

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-511277

(P2013-511277A)

(43) 公表日 平成25年4月4日(2013.4.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 2 4
C 1 2 P 7/46 (2006.01)	C 1 2 P 7/46 Z N A	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 53 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2012-540031 (P2012-540031)	(71) 出願人	512129033
(86) (22) 出願日	平成22年11月17日 (2010.11.17)		ミリアント・コーポレイション
(85) 翻訳文提出日	平成24年7月13日 (2012.7.13)		MYRIANT CORPORATION
(86) 国際出願番号	PCT/US2010/057119		アメリカ合衆国02169-4801マサ
(87) 国際公開番号	W02011/063055		チューセッツ州クウィンシー、バッテリー
(87) 国際公開日	平成23年5月26日 (2011.5.26)		マーチ・パーク2番
(31) 優先権主張番号	61/281, 481	(74) 代理人	100081422
(32) 優先日	平成21年11月18日 (2009.11.18)		弁理士 田中 光雄
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100084146
			弁理士 山崎 宏
		(74) 代理人	100122301
			弁理士 富田 憲史
		(74) 代理人	100127638
			弁理士 志賀 美苗
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 化学物質の効率的な生産のための微生物の改変

(57) 【要約】

本発明は、遺伝学的に改変された、および代謝的に進化した微生物からの化学物質の生産に関する。化学物質生産における改良は、確立し、そして、それらの改良をもたらす特定の変異は同定されてきた。具体的な例は、コハク酸を生産するように遺伝学的に改変された細菌の株の代謝的進化の間で生じた変異の同定において与えられる。本発明は、増大したコハク酸生産について、代謝的進化の間に選択された変異の産業上の適用性を評価するための方法も提供する。本発明は、さらに代謝的進化の間で選択された変異を有し、コハク酸、他の有機酸、および商業的関心のある他の化学物質の改良された生産に貢献するように改変された微生物を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

増大したレベルのホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ活性、およびピルビン酸キナーゼ活性をコードする遺伝子における変異を含む、非天然に生じる微生物。

【請求項 2】

増大したレベルのホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ活性が、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ活性を増大させる変化した調節配列に、p c k 遺伝子のネイティブの調節配列を交換すること起因する、請求項 1 の非天然に生じる微生物。

【請求項 3】

ピルビン酸キナーゼ活性をコードする遺伝子が、p y k A 遺伝子、またはそのホモログである、請求項 1 の非天然に生じる微生物。 10

【請求項 4】

ピルビン酸キナーゼ活性をコードする遺伝子が、p y k F 遺伝子、またはそのホモログである、請求項 1 の非天然に生じる微生物。

【請求項 5】

さらに P E P - 依存性ホスホトランスフェラーゼ系の機能を減少させる 1 または複数の遺伝学的修飾を含む、請求項 1 の非天然に生じる微生物。

【請求項 6】

さらに

(a) P E P - 依存性ホスホトランスフェラーゼ系の機能を減少させる 1 または複数の遺伝学的修飾、および 20

(b) 少なくとも 1 つの非 - P T S 糖輸送体の活性を増大させる 1 または複数の遺伝学的修飾

を含む、請求項 1 の非天然に生じる微生物。

【請求項 7】

前記非 - P T S 糖輸送体が、ガラクトースパーミターゼである、請求項 7 の非天然に生じる微生物。

【請求項 8】

ガラクトースパーミターゼの活性における増大が、ガラクトースパーミターゼをコードする g a l P 遺伝子のコピー数を増大させることによって達成される、請求項 7 の非天然に生じる微生物。 30

【請求項 9】

ガラクトースパーミターゼの活性における増大が、1 または複数の変異を通じてリプレッサーの陰性制御を軽減することによって達成される、請求項 7 の非天然に生じる微生物。

【請求項 10】

ガラクトースパーミターゼの前記リプレッサーが、g a l S または g a l R 遺伝子によってコードされる、請求項 9 の非天然に生じる微生物。

【請求項 11】

さらに発酵性経路にかかわる遺伝子の少なくとも 1 つにおける変異を含む、請求項 1 の非天然に生じる微生物。 40

【請求項 12】

さらにトリカルボン酸サイクルの作動と関連する遺伝子の少なくとも 1 つにおける変異を含む、請求項 1 の非天然に生じる微生物。

【請求項 13】

さらに R N A ポリメラーゼサブユニットをコードする遺伝子における変異を含む、請求項 1 の非天然に生じる微生物。

【請求項 14】

20 g / L を超えるオキサロ酢酸に由来する有機酸または他の化学物質を生産し、かつ、R N A ポリメラーゼのサブユニットをコードする遺伝子における変異を含む、非天然に 50

生じる微生物。

【請求項 15】

RNAポリメラーゼのサブユニットをコードする遺伝子が、*rpoA* 遺伝子である、請求項 13 または請求項 14 の非天然に生じる微生物。

【請求項 16】

RNAポリメラーゼのサブユニットをコードする遺伝子が、*rpoC* 遺伝子である、請求項 13 または請求項 14 の非天然に生じる微生物。

【請求項 17】

さらに染色体の DNA における欠失を含み、ここで、前記欠失が、*ydcC*、*ydcD*、*ydcE*、および *ydcF* 遺伝子を除去する、請求項 1 の非天然に生じる微生物。

10

【請求項 18】

さらに *ftsI* 遺伝子における変異を含む、請求項 1 または請求項 14 の非天然に生じる微生物。

【請求項 19】

さらに *glA* 遺伝子における変異を含む、請求項 1 または請求項 14 の非天然に生じる微生物。

【請求項 20】

さらに、*dhakLM* オペロンまたは *PTS* - 依存性ジヒドロキシアセトンキナーゼのサブユニットをコードする遺伝子における変異を含む、請求項 1 または請求項 14 の非天然に生じる微生物。

20

【請求項 21】

20 g/L を超えるオキサロ酢酸に由来する有機酸または他の化学物質を生産し、かつ、染色体の DNA における欠失を含み、ここで、前記欠失が、*ydcC*、*ydcD*、*ydcE*、および *ydcF* 遺伝子、またはそのホモログを除去する、非天然に生じる微生物。

【請求項 22】

(a) 請求項 1 ~ 請求項 14 のいずれかの微生物を培養すること、
(b) 炭素源を提供すること、
(c) 前記微生物に前記炭素源を代謝させることを可能にすること、および
(d) 随意的に、コハク酸を単離すること
を含む、コハク酸を生産する方法。

30

【請求項 23】

発酵によって所望の化学物質を生産する目的の微生物を構築するための方法であって、
(a) 第一の親株から、前記所望の化学物質と異なる発酵生産物への生合成の経路における工程を触媒する酵素をコードする遺伝子の少なくとも 1 つを欠失させて、第一の中間株をもたらすこと、

(b) 前記第一の中間株に対する代謝的進化を行い、前記第一の株のものと比較して改良された増殖を有する第二の中間株をもたらすこと、

(c) 前記第一の親株および第二の中間株のゲノムの DNA 配列を測定すること、

(d) 前記ゲノムの DNA 配列を比較して、前記代謝的進化の間で選択された変異を同定すること、

40

(e) 前記変異の少なくとも 1 つを試験すること、および前記変異のどれが、前記所望の化学物質の生産の効率の増殖比率における増大にとって有益であるかを同定すること、ならびに

(f) 前記同定された有益な変異の 1 もしくは複数、または前記有益な変異に 1 つに機能的に類似する変異の 1 もしくは複数、または第二の親株に導入して、所望の化学物質を生産するための微生物をもたらすこと、

を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【 0 0 0 1 】

関連出願への相互参照

この出願は、2009年11月18日に出願された米国仮出願第61/281,481号の優先権を主張する。

【 0 0 0 2 】

政府支援

この発明は、米国エネルギー省から承認された協定の下での米国政府支援で承認番号D E - E E 0 0 0 2 8 7 8 / 0 0 1で行われた。米国政府は、本発明における一定の権利を有する。

【 0 0 0 3 】

本発明の背景

過去10年間、微生物ゲノム、細胞内における生化学的経路、代謝的フラックス分析、マイクロアレイ分析、およびコンピューターによる(in silico)分析についての知識が激増し、産業上の微生物学は、生体触媒を用いて再生可能な原料から化学物質を製造することに踏み込んだ。

【 0 0 0 4 】

「Top value added chemicals from biomass」と題する2004年の米国エネルギー省の報告は、生体触媒を用いて再生可能な原料から生産することができる15の構成要素を同定した。その15の構成要素は、1,4-二酸(コハク酸、フマル酸、およびリンゴ酸)、2,5-フランジカルボン酸、3-ヒドロキシプロピオン酸、アスパラギン酸、グルカル酸、グルタミン酸、イタコン酸、レブリン酸、3-ヒドロキシブチロラクトン、グリセロール、ソルビトール、キシリトール、およびアラビニトールである。米国エネルギー省によって同定されたこれらの15の化学物質のうち、生体触媒を用いる産業上のスケールでのコハク酸生産は、顕著に発展してきた(Kurzrock and Weuster-Botz, 2009; Lee et al., 2008; Andersson, et al., 2007; Lu et al., 2009; 米国特許出願公開第2006/0073577号)。

【 0 0 0 5 】

ウシの第一胃に存在するバクテリアは、嫌気性増殖条件下で、コハク酸を生産することが知られている。アクチノバチルス(Actinobacillus)サクシノゲニス(succinogens)、アネロビオスピリウム(Anaerobiospirillum)サクシニシプロデュセンス(succiniproducens)、およびマンヘミア(Mannheimia)サクシニシプロデュセンス(succiniproducens)などの多数の第一胃バクテリアが、単離され、そして、コハク酸生産のための生体触媒として開発されてきた。商業的実現可能性に近づく力価、比率、および産出量においてコハク酸を生産することができる大腸菌(Escherichia coli)株も、微生物炭素代謝および微生物遺伝学の組み合わせた知識を用いて構築されてきた。米国特許第7,223,567号は、富栄養増殖培地においてコハク酸を生産する大腸菌(E. coli)株SBS550MGの構築を説明する。米国特許第6,455,284号は、コハク酸生産のための生体触媒として、外因性ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子を有する大腸菌(E. coli)株の構築を説明する。ピルビン酸カルボキシラーゼは、野生型大腸菌(E. coli)株には存在しない。リゾビウム・エトリ(Rhizobium elti)などの他の微生物から得られるピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子は、構成的プロモーターの下で発現させて、コハク酸生産を増進することができる。PCT特許出願第WO/2008/115958およびWO/2010/115067は、大腸菌(E. coli)株KJ122の構築を説明し、これは、最小増殖培地においてコハク酸を生産するための生体触媒である。

【 0 0 0 6 】

コハク酸および他の化学物質の商業的に魅力的な生合成の生産を達成するために、さらなる遺伝学的操作が必要である。新規の遺伝学的取り組みを用いて細胞内部の生化学的経

10

20

30

40

50

路を操作することによって微生物によるコハク酸塩および他の化学物質の生産の全般的な「効率」（力価、比率、および産出量含むが、それらに限定されないと定義される）を改良する必要がまだにある。化学物質生産が、細胞増殖に連動する範囲内において、コハク酸または他の化学物質生産の効率における増大は、所望の化学物質を生産する微生物細胞の増殖の比率を改良することによって達成することもできる。大腸菌（*E. coli*）におけるコハク酸生産についての最大の理論上の産出量は、1 molのグルコースごとに1.714 molのコハク酸であると計算され、全体の産出量で、摂取された1グラムのグルコースについて1.12グラムのコハク酸を提供する（Vemuri, et al., 2002）。

【0007】

米国特許出願公開第2008/0009041号は、野生型大腸菌（*E. coli*）株のものよりも少なくとも470 kb短い染色体のDNAを含む大腸菌（*E. coli*）株を説明する。この変異体大腸菌（*E. coli*）株は、より多くの細胞集団（mass）を蓄積し、そして、蓄積したスレオニンの量における有意な増大を示す。

【0008】

米国特許出願公開2009/0075333も、親株と比較して、1または複数の同等または改良された増殖比率、変換効率、タンパク質発現、DNA生産、DNA産出量、および/またはDNA質を有する低下したゲノムサイズを持つ大腸菌（*E. coli*）株を説明する。

【0009】

米国特許出願公開2009/0221055は、遺伝子破壊に由来する、様々な酵素の良好な生産力を有する新規な枯草菌（*Bacillus subtilis*）変異体株を説明する。

【0010】

増大した増殖比率達成するためにゲノムサイズを低下させるこれらの取り組みは、発酵槽において増殖するバクテリアが欠失させることができる多くの非必須遺伝子を含むという事実に基づいている。自然環境において生きているバクテリアは、温度、ストレス、または食物供給源の欠如の困難な環境的条件を生存するためのメカニズムを提供する多くの条件応答性遺伝子を有している。これらの遺伝子を複製することは、発酵槽においては必要ではないが、細胞のエネルギーの支出を必要とし、これは、そうではなくこれら不必要遺伝子の不存在であるならば節約することができた。

【0011】

ゲノムサイズを低下させることの取り組みは、組換えタンパク質、核酸、およびアミノ酸を生産する株の増殖性能を改良するためには有用であるかもしれないが、Krebsサイクル（トリカルボン酸サイクルまたはTCAサイクルとしても知られる）における中間体であるコハク酸、フマル酸、およびリンゴ酸などの他の化学物質生産する株の性能を改良するための有用な取り組みであることは示されていない。これらおよび他の化学物質の生産の効率は、中心代謝経路における異なる経路を通じた炭素のフローの比率にも依存し、そして、一定の場合には、嫌気性または微好気性増殖の間において好ましい酸化還元バランスを達成することに依存する。

【0012】

米国特許出願公開2009/0075352、およびLee et al. (2005) は、コンピューターによる（in silico）分析に基づいて細菌の株を改良するための方法を説明する。この取り組みにおいて、有意な量でコハク酸を生産するマンヘミア（*Mannheimia*）サクシニシプロデュセンス（*succiniproducens*）のゲノムの配列は、野生型大腸菌（*E. coli*）株をコハク酸生産する株に変質させる目的で大腸菌（*E. coli*）において欠失させるべき最適な遺伝子を同定するために、大腸菌（*E. coli*）のゲノムの配列と比較される。この取り組みは、一見すると魅力的であるのだけれども、*M.サクシニシプロデュセンス*（*succiniproducens*）に由来する遺伝学的情報が、商業的に実行可能なコハク酸塩生産株を達成する

10

20

30

40

50

ために、大腸菌 (*E. coli*) に推定することができるかどうかは、いまだにわからない。上記で引用された米国特許出願からの推奨される欠失は、*ptsG*、*pykA*、および *pykF* の組み合わせであった。しかしながら、このような株から実際に達成されるコハク酸塩力価は、 8.16 mM (0.96 g/l) のみであったが、これは、商業的に魅力的な生産にとって必要なレベルほど遠く、そして、株の増殖は、非常に貧弱なものであった。さらに、上で参照される出願において推奨されるものに類似する欠失変異の組み合わせ (*pykA*、*pykF*、および *ptsHI*) は、早くから報告され、そして、もたらされた株は、グルコース上で非常に貧弱にしか増殖しなかった (Ponce, et al., 1995)。このように、Lee et al (2005) によって説明された変異の組み合わせは、商業的に実行可能な株を構築するには十分ではなく、そして、変異は、それらが商業的に実行可能な株に必要なまたはふさわしいことを証明することができる株事情において試験されなかった。したがって、当業者にとって、上記の開示から商業的に実行可能なコハク酸塩生産株への明確な経路はなく、このことは、グルコースまたは他の安価な炭素源上において十分に増殖させて、少なくとも 20 g/l のコハク酸塩 (170 mM) を生産することを必要とするであろう。

10

【0013】

化学物質合成のための石油化学的プロセスと競合させるためには、本技術分野において、化学物質生産のための、より効率的な生体触媒開発する必要性がある。第一の工程は、増進した化学物質生産に貢献しうる宿主染色体における遺伝学的変更を同定することである。この状況を見ると、本発明の目的は、産業上の用途のために選択された微生物株による化学物質生産を改良するために使用することができる新規の変異を同定することである。具体的な実施態様において、本発明の目的は、有機酸の微生物生産の効率を改良することである。より具体的な実施態様において、該目的は、コハク酸生産の効率を改良することである。本発明の別の側面において、該目的は、いかにして、一般的に、代謝的進化などの労働集約型の方法に訴えなければならないことなく、微生物からのコハク酸などの化学物質の生産を理性的に改良するかを知ることである。

20

【0014】

突然変異を起こさせ、そして、高リジン生産についてスクリーニングされたコリネバクテリウム (*Corynebacterium*) グルタミンム (*glutamicum*) 株について、ある種のリバースエンジニアリングが行われてきた。高度に変化したリジン生産株のゲノムが、野生型株のものと比較され、そして、相違が、最小に変異した株を設計しなおすために使用された (Ikeda et al., 2006)。しかしながら、数百の変異が見出され、そして、これらのわずかしかりジン過剰生産において主要な役割を担わないようであるが、数百の変異の全てを関連性について試験するのは非常に非現実的であろう。一見すると、本明細書において開示された本発明は、この先行技術において開示されたものに類似するようにみえるかもしれないが、主要な相違は、本発明の開始株は、突然変異を起こさせておらず、むしろ自然発生的に変異させることを可能にさせたものであり、そして、それは、スクリーニングされておらず、むしろ代謝的進化のプロセスにおいて選択されたことである。このことは、本発明を識別する少なくとも2つの主要な相違をもたらす：

30

40

- (1) 変異の密度が、ほとんど2桁の大きさではるかに低いこと、および
- (2) 本発明において試験された変異の8つの全てが、改良された増殖、または改良された化学物質生産の効率のいずれかに関連性があることが証明されたこと。このように、本発明の方法および材料は、先行技術のものよりも非常に改良されている。

【発明の概要】

【0015】

本発明の概要

本発明は、コハク酸などの化学物質を生産するための改良された能力を有する微生物を提供する。

【0016】

50

本発明は、コハク酸などの化学物質を生産するための改良された能力を有する微生物を構築する方法も提供する。

【0017】

本発明は、コハク酸などの化学物質を生産するための改良された能力を有する微生物を用いてコハク酸を生産するための方法も提供する。

【0018】

本発明の1つの実施態様において、コハク酸などの化学物質を生産するための改良された能力を有する、および変異した *pykA* 遺伝子を有する微生物が提供される。

【0019】

本発明の別の実施態様において、コハク酸などの化学物質を生産するための改良された能力を有する、および変異した *pykF* 遺伝子を有する微生物が提供される。

10

【0020】

本発明のいまだ別の実施態様において、コハク酸などの化学物質を生産するための改良された能力を有する、ならびに変異した *pykA* および *pykF* 遺伝子を有する微生物が提供される。

【0021】

本発明の1つの実施態様において、コハク酸などの化学物質を生産するための改良された能力を有する、および不活性化した、または変異した *galS* 遺伝子を有する微生物が提供される。

【0022】

本発明の1つの実施態様において、コハク酸などの化学物質を生産するための改良された能力を有する、および不活性化した、または変異した *galR* 遺伝子を有する微生物が提供される。

20

【0023】

本発明の別の実施態様において、コハク酸を生産するための改良された能力を有する、および多重コピーの *galP* 遺伝子を有する微生物が提供される。

【0024】

本発明のいまだ別の実施態様において、コハク酸を生産するための改良された能力、多重コピーの *galP* 遺伝子、および細胞へのグルコース輸送のための変異したホスホトランスフェラーゼ系 (*PTS*) を有する微生物が提供される。

30

【0025】

本発明のいまだ別の実施態様において、コハク酸などの化学物質を生産するための改良された能力、および染色体の *DNA* の *48 kb* 領域における遺伝子 *ydcC* から *ydcF* を含む多重遺伝子を含むゲノムの広範な領域の欠失を有する微生物が提供される。

【0026】

本発明の1つの実施態様において、コハク酸などの化学物質を生産するための改良された能力、および *rpoA* 遺伝子におけるミスセンス変異を有する微生物が提供される。

【0027】

本発明のいまだ別の実施態様において、コハク酸などの化学物質を生産するための改良された能力、および *rpoA* 遺伝子のアミノ酸位置 *322* における変異を有する微生物が提供される。

40

【0028】

本発明のいまだ別の実施態様において、コハク酸などの化学物質を生産するための改良された能力、および *rpoA* 遺伝子のアミノ酸位置 *322* におけるプロリンからロイシンへの変異を有する微生物が提供される。

【0029】

本発明のいまだ別の実施態様において、コハク酸などの化学物質を生産するための改良された能力、および *rpoC* 遺伝子における変異を有する微生物が提供される。

【0030】

本発明のいまだ別の実施態様において、コハク酸などの化学物質を生産するための改良

50

された能力、および r p o C 遺伝子の F 領域における変異を有する微生物が提供される。

【 0 0 3 1 】

本発明のいまだ別の実施態様において、コハク酸などの化学物質を生産するための改良された能力、および r p o C 遺伝子の F 領域における位置 7 4 7 におけるアミノ酸におけるミスセンス変異を有する微生物が提供される。

