	74	294
A0A154W9T2	wt	t160973	1.171	75	295

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

I1D544	wt	t161185	1.149	76	296
A0A165NUD8	wt	t161204	1.149	77	297
A0A0A8JN83	wt	t160338	1.144	78	298
P0A392	N71T	t160401	1.144	79	299
F7RX04	wt	t160786	1.110	80	300
A0A1U9K9A9	wt	t160671	1.108	81	301
A0A0K6GVS2	wt	t160957	1.105	82	302
A0A136MKS4	wt	t160417	1.095	83	303
A0A0A5GIG6	wt	t160609	1.076	84	304
A0A143BJV1	wt	t160627	1.051	85	305
K6YKY7	wt	t161088	1.046	86	306
A0A0T5PG63	wt	t160158	1.032	87	307
A0A1M6L5E8	wt	t160479	1.032	88	308
P0A392	L42Q	t160013	1.029	89	309
A0A0A2TA47	wt	t160286	1.017	90	310
P0A392	A297H	t160636	1.012	91	311
A0A0Q5UT14	wt	t160279	1.002	92	312
I4D8U4	wt	t160598	1.000	93	313
P0A392	I113V	t160129	0.993	94	314
A0A1G3WLY4	wt	t159999	0.976	95	315
P0A392	A297N	t160134	0.968	96	316
P0A392	A297M	t160503	0.954	97	317
A0A1X4MV49	wt	t160926	0.949	98	318
P0A392	A297L	t160497	0.912	99	319
A0A0J1FEE3	wt	t160141	0.897	100	320
P0A392	E116A	t160512	0.892	101	321
P0A392	M67T	t160125	0.883	102	322
A0A0F7HKR2	wt	t160291	0.873	103	323
K0AAV5	wt	t160552	0.870	104	324
A0A1Q4XJW1	wt	t160891	0.868	105	325
P0A392	L300N	t160557	0.866	106	326
A0A0K9GVT6	wt	t160443	0.863	107	327
W7D8C3	wt	t160771	0.858	108	328
F7NG13	wt	t160215	0.851	109	329
A0A1H8Q403	wt	t160870	0.836	110	330
P0A392	L42T	t160357	0.829	111	331
E1WZZ8	wt	t160664	0.797	112	332
A0A0K9GC14	wt	t160444	0.790	113	333
P0A392	V296N	t160184	0.787	114	334
A0A1F3SFY8	wt	t160002	0.785	115	335
P0A392	L78K	t160487	0.782	116	336
P0A392	T136S	t160176	0.768	117	337
A0A1Y5EK08	wt	t160841	0.768	118	338
P0A392	T136F	t160489	0.763	119	339
N0AUJ4	wt	t160823	0.751	120	340
P0A392	M67Q	t159980	0.748	121	341
C4L3E4	wt	t160256	0.748	122	342
A0A1I6TTT1	wt	t160115	0.733	123	343
P0A392	A297R	t160509	0.733	124	344
A0A1H7JVK8	wt	t160952	0.733	125	345
A0A1U7M8J0	wt	t160255	0.724	126	346
P0A392	L300Q	t160226	0.721	127	347

10

20

30

40

50

【表 4 - 3】

A1S7B6	wt	t160188	0.719	128	348
P0A392	V293S	t160602	0.711	129	349
C1A7X5	wt	t160733	0.709	130	350
A0A0W0TJD2	wt	t161212	0.697	131	351
P0A392	I113F	t160504	0.689	132	352
P0A392	M67E	t160064	0.685	133	353
A0A1U7JH14	wt	t160966	0.685	134	354
P0A392	L300A	t160612	0.680	135	355
P0A392	E116S	t160543	0.675	136	356
P0A392	G43F	t160059	0.672	137	357
P0A392	A297F	t160588	0.670	138	358
M8DS05	wt	t160310	0.663	139	359
P0A392	L300C	t160633	0.658	140	360
P0A392	L300F	t160128	0.655	141	361
M7N8L2	wt	t160152	0.655	142	362
P0A392	L78F	t160584	0.653	143	363
G8R2S3	wt	t160212	0.650	144	364
A0A0P8B102	wt	t161073	0.650	145	365
S2YPJ0	wt	t160830	0.643	146	366
A0A1M5CX03	wt	t159964	0.636	147	367
P0A392	L76E	t160245	0.626	148	368
A0A1M5IEB6	wt	t160988	0.626	149	369
A0A0F6SHW7	wt	t160860	0.619	150	370
A0A0U3AUS4	wt	t160964	0.619	151	371
A0A081G3H3	wt	t160968	0.604	152	372
A0A1Q4UNH5	wt	t161006	0.599	153	373
P0A392	A297D	t160548	0.597	154	374
P0A392	V293Q	t160249	0.594	155	375
P0A392	T136E	t160648	0.594	156	376
P0A392	L300D	t160248	0.587	157	377
P0A392	L300T	t160270	0.587	158	378
P0A392	L76H	t160546	0.587	159	379
P0A392	L76W	t160139	0.579	160	380
P0A392	L76M	t160274	0.575	161	381
P0A392	L300M	t160541	0.548	162	382
T0CG61	wt	t160808	0.538	163	383
A0A166W971	wt	t160538	0.535	164	384
P0A392	V296C	t160206	0.533	165	385
P0A392	A297E	t160567	0.533	166	386
K2JU58	wt	t160877	0.523	167	387
P0A392	G44I	t160011	0.516	168	388
A0A0M4FMC6	wt	t160371	0.516	169	389
P0A392	M67S	t160060	0.509	170	390
A0A0K1JA83	wt	t160995	0.509	171	391
P0A392	A115T	t159988	0.504	172	392
A0A1N6U8W9	wt	t160814	0.504	173	393
A0A075LQK1	wt	t160493	0.499	174	394
P0A392	G44Y	t160080	0.494	175	395
P0A392	L300H	t160197	0.494	176	396
A0A0K8QRE8	wt	t160626	0.489	177	397
A0A1M6M3I5	wt	t160912	0.487	178	398
A0A0F7JZ22	wt	t161016	0.477	179	399

10

20

30

40

50

【表 4 - 4】

P0A392	L78H	t160634	0.469	180	400
A0A1Y6BX33	wt	t160700	0.460	181	401
P0A392	V296L	t160146	0.447	182	402
A0A1L8CT15	wt	t161020	0.445	183	403
P0A392	L300Y	t160145	0.443	184	404
P0A392	E116N	t160539	0.428	185	405
A0A171DN74	wt	t160716	0.423	186	406
P0A392	A297K	t160491	0.416	187	407
P0A392	L78Y	t160594	0.416	188	408
E6TXR8	wt	t160618	0.416	189	409
P0A392	N71H	t160120	0.411	190	410
A0A1G3X1T7	wt	t160910	0.411	191	411
P0A392	E116W	t160246	0.408	192	412
U4KND6	wt	t160852	0.408	193	413
P0A392	E116R	t160131	0.399	194	414
P0A392	N71C	t160385	0.399	195	415
A0A1G0BBA9	wt	t160899	0.396	196	416
A0A1Y2L717	wt	t160990	0.396	197	417
P0A392	A297T	t160227	0.389	198	418
A0A0M4UKZ2	wt	t160340	0.379	199	419
P0A392	A297W	t160596	0.357	200	420
P0A392	L78C	t160406	0.350	201	421
E2SC01	wt	t161059	0.350	202	422
A0A1K1PP57	wt	t160629	0.347	203	423
P0A392	G44K	t159990	0.345	204	424
P0A392	A115S	t160495	0.342	205	425
P0A392	L300S	t160275	0.337	206	426
P0A392	L300W	t160639	0.337	207	427
A0A1G0A9I7	wt	t160875	0.337	208	428
A0A0W7WYJ8	wt	t161047	0.337	209	429
P0A392	V296E	t160520	0.325	210	430
P0A392	T136Y	t160638	0.325	211	431
P0A392	A115V	t160123	0.320	212	432
A0A1V0ADI4	wt	t160970	0.318	213	433
W7ZGF1	wt	t160812	0.315	214	434
P0A392	A115Q	t159982	0.311	215	435
A0A1H6CJX7	wt	t161141	0.308	216	436
P0A392	M67K	t160356	0.296	217	437
P0A392	L78Q	t160581	0.296	218	438
P0A392	T136L	t160589	0.293	219	439
P0A392	E116L	t160604	0.293	220	440
P0A392	I113M	t160628	0.291	221	441
P0A392	L76Y	t160516	0.289	222	442
P0A392	V293A	t160655	0.274	223	443
P0A392	V296K	t160243	0.267	224	444
P0A392	L76R	t160153	0.264	225	445
P54531	wt	t160721	0.262	226	446
P0A392	V296I	t160271	0.259	227	447
P0A392	L300R	t160560	0.254	228	448
K9ARW8	wt	t160789	0.252	229	449
P0A392	L76S	t160133	0.249	230	450
P0A392	I113W	t160094	0.244	231	451

10

20

30

40

50

【表 4 - 5】

P0A392	A115N	t160194	0.240	232	452
P0A392	V296S	t160644	0.240	233	453
P0A392	E116M	t160643	0.235	234	454
P0A392	L42A	t160402	0.232	235	455
P0A392	V293C	t160500	0.225	236	456
P0A392	N71M	t160324	0.220	237	457
P0A392	V296A	t160143	0.213	238	458
P0A392	G43W	t160099	0.210	239	459
P0A392	A297Q	t160140	0.196	240	460
P0A392	V293T	t160221	0.191	241	461
P0A392	I113Y	t160098	0.188	242	462
P0A392	L76I	t160601	0.188	243	463
P0A392	G44H	t160029	0.176	244	464
P0A392	L76K	t160585	0.171	245	465
P0A392	G43Y	t159996	0.169	246	466
P0A392	N71D	t160415	0.142	247	467
P0A392	I113Q	t160632	0.139	248	468
P0A392	M67A	t160055	0.127	249	469
P0A392	V296T	t160630	0.122	250	470
P0A392	L76T	t160603	0.115	251	471
A0A1Q4VRJ4	wt	t161033	0.112	252	472
B2A513	wt	t160167	0.108	253	473
P0A392	G43E	t160096	0.083	254	474
P0A392	N71K	t160101	0.044	255	475

10

20

30

40

50

【表5-1】

表5: Ki vD酵素およびコントロールと比較した活性

アクセッション番号	ラベル	コントロールと比較して向上した倍率	核酸配列番号:	タンパク質配列番号
Q684J7	コントロール	0	477	533
A0A085UD38	t163850	1.958	478	534
A0A090DYY6	t163542	3.986	479	535
A0A0A6W4H3	t163732	4.354	480	536
A0A0B1U4F6	t163805	2.972	481	537
A0A0D0SDJ9	t163730	3.292	482	538
A0A0D2CSK3	t163274	3.965	483	539
A0A0D2GWW0	t163016	4.354	484	540
A0A0H4KFT8	t163716	3.958	485	541
A0A0J8UR79	t163869	2.250	486	542
A0A0K2Y209	t163916	3.944	487	543
A0A0L0P8D8	t163988	5.097	488	544
A0A0L7TB96	t163842	4.833	489	545
A0A0M5JJZ2	t164076	4.944	490	546
A0A0M5MY84	t163914	4.139	491	547
A0A0Q4N500	t164007	4.493	492	548
A0A0T9T7Y7	t163705	3.694	493	549
A0A0T9UPI9	t163338	3.493	494	550
A0A0U1CW59	t163964	3.201	495	551
A0A0U2NS09	t163656	2.222	496	552
A0A198FEB4	t163871	4.382	497	553
A0A1B1NY37	t163888	3.646	498	554
A0A1B7ILY5	t163742	3.792	499	555
A0A1B9AUW4	t162995	3.889	500	556
A0A1D4X3F2	t163818	4.708	501	557
A0A1F2KK66	t163546	3.403	502	558
A0A1G7WAJ7	t163085	5.076	503	559
A0A1M7EHD4	t163474	1.813	504	560
A0A1Q4T3V5	t163704	4.535	505	561
A0A1T1GFV6	t163784	3.500	506	562
A0A1U4TJK1	t163702	4.722	507	563
A0A1V2L8B3	t164100	3.229	508	564
A0A1V2YXQ3	t163766	2.319	509	565
A0A1V4SV36	t163852	4.396	510	566
A0A1V6TQU7	t162902	3.118	511	567
A0A1W6B724	t163806	3.639	512	568
A0A1X0AE10	t163798	3.104	513	569
A0A1X1XPA7	t163472	3.826	514	570

10

20

30

40

50

【表 5 - 2】

A0A1X2FKJ1	t163432	3.035	515	571
A0A1Y6E4E9	t163406	3.486	516	572
A0A205J7X5	t163837	3.910	517	573
A0A2B1L7A1	t163722	4.215	518	574
B9DJU8	t163844	4.597	519	575
D4B725	t163868	4.111	520	576
D4C3A5	t163661	2.139	521	577
D4F0I3	t163478	0.896	522	578
D7UWC4	t163880	3.785	523	579
F5SQV4	t163740	2.535	524	580
G9YCD8	t163678	0.090	525	581
I1CGS4	t163934	3.785	526	582
J2LV57	t163902	2.667	527	583
Q6C9L5	t163155	4.222	528	584
R5SST3	t163337	3.014	529	585
R8AV71	t163285	4.535	530	586
S3IST7	t163983	2.979	531	587
W0L941	t163973	3.396	532	588