【 0 0 3 2 】

本発明のいまだ別の実施態様において、コハク酸などの化学物質を生産するための改良された能力、および r p o C 遺伝子の F 領域における位置 7 4 7 におけるメチオニンからイソロイシンへの変異を有する微生物が提供される。

【 0 0 3 3 】

本発明の 1 つの実施態様において、コハク酸などの化学物質を生産するための改良された能力を有する、および g l d A 遺伝子における変異を有する微生物が提供される。

【 0 0 3 4 】

本発明の 1 つの実施態様において、コハク酸などの化学物質を生産するための改良された能力を有する、および f t s I 遺伝子における変異を有する微生物が提供される。

【 0 0 3 5 】

本発明のいまだ別の実施態様において、コハク酸などの化学物質を生産するための改良された能力を有する、および d h a M 遺伝子における変異を有する微生物が提供される。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 6 】

この出願には、図面は含まれていない。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 3 7 】

本発明の詳細な説明

発酵性プロセスを通じたコハク酸の生産に適した微生物が、本発明において開示される。本発明は、遺伝学的に修飾された細菌の株によって、炭素化合物から商業的に意味のある量でコハク酸を生産するためのプロセスを提供するが、本発明の教示は、等しく多数の他の化学物質の産業上の生産に応用できる。

【 0 0 3 8 】

本発明の説明の目的で、次の定義が使用されるものとする。

【 0 0 3 9 】

多数の産業上有用な化学物質が、本発明を用いて製造することができる。このような化学物質の例は、エタノール、ブタノール、乳酸塩、コハク酸塩、フマル酸塩、リンゴ酸塩、スレオニン、メチオニン、およびリジンを含むが、これらに限定されない。有機酸は、遊離酸、および塩（例えば、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、アンモニウムの塩、塩化物、硫酸塩、炭酸塩、重炭酸塩、等が挙げられるが、これらに限定されない）の両方として、存在することができるので、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸、アスパラギン酸、スレオニン、メチオニン、およびリジンなどの化学物質名は、遊離酸およびその任意の塩の両方を含むことが意図されているものとする。同様に、コハク酸塩、フマル酸塩、リンゴ酸塩、アスパラギン酸塩等などの任意の塩は、その上遊離酸を含むことが意図されているものとする。

【 0 0 4 0 】

本発明は、特定の遺伝学的修飾の技術を、代謝的進化のプロセスに組み合わせて、炭水化物基質を有する無機塩培地中で嫌気性または微好気性増殖条件下でコハク酸生産についての高い産出量、力価、および容量生産力を示す株を得る。

【 0 0 4 1 】

本発明において使用する場合、用語「力価」は、発酵プロセスにおける特定の化合物のモルの濃度を意味する。このように、本発明によってコハク酸を生産するための発酵プロセスにおいて、1 0 0 m M のコハク酸力価は、測定の時点での発酵プロセスが、発酵プロセスのリットルごとに 1 0 0 m モルのコハク酸を含有したことを意味するであろう。

10

20

30

40

50

【0042】

本発明において使用する場合、用語「産出量」は、発酵プロセスの間に摂取された原料のモルごとに生産された特定の化合物のモルを参照する。このように、原料としてグルコースを用いるコハク酸の生産のための発酵性プロセスにおいて、用語産出量は、摂取されたグルコースのモルごとに生産されたコハク酸のモルの数を参照する。

【0043】

本発明において使用する場合、用語「容量生産力」は、ユニット時間ごとにユニット体積ごとに生産されたグラムにおける特定の化合物の量を参照する。このように、コハク酸についての $0.9 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ の容量生産力値は、増殖の時間の間で発酵プロセスの 1 リットルにおいて、 0.9 グラムのコハク酸が蓄積することを意味するであろう。

10

【0044】

本明細書において使用される用語「遺伝学的に改変された」または「遺伝学的に修飾された」は、微生物のゲノムの DNA の操作を通じて微生物における 1 または複数の酵素の発現を変化させることの実行を参照する。

【0045】

本発明において使用する場合、用語「遺伝子」は、遺伝子のオープンリーディングフレーム、ならびに上流および下流調節配列を含む。上流調節領域は、遺伝子のプロモーター領域ともいわれる。下流調節領域は、ターミネーター領域ともいわれる。

【0046】

「対立遺伝子」は、特定の遺伝子の DNA 配列の 2 またはそれを超える形態の 1 つである。変異を有する対応する遺伝子と比較した場合、任意の変異のないそれぞれの遺伝子は野生型対立遺伝子と呼ばれる。

20

【0047】

「ホモログ」は、共通の祖先 DNA 配列からの系統による第二の遺伝子に関する遺伝子である。用語ホモログは、種形成の事象によって分類される遺伝子の間の関係に、または遺伝学的重複の事象によって分類される遺伝子の間の関係に適用されてもよい。「オーソログ」は、種形成によって共通の祖先遺伝子から進化した異なる種における遺伝子である。普通は、オーソログは、進化の過程において同一の機能を保持する。オーソログの同定は、新たに配列決定されたゲノムにおける遺伝子機能の信頼に値する予測にとって不可欠である。種形成は、由来する種からは新しい様式で生活することができる新種の起源である。このプロセスの部分として、それは、親種との遺伝学的交換に対するいくつかの障壁も獲得してきた。「パラログ」は、ゲノム内における重複によって関連付けられる遺伝子である。オーソログは、進化の過程において同一機能を保持するが、パラログは、新たな機能を進化させる、これは、たとえ、これらが、原初のものに関するものであってもである。

30

【0048】

語句「機能的に類似する」は、本明細書において開示される方法によって同一または異なる生物において見出される任意の野生型または変異した DNA 配列、遺伝子、酵素、タンパク質と同等または類似する生物学の機能を有する、任意の生物からの任意の野生型または変異した DNA 配列、遺伝子、酵素、タンパク質を広く意味する。機能的な類似は、配列ホモログを必要としないかもしれない。例えば、この発明において、我々は、大腸菌 (*E. coli*) における総ピルビン酸キナーゼ活性を低下させるが除去しない *pykA* における変異が、より効率的なコハク酸塩生産を導くことを見出す。敷衍して考えてみると、ピルビン酸キナーゼを低下させる例えば酵母 *Saccharomyces* などの生物の別のタイプにおける変異は、機能的に類似し、そして、*Saccharomyces* における関連性がある遺伝子、例えば、*PYK1* または *PYK2* 遺伝子は、大腸菌 (*E. coli*) の *pykA* 遺伝子に機能的に類似するであろう。

40

【0049】

「変化した活性」を持つ遺伝子またはタンパク質は、関連性がある野生型遺伝子または

50

タンパク質と比較した場合に、測定可能な特性における測定可能な相違を生み出す遺伝子またはタンパク質として広く定義される。該変化した活性は、変化した遺伝子またはタンパク質を含有する株のコハク酸塩生産の増殖比率または効率を増大させるまたは減少させることによって、一般的な様式で、それ自体明白に示すことができた。他の測定可能な特性は、酵素活性、酵素の基質特異性、基質に対する親和性または速度などの酵素の動力学的パラメーター、酵素の安定性、酵素の調節特性、遺伝子発現レベル、様々な条件下での遺伝子発現の調整、等を含むが、それらに限定されない。

【 0 0 5 0 】

本発明において使用する場合、用語変異は、オープンリーディングフレーム、上流調節領域、および下流調節領域を含む遺伝子に対して行われた遺伝学的修飾を参照する。遺伝子変異は、遺伝子のオープンリーディングフレームの転写の上方調整または下方調整もしくは完全阻害のいずれかをもたらす。遺伝子変異は、遺伝子全体のコード領域もしくはコードするヌクレオチド配列の部分を欠失させること、フレームシフト変異、ミスセンス変異、もしくは挿入を導入すること、または終止コドンもしくはその組み合わせを導入することのいずれかによって達成される。変異は、酵素反応または細胞膜を通した有機分子の輸送などの生物学の機能に直接にかかわるタンパク質をコードする構造的遺伝子において生じるかもしれない。また、変異は、生物学の機能に直接にかかわるタンパク質をコードする遺伝子の発現を制御するタンパク質をコードする調節遺伝子において生じるかもしれない。他の遺伝子の発現を制御するタンパク質は、調節タンパク質といわれ、そして、これらの調節タンパク質をコードする遺伝子は、調節遺伝子といわれる。

10

20

【 0 0 5 1 】

「変異」は、関連性がある野生型生物のものと比較したDNA配列における任意の変更をも含むものとする。例えば、株KJ122に見出される変異は、変異した領域のDNA配列が、親野生型株、ATCC8739としても知られる大腸菌(E. coli)Cのものと比較され場合に見出すことができるDNA配列における任意の変更である。変異は、任意の数の塩基対の付加的DNAの挿入、または任意の数の塩基対のDNAの欠失であることができる。挿入変異の特定のタイプは、遺伝子重複である。遺伝子は、遺伝子の第二のコピーが最初のコピーに隣接して位置することができる自然発生的変異事象によって重複していることができ、または遺伝子は、遺伝子の第二のコピーが最初のコピーから遠いゲノムにおける部位に位置することができる遺伝学的変化によって重複していることができる。変異は、1の塩基タイプから別の塩基タイプへの変更、例えば、アデニンからグアニン塩基への変更であることができる。遺伝学の専門語において、変異は、(コドンによってコードされるアミノ酸を変更する)ミスセンス、(コドンを終止コドンに変更する)ナンセンス、(3の倍数ではない多数の塩基の挿入または欠失であり、そして、リーディングフレームを変更し、変異から下流であるコードされるアミノ酸配列を変化させ、しばしば変異から下流に終止コドンを導入する)フレームシフト、または(極性において切り替えられたが欠失させられないDNA配列からもたらされる)反転であることができる。

30

【 0 0 5 2 】

「ヌル変異」は、関連性がある遺伝子の全体のオープンリーディングフレームの欠失のものと実質的に同一である、または関連性がある遺伝子の全ての測定可能な活性を除去する表現型を与える変異である。

40

【 0 0 5 3 】

「変異体」は、1または複数の変異を含有するゲノムを有する微生物である。

【 0 0 5 4 】

この発明において使用する場合、用語「外因性」は、細胞の外側に由来する分子または活性が、宿主微生物に導入されることを意味することが意図されている。微生物細胞に導入された外因性核酸分子の場合、導入された核酸は、独立のプラスミドとして存在してもよく、または宿主染色体のDNAに組み入れられてもよい。タンパク質をコードする外因性核酸は、プロモーターおよびターミネーター配列などのそれ自身の調節配列とともに、発現可能な形態で、微生物細胞に導入されてもよい。また、外因性核酸分子は、宿主染色

50

体のDNAに組み入れられてもよく、そして、宿主調節配列の制御の下にあってもよい。

【0055】

用語「内因性の」は、宿主細胞内に存在する分子および活性を参照する。生合成の活性に関して使用される場合、用語「外因性」は、宿主参照生物に導入される活性を参照する。供給源は、例えば、宿主微生物への導入に続いて参照活性を発現する同種または異種のコードする核酸であることができる。もし、タンパク質をコードする核酸が、微生物の同一种から得られるならば、それは、同種DNAと呼ばれる。もし、核酸が異なる微生物種に由来するならば、それは、異種DNAと呼ばれる。DNAの特質、それが同種または異種であるかどうかに関係なく、宿主細胞に導入された場合、DNAならびにDNAを導入した活性由来形態は、外因性と呼ばれる。したがって、本発明のコードする核酸の外因性発現は、異種および同種のコードする核酸のいずれかまたは両方を利用することができる。

10

【0056】

「微生物」は、任意のバクテリア、古細菌、酵母、糸状菌、単細胞藻類、または渦鞭毛藻を含むものとする。

【0057】

本発明に適した組換え微生物は、多くの細菌のファミリーに、好ましくは、エンテロバクテリアセエ (*Enterobacteriaceae*) ファミリーに由来する。適切な微生物は、エシェリキア (*Escherichia*)、エルウィニア (*Erwinia*)、プロビデンシア (*Providencia*)、およびセラシア (*Serratia*) 属から選択される。エシェリキア (*Escherichia*) 属が、特に好ましい。エシェリキア (*Escherichia*) 属内では、大腸菌 (*Escherichia coli*) 種が、特に好ましい。大腸菌 (*E. coli*) B、大腸菌 (*E. coli*) C、大腸菌 (*E. coli*) W、または同様のものなどの大腸菌 (*E. coli*) の任意の1つの株は、本発明に有用である。

20

【0058】

有機酸を有意な量で生産することができる大腸菌 (*E. coli*) 株は、本技術分野においてよく知られている。例えば、米国特許出願公開第2009/0148914号は、化学的に純粋な酢酸塩および/またはピルビン酸塩の生産のための生体触媒として、大腸菌 (*E. coli*) の株を提供する。米国特許7,629,162は、乳酸の生産のために構築された大腸菌 (*E. coli*) K011株の派生物を提供する。特許協力条約の下で公開された国際特許出願WO2008/115958およびWO2010/115067は、pH-制御されたバッチ発酵において、炭素の供給源としてグルコースを含有する最小無機塩培地においてコハク酸塩およびリンゴ酸塩を生産するように改変された微生物を提供する。

30

【0059】

本発明のいくつかの他の実施態様において、本発明によって修飾されることができるバクテリアは、アクロモバクター・デルマーベ (*Achromobacter delmarvae*)、アクロモバクター・ビスコーサス (*Achromobacter viscosus*)、アクロモバクター・ラクティカム (*Achromobacter lacticum*)、アクチノマツラ・マツレ (*Actinomadura madurae*)、アクチノマイセス・ピオラセオクロモゲネス (*Actinomyces violaceo-chromogenes*)、アエロモナス・サルモニシダ (*Aeromonas salmonicida*)、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*)、アグロバクテリウム・ラジオバクター (*Agrobacterium radiobacter*)、アルカリゲネス フェカリス (*Alcaligenes faecalis*)、アルスロバクター・シトレウス (*Arthrobacter citreus*)、アルスロバクター・トゥメセンス (*Arthrobacter tumescens*)、アリスロバクター・パラフィニス (*Arthrobacter paraffineus*)、アルスロバクター・ヒドロカーボグルタミカス (*Arth*

40

50

robacter hydrocarboglutamicus)、アルスロバクター・
 オキシダンス(Arthrobacter oxydans)、オウレオバクテリウム(
 Aureobacterium)サペルダエ(saperdae)、アゾトバクター イ
 ンディカス(Azotobacter indicus)、バチルス・アミロリケファシ
 エンス(Bacillus amyloliquefaciens)、バチルス・コアグ
 ランス(Bacillus coagulans)、バチルス・シルクランス(Baci
 llus circulans)、バチルス・リケニフォルミス(Bacillus l
 icheniformis)、バチルス・プミルス(Bacillus pumilus
)、枯草菌(Bacillus subtilis)、バチルス・チアミノリティカス(
 Bacillus thiaminolyticus)、ブレビバクテリウムアンモニア
 ジェネス(Brevibacterium ammoniagenes)、ディバリカツム
 (divaricatum)、ブレビバクテリウムラクトファーメンツム(Brevib
 acterium lactofermentum)、ブレビバクテリウムフラバム(Br
 evibacterium flavum)、ブレビバクテリウムグロボサム(Brevi
 bacterium globosum)、ブレビバクテリウムフスカム(Breviba
 cterium fuscum)、ブレビバクテリウムケトグルタミクム(Breviba
 cterium ketoglutamicum)、ブレビバクテリウムヘルコルム(Br
 evibacterium helcolum)、ブレビバクテリウム・プシルム(Bre
 vibacterium pusillum)、ブレビバクテリウムテストセウム(Bre
 vibacterium testaceum)、ブレビバクテリウム・ロゼウム(Bre
 vibacterium roseum)、ブレビバクテリウム・イマリオフィリカム(B
 revibacterium immariophilum)、ブレビバクテリウム・リ
 ネンス(Brevibacterium linens)、ブレビバクテリウム・プロトフ
 アルミエ(Brevibacterium protopharmiae)、シトロバクタ
 ー・フロインディイ(Citrobacter freundii)、コリネバクテリウ
 ム・アセトフィラム(Corynebacterium acetophilum)、コ
 リネバクテリウム・グルタミクム(Corynebacterium glutamic
 um)、コリネバクテリウム・カルナエ(Corynebacterium callu
 nae)、コリネバクテリウム・アセトアシドフィルム(Corynebacteriu
 m acetoacidophilum)、コリネバクテリウム・アセトグルタミクム(
 Corynebacterium acetoglutamicum)、エンテロバクタ
 ー・アエロゲネス(Eenterobacter aerogenes)、エルウィニア
 ・アミロボーラ(Erwinia amylovora)、エルウィニア・カロトボーラ
 (Erwinia carotovora)、エルウィニア・ヘルビコーラ(Erwin
 ia herbicola)、エルウィニア クリサンテミ(Erwinia chry
 santhemii)、エシェリキア フロインディイ(Escherichia freu
 ndii)、フラボバクテリウム・ペレグリナム(Flavobacterium per
 egrinum)、フラボバクテリウム・フカタム(Flavobacterium fu
 catum)、フラボバクテリウム・アウランティナム(Flavobacterium
 aurantinum)、フラボバクテリウム・レナヌム(Flavobacteriu
 m rhenanum)、フラボバクテリウム・セワネンセ(Flavobacter
 ium sewanense)、フラボバクテリウム・ブレベ(Flavobacteri
 um breve)、フラボバクテリウムメニンゴセプチクム(Flavobacteri
 um meningosepticum)、グルコノバクター・オキシダンス(Gluc
 onobacter oxydans)、グルコノバクター・アサイイ(Gluconob
 acter asaii)、キタサトスポリア・パルロサ(Kitasatospori
 a parulosa)、クレブシエラ・オキシトカ(Klebsiella oxyt
 oca)、クレブシエラ・ニューモニエ(Klebsiella pneumoniae
 e)、ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム(Microbacterium amm
 oniaphilum)、マイクロコッカス(Micrococcus) sp. CCM 8

10

20

30

40

50

25、モーガネラ・モーガニイ (*Morganelia morgani*)、ノカルジア・オパカ (*Nocardia opaca*)、ノカルジア・ルゴサ (*Nocardia rugosa*)、プラノコッカスユーシナタス (*Planococcus eucinatus*)、プロテウスレッゲリ (*Proteus rettgeri*)、プロピオニバクテリウム・セルマニ (*Propionibacterium shermanii*)、シュードモナス・シンキサンサ (*Pseudomonas synxantha*)、シュードモナス・アゾトフォルマン (*Pseudomonas azotoformans*)、シュードモナス・フルオレッセンス (*Pseudomonas fluorescens*)、シュードモナス・オパリス (*Pseudomonas ovalis*)、シュードモナス・スタッツェリ (*Pseudomonas stutzeri*)、シュードモナス・アシドボランス (*Pseudomonas acidovorans*)、シュードモナス・ムシドレン (*Pseudomonas mucidolens*)、シュードモナス・テストステロニ (*Pseudomonas testosteronei*)、シュードモナス・アエルギノサ (*Pseudomonas aeruginosa*)、ロドコッカス・エリスロポリス (*Rhodococcus erythropolis*)、ロドコッカス・ロドクロラス (*Rhodococcus rhodochrous*)、ロドコッカス (*Rhodococcus*) sp. ATCC 15592、ロドコッカス (*Rhodococcus*) sp. ATCC 19070、セラシア・マルセッセン (*Serratia marcescens*)、スポロサルシナ・ウレア (*Sporosarcina ureae*)、スタフィロコッカス・オーリーアス (*Staphylococcus aureus*)、ストレプトマイセス・セリカラー (*Streptomyces coelicolor*)、ストレプトマイセス・フラベラス (*Streptomyces flavellus*)、ストレプトマイセス・グリセオラス (*Streptomyces griseolus*)、ストレプトマイセス・リビダ (*Streptomyces lividans*)、ストレプトマイセス・オリバセウス (*Streptomyces olivaceus*)、ストレプトマイセス・タナシエンシス (*Streptomyces tanashiensis*)、ストレプトマイセス・バージニア (*Streptomyces virginiae*)、ストレプトマイセス・アンチバイオチクス (*Streptomyces antibioticus*)、ストレプトマイセス・カカオイ (*Streptomyces cacaoi*)、ストレプトマイセス・ラベンジュレ (*Streptomyces lavendulae*)、ストレプトマイセス・ビロクロモゲネス (*Streptomyces viridochromogenes*)、サルモネラチフィムリウム (*Salmonella typhimurium*)、サルモネラ・ショットムレリ (*Salmonella schottmulleri*)、ビブリオ・メツシュニコビ (*Vibrio metschnikovii*)、ビブリオ・チロゲネス (*Vibrio tyrogenes*)、およびキサントモナス・シトリ (*Xanthomonas citri*) などを含むが、それらに限定されない。