10

20

30

40

50

【表 6 - 1】

表6 : Adh酵素およびコントロールと比較した活性

アクセション番号	ラベル	コントロールと比較して向上した倍率	核酸配列配列番号	タンパク質配列配列番号
P00331	コントロール	0	589	645
A0A011RFM0	t159061	-0.581	590	646
A0A068NM64	t159163	4.815	591	647
A0A081B9F7	t159282	5.992	592	648
A0A0F7S860	t159174	-0.411	593	649
A0A0F8XA97	t159080	-0.250	594	650
A0A0L8BIH2	t158526	0.629	595	651
A0A0M2SIC1	t158995	0.323	596	652
A0A0M8TKC3	t158267	2.427	597	653
A0A0N1F703	t159004	9.032	598	654
A0A0P1J1W4	t158538	10.516	599	655
A0A0Q6FH05	t159022	-0.113	600	656
A0A0Q9AMT3	t158946	1.476	601	657
A0A163KUH6	t159154	0.710	602	658
A0A192IDS9	t159028	10.581	603	659
A0A1A0K0C6	t159162	0.645	604	660
A0A1E4TMA4	t159319	11.113	605	661
A0A1E7X363	t159283	4.234	606	662
A0A1Q7HM90	t159036	-0.492	607	663
A0A1V1TTZ9	t158998	-0.613	608	664
A0A1V2EYMI	t159040	3.750	609	665
A0A1V6E459	t159120	1.008	610	666
A0A1Y0G594	t159236	1.645	611	667
A2V8B3	t159176	4.758	612	668
A9MKQ8	t158774	-0.548	613	669
C0SPA5	t158820	1.113	614	670
D8MZP3	t159280	6.234	615	671
F0IX07	t159318	0.371	616	672
H1ZV38	t158442	1.694	617	673
J1KN15	t158976	4.008	618	674
J5T2P7	t159183	-0.161	619	675
K4IPR3	t158247	5.444	620	676
M1LUC5	t158246	0.073	621	677
M2N9N4	t159152	0.669	622	678
M2QHN1	t159090	0.282	623	679
M2YNQ9	t159054	3.629	624	680
M5FVU5	t158291	0.565	625	681
O74822	t158955	-0.500	626	682

10

20

30

40

50

【表 6 - 2】

P08843	t158458	0.460	627	683
P0DMQ6	t158893	-0.444	628	684
P13603	t158263	0.645	629	685
P14219	t158869	-0.048	630	686
P14673	t158726	0.952	631	687
P14675	t158728	6.056	632	688
P20368	t158816	0.798	633	689
P25141	t158333	3.677	634	690
P28032	t158454	2.887	635	691
P39451	t158390	5.500	636	692
P39849	t158243	0.516	637	693
P40394	t158613	3.460	638	694
P42328	t158520	2.065	639	695
Q2FJ31	t158326	1.024	640	696
Q38707	t158580	-0.105	641	697
Q99W07	t158330	1.597	642	698
S0EJ18	t159328	11.185	643	699
W5YKG3	t159122	0.782	644	700

10

20

30

40

50

【表7】

表7：配列番号27と比較して向上したLeuDH活性を持つ酵素において、保存されているアミノ酸

配列番号:27において対応する位置	アミノ酸
13	V
16	W
42	Q
43	T, Y, F, E, W
44	I, H, K, Y
67	T, E, A, S, K
71	K
73	S
76	R, H, Y, S, K, W
92	Y
93	H
95	G
100	G
105	C
111	G
113	M
115	N, V
116	R, N, W
120	A
122	D
136	E
140	D
141	M
160	S
185	F
196	N
228	Y
248	M
256	C
293	Q, C
296	K, N
297	R, Q, K
300	C, D
302	T, S
305	C
319	F
330	M

10

20

30

40

50

【表8】

表8：配列番号29と比較して向上したKivD活性を持つ酵素において、保存されているアミノ酸

配列番号: 29において対応する位置	アミノ酸
33	Y
44	Q
117	M
129	I
185	W
190	I
225	I
227	Y
311	L
312	G
313	T
328	P
341	W
345	H
347	C
420	R
494	D
508	C
550	F

10

20

30

40

50

【表9】

表9：配列番号31と比較して向上したADH活性を持つ酵素において、保存されているアミノ酸

配列番号:31において対応する位置	アミノ酸
9	P
16	G
23	Q
28	R
30	A
93	K
98	L
99	R
114	P
115	K
119	Y
194	Y
242	P
249	K
255	E
260	D
269	H
281	Q
325	L
333	M
334	P
348	Q

10

20

30

【0203】

均等物

当業者であれば、本願に記載される発明の特定の実施形態の多数の均等物を、常套の試験を超えることなく認識するはずであり、または確認することが可能である。このような均等物は、以下の特許請求の範囲に包含される事が意図される。