【0060】

本発明は、発酵プロセスのための基質として炭素源供給源を含有する最小塩培地において発酵性条件下で増殖した場合に、コハク酸についての、目覚しい力価、高産出量、および意味のある容量生産力を示す遺伝学的に修飾された細菌の株を提供する。主題 (subject) 発明の微生物は、ヘキソース、ペントース、二糖、およびグリセロールなどの他の炭素化合物などの様々な糖を用いる単一の工程生産プロセスにおいて採用することができる。

【0061】

ある文脈における用語「発酵 (fermentation)」および「発酵 (ferment)」は、生物による嫌気性増殖、または代謝を示唆する。しかしながら、この開示において、我々は、好気性、嫌気性、もしくは微好気性、またはそれらの組み合わせを含む任意の条件下での微生物の商業的または実験的増殖を広く参照するために、用語「発酵 (fermentation)」および「発酵 (ferment)」を使用するものと

する。

【0062】

多くの化学物質の生合成の生産は、酸素または空気が存在しないまたは限定されている条件下で生産生物の増殖が実行される場合には、より効率的に（例えば、より高い産出量で）進めることができる。これは、主に、酸素の存在が一般的に比較的低価値の副産物である炭素二酸化物への炭素源供給源の代謝をもたらすためである。酸素または空気の意図的な供給の不存在における発酵は、通常、「嫌気性」と呼ばれる。しかしながら、厳密な嫌気性条件を達成することは、コストがかかるものであり、そして、時に、実現しがたい。さらに、いくつかの発酵にとって、厳密な嫌気性条件は、必要ない、または時に最適でない。酸素または空気が厳密には存在しないようにされていない発酵、または酸素または空気が低い制御された比率で意図的に供給される発酵については、我々は、用語「微好気性」を使用するものとする。

10

【0063】

本発明の実行に適した微生物は、好気性的に（酸素の存在において）、または嫌気性的に（酸素の完全な不存在において）、または微好気性的に（最小量の酸素供給とともに）増殖することができる。本発明の好ましい実施態様において、コハク酸の生産のために選択される微生物は、嫌気性条件において増殖する。また、本発明に適した微生物は、二相増殖レジームにおいて増殖することができ、ここに、該微生物は、商業的に意味のある量のコハク酸の生産を達成するために嫌気性増殖条件に移動する前に、あるレベルの細胞増殖に到達するために、最初に嫌気性増殖条件において増殖する。本発明の微生物によるコハク酸の生産のための二相増殖の間、コハク酸の生産および蓄積は、嫌気性発酵性増殖フェーズの間に生じる。

20

【0064】

本発明において、遺伝子変異の固有および有利な組み合わせが、炭素流動をコハク酸生産に向けるために採用されてきた。加えて、コハク酸生産が微生物増殖に結び付けられ、これは、同じく細胞ATPレベルおよび酸化還元バランスに結び付けられる。

【0065】

用語「酸化還元バランス」は、 NAD^+ に対する NADH の適切な割合を維持する細胞の能力を参照する。すなわち、細胞は、嫌気性発酵性増殖の間、炭水化物基質を酸化する十分な NAD^+ があるように、 NADH を酸化することができる。好気性増殖の間、 NAD^+ プールは、 NADH が関与する酸化的ホスホリル化を通じて再生される。しかしながら、嫌気性増殖条件下、 NAD^+ プールの再生は、 NADH を酸化することができる細胞内部の様々な代謝的経路を通じて炭素の流動を操作することのみによって達成される。

30

【0066】

「炭素異化生成物抑止」は、1または複数の遺伝子の発現が一部分において炭素の供給源によって調整され、そのうえで生物が増殖する任意の生物学的系を広く参照する。例えば、大腸菌 (*E. coli*) において、野生型生物においてグルコネオゲネシスにおいて機能する遺伝子は、培地におけるグルコースの存在によって抑制される。特に、*pcK* 遺伝子は、大半の野生型大腸菌 (*E. coli*) 株においてグルコースによって下方調整される。別の例として、酵母サッカロミセスセレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) の野生型株において、ガラクトースなどのグルコース以外の炭素源供給源の利用は、培地におけるグルコースの存在によって阻害される。

40

【0067】

「トリカルボン酸サイクル」または「TCA」サイクルは、全体において、または一部分において、ほとんどの微生物に存在する一連の生化学的反応である。例えば、真正細菌および酵母などの多くの生物において、TCAサイクルは、好気性増殖の間の真正サイクルとして動く。この場合、TCAサイクルは、（酢酸塩などの）2つの炭素ユニットを炭素二酸化物に異化すること、およびグルタミン酸塩、コハク酸塩、およびアスパラギン酸塩などの生合成のための生化学的中間体を生成すること、という2つの主要な機能を有する。嫌気性または微好気性増殖の間、TCAサイクルは、真正のサイクルとしてではなく

50

、むしろ1または複数の線形経路として動くかもしれない。例えば、大腸菌 (*E. coli*) における低酸素条件下、TCAサイクル酵素は、リンゴ酸塩を通じてコハク酸塩をもたらすいわゆる還元的経路、およびクエン酸塩を通じて α -ケトグルタル酸をもたらすいわゆる酸化的経路を含む2つの分岐した経路として作動する。この場合、TCAサイクルの機能は、まず生化学的中間体であるグルタミン酸塩、コハク酸塩、およびアスパラギン酸塩を生産することである。いくつかの炭素は、グリオキシル酸短絡回路によって、2つの分岐の間で移動することができる。好気性、嫌気性、および微好気性増殖の間、生合成のために使用される生化学的中間体のそれぞれの分子について、TCAサイクルにおける分子は、交換されなければならない、さもなければ、該サイクルにおける該化合物は、枯渇するであろう。この交換反応は、アナブレロティック反応と呼ばれる。

10

【0068】

共通のアナブレロティック反応は、ビルビン酸塩、またはホスホエノールビルビン酸 (PEP) などの3つの炭素化合物を取り、そして、第二の基質として炭素二酸化物を用いてオキサロ酢酸、またはリンゴ酸塩などの4つの炭素化合物にそれを変質させる。

【0069】

真正細菌および酵母などの多くの生物において、TCAサイクルの酵素をコードする遺伝子の発現、およびグリオキシル酸短絡回路は、グルコースによって抑制される、および/または酸素によって誘導される (Cronan and Laporte, 1996)。この調整の制御は、複雑である。文献によれば、特に低酸素の条件下でのコハク酸塩および他の化合物の効率的な生産は、還元的TCAサイクル酵素、およびグリオキシル酸短絡回路のものの繊細なバランスを必要とする (Vemuri et al., 2002; Wang et al., 2006; Sanchez et al. 2005)。

20

【0070】

しかしながら、技術の状態は、コハク酸塩などの化合物の生合成のためのTCAサイクル、およびグリオキシル酸短絡回路経路の使用を最適にする、または最適に近くする株を合理的に設計するのに十分には発展していない。本発明の目的の1つは、TCAサイクルの化学物質の生産のために最適に近い高度に進化した微生物を、DNA配列のレベルで見極め、将来的に、より合理的な株の設計および構築が、コハク酸塩、および他の化学物質の生産のための株を改変するために使用することができるようにすることである。本発明において発見された変異は、TCAサイクル中間体、およびTCAサイクルの派生物中間体、特に、コハク酸塩、フマル酸塩、リンゴ酸塩、グルタミン酸塩、アスパラギン酸塩、スレオニン、リジン、メチオニン、およびイソロイシンを含むがそれらに限定されないオキサロ酢酸に由来する化学物質を含むTCAサイクルに関する化学物質の生合成を改良するのに有用である。というのは、本明細書において説明される変異は、野生型生物において、このような化合物を生産するために機能する遺伝子および酵素は、複雑な方法において負に調整される条件であるグルコース (または他の糖) ベースの培地における低酸素の条件下、オキサロ酢酸に向かう、およびそれからの代謝的フラックスを増大させることに有用だからである。

30

【0071】

しばしばバクテリアにおいて見出される糖の輸送のための1つのメカニズムは、ホスホトランスフェラーゼ系 (PTS) である。これは、2エネルギー-共役タンパク質である酵素IおよびHPr、ならびに典型的には3つのタンパク質ドメインであるEIIA、EII B、およびEII Cからなるいくつかの糖特異的酵素Iタンパク質、またはタンパク質複合体から構成される。EIIDメインの組織は、バクテリアの間で異なる。EIIは、単一の融合タンパク質、または異なる融合および非融合ドメインからなるかもしれない。膜を通じた特定の糖の転位は、内在性膜ドメイン (複数可) EII Cによって、および時にはEII Dによって促進される。しかしながら、一緒に機能して糖基質の輸送およびホスホリル化を引き起こし、ホスホリル化された炭水化物の細胞内プールをもたらすのは、3つの酵素ドメイン、またはタンパク質の複合体である。エネルギーおよびPTSのためのリン酸の供給源は、ホスホエノールビルビン酸 (PEP) である。しかしながら

40

50

、細胞の内部においてPTSおよび生合成の経路の間でPEPについての競合があることができるように、PEPは、リンゴ酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、アスパラギン酸塩などの多くの4-炭素化合物、およびそれらの4-炭素化合物から作られた他の化合物の生合成のための基質であることもできる。大腸菌(*E. coli*)において、グルコースのためのPTS系は、ptsH、I、G、およびcrr遺伝子によってコードされる。糖を微生物に輸送するための他のメカニズムであって、PTSと関わないものがある。我々は、直接にはPEPを基質として使用しないこれら他の輸送メカニズムにかかわるタンパク質を「非-PTS」糖輸送体と呼ぶものとする。非-PTS輸送体の例は、大腸菌(*E. coli*)のGalPおよびXylEなどのプロトン輸送体、サッカロミセスセレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)のHEX1、2、6、および7、およびザイモナス・モビリス(*Zymomonas mobilis*)のGl fなどの促進されたディフューザー、ならびに大腸菌(*E. coli*)のXyl FGHなどのABC-タイプ輸送体である。

10

【0072】

バクテリアにおける糖輸送体の最大群は、ATP結合カセット(ABC)輸送体として知られている。名が暗示するように、ABC輸送体は、バクテリアの細胞に輸送された糖の各分子のためにATPの分子を必要とする。Xyl FGHは、ペントース糖であるキシロースを細胞に輸送するためのABC輸送体である。Ara FGHは、別のペントース糖であるアラビノースを輸送するためのABC輸送体である。

20

【0073】

他のタイプの非-PTSバクテリア糖輸送体は、主要ファシリテータースーパーファミリー(MFS)下でグループ化される。MFS糖輸送体内で、輸送体の2つの異なるカテゴリーが認められている。MFSは、H⁺-連動輸送体、Na⁺-連動輸送体-対向輸送体、および単輸送体を含む。単輸送体は、糖輸送のための単純なファシリテーターである。大腸菌(*E. coli*)における膜貫通タンパク質Gl fは、単輸送体の例である。H⁺-輸送体は、細胞に輸送された各糖分子のためにプロトンが必要とする。大腸菌(*E. coli*)におけるGalPタンパク質は、ヘキソース糖であるガラクトースを細胞に輸送するための輸送体である。GalPは、12の膜貫通ループを有する非常によく特徴付けられた輸送体である。GalPは、細胞膜を越えてグルコースを輸送する能力を有するとも報告されている。Ara Eは、細胞膜を越えてアラビノースを輸送するためのプロトン-連動輸送体である。同様に、Xyl Eタンパク質は、キシロースの輸送のためのプロトン-連動輸送体である。

30

【0074】

ホスホトランスフェラーゼ系(PTS)によるグルコース取り込みの除去は、微生物細胞へのグルコース取り込みに費やされるエネルギーを低下させるのに役立つことができた。PTSを操作することによって保存されるエネルギーは、有機酸生産の効率を改良することに向かわせることができる。ホスホトランスフェラーゼ系遺伝子ptsH、およびptsGは、グルコース取り込みにおけるエネルギーを保存するように操作し、そしてそれによって微生物によるコハク酸生産の効率を改良することができる。このように、微生物代謝的経路の分野において入手することができるデータを採ることによって、代謝的経路の大半をブロックするために、および炭素流動を高い効率でのコハク酸の生産に向かわせるために、一連の遺伝子を欠失させることができる。PTS-介在グルコース取り込みの阻害を用いて、グルコース取り込みのための他の系は、産業上有用な化学物質の生産のために細胞内でグルコースを確実に継続して入手することができるように活性化することができる。例えば、グルコース単輸送体であるグルコースパーミアーゼをコードするgl f遺伝子は、PTS介在グルコース取り込みの喪失の代わりになることが示されてきた。同様に、galPおよびgl k遺伝子の過剰発現は、大腸菌(*E. coli*)のpts⁻株におけるグルコース取り込みおよびホスホリル化を増進することが報告されている。GalPは、ヘキソース糖であるガラクトースの取り込みのための輸送体である。GalPは、pts⁻株においてグルコースを輸送することが報告されてきた。GalP介在グルコ

40

50

ース取り込みの意義は、*p t s⁻* 変異体における *g a l P* 遺伝子の不活性化が致死であることが見出されたという事実によって証明されている (Y i e t a l . , 2 0 0 3)。 *G l k* は、解糖に入ることができる前に、グルコース分子のホスホリル化を達成することが必要である。*p t s⁻* 株における *G a l P* タンパク質の発現は、構成的プロモーター下の外因性遺伝子を発現すること、または *g a l S* および *g a l R* などの *g a l P* 遺伝子のリプレッサーをコードする遺伝子における変異を通じて *g a l P* 発現の抑止を軽減することのいずれかによって達成することができる。

【 0 0 7 5 】

微生物細胞における代謝的経路についての我々の最近の理解を用いて、有意な量のコハク酸を生産するように設計された株を合理的に構築することができる。効率的にコハク酸を生産する微生物の構築のための合理的設計は、細胞の内部の炭素流動のための他の潜在的発酵性経路が遺伝学的操作を通じてブロックされている場合に、コハク酸は、嫌気性または微好気性条件下で蓄積することができたという仮定に基づく。細胞内の炭素流動のために特定の経路をブロックすることが必要である遺伝学的操作は、ブロックされることが求められる経路の作動にかかわる酵素をコードする 1 または複数の遺伝子の活性を低下させること、または除去することを伴う。酢酸塩、蟻酸塩、エタノール、および乳酸塩への炭素流動は、適切な遺伝学的方法を通じてブロックすることができる。例えば、*a d h E* についての遺伝子を欠失させることによって、嫌気性アルコール生産をブロックすることができ、そして、*a c k* および / または *p t a A* 遺伝子を欠失させることによって酢酸塩への炭素流動をブロックすることができる。

【 0 0 7 6 】

細胞内の炭素流動のために特定の無用の経路をブロックすること、および炭素流動をコハク酸生産に向けることが原理上は正攻法であるけれども、実際には、合理的に設計された遺伝子欠失は、所望の表現型をもたらさない。J a n t a m a e t a l (2 0 0 8 a ; 2 0 0 8 b) によって説明されるように、合理的に設計された遺伝子欠失は、最初に、増殖が乏しいバクテリア株をもたらした。増殖が乏しい遺伝子 - 欠失株は、次に、増殖比率を改良するために代謝的進化にさらされた。このように、コハク酸生産のための大腸菌 (*E . c o l i*) 株を構築するにあたり、*l d h A*、*a d h E*、および *a c k* 遺伝子を除去した第一段の欠失が行われ、続いて、第一段階の代謝的進化が行われた。

【 0 0 7 7 】

第一段階の代謝的進化の後、第二段の遺伝子欠失が、*f o c A* および *p f l B* 遺伝子を除去した。そして、第二段の代謝的進化が、行われた。第三段の欠失において、*m g s A* 遺伝子が、除去された。そして、第三段階の代謝的進化が、行われた。第四段の欠失において、*p o x B* 遺伝子が、欠失させられ、除去された。そして、第四段階の代謝的進化が行われた。

【 0 0 7 8 】

「代謝的進化」は、生物 (しばしば遺伝学的に改変された生物) の培養 (必ずしもそうとは限らないが通常は、液体培養) が、希釈および (「移動」とよばれる) 再 - 増殖の反復したサイクルにさらされ、それによって、多数の移動の後、改良された増殖特性および / またはコハク酸、乳酸、エタノール、またはブタノールなどの増殖に連結している化学物質の改良された生産を保有する株を得ることができるようにするプロセスである。微生物の増殖が発酵によって所望の化学物質を生産することに依存的にされる場合には、代謝的進化は、株改良のための方法として特に効果的である。例えば、野生型大腸菌 (*E . c o l i*) などのヘテロ発酵性微生物は、グルコースなどの糖上で嫌氣的にまたは微好氣的に増殖させられる場合、化学物質である D - 乳酸塩、L - 乳酸塩、蟻酸塩、コハク酸塩、酢酸塩、炭素二酸化物、水素、およびエタノールの混合物を生産する。これらの化合物への経路は、「発酵性経路」と呼ばれる。他の生物において、発酵性経路は、ブタノール、他のアルコール、他の有機酸、エステル、3 - ヒドロキシアルカン酸、脂肪酸、アルカン、アルケン、カロテノイド、アミノ酸、およびビタミンなどの非常に多様な化学物質をもたらすことができる。野生型大腸菌 (*E . c o l i*) によって作られる化合物のうち、少

なくとも D - 乳酸塩、コハク酸塩、およびエタノールは、商業的関心があるものであり、そのため、「所望の化合物」であると考えることができる。無用の化合物への経路を制御する遺伝子を欠失させることによって、生物は、所望の化合物への 1 または複数の経路のみが残され、そのため、増殖が、前記所望の化合物に依存的になる、またはそれに連動する。また、宿主生物からの全ての発酵性経路は、欠失させることができ、そして、宿主生物において天然に生産されない所望の化合物をもたらし異なる生物からの新たな外因性経路が、遺伝学的改変によって導入されることができる。代謝的進化は、そして、増殖をしたがって所望の化合物の生産を改良するために、変異したまたは改変された株に適用される。代謝的進化は、意図的な突然変異生成を必要としないので、進化した株に対する変異的負担は、最小であり、そして、大抵、全てでないかもしれないが、蓄積する変異は、所望の化合物の増殖および / または生産に有益であろう。代謝的進化の良好な例は、株 K J 1 2 2 であり、これは、所望の化合物としてコハク酸塩を生産するように改変されており、そして、代謝的進化にさらされている (J a n t a m a e t a l . , 2 0 0 8 b) 。

10

【 0 0 7 9 】

この明細書において、用語「化学物質」および「化合物」は、区別しないで使用されるものとし、そして、両方ともが、従来の意味において使用されるものとする。

【 0 0 8 0 】

自然発生的変異が生じ、そして、集団において固定されるクローンの間での付随する競合を有する多くの世代の増殖を達成するために、代謝的進化の間、選択された培養物は、反復して移動され、そして、連続して多くの回数、新鮮最小培地に希釈させられ、いくつかの変異が、供給されている炭素源供給源のより効率的な使用、培養における毒性化学物質に耐えるためのより良い能力、およびこの例においてコハク酸であった望ましい化学物質の生産のより高い効率を与える。代謝的進化の間、望ましい表現型を有するが望ましくない副産物の生産も低いまたは存在しないクローンを選択することに注意が払われる。

20

【 0 0 8 1 】

このように、一般化すると、特定の化学物質を過剰生産するように設計され、そして遺伝学的に改変された微生物生物は適切な増殖比率を有しなくてもよく、そして、結果的に、特定の化学物質を生産するための期待されたまたは所望の効率を示さなくてもよい。代謝的進化は、その特定の化学物質の生産のための増大した比率を伴う生産耐性、および改良した増殖を有する株を選択するために使用されることができる。しかしながら、代謝的進化は、自然発生的変異からもたらされるので、改良された増殖、生産耐性、および化学物質生産の効率をもたらし正確な遺伝学的変更は、代謝的進化方法によって、明白、予測可能、または再現可能でないかもしれない。進化した生物のゲノムの DNA 配列の測定は、蓄積した変異の詳細を提供することができる。そして、同種野生型対立遺伝子を有する進化した株におけるそれぞれの個別の変異を交換することによって、またはその代わりに、ナイーブで進化していない株に変異した対立遺伝子を導入し、続いて、株性能の比較分析をすることによって、どの変異が所望の表現型に貢献するかを実証することができる。進化した株に残るいくつかの変異が所望のプロセスに有害であることはありうる。これらは、進化における初期の段階では有益な変異である、または離れて進化する時間がなかった変異であることができた。任意の場合において、どの変異が有益であるかを、そして、それらの変異の正確な特質を知ることは、(1) 将来の遺伝学的改変のためのより合理的な設計、例えば、長期にわたる進化プロセスが必要ないコハク酸生産のための新株または生物の改変、および (2) 同じくさらにより合理的な株改良をもたらしことができる、株性能を改良する僅かなまたは予想外の変異に対する洞察、を可能にする。例えば、リプレッサー遺伝子において見出されるフレームシフト変異が進化した株において発見されるならば、遺伝学的改変は、同一の表現型を与える非 - 復帰可能であり、そしてそのためより安定な対立遺伝子を作成するために、そのリプレッサー遺伝子の完全な欠失を作成するように使用することができる。