【0204】

本願で開示された特許文献を含む全ての参考文献、特に本開示で参照される開示については、ここに本明細書の一部として参照によりその全体を援用する。

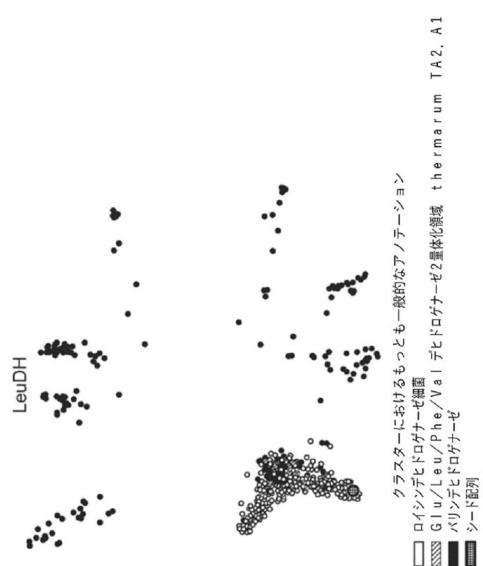
40

50

【図面】

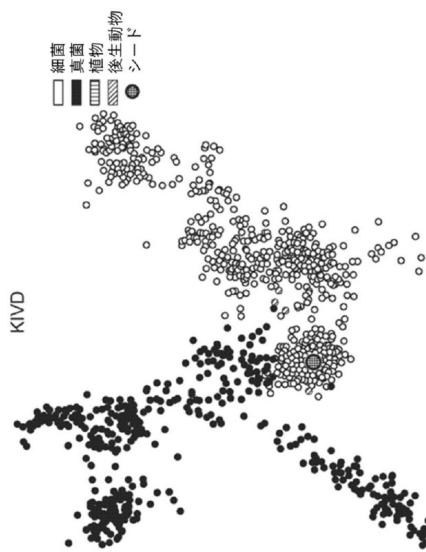
【図 1 - 1】

1/11



【図 1 - 2】

2/11



10

20

FIG. 1A

FIG. 1B

【図 1 - 3】

3/11

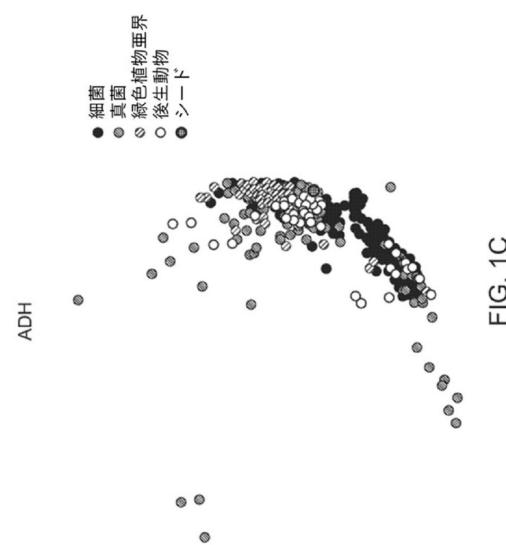
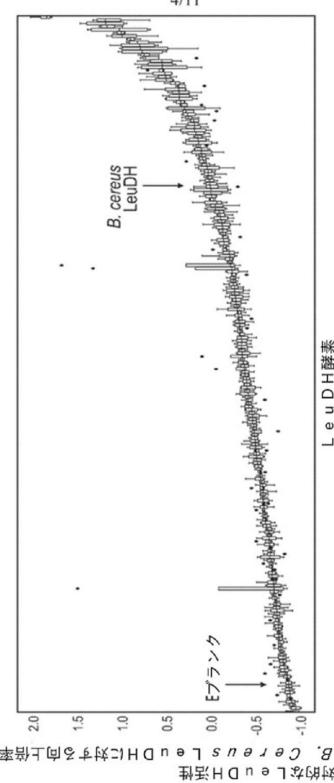