30

40

【 0 0 8 2 】

50

生物がある望ましい表現型を獲得するように強いるある選択的な圧力を用いる代謝的進化のプロセスの間、2つの可能な変更が生じた。該生物は、単純にそれ自体を選択的圧力に適応させることができ、そして、変更した遺伝子型を示さないことができた。また、生物は、選択的圧力下である遺伝学的変更を経験し、そして、より永続的な変更した表現型を示すかもしれない。適応しかない、および遺伝学的変更がない場合、いったん選択圧力が軽減すると、生物は、その最初の表現型に復帰するであろう。これらの生物は、「適応した」生物といわれる。該「適応した」微生物は、変更した表現型を示すためには別の新鮮な段の選択圧力を経験しなければならない。他方、付随する遺伝学的変更がある場合には、変更した表現型は、選択圧力がない場合であっても、存在し続けるであろう。ある遺伝学的変更を伴う代謝的進化は、望ましい。代謝的進化の間で安定な遺伝学的変更を獲得している微生物は、選択圧力のある新鮮培地に移動する前に、微生物を最初の増殖培地においていかなる選択圧力もなしに、しばらく増殖させることによって容易に同定することができる。これらの生物が、いかなる遅延期なしに良好な増殖、および期待される表現型を示すことができるならば、該生物は、代謝的進化の間で、表現型を伴う変更した遺伝子型を獲得したと考えられる。

10

【0083】

有意な量のコハク酸を生産するための微生物を作るために、糖分解経路、トリカルボン酸サイクル (Krebs サイクルまたは TCA サイクルとしても知られる)、およびグリオキシル酸短絡回路を含む多くの微生物代謝的経路にかかわる様々な酵素が、引用され、そして、参照によって上記の段落に組み込まれる科学および特許文献において説明される多様な遺伝学的改変技術を用いて操作することができる。様々な微生物代謝的経路についての詳細は、Lehninger による生化学の原理、および Lubert Stryer による生化学などの標準的な生化学テキストブックにおいて見出すことができる。St. Louis, MO, USA における Sigma Chemical Company から入手することができる G. Michael による pathways poster も、バクテリア細胞内の様々な生化学的経路についての詳細を提供する。

20

【0084】

好気性増殖の間、微生物炭素代謝は、解糖、トリカルボン酸サイクル、および酸化的ホスホリル化に関わる。NADPH および NADH などの低下した酵素共因子は、細胞増殖に必要な ATP 生産を伴う酸化的ホスホリル化の作動によって再生される。本発明の好ましい実施態様におけるコハク酸の生産のための嫌気性増殖条件下、低下した共因子 NADPH および NADH の再生は、トリカルボン酸サイクルへの炭素流動をコハク酸生産に向かわせて、そして、 NADP^+ および NAD^+ の再生のために他の発酵性経路の全てを除去することによって達成される。

30

【0085】

好ましい有機酸のタイプに依存して、微生物が我々の選択の特定の有機酸を生産するように、代謝的経路は、特に改変される。微生物は、乳酸、酢酸、リンゴ酸、ピルビン酸、蟻酸、およびコハク酸を含む多数の有機酸を合成することができる。このように、コハク酸の生産のために生体触媒を開発するにあたり、酢酸、乳酸、ピルビン酸、および蟻酸の生産のための経路は、ブロックされ、そして、コハク酸生産物への炭素流動が、細胞内の炭素代謝にかかわる 1 または複数の酵素を操作することを通じて促進される。既知の遺伝学的改変技術を用いて操作することができる微生物発酵性経路において活性である該酵素の一覧は、イソクエン酸シンターゼ (aceA)、リンゴ酸シンターゼ (aceB)、グリオキシル酸短絡回路オペロン (aceBAK)、酢酸キナーゼ - ホスホトランスアセチラーゼ (ackA-ptA); アコニターゼヒドラーゼ 1 および 2 (aconA および aconB); アセチル-CoA シンターゼ (acs); クエン酸リアーゼ (citDEF); アルコールデヒドロゲナーゼ (adhE); クエン酸シンターゼ (citZ); フマル酸レダクターゼ (frd); 乳酸デヒドロゲナーゼ (ldh); リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (mdh); aceBAK オペロンリプレッサー (iclR); ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (pepC); ピルビン酸蟻酸リアーゼ (pf1); ピルビン

40

50

酸オキシダーゼ (p o x B) ; ピルビン酸カルボキシキナーゼ (p c k) ; およびピルビン酸カルボキシラーゼ (p y c) を含むがそれらに限定されない。

【 0 0 8 6 】

炭素源供給源の解糖は、ホスホエノールピルビン酸 (P E P) の生産をもたらす。P E P は、さらに、混合した酸経路によって代謝される。本発明において使用する場合、用語「混合した酸経路」は、トリカルボン酸サイクルおよび嫌気性条件下で作動可能である様々な発酵性経路の両方を通じた P E P からの炭素の流動を参照する。嫌気性条件下、ピルビン酸塩の代謝のための少なくとも 4 つの異なる発酵性経路が認められる。ピルビン酸塩は、N A D H を用いて、それによって、N A D ⁺ を生産して炭素源供給源の持続的な代謝に必要な細胞の酸化還元バランスを維持して、乳酸塩に還元してもよい。ピルビン酸塩に由来するアセチル - C o A も、N A D ⁺ を生産するための N A D H の酸化に伴いエタノールを生産するために還元されもよい。ピルビン酸塩も、蟻酸塩または酢酸塩に変質されてよい。

10

【 0 0 8 7 】

T C A サイクル内において、2 つの異なる腕 (a r m s) が認められる。イソクエン酸を通じたオキサロ酢酸からコハク酸への炭素流動を包含する酸化的腕 (a r m) と呼ばれる T C A サイクルの 1 つの腕 (a r m) において、N A D P ⁺ が、結果として生じる N A D P H の形成とともに、イソクエン酸を酸化するために利用される。リンゴ酸塩およびフマル酸塩を通じたオキサロ酢酸からコハク酸への炭素の流動を包含する T C A サイクルの還元的腕 (a r m) と呼ばれる T C A サイクルの他の腕 (a r m) において、N A D ⁺ を生産し、それによって細胞が酸化還元バランスを維持するのに役立つようにするために、N A D H は、酸化される。

20

【 0 0 8 8 】

本発明の 1 つの実施態様において、発酵性経路を通じた P E P からの炭素流動は、発酵性経路にかかわる酵素をコードする遺伝子を不活性化することによって阻害される。これらの発酵性経路を通じた炭素流動をブロックするのに適した遺伝子は、l d h A、p f l B、a d h E、p t a、a c k A、および p o x B を含む。これらの遺伝子の 1 または複数の除去は、発酵性経路を通じた P E P からの炭素流動を低下させることが期待される。本発明の別の側面において、メチルグリオキサルの乳酸への変質に関与するメチルグリオキサシンターゼ (m g s A) をコードする m g s A 遺伝子は、発酵性経路にかかわる 6 つの他の遺伝子の不活性化と並んで不活性化される。

30

【 0 0 8 9 】

本発明のいまだ別の実施態様において、発酵性経路にかかわる遺伝子の機能的ホモログも、1 または他の発酵性経路にかかわることがよく知られている遺伝子を不活性化することのほかにも不活性化される。酢酸キナーゼ活性を有するプロピオン酸キナーゼは、スレオニンの分解のためのみに生産される t d c D 遺伝子によってコードされる。しかしながら、1 0 % (w / v) グルコースを有する嫌気性増殖の間、t d c D の発現は、機能的に a c k A を交換することができた。加えて、同一オペロンにおける隣接 t d c E 遺伝子は、p f l B に類似し、そして、ピルビン酸蟻酸 - リアーゼ活性を有する - ケト酪酸蟻酸リアーゼをコードする。本発明の 1 つの側面において、t d c D E 遺伝子は、炭素の発酵性経路への進入を阻害して、そして、T C A サイクルへの炭素の流動を確実にするために不活性化される。

40

【 0 0 9 0 】

本発明の別の実施態様において、発酵性経路を通じた炭素流動をブロックすることに加えて、T C A サイクル内の炭素流動が、コハク酸の生産に向かう炭素流動があるように変化させられる。本発明の 1 つの側面において、T C A サイクル内の炭素流動の操作は、1 または複数の遺伝子の発現を上方 - 調整することによって達成される。本発明のいまだ別の側面において、T C A サイクル内で機能する 1 または複数の遺伝子は、コハク酸への増大した炭素流動を促進するように不活性化されてもよい。

【 0 0 9 1 】

50

本発明の好ましい側面において、リンゴ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子 *mdh* が、フマル酸塩およびコハク酸塩へのリンゴ酸塩の変質を改良するために上方調整される。リンゴ酸塩およびフマル酸塩を通じたオキサロ酢酸からのコハク酸への炭素の流動は、TCAサイクルの還元的腕 (*arm*) と呼ばれる。オキサロ酢酸からコハク酸へのこのTCAサイクルの還元的腕 (*arm*) を通じた炭素の流動は、生産されるコハク酸の各モルについて2モルのNADHを消費し、そして、それによって、嫌気性条件下、細胞の酸化還元バランスを維持することに役立つであろう。換言すると、*mdh* の上方 - 調整は、細胞の酸化還元バランスを維持するために必要なNAD⁺ を再生することに役立つであろう。*mdh* 遺伝子発現の該上方 - 調整は、*mdh* 遺伝子のためのネイティブのプロモーターをいくつかの他の強力なプロモーター配列に交換することによって、またはそれに代えて *mdh* 遺伝子の増大した転写があるように *mdh* 遺伝子のプロモーター領域を変異させることによって達成することができる。また、*mdh* 遺伝子の付加的コピーを、株に付加することができる、または *mdh* 遺伝子の発現を調整する遺伝子を *mdh* 遺伝子の発現を増大させるために操作することができる。本発明の好ましい実施態様において、*mdh* 遺伝子発現の上方調整は、そのプロモーター領域を遺伝学的に操作することによって達成される。

10

【0092】

TCAサイクルの正常な作動において、コハク酸は、TCAサイクルの腕 (*arm*) の酸化の作動を通じて生産される。クエン酸塩、シス - アコニット酸塩、イソクエン酸塩、
- ケトグルタル酸塩、およびスクシニル - CoA を通じたオキサロ酢酸からコハク酸への炭素の流動は、TCAサイクルの酸化的腕 (*arm*) と呼ばれる。コハク酸は、グリオキシル酸副経路の作動を通じて生産することもできる。グリオキシル酸副経路の作動の間、イソクエン酸リアーゼの作用によって、コハク酸塩およびグリオキシル酸塩がイソクエン酸塩から生産される。このようにTCAサイクルの酸化的腕 (*arm*) の作動から、またはグリオキシル酸副経路の作動から生産されるコハク酸塩は、コハク酸デヒドロゲナーゼ (*sdh*) によって、フマル酸を、そして、リンゴ酸を産出するように作用されることができる。したがって、本発明の別の実施態様において、遺伝子不活性化は、細胞内のコハク酸生産を増大させるために、コハク酸塩の脱水素化の阻害に使用することができる。

20

【0093】

本発明の別の側面において、グリオキシル酸副経路を通じた炭素流動は、コハク酸生産における増大を達成するように操作することができる。イソクエン酸リアーゼ酵素は、グリオキシル酸塩およびコハク酸塩へのイソクエン酸塩の切断を触媒する。イソクエン酸リアーゼは、*aceBAK* オペロンによってコードされる。イソクエン酸リアーゼ活性は、*iclR* 遺伝子によって抑制される。換言すれば、*iclR* 遺伝子の発現は、グリオキシル酸短絡回路の作動を阻害する。本発明の1つの側面において、*iclR* 遺伝子は、発酵性代謝にかかわる遺伝子の不活性化と並んで不活性化される。

30

【0094】

本発明のいまだ別の実施態様において、発酵性経路の作動を阻害すること、および遺伝学的操作を通じてコハク酸生産に向かうTCAサイクル内の炭素の流動を増大させることに加えて、TCAサイクルから他の代謝的経路への外部からの炭素流動は、コハク酸生産を増大させるための遺伝学的手段を通じてブロックされることもできる。例えば、TCAサイクルからアミノ酸代謝への炭素の流動は、コハク酸に向かう炭素流動を改良するためにブロックすることができる。アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ遺伝子 (*aspC*) は、アスパラギン酸合成においてグルタミン酸からオキサロ酢酸にアミノ基を転位し、それによってTCAサイクルからの炭素の外部からの流動を促進する。本発明の1つの側面において、TCAサイクルからの炭素の外部からの流動をブロックするために、TCAサイクルの酸化的または還元的腕 (*arm*) のいずれかを通じたオキサロ酢酸からコハク酸生産に向かう炭素流動を改良するために、*aspC* 遺伝子の不活性化が続いて行われる。

40

【0095】

50

他のT C Aサイクルからの炭素の外部からの流動は、リンゴ酸塩から生じる。リンゴ酸酵素 (s f c A) によるリンゴ酸塩の脱カルボキシル化は、ピルビン酸塩の生産をもたらす。本発明の1つの側面において、s f c A 遺伝子をコードする遺伝子は、T C Aサイクルからの炭素の外部からの流動を縮小するために不活性化される。本発明のいまだ別の側面において、a s p C および s f c A 遺伝子の両方が、T C Aサイクルからの炭素の外部からの流動を阻害して、コハク酸蓄積を増進するために不活性化される。

【0096】

本発明のいまだ別の側面において、T C Aサイクルからの炭素の外部からの流動は、オキサロ酢酸塩および酢酸塩へのクエン酸の切断に關与するクエン酸リアーゼ遺伝子 (c i t D E F) を不活性化することによって阻害される。

10

【0097】

発酵性経路にかかわる遺伝子およびそれらの機能的アナログを不活性化することに加えて、増殖に連動するコハク酸産出量は、微生物細胞内のカルボキシル化酵素の遺伝学的操作によってさらに改良することができる。遺伝学的および酵素分析を実施することを通じて代謝的進化の間に生じる変更を特徴付ける間、細胞内のカルボキシル化酵素が、改良されたコハク酸産出量を達成するための遺伝学的操作についてのいまだ別の標的であることができることが示されてきた。

【0098】

糖分解中間体ホスホエノールピルビン酸 (P E P) およびピルビン酸は、T C Aサイクルへの炭素流動を改良するためにカルボキシル化することができる。普通の条件下、T C Aサイクルへの炭素進入は、クエン酸を生産するために、ピルビン酸塩に由来するアセチル - C o A と、T C Aサイクルにおける中間体であるオキサロ酢酸とを組み合わせるクエン酸シンターゼの作用によって達成される。細胞内に存在する1または複数のカルボキシル化酵素の効率を改良することによって、ホスホエノールピルビン酸ピルビン酸塩およびピルビン酸塩をT C Aサイクル中間体であるオキサロ酢酸にカルボキシル化することが可能である。カルボキシル化反応からこのようにして生産されるオキサロ酢酸は、コハク酸を生産するため、T C Aサイクルの還元的腕 (a r m) を通じてさらに還元することができる。

20

【0099】

細胞内に存在するカルボキシル化酵素を操作することは、嫌気性発酵性増殖の間のコハク酸産出量を増大させる方法である。外因性供給源からピルビン酸カルボキシラーゼ (p y c) を導入することによって、ピルビン酸塩をオキサロ酢酸にカルボキシル化することが可能であることは、本技術分野においてよく知られている。大腸菌 (E . c o l i) などの遺伝学的操作によく適している微生物株は、p y c 遺伝子を有さない。リゾビウム・エトリ (R h i z o p i u m e l t i) およびラクトバチルス・ラクチス (L a c t o b a c i l l u s l a c t i) などの他のバクテリア種に由来するp y c 遺伝子が、コハク酸生産を改良するために遺伝学的に修飾された大腸菌 (E . c o l i) 株に導入されてきた。

30

【0100】

4つの異なる内因性のカルボキシル化酵素が、大腸菌 (E . c o l i) において知られている。これらの酵素の2つは、ホスホエノールピルビン酸をカルボキシル化することに関与し、そして、2つの他の酵素は、ピルビン酸キナーゼ酵素の作用に由来するホスホエノールピルビン酸に由来するピルビン酸塩のカルボキシル化に関与する。酵素ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (p p c) は、コハク酸塩を生産するために、T C Aサイクルの還元的腕 (a r m) に進入することができたオキサロ酢酸にホスホエノールピルビン酸をカルボキシカルボキシル化する。第二のカルボキシル化酵素ホスホエノールピルビン酸キナーゼ (p c k) も、オキサロ酢酸を生産するためにホスホエノールピルビン酸をカルボキシカルボキシル化するが、普通は、グルコースの存在においては発現しないので、逆反応を触媒する。2つの他のカルボキシル化酵素、すなわち、N A D H - 連動リンゴ酸酵素 (m a e B) およびN A D P H - 連動リンゴ酸酵素 (m a e A / s f c A) は、

40

50

ピルビン酸をリンゴ酸にカルボキシカルボキシル化する。maeBおよびsfcA酵素は、ピルビン酸キナーゼの作用によってホスホエノールピルビン酸に由来するピルビン酸塩をカルボキシカルボキシル化する。

【0101】

細胞に存在する4つのカルボキシル化酵素の任意の1つは、糖分解サイクル中間体からTCAサイクルへの炭素流動を改良するため、その酵素的活性を増大するために、遺伝学的に操作することができる。大腸菌(E. coli)において存在する4つのネイティブのカルボキシル化酵素のPPC-触媒反応が、強く好まれる。PEPにおいて含まれるエネルギーは、無機リン酸塩の放出を有するこの反応において失われる。他の3つのカルボキシル化酵素、すなわち、pcK、maeA、およびsfcA(maeB)は、これらの3つのカルボキシル化酵素は、グルコースによって抑制されるので、基質としてグルコースを用いた発酵性増殖の間、機能することが期待されない。これら3つのカルボキシル化酵素は、細胞が、有機酸を酸化的に代謝している場合、グルコネオゲネシスの間、逆方向において機能すると考えられる。

10

【0102】

糖新生PEPカルボキシキナーゼ(pcK)は、TCAサイクルへの炭素の流動を改良するために遺伝学的に操作することができる。pcKの活性を改良することにおける利点は、ホスホエノールピルビン酸をオキサロ酢酸にカルボキシル化する間のこの酵素が、生産されたオキサロ酢酸の各分子についてATPの分子の生産をもたらすという事実にある。ATP産出量における増大は、細胞の増殖比率を増大するであろう。

20

【0103】

発酵性コハク酸塩生産のためのネイティブの糖新生pcKの動員は、pcK遺伝子の転写に肯定的に影響する任意の変異によって達成することができる。PCK活性のレベルにおける増大は、ネイティブのプロモーター、または遺伝子の発現を増大させることが知られている任意の他のプロモーター配列を有する多コピープラスミドにおいてpcK遺伝子を発現させることによって達成することができる。細胞内pcK遺伝子の発現を増大させるための別の方法は、付加的コピーのpcK遺伝子を組み入れることである。本発明の別の実施態様において、pcK遺伝子のネイティブのプロモーターは、活性のレベルを増進させることが知られているいくつかの他のプロモーター要素と交換することができる。pcK遺伝子の増大した発現は、該遺伝子のプロモーター領域における変異によって、またはpcK遺伝子のプロモーター領域と相互作用することが知られている調節要素の遺伝学的操作のいずれかによって達成することもできる。pcK遺伝子の調節遺伝子タンパク質をコードする遺伝子は、pcK遺伝子の発現を増大させるために、変異させる、もしくは欠失させる、またはいくつかの方法において過剰発現させることができる。単一点変異(pcK遺伝子のATG開始コドンと比較して、位置-64におけるGからAへの転位)は、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ酵素活性における対応する増大を伴い、pcK遺伝子の転写を増大させることができた。pcK遺伝子発現における同様の増大は、pcK遺伝子の発現を調整することが知られているタンパク質をコードする遺伝子を遺伝学的に操作することによって達成することもできる。例えば、Craタンパク質は、大腸菌(E. coli)においてpcK遺伝子の発現を活性化することが示されてきた(Saier and Ramseier, 196)。同様に、csrA系(csrA、csrB、csrC、csrD、uvrY、またはbarAを含む)は、mRNA安定性を変化させることによって、pcKおよびグルコース代謝にかかわる他の遺伝子レベルを調整することも報告されてきた(Babitzke and Romeo, 2007; Pernestig et al., 2003; Suzuki K et al., 2002)。

30

40

【0104】

本発明において、望ましい表現型、例えば、改良された効率コハク酸生産を示す遺伝学的に改変された、そして、代謝的に進化した株、および遺伝学的に改変されたおよび代謝的に進化した株の構築にあたり使用される野生型株は、ゲノムのDNA配列分析にさらさ

50

れる。

【0105】

野生型親株および遺伝学的に改変された、および代謝的に進化した株の全体ゲノムシーケンシングは、ハイスループットDNAシーケンシングの分野における当業者によく知られているシーケンシング技術によって達成することができる。多数のシーケンシング技術は、市場において入手可能であり、そこでは、例えば、Illumina, Inc., および454, Inc.によって提供されるハードウェア、ソフトウェア、および方法など、コスト-効果的態様で、ゲノムの配列情報を提供することができた。

【0106】

野生型および進化したバクテリア株から得られる配列データは、適切なソフトウェアを用いて比較することができ、そして、2つの株の間の遺伝学的変更を得ることができる。2つの株の間の遺伝学的変更の全ての一覧から、遺伝学的改変の段階で意図的に導入された遺伝学的変更は、検証することができ、そして、代謝的進化のプロセスの間に生じて固定された付加的遺伝学的変更は、同定することができる。

【0107】

一度、代謝的進化の間に生じた変異が同定されると、所望の化学物質の生産を改良することにおけるこれらの変異の重要性が、逆遺伝学的分析を用いることによって測定される。例えば、測定することができる力価でコハク酸を生産し、そして、その染色体のDNAにおける最小数の遺伝子変更を含むナイーブなバクテリア株が、利用することができる。ともに変異した形態のpckおよびpstI、ならびにpflBにおける欠失を含む大腸菌(E. coli)株XZ722、および同一公表株XZ721は、他の株のうち、この目的に適している(Zhang et al., 2009)。株KJ122(または関心のある任意の他の株)の代謝的進化の間に生じた遺伝学的変異は、本技術分野においてよく知られている技術を用いて株XZ721またはXZ722に導入することができる。2工程遺伝子交換方法は、本技術分野においてよく知られている(Zhang et al., 2009a; Zhang et al., 2009b; Jantama et al., 2008a; Jantama et al., 2008b)。本発明の株を構築するために使用される「2工程遺伝子交換方法」については、第一の工程は、cat(30mg/lでのクロラムフェニコールに対する耐性)またはkan(50mg/lでのカナマイシン耐性)などの薬剤耐性遺伝子を含む選択可能であり、そして反対-選択可能であるカセットを、60g/lスクロースに対する感受性を与える枯草菌(Bacillus subtilis)からのsacB遺伝子とともに導入することである。cat-sacBまたはkan-sacBカセットは、pLOI4151(配列番号33)またはpGW162(配列番号34)をそれぞれテンプレートとして用いるPCRによって得られる。PCRプライマーは、同種組換えを助長するために、プライミング配列の約18~25の塩基に加えて、染色体の標的配列の5'および3'末端に対して相同の約50の塩基を含む。線状PCR生産物は、プラスミドpKD46で以前に形質転換された受容株へのエレクトロポレーションによって形質転換され、ここで、pKD46は、受容株の染色体への所望のPCR断片の組み入れの頻度を増大させるためにファージラムダRedリコンビナーゼを発現させるものである。pKD46は、30℃で100mg/lでのアンピシリン耐性について選択される。それは、温度感受性複製起点を有し、そして、42℃での増殖によって宿主株から取り除くことができる。pKD46は、Datsenko and Wanner(2000)に説明されており、そして、Coli Genetic Stock Center, Yale University, New Haven, CT, USAから入手可能である。2工程遺伝子交換方法の第二の工程については、第二のPCR生産物は、導入に望ましい対立遺伝子の5'および3'末端にプライムする(prime)第二の対のPCRプライマーを用いて、例えば、KJ122染色体DNAをテンプレートとして用いて作られる。この第二の対のプライマーは、第一の対のPCRプライマーと同様に、相同組換えを助長するために、染色体の標的配列の5'および3'末端に相同である約50の塩基対を含むこともできる。しかしながら、挿入した対立遺

10

20

30

40

50

伝子にとっての染色体の標的が、挿入されるべき対立遺伝子のネイティブの遺伝子座である場合、第二の工程のための相同配列は、単に増幅したDNA配列の一部であることもできる。換言すると、染色体における第二の部位において遺伝子の第二のコピーを導入することにおいて染色体の標的が対立遺伝子のネイティブの遺伝子座と異なる部位である場合、染色体の標的に相同である50塩基対配列は、PCRプライマーの5'末端に付加されることのみが必要である。第二の工程での変更した対立遺伝子の導入は、相同組換えを刺激するためにいまだpKD46を含有する線状の第二のPCR生産物を受容株（これは第一の工程において作出された株である）にエレクトロポレーションすること、および60g/lスクロースを含有するプレート上で選択することによって達成される。この2工程方法において、相同組換えが臨まれる全ての操作について、ヘルパープラスミドpKD46からラムダRedリコンビナーゼ遺伝子の発現を引き起こすために、細胞は、5g/lアラビノースを含有する富栄養培地において増殖させられる。スクロース選択の間に、自然発生的sacB変異体が生じることができるので、結果として生じるコロニーは、クロラムフェニコールまたはカナマイシン感受性について、および所望の対立遺伝子変更を拾い上げたコロニーを同定するための診断的PCRによって、スクリーニングされる。点変異などの僅かな変異については、所望の対立遺伝子が導入されたことを確認するために、導入される対立遺伝子のDNA配列を得ることが必要である。これは、導入される対立遺伝子のPCR増幅されたコピーを得ること、およびPCR生産物をシーケンシングすることによって達成することができる。例えば、タフツ(Tufts)大学コア施設(Core Facility)、タフツ(Tufts)大学医大、ボストン、マサチューセッツ州、USAなどの商業的サービスとしてDNAシーケンシングを行う多くの組織がある。

【0108】

2工程遺伝子交換のために使用されるPCRプライマーの例は、表2において与えられる。

【0109】

それぞれの変異の効果を測定する別の取り組みは、上記の同一の2工程遺伝子交換方法を用いて、進化した株（例えば、KJ122）における単一変異体対立遺伝子を親株である大腸菌(E.coli)C(ATCC 8739)からの同種野生型対立遺伝子に交換することである。株構築は、例えば、ファージP1 vir(Silhavy et al., 1984)を用いて普及したバクテリオファージ形質導入によっても達成することができる。

【0110】

大腸菌(E.coli)染色体にける特定の小さなまたは大きな欠失を作出するための技術も、よく知られており、そして、これらの技術は、他のバクテリア、古細菌酵母、および糸状菌(filamentous fungi)に応用できるべきである。例えば、Kolishnychenko et al.(2002)は、染色体のDNAから特定の遺伝子配列を除去するために従うことができる技術を説明しており、そして、これは、参照によって本明細書に組み込まれる。

【0111】

野生型または変異体を含有する株の同質対後、対立遺伝子が、構築され、対のメンバーは、適切な小スケール発酵槽における増殖および化学物質生産について試験されることができる。例えば、嫌気性または微-好気性条件下でのpH制御での増殖およびコハク酸生産は、以前に説明されたようにして(Zhang et al., 2009a; Zhang et al., 2008b; Janatama et al., 2008a; Janatama et al., 2008b)試験することができる。小スケール発酵槽における株性能を試験するためには、それが生産される場合にコハク酸を中和するために使用されるアルカリ性の溶液は、2.4Mカリウム炭酸塩を加えた1.2Mカリウム水酸化物であることができ、またはそれに代えて、株性能を試験するためには、それは、6Mアンモニウム水酸化物を加えた3Mアンモニウム重炭酸塩であることができる。

【0112】

10

20

30

40

50

一度に1つの変異をXZ722などのコハク酸塩-生産大腸菌(E.coli)株に導入することによって、またはKJ122などのコハク酸塩-生産株から1つの変異を一度に除去する(すなわち、1または複数の変異した遺伝子の野生型対立遺伝子を再-導入すること)ことによって、増殖または化学物質生産を改良することに貢献する遺伝学的変更を決定することができる。加えて、変異の組み合わせによる任意の付加的なまたは相乗的な効果があるかどうかを決定するために、1を超えるタイプの変異が、化学物質-生産株に導入する、または除去することができる。変異のこのスクリーニングを通じて、効率的な増殖および化学物質生産を達成するために重要である変異を同定することが可能である。いったん化学物質生産を改良することに関与するそれらの新規の変異が同定されれば、それらの変異は、コハク酸または他の化学物質生産のためのバクテリア株を合理的に設計するために有用である遺伝子修飾の一覧に付加することができ、そして、それにより、望ましい表現型を有する株を選択することにおける代謝的進化のプロセスについての必要性を除去することができる。

【0113】

本明細書の開示において、大腸菌(E.coli)の株によってコハク酸塩を生産することに関係する特定の例が与えられる。しかしながら、本発明において発見される原理は、広い適用性を有しており、そのため、特定の例の言及は、広い含意をいかなる方法においても限定するために使用されるべきではない。例えば、特定の遺伝子における特定のタイプの変異が、大腸菌(E.coli)におけるコハク酸塩合成に有用であるという発見は、過度の実験なしに、他のバクテリアおよび他の生物に適用することができる。いったん関心のある遺伝子における変異が同定されると、類似の変異、または同一の機能または目的を達成する変異が、幅広い種類の生物に導入することができる。

【0114】

例えば、本発明は、高度に発達した大腸菌(E.coli)の生産株の文脈において、ピルビン酸キナーゼをコードする遺伝子の発現における減少が、コハク酸塩生産に有用であることを開示する。他の生物におけるピルビン酸キナーゼをコードする遺伝子を同定すること、およびコハク酸塩生産を改良するために、欠失または他の変異によって新生物における遺伝子のそのものの発現を減少させることは現在容易である。Klebsiella、セラシア(Serratia)、Citrobacter、エルウィニア(Erwinia)、またはSalmonella属のバクテリアなどの大腸菌(E.coli)の近親については、関連性がある遺伝子が、GenBankまたはDNAまたはタンパク質配列の他の公的なデータベースを通じた相同性検索によって容易に見出すことができる。何がホモログであり、またはそうでないかを定義するために使用することができるはっきりとした境界はないけれども、クエリー配列の「ホモログ」は、進化的にクエリー配列に関するDNA配列であり、そして、通常は、1)長さが50またはそれを超える塩基である配列、または該配列の部分がクエリー配列と50%またはそれを超える同一性の一致を有する遺伝子またはDNA配列として見出されることができ、GenBankを通じて入手可能であるBLASTNプログラムを用いた欠失および挿入、および初期設定パラメータを選ぶこと(「説明」、「グラフィカル概説」、および「アラインメント」を設定すること、フォーマット要求形態において1000またはそれを超えるものに設定することは、10の初期設定からより大きい数に「期待された」数を増大するように、より大きな数のホモログを生み出すであろう)が可能となり、または2)長さが25またはそれより多いアミノ酸であり、そしてクエリー配列に対して25%もしくはそれより高い同一性、または50%またはそれを超える類似性を有するタンパク質配列、またはタンパク質配列の部分として見出されることができ、GenBankを通じて入手可能なBLASTPプログラムの初期設定パラメータを用いた欠失および挿入が可能となる。相同性検索を行うためにGenBankデータベースおよび様々なBLASTプログラムを用いる場合、クエリーの最近縁のゲノムを選択しない(または除外する)ことが時に必要である。例えば、エシェリキア(Escherichia)属のメンバーの多数のゲノムは、相同性ヒット一覧においてKlebsiellaなどのより遠縁において存在する大腸菌(E.coli)

o l i) クエリーのホモログを締め出すことができるが、エシェリキア (E s c h e r i c h i a) のメンバーのゲノムを除外することは、K l e b s i e l l a 「ヒット」が見出されることを可能にする。より少ない関連性の生物については、関連性がある遺伝子は、ホモログではないかもしれないが、またはDNAまたはタンパク質配列相同性によっては同定することができないかもしれないが、遺伝子は、いまだキーワード検索によって見出すことができる。例えば、検索においてキーワードとして「サッカロミセス (S a c c h a r o m y c e s) 」および「ピルビン酸キナーゼ」を用いてG e n B a n k を検索することによって、ピルビン酸キナーゼをコードするサッカロミセスセラヴィシエ (S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e) 遺伝子を見出すことは容易である。このような検索が行われ、そして、ともにピルビン酸キナーゼをコードするC D C 1 9 (P Y K 1 としても知られる) およびP Y K 2 の2つの遺伝子が見出された。

10

【0115】

つまり、この発明は、代謝的進化の労働集約型のプロセスを通ずることなく望ましい表現型を産業上有用な微生物に与える新規遺伝子変異を同定するための減法的なまたは付加的なゲノム分析を提供する。このようにして、産業上の微生物生物は、完全に合理的な設計を用いて構築することができる。この開示は、微生物を用いた有機酸の生産、より具体的には、生体触媒を用いたコハク酸の生産を詳細に説明するけれども、産業的微生物学の技術分野における当業者は、本明細書に開示された方法を幅広い種類の微生物生体触媒を用いた他の産業上の化学物質の生産力を改良するために適用することができるであろう。

20

【実施例】

【0116】

実験的セクション

一般的注釈

株、培地、および増殖条件

大腸菌 (E . c o l i) C (A T C C 8 7 3 9) の新たな派生物が、増殖ベースの選択とともに遺伝子欠失の固有の組み合わせを用いたコハク酸塩生産のために開発された。

【0117】

本発明の微生物は、微生物学の技術分野においてよく知られた多数の異なる培養培地において増殖させることができる。例えば、大腸菌 (E . c o l i) の野生型および変異体株は、1 % (w / v) トリプトン、0 . 5 % (w / v) 酵母抽出物、および0 . 5 % (w / v) N a C l を含有するL u r i a - B e r t a n i (L B) 培地において増殖する。遺伝学的に修飾された微生物を生体触媒にする発酵性プロセスを用いた有機酸の商業的生産のためには、炭素源供給源を補った最小無機塩培地が、好ましい。LB培地のような富栄養培地とは対照的に最小無機塩培地の使用は、商業的スケールにおける有機酸の生産のためのコストを下げる。

30

【0118】

本発明に適している最小無機物培地は、N B S 培地 (C a u s e y e t a l . , 2 0 0 7) およびA M 1 培地 (M a r t i n e z e t a l . , 2 0 0 7) を含む。N B S 培地は、1 m M ベタイン、2 5 . 7 2 m M K H ₂ P O ₄、2 8 . 7 1 m M K ₂ H P O ₄、2 6 . 5 0 m M (N H ₄) ₂ H P O ₄、1 m M M g S O ₄ . 7 H ₂ O、0 . 1 m M C a C l ₂ . 2 H ₂ O、0 . 1 5 m M チアミンH C l、5 . 9 2 μ M F e C l ₃ 6 H ₂ O、0 . 8 4 μ M C O C l ₂ . 6 H ₂ O、0 . 5 9 μ M C u C l ₂、2 H ₂ O、1 . 4 7 μ M Z n C l ₂、0 . 8 3 μ M N a ₂ M o O ₄ 2 H ₂ O、および0 . 8 1 μ M H ₃ B O ₃ を含有する。A M 1 培地は、1 m M ベタイン、1 9 . 9 2 m M (N H ₄) ₂ H P O ₄、7 . 5 6 m M N H ₄ H ₂ P O ₄、1 . 5 m M M g S O ₄ . 7 H ₂ O、1 . 0 m M ベタイン - K C l、8 . 8 8 μ M F e C l ₃ 6 H ₂ O、1 , 2 6 μ M C O C l ₂ . 6 H ₂ O、0 . 8 8 μ M C u C l ₂ . 2 H ₂ O、2 . 2 0 μ M Z n C l ₂、1 . 2 4 μ M N a ₂ M o O ₄ 2 H ₂ O、1 . 2 1 μ M H ₃ B O ₃、および2 , 5 0 μ M M n C l ₂ 4 H ₂ Oを含有する。微量元素は、1 0 0 0 X ストックとして調製され、そして、次の成分が含まれる：1 . 6 g / L F e C l ₃、0 . 2 g / L

40

50

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 0.1 g/L CuCl_2 、 0.2 g/L $\text{ZnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 0.2 g/L NaMoO_4 、 0.05 g/L H_3BO_3 、および 0.33 g/L $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 。

【0119】

有機酸の微生物生産のための無機物培地は、炭素源供給源が補われる。本発明に有用である炭素源供給源は、キシロースのようなペントース糖、グルコース、フルクトース、およびガラクトースのようなヘキソース糖、またはスクロースおよびマルトースのような二糖を含むが、それらに限定されない。炭素源供給源は、グルコースおよびキシロースの組み合わせなどの異なる糖の組み合わせを提供することによっても満足させることができる。炭素源供給源は、でんぷんまたはリグノセルロースの加水分解に由来することもできる。でんぷんおよびリグノセルロースなどの複合体炭水化物の加水分解は、熱・化学物質変質プロセスを用いること、または本技術分野においてよく知られている酵素的方法を用いることのいずれかによって、達成することができる。微生物発酵を用いた有機酸の産業上の生産のための好ましい炭素源供給源は、農業または林業廃棄物の加水分解に由来するリグノセルロース加水分解物である。リグノセルロース加水分解物は、ヘキソース・濃縮およびペントース・濃縮分画を産出するためにさらに分画化してよく、そして、それらの分画は、微生物発酵プロセスを用いた有機酸の商業的生産のための炭素の供給源として役立つことができる。上記のある濃度で多数の微生物に毒性であると見出されるフルフラールなどの特定の化学物質を除去するために、リグノセルロース加水分解物はさらに解毒することができる。

10

20

【0120】

株構築の間、培養物は、 2% (w/v) グルコースまたは 5% (w/v) アラビノースを含有するルリア (*Luria*) ブロス (*broth*) (10 g l^{-1} ディフコ (*Difco*) トリプトン、 5 g l^{-1} ディフコ (*Difco*) 酵母抽出物および 5 g l^{-1} NaCl) において 30 、 37 、または 39 で好氣的に増殖させられた。抗生物質耐性をコードする遺伝子、プラスミド、または外来性遺伝子はコハク酸塩生産のために開発された最終株には存在しない。しかしながら、異なる株の構築の初期段階の間、様々な抗生物質耐性マーカーが使用された。抗生物質選択プロセスに必要とされるアンピシリン (50 mg l^{-1})、カナマイシン (50 mg l^{-1})、またはクロラムフェニコール (40 mg l^{-1}) などの抗生物質が、添加された。

30

【0121】

種培養物および発酵物を、グルコース、 100 mM KHCO_3 、および 1 mM ベタイン HCl を含有する *NBS* または *AM1* 無機塩培地において 37 、 100 rpm で増殖させた。いくつかの実験においてコーンステイーブリカーを使用した。それは、コーン湿潤製粉工業からの副産物である。酵母抽出物およびペプトンと比較すると、それは、ビタミンおよび微量元素の安価な供給源である。

【0122】

特に言及がない場合、発酵性コハク酸塩生産のためには、株は、 37 で抗生物質を用いずに 10% (w/v) グルコースおよび 100 mM カリウム重炭酸塩を補った *NBS* 無機塩培地 (*Causey et al.*, 2004) において増殖させた。発酵のための前・接種材料は、新鮮コロニーを 250 ml フラスコ (100 ml *NBS* 培地、 2% グルコース) に移動することによって増殖させた。 16 時間 (37 、 120 rpm) 後、この培養物は、 0.033 g 細胞乾燥重量 (*CDW*) l^{-1} の接種材料を提供するために、 300 ml *NBS* 培地 (10% グルコース、 100 mM カリウム重炭酸塩) を含有する小発酵器に希釈した。

40

【0123】

増殖培地における有機酸の蓄積は、培地の pH を低下させる傾向があるので、培養培地に必要とされるような適切な中和剤を添加することが必要である。培養器の pH は、 pH プロブを用いて連続的に観測することができ、そして、増殖培地の pH をおおよそ中性 pH に維持するために適切な塩基は、添加することができる。微生物培養物の pH を維持

50

することに適した塩基は、 NaOH 、 KOH 、 NH_4SO_4 、 Na_2CO_3 、 NaHCO_3 、および NH_4CO_3 を含むが、それらに限定されない。この目的に適した塩基は、単独でまたは組み合わせて使用することができる。