FIG. 1C

【図 2】

4/11



30

40

50

(B. cereus LeuDH活性) 向上倍率

【図3】

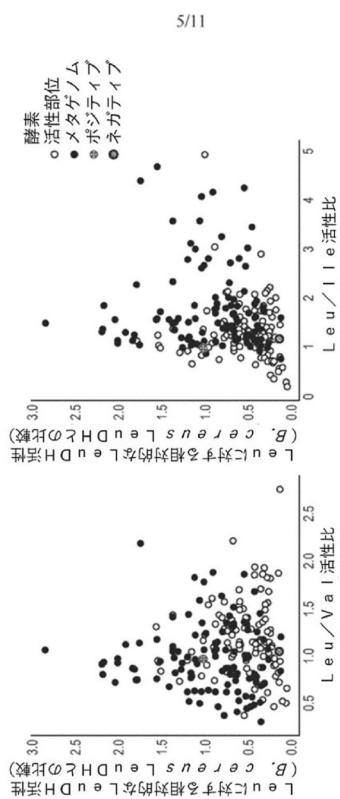


FIG. 3

10

【図4】

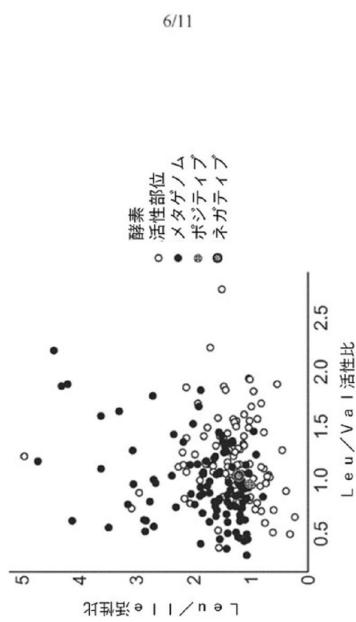


FIG. 4

20

【図5】

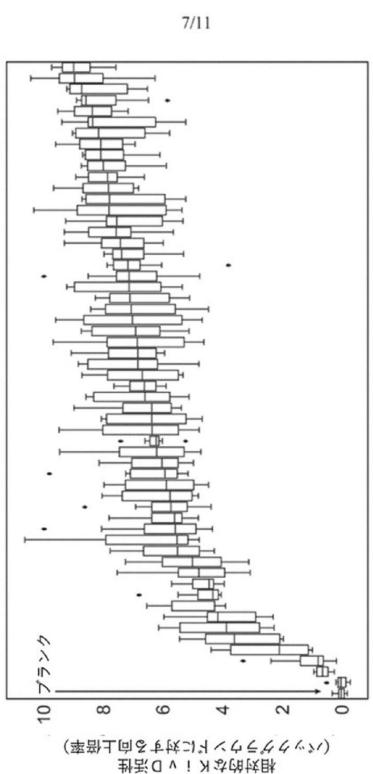


FIG. 5

30

【図6】

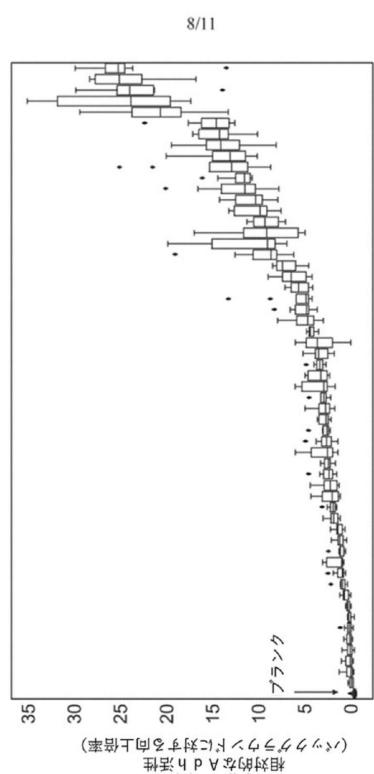


FIG. 6

40

50

【図7】

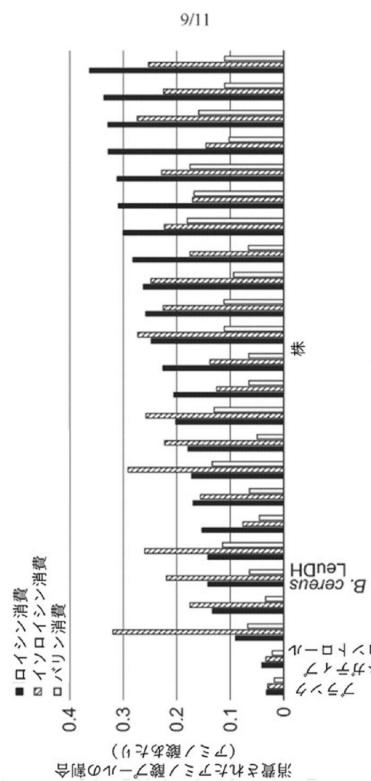
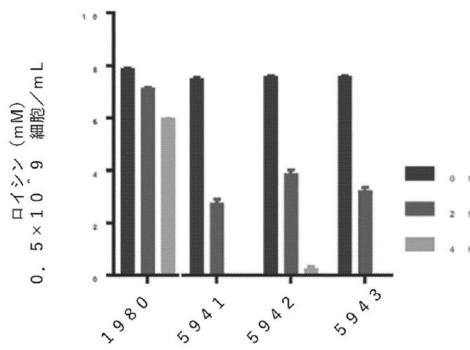


FIG. 7

10/11



10

20

30

40

50

【図9】



FIG. 9

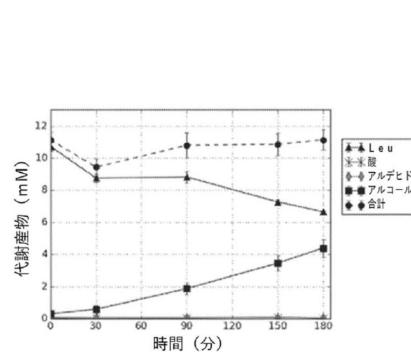


FIG. 10

50

【配列表】

2022537214000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US2020/038813
Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)	
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: the subject matter listed in Rule 39 on which, under Article 17(2)(a)(i), an international search is not required to be carried out, including 2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: 3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a) 	
Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)	
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</p> <p style="text-align: center;">See Supplemental Box for Details</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims. 2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees. 3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 4. <input checked="" type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-9, 30, 37 and 40 (completely) and claims 20-29, 33-36, 43 and 44 (in part) 	
Remark on Protest	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2020/038813																								
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER																										
C12N 15/52 (2006.01) C12N 15/70 (2006.01) C12N 9/04 (2006.01) C12N 9/06 (2006.01) C12N 9/88 (2006.01) C12P 7/04 (2006.01)																										
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																										
B. FIELDS SEARCHED																										
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)																										
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched																										
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Espacenet/AusPat/PubMed: Patrick Boyle, Dylan Carlin, Rishi Jain, Ryan Putman, Laura Stone, Alex Tucker, Kolea Zimmerman, Ginkgo Bioworks, Synlogic Operating Company PATENW: LeuDH, Maple Syrup Urine Disease, BmQ, KivD, Adh, BCAA, C12N15/63, C12Y104/01009, C12P7/04, C12N15/52, isopentanol Google: lac operon circuit RBS, operon use in plasmids, isopentanol from leucine GenomeQuest: SEQ ID NO: 1-12, 27, and 35																										
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT																										
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																								
	Documents are listed in the continuation of Box C																									
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex																								
<p>* Special categories of cited documents:</p> <table> <tr> <td>"A"</td> <td>document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"T"</td> <td>later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"D"</td> <td>document cited by the applicant in the international application</td> <td>"X"</td> <td>document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"E"</td> <td>earlier application or patent but published on or after the international filing date</td> <td>"Y"</td> <td>document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"L"</td> <td>document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"&"</td> <td>document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"O"</td> <td>document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>"P"</td> <td>document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>			"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"D"	document cited by the applicant in the international application	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&"	document member of the same patent family	"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means			"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention																							
"D"	document cited by the applicant in the international application	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone																							
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art																							
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&"	document member of the same patent family																							
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means																									
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																									
Date of the actual completion of the international search 25 September 2020	Date of mailing of the international search report 25 September 2020																									
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaaustralia.gov.au	Authorised officer Kristin McKinnon AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. +61262832116																									

INTERNATIONAL SEARCH REPORT C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		International application No. PCT/US2020/038813
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GenBank Accession No. WP_078694365 20 July 2017 Title, definition, and origin	1-5, 20-24, 27-29, 35, 40, 43-44
X	GenBank Accession No. WP_073105874 14 May 2017 Title, definition, and origin	1-5, 20-24, 27-29, 35, 40, 43-44
X	GenBank Accession No. WP_078010585 19 July 2017 Title, definition, and origin	1-5, 20-24, 27-29, 35, 40, 43-44
X	GenBank Accession No. ODS64950 13 September 2016 Title, definition, and origin	1-5, 20-24, 27-29, 35, 40, 43-44
X	GenBank Accession No. OJX58257 9 December 2016 Title, definition, and origin	1-5, 20-24, 27-29, 35, 40, 43-44
X	GenBank Accession No. WP_047829337 13 May 2017 Title, definition, and origin	1-5, 20-24, 27-29, 35, 40, 43-44
X	CN 108559735 A (UNIV JIANGNAN) 21 September 2018 & Machine Translation Google Address: https://patents.google.com/patent/CN108559735B/en?oq=CN108559735 claim 1, disclosure of invention paragraph 1, and embodiments 1-4, sequence 5 and 6	6-9, 20-24, 27-29 and 35
X Y	US 10059969 B1 (AbbVie Inc.) 28 August 2018 SEQ ID NO: 20, claim 1, column 4 lines 28-36, and abstract Column 12 lines 4-25	6-9, 20-24, 27-29 and 35 25-26, 30, 33, and 36
X	CN 108103038 A (UNIV JIANGNAN) 01 June 2019 & Machine Translation Google Address: https://patents.google.com/patent/CN108103038A/en?oq=CN108103038 examples 1, 4 and SEQ ID Nos: 1 and 3	6, 8, 20-24, 27-29 and 35
Y	WO 2016/201380 A1 (SYNLOGIC, INC.) 15 December 2016 Figure 3, 8, and summary on page 2	25-26, 30, 33, and 36
A	US 2018/0280451 A9 (SYNLOGIC, INC.) 04 October 2018 Whole document	
A	Keeney, J., 'Microorganism: Applications in Molecular Biology', Encyclopedia of Life Sciences. December 21 2007, doi: 10.1002/9780470015902.a0000971.pub2 Yeast: Eukaryotic Unicellular Organisms	21-22
A	Engstrom, M. et al., 'Transcription control engineering and applications in synthetic biology', Synthetic and Systems Biotechnology. September 2017, vol.2, pages 176-191 figure 1, introduction, and page 178 column 1 para 2	28-29
Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2019)		

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		International application No. PCT/US2020/038813
Category*		Relevant to claim No.
P,A	<p>The development of leucine consuming strains as therapeutics for Maple Syrup Urine Disease (Poster) [retrieved from internet on 03 September 2020]</p> <p><URL: https://investor.synlogictx.com/static-files/e11e9025-3f08-49ea-966e-de83e7aca108> published on 25 June 2019</p>	10
		20
		30
		40
Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2019)		50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US2020/038813
Supplemental Box	
<p>Continuation of: Box III</p> <p>This International Application does not comply with the requirements of unity of invention because it does not relate to one invention or to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.</p> <p>This Authority has found that there are different inventions based on the following features that separate the claims into distinct groups:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Group 1 is defined by claims 1-9, 30, 37 and 40 (completely) and claims 20-29, 33-36, 43 and 44 (in part). The feature of a LeuDH enzyme variant or a cell expressing a LeuDH enzyme variant suitable for the treatment of Maple Syrup Urine Disease (MSUD) is specific to this group of claims. • Group 2 is defined by claims 10-14, 31, 38 and 41 (completely) and claims 20-29, 33-36, 43 and 44 (in part). The feature of a KivD enzyme variant or a cell expressing a KivD enzyme variant suitable for the treatment of MSUD is specific to this group of claims. • Group 3 is defined by claims 15-19, 32, 39 and 42 (completely) and claims 20-29, 33-36, 43 and 44 (in part). The feature of a Adh enzyme variant or a cell expressing a Adh enzyme variant suitable for the treatment of MSUD is specific to this group of claims. <p>PCT Rule 13.2, first sentence, states that unity of invention is only fulfilled when there is a technical relationship among the claimed inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. PCT Rule 13.2, second sentence, defines a special technical feature as a feature which makes a contribution over the prior art.</p> <p>When there is no special technical feature common to all the claimed inventions there is no unity of invention.</p> <p>In the above groups of claims, the identified features may have the potential to make a contribution over the prior art but are not common to all the claimed inventions and therefore cannot provide the required technical relationship. The only feature common to all of the claimed inventions and which provides a technical relationship among them is a variant of an enzyme of the isopentanol pathway or a cell expressing such an enzyme for the treatment of maple syrup urine disease. However this feature does not make a contribution over the prior art because it is disclosed in: WO 2016/201380 A1 (SYNLOGIC, INC.) 15 December 2016 see [090] (page 88), [0105] (pages 95-96), Example 7 (pages 260- 263)</p> <p>Therefore in the light of this document this common feature cannot be a special technical feature. Therefore there is no special technical feature common to all the claimed inventions and the requirements for unity of invention are consequently not satisfied <i>a posteriori</i>.</p> <p>It is considered that search and examination for the additional inventions would require more than negligible additional search and examination effort over that for the first invention. As such, the International Searching Authority requested an additional search fee for each of Inventions 2-3, however, no additional search fees were paid within the prescribed time.</p> <p>Therefore, for the fee already paid the International Searching Authority has limited this search and examination to Invention 1.</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/US2020/038813	
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
CN 108559735 A	21 September 2018	CN 108559735 A	21 Sep 2018
		CN 108559735 B	07 Jul 2020
US 10059969 B1	28 August 2018	US 10059969 B1	28 Aug 2018
		US 2019048372 A1	14 Feb 2019
		US 10465216 B2	05 Nov 2019
CN 108103038 A	01 June 2019	CN 108103038 A	01 Jun 2018
WO 2016/201380 A1	15 December 2016	WO 2016201380 A1	15 Dec 2016
		AU 2015357549 A1	29 Jun 2017
		AU 2015369627 A1	06 Jul 2017
		AU 2016226234 A1	21 Sep 2017
		AU 2016262569 A1	04 Jan 2018
		AU 2016274311 A1	18 Jan 2018
		AU 2016276973 A1	18 Jan 2018
		AU 2016303662 A1	22 Feb 2018
		AU 2016346646 A1	17 May 2018
		AU 2016356684 A1	31 May 2018
		AU 2017213646 A1	23 Aug 2018
		AU 2018205276 A1	18 Jul 2019
		AU 2018301668 A1	19 Dec 2019
		BR 112017011923 A2	27 Feb 2018
		BR 112017018656 A2	17 Apr 2018
		BR 112017024384 A2	24 Jul 2018
		BR 112019013863 A2	03 Mar 2020
		CA 2969724 A1	09 Jun 2016

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/US2020/038813	
Patent Document/s Cited in Search Report			Patent Family Member/s
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
		CA 2971876 A1	30 Jun 2016
		CA 2978315 A1	09 Sep 2016
		CA 2985819 A1	17 Nov 2016
		CA 2988930 A1	15 Dec 2016
		CA 2988981 A1	15 Dec 2016
		CA 2996535 A1	09 Feb 2017
		CA 3002965 A1	04 May 2017
		CA 3005451 A1	26 May 2017
		CA 3011283 A1	20 Jul 2017
		CA 3013770 A1	10 Aug 2017
		CA 3049579 A1	12 Jul 2018
		CA 3066109 A1	17 Jan 2019
		CN 107208044 A	26 Sep 2017
		CN 107636146 A	26 Jan 2018
		CN 110913875 A	24 Mar 2020
		CN 111246865 A	05 Jun 2020
		EP 3227440 A1	11 Oct 2017
		EP 3237437 A1	01 Nov 2017
		EP 3265105 A1	10 Jan 2018
		EP 3294757 A1	21 Mar 2018
		EP 3294760 A1	21 Mar 2018
		EP 3307870 A1	18 Apr 2018
		EP 3307879 A2	18 Apr 2018
		EP 3313371 A2	02 May 2018
		EP 3328988 A1	06 Jun 2018
		EP 3344266 A1	11 Jul 2018
		EP 3368696 A1	05 Sep 2018
		EP 3377518 A1	26 Sep 2018
		EP 3402497 A1	21 Nov 2018
		EP 3402498 A1	21 Nov 2018
		EP 3411051 A2	12 Dec 2018
		EP 3565566 A1	13 Nov 2019
		EP 3651782 A1	20 May 2020
		HK 1250244 A1	07 Dec 2018
		JP 2018501797 A	25 Jan 2018
		JP 2018504919 A	22 Feb 2018