【0124】

ある実験において、発酵物は、付加的な CO_2 （1.2 Mカリウム水酸化物中の2.4 Mカリウム炭酸塩）を含有する塩基を添加することによって、 pH 7.0に自動的に維持された。次に、 pH は、3 M K_2CO_3 および6 N KOH の1:1混合物を添加することによって維持された。発酵器は、サンプル除去のための排出口として役立つ16ゲージ針を除き密封した。嫌気は、 CO_2 の大気を実際にするために役立つ添加された重炭酸塩で増殖の間に迅速に達成された。

10

【0125】

細胞増殖：細胞集団は、Thermo Electronic Spectronic 20 spectrophotometerを用いて550 nm (OD_{550})での光学密度を測定することによって推定された。

【0126】

有機酸および糖分析：様々な有機酸および糖の濃度が、HPLCによって測定された。発酵プロセスに存在するコハク酸および他の有機酸が、BioRad Aminex HPLC - 87H カラムを有するAgilent 1200 HPLC装置上で分析された。BioRad Microguard Cation H^+ が、保護カラムとして使用された。HPLC分析のための標準は、0.008 N硫酸において調製された。HPLC カラム温度は、50 に維持された。0.008 N濃度での硫酸が0.6 ml / 分の流動比率での移動相として使用された。様々な成分の定量化は、210 nmでのその吸光を測定することによって行われた。

20

【0127】

実施例

実施例1 KJ122および大腸菌（*E. coli*）C野生型（ATCC 8739）のゲノム配列の比較

KJ122株は、一連の遺伝学的操作、および多くの数または段の代謝的進化を通じて、大腸菌（*E. coli*）C株に由来した。KJ122株の構築の詳細は、PCT特許出願公開第WO/2008/15958号、およびWO/2010/115067号において提供され、それらは、参照によって本明細書に組み込まれる。Jantama et alによる2つの科学的出版物（2008aおよび2008b）、ならびにZhang et alによる2つの科学的出版物（2009a; 2009b）も、KJ122株の構築を説明する。これら科学的出版物の両方が、参照によって本明細書に組み込まれる。株KJ122は、株指定番号B-50115として、2008年2月20日にUSDA-ARS culture collectionに寄託された。

30

【0128】

KJ122のゲノムの配列およびは、タフツ（Tufts）大学コア施設（Core Facility）でのイルミナ（Illumina）シーケンシングシステムを用いて得られ、そして、該配列は、GenBankから入手可能である（アクセス番号CP000946）注釈付きの野生型大腸菌（*E. coli*）C配列と比較された。この比較ゲノム分析から、これら2つの株の間の多数の遺伝学的相違が検出された。この開示において、オープンリーディングフレームにおいて生じる変異の位置は、オープンリーディングフレームの開始コドンの第一の塩基（上で参照したGenBank配列において注釈される）を、塩基数1として数えるヌクレオチド塩基数に基づく座標を用いて与えられるであろう。KJ122および大腸菌（*E. coli*）Cの間の遺伝学的相違の一覧から、KJ122を構築するにあたっての様々な段階で意図的に導入された欠失が検証され、そして、代謝的進化のプロセスの間で生じる遺伝学的変更の付加的一覧が同定された。代謝的進化のプロセスの間でKJ122のゲノムにおいて固定された変異の一覧に含まれたものは、

40

50

- 1) 2つのピルビン酸キナーゼの1つをコードする *pykA* (配列番号1)におけるフレームシフト変異、
 - 2) 糖輸送体遺伝子 *galP* などのガラクトース誘導性遺伝子のリプレッサーをコードする *galS* 遺伝子 (配列番号2) におけるフレームシフト変異、
 - 3) 大腸菌 (*E. coli*) Cゲノムの *ydcC* から *ydcF* までを含む多くの遺伝子を含む大腸菌 (*E. coli*) ゲノムの領域の48キロ塩基欠失 (配列番号3)、
 - 4) RNAポリメラーゼのサブユニットをコードする *rpoA* 遺伝子のC-末端ドメインにおける点ミスセンス変異 (配列番号4)、
 - 5) RNAポリメラーゼの異なるサブユニットをコードする *rpoC* 遺伝子のF領域における点ミスセンス変異 (配列番号5)、
 - 6) グリセロールデヒドロゲナーゼをコードする *gl d A* 遺伝子におけるフレームシフト変異 (配列番号6)、
 - 7) PEP-依存性ジヒドロキシアセトンキナーゼのサブユニットをコードする *dhaM* 遺伝子におけるフレームシフト変異 (配列番号7)、および
 - 8) 細胞壁合成および細胞形状にかかわる遺伝子をコードする *ftsI* 遺伝子におけるミスセンス点変異 (配列番号8)、
- であった。

10

【0129】

実施例2

KJ122における変異 *pykA* 遺伝子の回復

20

野生型大腸菌 (*E. coli*) および多くの他のバクテリアがグルコース含有培地において増殖する場合、細胞の内部でのピルビン酸塩生産は、結果的に生じるピルビン酸塩の分子の形成とともにグルコースを輸送およびホスホリル化するためにホスホエノールピルビン酸塩 (PEP) の分子を使用するホスホトランスフェラーゼ系 (PTS) の作用を通じて生じる。ピルビン酸塩形成は、*pykA* および / または *pykF* 遺伝子によってコードされるピルビン酸キナーゼ酵素の作用から生じることでもある。*PykA* および *PykF* タンパク質は、アイソザイムである。グルコースが炭素の供給源である場合、両方のピルビン酸キナーゼアイソザイムは、ピルビン酸塩生成における積極的役割を有する。しかしながら、3つの変異体 *pts*、*pykA* および *pykF* は、唯一の炭素源供給源としてのグルコース上で増殖することができない。というのは、ピルビン酸塩を形成する細胞の能力が存在しない、または非常に減少しているからである (Ponce et al., 1995)。

30

【0130】

KJ122は、PTSの成分であるタンパク質 *PtsI* をコードする *ptsI* において変異を含有するので (Zhang et al., 2009a Zhang et al., 2009b)、代謝的進化の間でKJ122において *pykA* 遺伝子も変異したという観察は、期待されなかった。この変異がコハク酸生産に貢献するかどうかを決定するために、野生型 *pykA* 対立遺伝子がKJ122に導入され、新株WG85aが与えられ、そして、コハク酸生産に対するこの変異の効果の観点から、表現型の変更が評価された。WG85aは、上記の2工程遺伝子交換方法を用いる2工程において構築された。第一の工程において、*cat-sacB* カセットが、株KJ122の *pykA* 遺伝子座に導入され、株WG84が得られた。使用されたPCRプライマーは、配列番号21および22であった (表1参照)。第二の工程において、大腸菌 (*E. coli*) Cからの野生型 *pykA* 遺伝子がWG84に導入され、株WG85aが得られた。使用したPCRプライマーは、配列番号23および24であった (表1参照)。KJ122についての約550mMと比較して、WG85aは、約160mMのコハク酸塩を生産した。明らかに、KJ122における *pykA* 変異は、コハク酸塩生産に重要である。KJ122における *pykA* 変異は、フレームシフトであるので、*pykA* の欠失を含有する株が同様に機能するものと推論することができる。中間体株WG84は、*pykA* オープンリーディングフレームの完全な欠失を含有し、そして、予測されたように、WG84は、540mMのコハク酸

40

50

塩力価でK J 1 2 2と同様に機能し、K J 1 2 2におけるフレームシフト変異がヌル変異に類似することが示された。この発見が得られたので、次に、発明者は、低下したレベルのピルビン酸キナーゼ活性がK J 1 2 2にとって重要であり、そして、この状態は、関連する取り組みのいずれか1つによって達成することができたと推論することができた。例えば、K J 1 2 2におけるp t s I *活性は、さらに低下し、または除去することができた、P y k F活性は、縮小または除去することができた、またはP y k A、P y k F、および/またはP t s Iの減少した活性の組み合わせが、コハク酸塩生産にとって重要であることが現在知られている総ピルビン酸キナーゼ活性における低下を確立するために使用することができた。

【0131】

第二のピルビン酸キナーゼ遺伝子であるp y k Fにおける欠失がp y k Aにおける欠失と置換することができたかどうかを決定するために、p y k Fにおける欠失が株W G 8 5 aに導入され、株W G 8 9が得られた。これは、2工程遺伝子交換方法を用いて達成された。第一の工程については、k a n - s a c Bカセットが、W G 8 5 aのp y k F伝子座に導入され、株W G 8 7が得られた。使用されたプライマーは、配列番号36および37であった(表1参照)。第二の工程については、p y k Fオープンリーディングフレームの欠失がW G 8 7に導入され、新株W G 8 9が得られた。使用されたP C Rプライマーは、配列番号38および39であり(表1参照)、そして、テンプレートはp G W 1 9 1(配列番号35)であった。小スケール発酵槽において、W G 8 9は、より不十分に増殖して、そして、K J 1 2 2についての510mMと比較して、115mMコハク酸塩のみを生産した。このように、p y k Fの欠失は、コハク酸塩生産を改良するためには、p y k Aの欠失またはフレームシフトの代わりになることができない。W G 8 9およびW G 8 5 aは、異なる実験において試験されたけれども、W G 8 9は、W G 8 5 aよりも不十分に行うようであり、このことは、K J 1 2 2における増殖およびコハク酸塩生産にとってのピルビン酸キナーゼの最適レベルがあるが、p y k Fの欠失が良好なコハク酸塩生産にとって最適ではない総ピルビン酸キナーゼ活性のレベルをもたらすことを示す。このように、代謝的進化は、最適レベルに近いピルビン酸キナーゼのレベルを有する株を生産した。さらに、米国特許出願公開2009/0075352およびL e e e t a l(2005)に示唆されるように、ピルビン酸キナーゼ(p y k A、p y k F、および1または複数のp t s 遺伝子)をコードする全ての遺伝子の欠失は、コハク酸塩生産を改良しないであろう。というのは、総ピルビン酸キナーゼ活性は、このような株において低すぎるであろうからである。本発明によって、新株における、例えば、サッカロミセスセレビシエ(*S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e*)における、新しいコハク酸塩生産株を構築する場合、無用の経路をブロックした後、総ピルビン酸キナーゼのレベルは、コハク酸塩生産の良好な効率を与えるように調節されるであろう。このことは、例えば、非必須ピルビン酸キナーゼ遺伝子であるP Y K 2を欠失させること、そして、残っているP Y K 1の発現または活性のレベルを変化させることによって、P Y K 1の前に様々な長さのプロモーターを導入することによって、またはP Y K 1オープンリーディングフレームの5'末端または3'末端から進行性欠失を作ること、および改良されたコハク酸塩生産について試験することによって、達成することができる。

【0132】

実施例3

X Z 7 2 2におけるg a l Sの変異

大腸菌(*E . c o l i*) C株およびK J 1 2 2株の間の比較ゲノム配列分析は、g a l S遺伝子におけるフレームシフト変異を明らかにした。この遺伝子は、ガラクトースパーミアーズであるG a l Pをコードするg a l P遺伝子の発現を抑制することが知られている。G a l Pタンパク質は、P T Sの成分であるP t s Iタンパク質をコードするp t s Iが変異しているK J 1 2 2株の場合のように、グルコース輸送のための完全に機能的なホスホトランスフェラーゼ系(P T S)の不存在に少なくとも部分的に参与することが報告されている(Z h a n g e t a l 2009a)。このように、K J 1 2 2におけ

る *galS* 変異は、グルコース取り込みに関するいくつかの機能的意義、またはコハク酸生産の比率に対するいくつかの他の効果を有する可能性がある。このことは、*galS* の *KJ122* 対立遺伝子が大腸菌 (*E. coli*) 株 *XZ722* (*pf1B*、*ptsI*^{*}、*pcK*^{*}) に移動して、新株 *WG86a* を与えること、およびこの株におけるコハク酸生産の比率に対する変異の効果を評価することによって試験される。*WG86a* は、上で説明した 2 工程遺伝子交換方法を用いる 2 工程において構築された。第一の工程において、*kan-sacB* カセットは、株 *XZ722* の *galS* 遺伝子座に導入され、株 *WG83* が得られた。使用された *PCR* プライマーは、配列番号 17 および 18 であった (表 1 参照)。第二の工程において、*KJ122* 遺伝子からの *galS* のフレームシフトした対立遺伝子が導入され、株 *WG86a* が得られた。使用された *PCR* プライマーは、配列番号 19 および 20 であった (表 1 参照)。小スケール発酵槽において、*XZ722* からのコハク酸塩力価は、175 mM であったが、他方、*WG86a* のものは、210 mM であり、*galS* 変異は、改良されたコハク酸塩生産に貢献することができることを提供する。*galS* 変異は、フレームシフトであり、そのため、*galS* における欠失が、同様に振舞うであろうが、より遺伝学的に安定であろうと推論することができる。中間体株 *WG83* は、*galS* オープンリーディングフレームの欠失を含有し、そして、それは、*WG86a* と同様に振る舞い、220 mM コハク酸塩を生産する。加えて、発明者らは、*galP* 発現の異なるリプレッサーをコードすることが知られている *galR* 遺伝子を変異させることも、グルコースを移入する細胞の能力を増大させることによって、コハク酸生産を増進するであろうと推論することができる。さらに、発明者らは、*galP* 遺伝子のコ

ピー数における増大は、類似の効果を有し、そして、コハク酸塩生産の効率を増大させるためのいまだ別の取り組みを提示するであろうと推論することができる。*galP* 遺伝子、ならびに調節部位とともに、またはそれなしでプロモーターおよびターミネーターを含有する隣接上流および下流 DNA は、*PCR* によって増幅し、そして、コハク酸塩生産大腸菌 (*E. coli*) 株の染色体のネイティブの *galP* 遺伝子座から遠位である 1 または複数の部位に導入し、*galP* 遺伝子の 1 を超えるコピーを含有する株を得ることができる。結果として生じる株は、より高いレベルの *GalP* タンパク質を有するおかげで、コハク酸生産について増進するであろう (実施例 11 参照)。

【0133】

実施例 4

染色体 DNA からの 48 kbp 領域の欠失

KJ122 および大腸菌 (*E. coli*) C 株の間の比較ゲノム配列分析は、代謝的進化のプロセスの間での *KJ122* におけるゲノムの遺伝子 *ydcC* から *ydcF* を含む 48 キロ塩基領域の欠失を明らかにした。この欠失は、大腸菌 (*E. coli*) *ATCC 8739* のヌクレオチド座標 2,416,108 および 2,464,284 の間の配列 (両方のヌクレオチドを含む) に対応する。この遺伝子欠失の機能的意義、およびコハク酸生産に対するその影響は、*KJ122* に 48 キロ塩基配列を再導入し、株 *WG110* を得ることによって評価される。このことは、遺伝子交換方法および *P1 vir* 形質導入の組み合わせを用いる 2 工程において達成される。第一の工程については、*cat-sacB* カセットは、*KJ122* の欠失末端点の間に導入され、株 *WG51* が得られた。使用される *PCR* プライマーは、配列番号 31 および 32 であった (表 1 参照)。第二の工程において、*WG51* は、宿主としての大腸菌 (*E. coli*) C とともに *P1 vir* を用いてスクロース耐性およびクロラムフェニコール感受性に形質導入され、*KJ122* 株バックグラウンドにおいてそのネイティブの遺伝子座に復帰した現在 48 キロ塩基配列を有する新株 *WG110* が得られる。大腸菌 (*E. coli*) の株の特定の領域の欠失は、米国特許出願公開 2009/0075333 および 2008/0009041 において説明される方法を用いて達成することができる。*KJ122* の特定の 48 キロ塩基欠失は、(1) *WG51* から受容株に形質導入すること、クロラムフェニコール耐性について選択すること、および (2) *KJ122* から工程 1 において構築された株に形質導入すること、スクロース耐性について選択すること、およびクロラムフェニコール感受性についてスク

リーニングすることによる 2 工程において他の受容大腸菌 (E. coli) 株に導入することができる。

【0134】

明白に、48キロ塩基欠失下に含まれる遺伝子は、最小グルコース培地における増殖に、またはコハク酸生産に必須ではない。48kb欠失の利点は、結果として生じる染色体がわずかに短いことであり、このことは、増殖の比率においてわずかに増大を与えるであろう。さらに、少なくとも欠失下に4つの遺伝子があり、これは、単独で欠失させた場合、最小グルコース培地における増殖で密度がより高くなる。ケイオウ (Keio) 欠失コレクションの株 JW5226、JW1427、JW5229、および JW1438 は、それぞれ遺伝子 ydcI、ydcL、ydcO、および ydcV における欠失を含有するが、全て、最小グルコース培地において48時間で顕著に高い OD600 に増殖する (Baba, T. et al (2006) における補足表3参照)。

10

【0135】

実施例 5

KJ122 における変異した rpoA 遺伝子の回復

バクテリア RNA ポリメラーゼのコア酵素は、化学量論 $\alpha_2\beta\beta'$ でアルファ ()、ベータ ()、ベータ' ()、およびオメガ () の4つの異なるポリペプチドサブユニットを含有する。RNA ポリメラーゼのアルファサブユニットは、rpoA 遺伝子によってコードされる。このサブユニットは、酵素の会合に必要であり、そして、それは、いくつかの調節タンパク質と相互作用する。KJ122 および大腸菌 (E. coli) C 株の間の比較ゲノム配列分析は、rpoA 遺伝子におけるミスセンス点変異を明らかにした。より具体的には、この変異は、RNA ポリメラーゼアルファサブユニット C-末端ドメイン (CTD) におけるアミノ酸位置 322 に位置する。野生型大腸菌 (E. coli) C 株におけるプロリン残基は、KJ122 株においてロイシン残基に変質した。

20

【0136】

アラニンにプロリン 322 を変更する異なる変異は、metE 遺伝子の発現に対して負の効果を有するとして、以前に説明されてきた (Fritsch et al., 2000)。別の報告において、RpoA タンパク質におけるこの位置でのアラニンへのプロリンの変異は、大腸菌 (E. coli) において rhaS プロモーターのサイクリック AMP 受容体タンパク質 (CRP) 活性化を低下させることが見出された (Holcroft and Egan, 2000)。KJ122 の RpoA タンパク質におけるプロリンのロイシンへの点変異の効果は、rpoA 変異の野生型対立遺伝子を KJ122 に移動して、新株 RY859A1 を得ること、およびコハク酸生産に対するこの変異の効果を測定することによって評価された。RY859A1 は、P1 vir 形質導入を用いる 2 工程において構築された。第一に、連鎖 aroE::kan 対立遺伝子が、宿主としてのケイオウ (Keio) 欠失コレクション (Coli Genetic Stock Center, Yale University, New Haven, CT, USA から入手可能) から JW3242 を用いて、そして、カナマイシン耐性について選択して、KJ122 に形質導入された。第二の工程については、野生型大腸菌 (E. coli) C が宿主として使用され、そして、選択は、最小グルコース培地上での増殖について行った。RY859A1 の rpoA 遺伝子の配列が測定され、そして、野生型であることが示された。小スケール発酵槽中 48 時間で、RY859A1 は、370mM でコハク酸塩を生産したが、これは、385mM を生産した KJ122 よりわずかに少ない。発酵は、2 通り行われ、そして、再現性があった。

30

40

【0137】

実施例 6

KJ122 における変異した rpoC 遺伝子の回復

KJ122 および大腸菌 (E. coli) C 株の間の比較ゲノム配列分析は、rpoC 遺伝子によってコードされる RNA ポリメラーゼの β' サブユニットの F 領域におけるミスセンス点変異を明らかにした。RpoC タンパク質は、RNA 合成の間、DNA テンプ

50

レートに結合する。位置 747 におけるメチオニン残基は、K J 1 2 2 においてイソロイシンに交換された。K J 1 2 2 の R p o C タンパク質におけるこの点変異の効果は、r p o C 変異の野生型対立遺伝子を K J 1 2 2 に移動して、新株 R Y 8 6 2 A を得ること、およびコハク酸生産に対するこの変異の効果測定することによって評価された。R Y 8 6 2 A は、P 1 v i r 形質導入を用いて構築された。連鎖 t h i G : : k a n 対立遺伝子は、宿主としてケイオウ (K e i o) 欠失コレクション (C o l i G e n e t i c S t o c k C e n t e r , Y a l e U n i v e r s i t y , N e w H a v e n , C T , U S A から入手可能) からの J W 5 5 4 9 を用いて、そしてカナマイシン耐性について選択して K J 1 2 2 に形質導入された。R Y 8 6 2 A の r p o C 遺伝子の配列は、測定され、そして、野生型であることが示された。5 m g / リットルでのチアミン H C l が、R Y 8 6 2 A の増殖を確実にするために、R Y 8 6 2 A および対照 K J 1 2 2 のための発酵培地に添加された。小スケール発酵槽において 48 時間で、R Y 8 6 2 A のコハク酸塩力価は、320 m M であり、K J 1 2 2 の力価 425 m M よりも顕著に小さかった。R Y 8 6 2 A の初期の増殖比率も、0.23 O D 550 / 時間である K J 1 2 2 の比率と比較して遅く、0.15 O D 550 / 時間であった。発酵は、2 通りについて行われ、再現性があった。