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/US2020/038813	
Patent Document/s Cited in Search Report			Patent Family Member/s
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
		JP 2018512841 A	24 May 2018
		JP 2018515106 A	14 Jun 2018
		JP 2018521674 A	09 Aug 2018
		JP 2018523978 A	30 Aug 2018
		JP 2018532412 A	08 Nov 2018
		JP 2018535678 A	06 Dec 2018
		JP 2020505016 A	20 Feb 2020
		JP 2020527025 A	03 Sep 2020
		KR 20170097078 A	25 Aug 2017
		KR 20170121291 A	01 Nov 2017
		KR 20200064980 A	08 Jun 2020
		MX 2017007148 A	11 Oct 2017
		MX 2017011037 A	02 Mar 2018
		MX 2019008196 A	16 Dec 2019
		RU 2017130462 A	02 Apr 2019
		SG 11201704543X A	28 Jul 2017
		SG 11201707025W A	28 Sep 2017
		SG 11201906161V A	27 Aug 2019
		SG 11201911031T A	30 Jan 2020
		US 2016177274 A1	23 Jun 2016
		US 9487764 B2	08 Nov 2016
		US 2016333326 A1	17 Nov 2016
		US 9688967 B2	27 Jun 2017
		US 2017136073 A1	18 May 2017
		US 9889164 B2	13 Feb 2018
		US 2017014457 A1	19 Jan 2017
		US 9943555 B2	17 Apr 2018
		US 2017312320 A1	02 Nov 2017
		US 10195234 B2	05 Feb 2019
		US 2017128499 A1	11 May 2017
		US 10273489 B2	30 Apr 2019
		US 2016340665 A1	24 Nov 2016
		US 10610546 B2	07 Apr 2020
		US 2016206666 A1	21 Jul 2016
		US 2017067065 A1	09 Mar 2017
		US 2017216370 A1	03 Aug 2017

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/US2020/038813	
Patent Document/s Cited in Search Report			Patent Family Member/s
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
		US 2017232043 A1	17 Aug 2017
		US 2017253862 A1	07 Sep 2017
		US 2017360850 A1	21 Dec 2017
		US 2018169154 A1	21 Jun 2018
		US 2018273956 A1	27 Sep 2018
		US 2018312851 A1	01 Nov 2018
		US 2018320161 A1	08 Nov 2018
		US 2018325963 A1	15 Nov 2018
		US 2019010506 A1	10 Jan 2019
		US 2019160115 A1	30 May 2019
		US 2019282628 A1	19 Sep 2019
		US 2019298779 A1	03 Oct 2019
		US 2019336544 A1	07 Nov 2019
		US 2020149053 A1	14 May 2020
		US 2020246394 A1	06 Aug 2020
		WO 2016090343 A1	09 Jun 2016
		WO 2016106343 A1	30 Jun 2016
		WO 2016141108 A1	09 Sep 2016
		WO 2016183531 A1	17 Nov 2016
		WO 2016183532 A1	17 Nov 2016
		WO 2016200614 A2	15 Dec 2016
		WO 2016210373 A2	29 Dec 2016
		WO 2016210378 A2	29 Dec 2016
		WO 2016210384 A2	29 Dec 2016
		WO 2017023818 A1	09 Feb 2017
		WO 2017040719 A1	09 Mar 2017
		WO 2017074566 A1	04 May 2017
		WO 2017075485 A1	04 May 2017
		WO 2017087580 A1	26 May 2017
		WO 2017123418 A1	20 Jul 2017
		WO 2017123592 A1	20 Jul 2017
		WO 2017123610 A2	20 Jul 2017
		WO 2017123675 A1	20 Jul 2017
		WO 2017123676 A1	20 Jul 2017
		WO 2017136792 A2	10 Aug 2017
		WO 2017136795 A1	10 Aug 2017

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)

<p>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</p> <p>Information on patent family members</p>	<p>International application No. PCT/US2020/038813</p>
<p>This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.</p>	
Patent Document/s Cited in Search Report	Patent Family Member/s
Publication Number	Publication Number
Publication Date	Publication Date
	WO 2017139697 A1 WO 2017139708 A1 WO 2018129404 A1 WO 2019014391 A1
	17 Aug 2017 17 Aug 2017 12 Jul 2018 17 Jan 2019

10

20

30

40

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.
 Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/US2020/038813	
Patent Document/s Cited in Search Report			Patent Family Member/s
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
US 2018/0280451 A9	04 October 2018	US 2018169154 A1	21 Jun 2018
		AU 2015357549 A1	29 Jun 2017
		AU 2015369627 A1	06 Jul 2017
		AU 2016226234 A1	21 Sep 2017
		AU 2016262569 A1	04 Jan 2018
		AU 2016274311 A1	18 Jan 2018
		AU 2016276973 A1	18 Jan 2018
		AU 2016303662 A1	22 Feb 2018
		AU 2016346646 A1	17 May 2018
		AU 2016356684 A1	31 May 2018
		AU 2017213646 A1	23 Aug 2018
		AU 2018205276 A1	18 Jul 2019
		AU 2018301668 A1	19 Dec 2019
		BR 112017011923 A2	27 Feb 2018
		BR 112017018656 A2	17 Apr 2018
		BR 112017024384 A2	24 Jul 2018
		BR 112019013863 A2	03 Mar 2020
		CA 2969724 A1	09 Jun 2016
		CA 2971876 A1	30 Jun 2016
		CA 2978315 A1	09 Sep 2016
		CA 2985819 A1	17 Nov 2016
		CA 2988930 A1	15 Dec 2016
		CA 2988981 A1	15 Dec 2016
		CA 2996535 A1	09 Feb 2017
		CA 3002965 A1	04 May 2017
		CA 3005451 A1	26 May 2017
		CA 3011283 A1	20 Jul 2017
		CA 3013770 A1	10 Aug 2017
		CA 3049579 A1	12 Jul 2018
		CA 3066109 A1	17 Jan 2019
		CN 107208044 A	26 Sep 2017
		CN 107636146 A	26 Jan 2018
		CN 110913875 A	24 Mar 2020
		CN 111246865 A	05 Jun 2020
		EP 3227440 A1	11 Oct 2017