10

【0138】

実施例 7

K J 1 2 2 における変異した g l d A 遺伝子の回復

N A D⁺-依存性グリセロールデヒドロゲナーゼは、g l d A 遺伝子によってコードされる。G l d A タンパク質は、グリセロールのジヒドロキシアセトンへの可逆的酸化を触媒し、そして、R-ラクトアルデヒドへのメチルグリオキサルの還元を触媒することでもできる。比較ゲノム配列分析は、K J 1 2 2 における g l d A 遺伝子がフレームシフト変異を含有することを明らかにした。コハク酸生産に対する変異した形態の g l d A 遺伝子の影響は、上で説明した 2 工程遺伝子交換方法を用いて野生型 g l d A 遺伝子を K J 1 2 2 に導入して、新株 A C 6 を得ることによって評価された。第一の工程において、c a t - s a c B カセットが、株 K J 1 2 2 の g l d A 遺伝子座に導入され、株 A C 5 が得られた。使用した P C R プライマーは、配列番号 9 および 10 であった (表 1 参照)。第二の工程において、大腸菌 (E . c o l i) C からの野生型 g l d A 遺伝子が、A C 5 に導入され、株 A C 6 が得られた。使用した P C R プライマーは、配列番号 13 および 14 であった (表 1 参照)。小スケール発酵槽において、96 時間で、A C 6 のコハク酸塩力価は、580 m M であり、530 m M である K J 1 2 2 の力価よりもわずかに高かった。しかしながら、A C 6 の初期増殖比率は、0.16 O D 550 / 時間であり、0.20 O D 550 / 時間である K J 1 2 2 の力価よりわずかに遅かった。このように変異した g l d A は、K J 1 2 2 の代謝的進化の間で選択されるであろうわずかな増殖の利点を与える。

20

30

【0139】

実施例 8

K J 1 2 2 における変異した d h a M 遺伝子の回復

ジヒドロキシアセトンキナーゼは、1つのオペロンにおける 3 つの遺伝子 d h a K L M によってコードされるホスホトランスフェラーゼ (P T S) 系に関するマルチサブユニットタンパク質である。D h a M サブユニットは、マンノース輸送体の I I A ドメイン、ホスホリル担体タンパク質 H p r、および酵素 1 の N-末端ドメインに対して配列類似性を有する。大腸菌 (E . c o l i) において、D h a M は、ジヒドロキシアセトンのホスホリル化におけるリン酸のための供与体として、A T P の代わりに P E P を使用する。D h a M は、酵素 1 およびホスホリル担体タンパク質 H P r を通じた P E P によってホスホリル化される。K J 1 2 2 の d h a M 遺伝子は、フレームシフト変異を含有する。K J 1 2 2 における d h a M 変異の効果の評価するために、野生型 d h a M 遺伝子が上記の 2 工程遺伝子交換方法を用いて K J 1 2 2 に導入され、新株 A C 2 が得られた。第一の工程において、c a t - s a c B カセットが株 K J 1 2 2 の d h a M 遺伝子座に導入され、株 A C 1 が得られた。使用した P C R プライマーは、配列番号 11 および 12 であった (表 1 参

40

50

照)。第二の工程において、大腸菌 (*E. coli*) Cからの野生型 *dhaM* 遺伝子が、AC1に導入され、株AC2が得られた。使用したPCRプライマーは、配列番号15および16であった(表1参照)。小スケール発酵槽において、96時間で、AC2からのコハク酸塩の力価は、560mMであり、530mMであるKJ122の力価よりもわずかに高かった。しかしながら、AC6の初期増殖比率は、0.16 OG550/時間であり、0.20 OD550/時間であるKJ122の比率よりもわずかに遅かった。このように、*dhaM*を変異させることは、KJ122の代謝的進化の間で選択されるであろうわずかな増殖利点を与える。*DhaKLM*は、コハク酸生合成のための基質であるPEPを消費するので、PEPの保存は、KJ122の増殖利点のためのメカニズムである。*dhaKLM*オペロンにおける遺伝子を変異させることに加えて、またはそれに代えて、任意の他のPTS-依存性ジヒドロキシアセトンキナーゼのサブユニットをコードする遺伝子も、コハク酸生産におけるその重要性を試験するために変異させることができる。

10

20

30

40

50

【0140】

実施例9

KJ122におけるftsI遺伝子におけるミスセンス変異の回復

ftsI遺伝子は、細胞壁合成および/または隔壁形成にかかわる必須タンパク質をコードする。KJ122のftsI遺伝子は、コード配列の塩基619をCからTに変更するミスセンス変異を含有し、これは、アルギニン207をシステインに変更する。KJ122のftsIタンパク質におけるアルギニンのシステインへの点変異の効果は、ftsI変異の野生型対立遺伝子をKJ122に移動して新株RY858G1を得ること、およびコハク酸生産に対するこの変異の効果を測定することによって、評価された。ftsIは、必須タンパク質であるので、2工程遺伝子交換方法は、働かないだろう。そのため、RY858G1を構築するかわりに2工程P1 vir形質導入が使用された。第一に、連鎖leuA::kan対立遺伝子が、宿主としてケイオウ(*Keio*)欠失コレクション(*Coli Genetic Stock Center, Yale University, New Haven, CT, USA*から入手可能である)からJW0073を用いて、およびカナマイシン耐性について選択してKJ122に形質導入され、新株RY853G1が得られた。第二の工程について、大腸菌(*E. coli*)Cが宿主として使用され、RY853G1が受容者であり、および選択は最小グルコース培地上での増殖について行われた。RY858G1のftsI遺伝子の配列が、測定され、そして、野生型であることが示された。小スケール発酵槽において、RY858G1は、KJ122と約同一の初期比率で増殖したが、72時間において、RY858G1は、460mMを生産したKJ122よりもわずかに少ないコハク酸塩である440mMを生産した。このように、KJ122のftsI遺伝子におけるミスセンス変異は、コハク酸塩力価における増大にわずかに寄与する。

【0141】

実施例10

変異の組み合わせの付加的効果

上述の実施例で詳細に説明された株比較の結果は、表3において要約される。1つずつ試験された多くの変異は、コハク酸塩力価または増殖比率においてわずかな増大しか与えなかった。しかしながら、これらの増大は、その原種と比較してKJ122について見いだされた全般的な改良を与えるためには付加的および/または相乗的でなければならない(*Jantama et al., 2008a; Jantama et al. 2008b*)。例えば、野生型rpoA遺伝子を含有するRY859A1に野生型rpoC遺伝子を形質導入することによって構築された、rpoAにおけるミスセンス変異、およびrpoCにおけるミスセンス変異の両方について回復したKJ122の派生物は、新株RY860Aをもたらした。RY860Aの構築は、受容株がKJ122の代わりにRY859A1であるほかは、実施例6において上で説明されたRY862Aと同一の方法において行われた。小スケール発酵槽において、チアミンHClを5mg/lで補って48時間で、RY860Aは、KJ122(425mM)よりも顕著に少なく、そして、rpoC変

異のみについて回復している R Y 8 6 2 A (3 2 0 m M) よりも少ないコハク酸塩 (3 0 0 m M) を生産した。

【 0 1 4 2 】

実施例 1 1

ナイーブ株からの新コハク酸塩生産体の構築

株 T G 1 2 8 は、遺伝子型 *f r d A B C D*、*a d h E*、*p f l B*、*m g s A*、および *a c k* を有する、大腸菌 (*E . c o l i*) W (A T C C 9 6 3 7) に由来した D - 乳酸塩生産体である。T G 1 2 8 は、2 0 0 5 年 7 月 2 5 日に *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 s C u l t u r e C o l l e c t i o n* , 1 8 1 5 N . U n i v e r s i t y S t r e e t , P e o r i a , I l l i n o i s , 6 1 6 0 4 U . S . A . に寄託され、そして、株寄託番号 N R R L B - 3 0 9 6 2 を有する。T G 1 2 8 は、そして、第一にスクロース上での増殖について、第二に 3 9 での増殖について、および第三に 4 0 での増殖について選択することによって代謝的に進化させた。結果として生じた株は、T G 1 6 0 と名付けられた。T G 1 6 0 は、次に、コハク酸生産株であるように再改変された。K J 1 2 2 からの対立遺伝子が、上で説明した 2 工程遺伝子交換方法を用いる次の時系列で導入された：*p c k **、*l d h A*、*f r d A B C D **、および *p t s I **。*p c k ** および *p t s I ** 変異は、両方とも、K J 1 2 2 ゲノムにおいて見出され、そして、コハク酸生産の効率を増大することが示された変異であった (Z h a n g e t a l . , 2 0 0 9 a) 。結果として生じた株である W G 3 2 b を、次に、約 1 2 6 世代間 (2 3 移動) 、小微好気性発酵槽において増殖させ、株 W G 3 2 b - T 2 3 が得られた。W G 3 2 b - T 2 3 は、小スケール発酵槽において約 2 6 0 m M コハク酸を作成する適度に良好なコハク酸生産体である。次に、本発明の発見に基づき、K J 1 2 2 のゲノムに、2 つの付加の変異が W G 3 2 b - T 2 3 に付加された。第一に、*g a l P* 遺伝子の第二のコピーは、ネイティブのプロモーター、およびターミネーターを含有するフランキング配列とともに、2 工程遺伝子交換方法を用いて、ゲノムにおいて *d n a A* 遺伝子の近くの遺伝子座に組み入れられた。挿入部位における D N A 配列は、

a t t a a a t t t t c c a a t a t g c g g c g t a a a t c g t g c c c g c c t c
g c g g c a g g a t c g t t t a c a c t t a g c g a g t t c t g g a a a g t c c
t g t g g a t a a a t c g g g a a a a t c t g t g a g a a a c a g a a g a t c t
- 挿入部位 - c t t g c g c a g t t t a g g c t a t g a t c c g c g g t c c c g a
t c g t t t t g c a g g a t c t t g a c t c g g g c a t a t a a c c g c a g a c
a g c g g t

である。第一の工程において、*k a n - s a c B* カセットが、*d n a A* 遺伝子座に挿入され、株 W G 6 2 が得られた。使用された P C R プライマーは、配列番号 2 5 および 2 6 であった (表 1 参照) 。第二の工程において、*g a l P* の第二のコピーが、*d n a A* 遺伝子座に導入された。使用された P C R プライマーは、配列番号 2 7 および 2 8 であった (表 1 参照) 。W G 7 4 と名づけられた結果として生じた株は、小スケール発酵において約 3 2 0 m M コハク酸を生産した。第二に、*p y k A* 遺伝子のオープンリーディングフレームの全体が W G 7 4 から欠失させられ、そして、*c a t - s a c B* カセットに交換され、新株 W G 9 6 が得られた。使用された P C R プライマーは、配列番号 2 9 および 3 0 であった (表 1 参照) 。小スケール発酵において、W G 9 6 は、4 5 0 m M コハク酸を生産し、これは、前駆株 W G 3 2 b - T 2 3 および W G 7 4 のものに対して明確な改良である。このように、発明者らは、K J 1 2 2 における変異の正確な特質を発見することが、異なる、より進化が少ない親株から、新しい、改良されたコハク酸生産株をいかにして構築するかについての固有の情報、および洞察を与えることを明確に確立した。さらに、本発明の発見は、広く適用可能である。例えば、*g a l S* 変異を知ることは、新株における K J 1 2 2 において見出される同一の変異を導入することのみでなく、*G a l S* 抑制の標的である *g a l P* 遺伝子を複製することにも適用することができる。別の例として、*p y k A* 変異のことは、新株における K J 1 2 2 において見出される同一の変異を導入

することにのみでなく、p y k Aの欠失を導入することにも適用することができる。

【0143】

本明細書において開示される本発明は、コハク酸以外の化学物質を生産するための株、およびプロセスを改良することに一般化することができる。提供される実施例は、例示的であり、限定的でないことが意図されている。

【0144】

G a l Pタンパク質は、細胞におおよそA T Pの1 / 3を負担させるプロトン共輸送メカニズムによって、グルコースおよび他の糖を移入する機能がある。移入の後、グルコースなどの糖は、ホスホリル化されることが必要であり、これは、総コストの約1 . 3 3 A T Pについて、1つの付加的A T Pを消費する。代謝的エネルギーに関して、これは、1つのP E Pが費やされるP T S系によってグルコースなどの糖を移入するよりもコストが少なく、これは約2 A T Pとエネルギー的に同等である。このように、G a l Pによってグルコースなどの糖を移入することは、P T Sを用いることによるよりも、より効率的である。

10

【0145】

さらに、多くの発酵性プロセスにおいて、特に、しかし嫌気性および微好気性プロセスに限り、P E Pは、リンゴ酸、フマル酸、アスパラギン酸塩、スレオニン、メチオニン、リジン、およびその他などの、コハク酸以外の化学物質の生合成のための中間体であることができる。このように、P T Sの代わりにG a l Pを用いることによってP E Pを保存することによって、およびピルビン酸キナーゼ活性を低下させることによって、一般に、生合成の効率を改良することができる。

20

【0146】

多くの発酵において、最小培地におけるより効率的な増殖が望ましく、そして、K J 1 2 2に見出される4 8 k b欠失が、最小培地において大腸菌(E . c o l i)を用いる任意の発酵における効率の改良を助力するであろう。

【0147】

K J 1 2 2に見出されるf t s I変異は、同じく体積に対するより高い表面積割合を導く、より小さい、またはより球状である細胞に導くことによって効率を改良するかもしれない。これは、今度は、グルコース、スクロース、マルトース、グリセロールなどの栄養素のより効率的な移入、およびコハク酸塩、リンゴ酸塩、マル酸塩、アスパラギン酸塩、スレオニン、メチオニン、リジンなどの生産物のより効率的な排出をもたらすであろう。

30

【0148】

r p o Aおよびr p o Cに見出される変異は、グルコースによる異化生成物抑制の一般的な喪失をもたらす。この抑止解除は、多くの場合において生合成の効率を増大させる。例えば、安価な糖の望ましい供給源であるバイオマス加水分解物は、通常、グルコースを含む糖の混合物を含有する。様々な他の糖がグルコースと同時に使用され、そして、異化生成物抑制の除去が非 - グルコース糖をグルコースとともに効率的に摂取し、そして、代謝させる細胞の能力を増進させることが望ましい。さらに、異化生成物抑制の除去は、p c k、g a l P、m d h、f u m A、x y l E、l a c Z、l a c Y、f u m B、およびf r d A B C Dなどの所望の遺伝子の発現を増大させる。このように、本発明のR N Aポリメラーゼ変異は、様々な商業的有用株および発酵プロセスに対する広い適用性を有する。

40

【0149】

このように、本発明において発見された変異は、コハク酸生産を増大させることに有用であり、それらは、コハク酸生産または他の有機酸生産について以前に説明されてこなかった点において新規であり、そして、それらは、当業者が本発明の個々の変異、またはそれらの変異の組み合わせがコハク酸または他の有機酸生産を改良するであろうと予測することができなかった点において進歩性がある。

【0150】

K J 1 2 2のゲノム配列において発見されたいくつかの変異は、1つずつ変化した場合

50

には増殖またはコハク酸生産に対してごくわずかな効果しか生み出さないけれども、増殖の比率における小さい増大でさえ、多くの世代にカバーされる期間としての代謝的進化の間に選択されるであろうことが強調されるべきである。さらに、それぞれの個々の変異が付加的にまたは相乗的に寄与するいくつかの変異の組み合わせは、増殖および／またはコハク酸生産の効率におけるずっと大きい増大を与えるであろう。

【0151】

新しい第二の親株から発酵によって所望の化学物質を生産する目的で微生物を構築するための方法は、実施例11に開示するように、幅広い種類の化学物質および株に一般化することができる。一般的な方法は、

(A) 第一の親株から、前記所望の化学物質と異なる発酵生産物への生合成の経路における工程を触媒する酵素をコードする遺伝子の少なくとも1つを欠失させ、第一の中間株をもたらすこと

(B) 前記第一の中間株に対して代謝的進化を行い、第二の中間株をもたらすこと、

(C) 前記親株、および前記第二の中間株のゲノムのDNA配列を測定すること、

(D) 前記ゲノムのDNA配列を比較して、前記代謝的進化の間に選択された変異を同定すること、

(E) 前記変異の少なくとも1つを試験して、前記変異のどれが増殖比率または前記所望の化学物質の生産の効率を増大させることに有益であるかを決定すること、

(F) 前記有益な変異の少なくとも1つを選ぶこと、および

(G) 前記有益な変異の少なくとも1つ、または前記有益な変異の1つと機能的に類似する変異の少なくとも1つを、第二の親株に導入して、前記微生物をもたらすことを含むであろう。

【0152】

この一般的な方法は、フマル酸塩、リンゴ酸塩、アスパラギン酸塩、グルタミン酸塩、およびこれらの化学物質のいずれかの派生物などの、コハク酸塩以外の化学物質に、ならびに他のバクテリア、古細菌 (archaeon)、酵母、糸状菌 (filamentous fungi)、藻類 (algae)、および渦鞭毛藻 (dinoflagellate) を含む、大腸菌 (E. coli) 以外の微生物に、適用されるであろう。

【0153】

本出願の発明は、特に好ましい実施態様に関して上で詳細に説明されてきた。上で詳細に行った説明に詳しい技能を持つ実施者は、次の請求項の精神を逸脱することなく任意の修飾を作ることができる。

【0154】

10

20

30

【表 1 - 1】

表 1 使用されたプライマーの配列		
配列 番号	プライマー名	配列 (5' → 3')
9	BY60	caggaaacgctgaccgtactggctcggtaccagcagagcgggcgtaaacctgtgacggaag atcacttegcagaataa
10	BY61	gtgagtttgaccgtatctgctgttgccaaataacccgaatatggtcattgaagcacttcac tgacaccctcatca
11	BY62	tctctggcggtgggtcataaaaaacgtaacggcctgcatgtacgtccggcgtagcgaaga tcacttegcagaataaat
12	BY63	aacctgacggttgaaacgttgctgtttaacgtccagcgtagcgtttctgaagcacttcac tgacaccctcatca
13	AC16	gcattgtctgttatctacaccgatgagg
14	AC17	tcccactcttgacaggaaacgct
15	AC33	gactgggagaagggtgcggtgaat
16	AC34	catcattaaacagcgccctaataaaata
17	91A	aaacgccaatgcccagcgctggcaactcaggttagcgacaccattggcggtggtgat ctagcgcatgcatttca
18	91B	aatcaacgcattacaacgctggcgaattaacacctcaatggcgtagcgctctttttccgc ggcgaagaactccagcatga
19	90A	gaataacagcacgctggtea

10

20

【表 1 - 2】

20	90B	tcaacgcactcatccagcct	
21	60A	atgtccagaaggettgcagaaacaaaatcggtaccacgtaggcccagcaacagatcgc gacggaagatcacttcgcag	
22	60B	ttactctaccgttaaaatacgcgtggtattagtagaaccacggtaactcatcacgtcgccaa gaaataaaaagaaaatgcc	
23	59A	tacatgtccagaaggettgc	
24	59B	catccggcaacgtacttact	
25	75A	ccaggacgatccttgcgtttaccatcagcccgataatectccacccggcgcgccatgc tagcgcatgcatecattta	10
26	75B	ccgcgttttcgcaccttttcgcagggaatgtacgacctcacaccagtggaaaccagc ggcgaagaactccagcatga	
27	76A	ccaggacgatccttgcgtttaccatcagcccgataatectccacccggcgcgccatgc cgattacaccaaccacaac	
28	76B	ccgcgttttcgcaccttttcgcagggaatgtacgacctcacaccagtggaaaccagc ggcgaa ttcatagctttcc	
29	60A	atgtccagaaggettgcagaaacaaaatcggtaccacgtaggcccagcaacagatcgc gacggaagatcacttcgcag	
30	60B	ttactctaccgttaaaatacgcgtggtattagtagaaccacggtaactcatcacgtcgccaa gaaataaaaagaaaatgcc	20
31	67A	ggctgggacggaagtcgtgtctgtctcaaaatcggtggagctgcatgacaaggteatcgg acggaagatcacttcgcag	
32	67B	atggagcagattagcggttaacctgtctatttgctgataaatctaaaacccggtaagcaa agaaataaaaagaaaatgcc	
36	87A	atgaaaaagacaaaattgtttgcaccatcggaaccgaaaaccgaatctgaagagatgtcta gcgcatgcatccattta	
37	87B	ttacaggacgtgaacagatgcggtggttagtagtgccgctcggtaccagtgcaccagaaagg cgaagaactccagcatga	
38	78A	acacattcctctgcacgett	30
39	78B	aggatgcttccatcggtatc	