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/US2020/038813	
Patent Document/s Cited in Search Report			Patent Family Member/s
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
		EP 3237437 A1	01 Nov 2017
		EP 3265105 A1	10 Jan 2018
		EP 3294757 A1	21 Mar 2018
		EP 3294760 A1	21 Mar 2018
		EP 3307870 A1	18 Apr 2018
		EP 3307879 A2	18 Apr 2018
		EP 3313371 A2	02 May 2018
		EP 3328988 A1	06 Jun 2018
		EP 3344266 A1	11 Jul 2018
		EP 3368696 A1	05 Sep 2018
		EP 3377518 A1	26 Sep 2018
		EP 3402497 A1	21 Nov 2018
		EP 3402498 A1	21 Nov 2018
		EP 3411051 A2	12 Dec 2018
		EP 3565566 A1	13 Nov 2019
		EP 3651782 A1	20 May 2020
		HK 1250244 A1	07 Dec 2018
		JP 2018501797 A	25 Jan 2018
		JP 2018504919 A	22 Feb 2018
		JP 2018512841 A	24 May 2018
		JP 2018515106 A	14 Jun 2018
		JP 2018521674 A	09 Aug 2018
		JP 2018523978 A	30 Aug 2018
		JP 2018532412 A	08 Nov 2018
		JP 2018535678 A	06 Dec 2018
		JP 2020505016 A	20 Feb 2020
		JP 2020527025 A	03 Sep 2020
		KR 20170097078 A	25 Aug 2017
		KR 20170121291 A	01 Nov 2017
		KR 20200064980 A	08 Jun 2020
		MX 2017007148 A	11 Oct 2017
		MX 2017011037 A	02 Mar 2018
		MX 2019008196 A	16 Dec 2019
		RU 2017130462 A	02 Apr 2019
		SG 11201704543X A	28 Jul 2017
		SG 11201707025W A	28 Sep 2017

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/US2020/038813	
Patent Document/s Cited in Search Report			Patent Family Member/s
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
		SG 11201906161V A	27 Aug 2019
		SG 11201911031T A	30 Jan 2020
		US 2016177274 A1	23 Jun 2016
		US 9487764 B2	08 Nov 2016
		US 2016333326 A1	17 Nov 2016
		US 9688967 B2	27 Jun 2017
		US 2017136073 A1	18 May 2017
		US 9889164 B2	13 Feb 2018
		US 2017014457 A1	19 Jan 2017
		US 9943555 B2	17 Apr 2018
		US 2017312320 A1	02 Nov 2017
		US 10195234 B2	05 Feb 2019
		US 2017128499 A1	11 May 2017
		US 10273489 B2	30 Apr 2019
		US 2016340665 A1	24 Nov 2016
		US 10610546 B2	07 Apr 2020
		US 2016206666 A1	21 Jul 2016
		US 2017067065 A1	09 Mar 2017
		US 2017216370 A1	03 Aug 2017
		US 2017232043 A1	17 Aug 2017
		US 2017253862 A1	07 Sep 2017
		US 2017360850 A1	21 Dec 2017
		US 2018273956 A1	27 Sep 2018
		US 2018312851 A1	01 Nov 2018
		US 2018320161 A1	08 Nov 2018
		US 2018325963 A1	15 Nov 2018
		US 2019010506 A1	10 Jan 2019
		US 2019160115 A1	30 May 2019
		US 2019282628 A1	19 Sep 2019
		US 2019298779 A1	03 Oct 2019
		US 2019336544 A1	07 Nov 2019
		US 2020149053 A1	14 May 2020
		US 2020246394 A1	06 Aug 2020
		WO 2016090343 A1	09 Jun 2016
		WO 2016106343 A1	30 Jun 2016
		WO 2016141108 A1	09 Sep 2016

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/US2020/038813	
Patent Document/s Cited in Search Report			Patent Family Member/s
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
		WO 2016183531 A1	17 Nov 2016
		WO 2016183532 A1	17 Nov 2016
		WO 2016200614 A2	15 Dec 2016
		WO 2016201380 A1	15 Dec 2016
		WO 2016210373 A2	29 Dec 2016
		WO 2016210378 A2	29 Dec 2016
		WO 2016210384 A2	29 Dec 2016
		WO 2017023818 A1	09 Feb 2017
		WO 2017040719 A1	09 Mar 2017
		WO 2017074566 A1	04 May 2017
		WO 2017075485 A1	04 May 2017
		WO 2017087580 A1	26 May 2017
		WO 2017123418 A1	20 Jul 2017
		WO 2017123592 A1	20 Jul 2017
		WO 2017123610 A2	20 Jul 2017
		WO 2017123675 A1	20 Jul 2017
		WO 2017123676 A1	20 Jul 2017
		WO 2017136792 A2	10 Aug 2017
		WO 2017136795 A1	10 Aug 2017
		WO 2017139697 A1	17 Aug 2017
		WO 2017139708 A1	17 Aug 2017
		WO 2018129404 A1	12 Jul 2018
		WO 2019014391 A1	17 Jan 2019
End of Annex			
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.			
Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)			

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
------------	-----	------------

C 12 N 9/06 (2006.01)	C 12 N 9/06	B
C 12 N 15/60 (2006.01)	C 12 N 15/60	
C 12 N 9/88 (2006.01)	C 12 N 9/88	
C 12 N 9/04 (2006.01)	C 12 N 9/04	E
C 12 P 7/04 (2006.01)	C 12 P 7/04	
C 12 N 15/63 (2006.01)	C 12 N 15/63	Z

,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,D
K,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),O
A(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,B
B,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD
,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,
MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,
RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁理士 富田 憲史

(74)代理人 100157956

弁理士 稲井 史生

(74)代理人 100170520

弁理士 笹倉 真奈美

(74)代理人 100221545

弁理士 白江 雄介

(72)発明者 ジャイン , リシ

アメリカ合衆国 0 2 2 1 0 マサチューセッツ州ボストン、ドライドック・アベニュー 27、エイス
・フロア

(72)発明者 パットマン , ライアン

アメリカ合衆国 0 2 2 1 0 マサチューセッツ州ボストン、ドライドック・アベニュー 27、エイス
・フロア

(72)発明者 ジマーマン , コレア

アメリカ合衆国 0 2 2 1 0 マサチューセッツ州ボストン、ドライドック・アベニュー 27、エイス
・フロア

(72)発明者 ポイル , パトリック

アメリカ合衆国 0 2 2 1 0 マサチューセッツ州ボストン、ドライドック・アベニュー 27、エイス
・フロア

(72)発明者 カーリン , ディラン アレクサンダー

アメリカ合衆国 0 2 2 1 0 マサチューセッツ州ボストン、ドライドック・アベニュー 27、エイス
・フロア

(72)発明者 ストーン , ローラ

アメリカ合衆国 0 2 2 1 0 マサチューセッツ州ボストン、ドライドック・アベニュー 27、エイス
・フロア

(72)発明者 タッカー , アレックス シー

アメリカ合衆国 0 2 2 1 0 マサチューセッツ州ボストン、ドライドック・アベニュー 27、エイス
・フロア

F ターム(参考) 4B050 CC04 DD02 EE10

4B064 AC02 CA19 CC24 CD13 DA01

4B065 AA26X AB01 AC14 AC20 BA02 CA05 CA44 CA46