【 0 1 5 5 】

【表 2】

表 2 使用されたプライマー対およびDNAテンプレート、ならびに作出された細菌株		
P C R プライマー対	D N A テンプレート	作出された株
BY60 / BY61	pCA2	AC5
BY62 / BY63	pCA2	AC1
AC16 / AC17	大腸菌(E.coli) C	AC6
AC33 / AC34	大腸菌(E.coli)C	AC2
91A / 91B	pGW162	WG83
90A / 90B	KJ122	WG86
60A / 60B	pLOI4151	WG84
59A / 59B	大腸菌(E.coli)C	WG85
75A / 75B	pGW162	WG62
76A / 76B	KJ122	WG74
60A / 60B	pLOI4151	WG96
67A / 67A	pLOI4151	WG51
87A / 87B	pGW162	WG87
78A / 78B	pGW191	WG89

10

20

【 0 1 5 6 】

【表 3】

表 3 全体ゲノムシーケンシングを通じて検出された変異の詳細						
関連遺伝子	株名	親株	対立遺伝子タイプ	コハク酸塩力価	初期増殖比率 O D 5 5 0 / 時間	一定の力価についての発酵時間 (時間)
pykA	KJ122	-	フレームシフト	550 mM	0.21	96
pykA	WG85a	KJ122	野生型	160 mM	0.022	96
pykA	WG84	KJ122	欠失	540 mM	0.21	96
pykA,F	KJ122	-	pykA ^{fs} , pykF+	510 mM	0.20	97
pykA,F	WG89	KJ122	pykA ⁺ , ΔpykF	115 mM	0.021	97
galS	XZ722	-	野生型	175 mM	0.017	144
galS	WG86a	XZ722	フレームシフト	210 mM	0.019	144
galS	WG83	XZ722	欠失	220 mM	0.018	144
rpoA	KJ122	-	ミスセンス	385 mM	0.24	48
rpoA	RY859A1	KJ122	野生型	370 mM	0.23	48
rpoC	KJ122	-	ミスセンス	425 mM	0.23	48
rpoC	RY862A	KJ122	野生型	320 mM	0.15	48
rpoA, rpoC	RY860A	RY859A1	両方とも野生型	300 mM	0.14	48
gldA	KJ122	-	フレームシフト	530 mM	0.20	96
gldA	AC6	KJ122	野生型	580 mM	0.16	96
dhaM	KJ122	-	フレームシフト	530 mM	0.20	96
dhaM	AC2	KJ122	野生型	560 mM	0.16	96
ftsI	KJ122	-	ミスセンス	460 mM	0.20	72
ftsI	RY858G1	KJ122	野生型	440 mM	0.20	72

10

20

【 0 1 5 7 】

30

参考文献

【 0 1 5 8 】

全ての参考文献は、読み手の便宜のために掲載される。それぞれの参考文献は、参照によってその全体が組み込まれる。

【 0 1 5 9 】

U.S. Patent No. 6,455,284

【 0 1 6 0 】

U.S. Patent No. 6,962,794

【 0 1 6 1 】

U.S. Patent No. 6,989,265

【 0 1 6 2 】

U.S. Patent No. 7,223,567

【 0 1 6 3 】

U.S. Patent No. 7,229,794

【 0 1 6 4 】

U.S. patent No. 7,303,906

【 0 1 6 5 】

U.S. Patent No. 7,371,558

【 0 1 6 6 】

U.S. Patent No. 7,524,660

40

50

- 【 0 1 6 7 】
U.S. Patent No. 7,629,162
- 【 0 1 6 8 】
U.S. Patent Application Publication No. 2004/0214294
- 【 0 1 6 9 】
U.S. Patent Application Publication No. 2004/0146966
- 【 0 1 7 0 】
U.S. Patent Application Publication No. 2005/0181488
- 【 0 1 7 1 】
U.S. Patent Application Publication No. 2005/0176114 10
- 【 0 1 7 2 】
U.S. Patent Application Publication No. 2005/0221455
- 【 0 1 7 3 】
U.S. Patent application Publication No. 2006/0073577
- 【 0 1 7 4 】
U.S. Patent Application Publication No. 2007/0111294
- 【 0 1 7 5 】
U.S. Patent Application Publication No. 2008/0009041
- 【 0 1 7 6 】
U.S. Patent Application Publication No. 2008/0176302 20
- 【 0 1 7 7 】
U.S. Patent Application Publication No. 2008/0293100
- 【 0 1 7 8 】
U.S. Patent Application Publication No. 2009/0047719
- 【 0 1 7 9 】
U.S. Patent Application Publication No. 2009/0075333
- 【 0 1 8 0 】
U.S. Patent Application Publication No. 2009/0075352
- 【 0 1 8 1 】
U.S. Patent Application Publication No. 2009/0221055 30
- 【 0 1 8 2 】
U.S. Patent Application Publication No. 2009/0325243
- 【 0 1 8 3 】
U.S. Patent Application Publication No. 2010/0143997
- 【 0 1 8 4 】
U.S. Patent Application Publication No. 2010/0261239
- 【 0 1 8 5 】
U.S. Patent Application Publication No. 2010/0248311
- 【 0 1 8 6 】
U.S. Patent Application Publication No. 2010/0279369 40
- 【 0 1 8 7 】
International Patent Application Publication No. WO 2008/115958
- 【 0 1 8 8 】
International Patent Application Publication No. WO 2010/115067
- 【 0 1 8 9 】
European Patent Application EP 2,241,630
- 【 0 1 9 0 】
Altaras, N. E., Cameron, D. C. (1999) "Metabolic engineering of a 1,2-propanedio
l pathway in Escherichia coli." App Environ Microbiol 65: 1180-1185.
- 【 0 1 9 1 】 50

Andersson, C., Hodge, D., Berglund, K.A., Rova, U. (2007) "Effect of different carbon sources on the production of succinic acid using metabolically engineered *Escherichia coli*." *Biotechnol Prog* 23: 381-388.

【 0 1 9 2 】

Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B. L., Mori, H. (2006) "Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection." *Mol Syst Biol* 2: Article number: 2006.0008

【 0 1 9 3 】

Babitzke, P., Romeo, T. (2007) "CsrB sRNA family; sequestration of RNA-binding regulatory proteins." *Curr Opin Microbiol* 10: 156-163. 10

【 0 1 9 4 】

Causey, T.B., Shanmugam, K.T., Yomano, L.P, Ingram, L.O. (2004) "Engineering *Escherichia coli* for efficient conversion of glucose to pyruvate." *Proc Natl Acad Sci USA* 101:2235-2240.

【 0 1 9 5 】

Cronan, J., Laporte, D. (1996) "Tricarboxylic acid cycle and glyoxylate bypass" in *Escherichia Coli and Salmonella*. editors Neidhardt, F., et al., ASM Press, Washington, DC., USA.

【 0 1 9 6 】

Datsenko, K. A., Wanner, B. L. (2000) "One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products." *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 6640-6645. 20

【 0 1 9 7 】

Fritsch, P. S., Urbanowski, M. L., Stauffer, G. V. (2000) "Role of RNA polymerase subunits in MetR-dependent activation of metE and metH: Important residues in the C-terminal domain and orientation requirements within RNA polymerase." *J Bacteriol* 182:5539-5550.

【 0 1 9 8 】

Holcroft, C.C., Egan, S. M. (2000) "Interdependence of activation at rhaSR by cyclic AMP receptor protein, the RNA polymerase alpha subunit C-terminal domain, and RhaR." *J Bacteriol* 182: 3529-3535. 30

【 0 1 9 9 】

Ikeda, M., Ohnishi, J., Hayashi, M., Mitsuhashi, S. (2006) "A genome-based approach to create a minimally mutated *Corynebacterium glutamicum* strain for efficient L-lysine production." *J Ind Microbiol Biotechnol* 33: 610-615

【 0 2 0 0 】

Jantama, K., Haupt, M. J., Svoronos, S. A., Zhang, X., Moore, J. C., Shanmugam, K. T., Ingram, L. O. (2008a) "Combining metabolic engineering and metabolic evolutions to develop nonrecombinant strains of *Escherichia coli* C that produce succinate and malate." *Biotechnol Bioeng* 99: 1140-1153. 40

【 0 2 0 1 】

Jantama, K., Zhang, X., Moore, J. C., Shanmugam, K. T., Svoronos, S. A., Ingram, L. O. (2008b) "Eliminating side products and increasing succinate yields in engineered strains of *Escherichia coli* C." *Biotechnol Bioeng* 101: 881-893.

【 0 2 0 2 】

Kurzrock, T., Weuster-Botz, D. (2009) "Recovery of succinic acid from fermentation broth." *Biotechnol Lett* 32: 331-339.

【 0 2 0 3 】

Knag, Y., Durfeem T., Glasner, J. D., Qiu, Y., Frisch, D., Winterberg, K. M., Bl 50

attner, F. R. (2004) "Systematic mutagenesis of the *Escherichia coli* genome." *J Bacteriol* 186: 4921-4930.

【 0 2 0 4 】

Kolisnychenko, V., Plunkett III, G., Herrigni, C. D., Feher, T., Posfai, J., Blattner, F. R., Posfai, G. (2009) "Engineering a reduced *Escherichia coli* genome." *Genome Res* 12: 640-647.

【 0 2 0 5 】

Lee, S.J., Lee, D-Y., Kim, T. Y., Kim, B.H., Lee J., Lee, S. Y. (2005) "Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for enhanced production of succinic acid, based on genome comparison and in silico gene knockout stimulation." *App Environ Microbiol* 71: 7880-7887.

10

【 0 2 0 6 】

Lee, S. Y., Lee, D. Y., Kim, T. Y. (2005) "Systems biotechnology for strain improvement." *Trends Biotech* 23: 349-358.

【 0 2 0 7 】

Lee, S. Y., Kim, J. M., Lee, J. W., Kim, T. Y., Jang, Y.S. (2008) "From genome sequence to integrated bioprocess for succinic acid production by *Mannheimia succiniproducens*." *App Microbiol Biotechnol* 79:11-22;

【 0 2 0 8 】

Lu, S., Eiteman, M. A., Altman, E. (2009) "pH and base counterion affect succinate production in dual-phase *Escherichia coli* fermentations." *J Ind Microbiol Biotechnol* 36:1101-1109.

20

【 0 2 0 9 】

Martinez, A., Grabar, T.B., Shanmugam, K.T., Yomano, L.P., York, S.W., Ingram, L. O. (2007) "Low salt medium for lactate and ethanol production by recombinant *Escherichia coli*." *Biotechnol Lett* 29:397-404.

【 0 2 1 0 】

Millard, C. S., Chao, Y-P., Liao, J. C. Donnelly, M. I. (1996) "Enhanced production of succinic acid by overexpression of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Escherichia coli*." *App Environ Microbiol* 62: 1808-1810.

30

【 0 2 1 1 】

Pernestig, A. K., Geogellis, D., Romeo, T., Suzuki, K., Tomenius, H., Normakr, S., Melefors, O. (2003) "The *Escherichia coli* BarA-UvrY two component system is needed for efficient switching between glycolytic and gluconeogenic carbon sources." *J Bacteriol* 185:843-853.

【 0 2 1 2 】

Ponce, E., Flores, N., Martinez, A., Valle, F., Bolivar, F. (1995) "Cloning of the two pyruvate kinase isoenzymes structural genes from *Escherichia coli*: the relative roles of these enzymes in pyruvate biosynthesis." *J Bacteriol* 177: 5719-5722.

40

【 0 2 1 3 】

Posfai, G., Plunkett III, G., Feher, T., Frisch, D., Keil, G. M., Umenhoffer, K., Kolisnychenko, V., Stahl, B., Sharma, S., de Srruda, M., Burland, V., Harcum, S. W., Blattner, F. R. (2006) "Emergent properties of reduced-genome *Escherichia coli*." *Science* 312: 1044-1046.

【 0 2 1 4 】

Saier, M. H. Jr., and Ramseier, T. M. (1996) "The catabolite repressor/activator (Cra) protein of enteric bacteria." *J Bacteriol* 178: 3411-3417.

【 0 2 1 5 】

Sanchez AM, Bennett GN, San KY (2005) "Novel pathway engineering design of the a

50

naerobic central metabolic pathway in *Escherichia coli* to increase succinate yield and productivity." *Metab Eng* 7:229-239.

【 0 2 1 6 】

Siebold, C., Garcia-Alles, L. F., Erni, B., Baumann, U. (2003) "A mechanism of covalent substrate binding in the x-ray structure of subunit K of the *Escherichia coli* dihydroxyacetone kinase." *Proc Natl Aca Sci USA* 100:8188-8192.

【 0 2 1 7 】

Silhavy, T., Berman, M., Enquist, L. (1984) "Experiments With Gene Fusions." Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp 107-112

【 0 2 1 8 】

Subedi, K. P., Kim, I., Kim, J., Min, B., Park, C. (2007) "Role of *gldA* in dihydroxyacetone and methylglyoxal metabolism of *Escherichia coli* K12." *FEMS Microbiol Lett* 279: 180-187.

【 0 2 1 9 】

Suzuki, K., Wang, X., Weilbacher, T., Pernestig, A. K., Melefors, O., Georgellis, D., Babitzke, P., Romeo, T. (2002) "Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of *Escherichia coli*." *J Bacteriol* 184:5130-5140.

【 0 2 2 0 】

Sivagamisundaram, C., Wooff, E., Coldham, N. G., Sritharan, M., Hewinson, R. G., Gordon, S. V., Wheeler, P. R. (2009) "Global effects of inactivation of the pyruvate kinase gene in the *Mycobacterium tuberculosis* complex." *J Bacteriol* 191:7545-7553.

【 0 2 2 1 】

Truniger, V., Boos, W. (1994) "Mapping and cloning of *gldA*, the structural gene of the *Escherichia coli* glycerol dehydrogenase." *J Bacteriol* 176: 1796-1800.

【 0 2 2 2 】

Vemuri, G. N., Eiteman, M. A., Altman, E. (2002) "Effects of growth mode and pyruvate carboxylase on succinic acid production by metabolically engineered strains of *Escherichia coli*." *App Environ Microbiol* 68: 1715-1727.

【 0 2 2 3 】

Wang, Q., Chen, X., Yang, Y., Zhao, X. (2006) "Genome-scale in silico aided metabolic analysis and flux comparisons of *Escherichia coli* to improve succinate production." *App Microbiol Biotechnol*. 2006 73: 887-894.

【 0 2 2 4 】

Weickert, M. J., Adhya, S. (1993) "Control of transcription of Gal Repressor and isorepressor genes in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* 175: 251-258.

【 0 2 2 5 】

Zhang, X., Jantama, K., Moore, J. C., Jarboe, L. R., Shanmugam, K. T., Ingram, L. O. (2009a) "Metabolic evolution of energy-conserving pathways for succinate production in *Escherichia coli*." *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 20180-20185.

【 0 2 2 6 】

Zhang, X., Jantama, K., Shanmugam, K. T., Ingram, L. O. (2009b) "Re-engineering *Escherichia coli* for succinate production in mineral salts medium." *App Environ Microbiol* 75: 7807-7813.

【 配列表 】

2013511277000001.app

【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成24年7月19日 (2012.7.19)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

増大したレベルのホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ活性、およびピルビン酸キナーゼ活性をコードする遺伝子における変異を含む、非天然に生じる微生物。

【請求項 2】

増大したレベルのホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ活性が、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ活性を増大させる変化した調節配列に、p c k 遺伝子のネイティブの調節配列を交換することに起因する、請求項 1 の非天然に生じる微生物。

【請求項 3】

ピルビン酸キナーゼ活性をコードする遺伝子が、p y k A 遺伝子、またはそのホモログである、請求項 1 の非天然に生じる微生物。

【請求項 4】

ピルビン酸キナーゼ活性をコードする遺伝子が、p y k F 遺伝子、またはそのホモログである、請求項 1 の非天然に生じる微生物。

【請求項 5】

さらに P E P - 依存性ホスホトランスフェラーゼ系の機能を減少させる 1 または複数の遺伝学的修飾を含む、請求項 1 の非天然に生じる微生物。

【請求項 6】

さらに

(a) P E P - 依存性ホスホトランスフェラーゼ系の機能を減少させる 1 または複数の遺伝学的修飾、および

(b) 少なくとも 1 つの非 - P T S 糖輸送体の活性を増大させる 1 または複数の遺伝学的修飾

を含む、請求項 1 の非天然に生じる微生物。

【請求項 7】

前記非 - P T S 糖輸送体が、ガラクトースパーミターゼである、請求項 6 の非天然に生じる微生物。

【請求項 8】

ガラクトースパーミターゼの活性における増大が、ガラクトースパーミターゼをコードする g a l P 遺伝子のコピー数を増大させることによって達成される、請求項 7 の非天然に生じる微生物。

【請求項 9】

ガラクトースパーミターゼの活性における増大が、1 または複数の変異を通じてリプレッサーの陰性制御を軽減することによって達成される、請求項 7 の非天然に生じる微生物。

【請求項 10】

ガラクトースパーミターゼの前記リプレッサーが、g a l S または g a l R 遺伝子によってコードされる、請求項 9 の非天然に生じる微生物。

【請求項 11】

さらに発酵性経路にかかわる遺伝子の少なくとも 1 つにおける変異を含む、請求項 1 の非天然に生じる微生物。

【請求項 12】

さらにトリカルボン酸サイクルの作動と関連する遺伝子の少なくとも 1 つにおける変異を含む、請求項 1 の非天然に生じる微生物。

【請求項 13】

さらに R N A ポリメラーゼサブユニットをコードする遺伝子における変異を含む、請求項 1 の非天然に生じる微生物。

【請求項 14】

RNAポリメラーゼのサブユニットをコードする遺伝子が、*rpoA* 遺伝子である、請求項 13 の非天然に生じる微生物。

【請求項 15】

RNAポリメラーゼのサブユニットをコードする遺伝子が、*rpoC* 遺伝子である、請求項 13 の非天然に生じる微生物。

【請求項 16】

さらに染色体の DNA における欠失を含み、ここで、前記欠失が、*ydcC*、*ydcD*、*ydcE*、および *ydcF* 遺伝子を除去する、請求項 1 の非天然に生じる微生物。

【請求項 17】

さらに *ftsI* 遺伝子における変異を含む、請求項 1 の非天然に生じる微生物。

【請求項 18】

さらに *glbA* 遺伝子における変異を含む、請求項 1 の非天然に生じる微生物。

【請求項 19】

さらに、*dhakLM* オペロンまたは *PTS* - 依存性ジヒドロキシアセトンキナーゼのサブユニットをコードする遺伝子における変異を含む、請求項 1 の非天然に生じる微生物。

【請求項 20】

- (a) 請求項 1 の微生物を培養すること、
 - (b) 炭素源を提供すること、
 - (c) 前記微生物に前記炭素源を代謝させることを可能にすること、および
 - (d) 随意的に、コハク酸を単離すること
- を含む、コハク酸を生産する方法。

【請求項 21】

- 発酵によって所望の化学物質を生産する目的の微生物を構築するための方法であって、
- (a) 第一の親株から、前記所望の化学物質と異なる発酵生産物への生合成の経路における工程を触媒する酵素をコードする遺伝子の少なくとも 1 つを欠失させて、第一の中間株をもたらすこと、
 - (b) 前記第一の中間株に対する代謝的進化を行い、前記第一の株のものと比較して改良された増殖を有する第二の中間株をもたらすこと、
 - (c) 前記第一の親株および第二の中間株のゲノムの DNA 配列を測定すること、
 - (d) 前記ゲノムの DNA 配列を比較して、前記代謝的進化の間で選択された変異を同定すること、
 - (e) 前記変異の少なくとも 1 つを試験すること、および前記変異のどれが、前記所望の化学物質の生産の効率の増殖比率における増大によって有益であるかを同定すること、ならびに
 - (f) 前記同定された有益な変異の 1 もしくは複数、または前記有益な変異に 1 つに機能的に類似する変異の 1 もしくは複数、を、第二の親株に導入して、所望の化学物質を生産するための微生物をもたらすこと、
- を含む方法。



【請求項 22】

20 g / L を超えるオキサロ酢酸に由来する有機酸または他の化学物質を生産し、かつ、RNAポリメラーゼのサブユニットをコードする遺伝子における変異を含む、非天然に生じる微生物。

【請求項 23】

20 g / L を超えるオキサロ酢酸に由来する有機酸または他の化学物質を生産し、かつ、染色体の DNA における欠失を含み、ここで、前記欠失が、*ydcC*、*ydcD*、*ydcE*、および *ydcF* 遺伝子、またはそのホモログを除去する、非天然に生じる微生物。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2010/057119
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C12N 1/21(2006.01)i, C12N 15/54(2006.01)i, C12P 7/40(2006.01)i</i>		
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) C12N 1/21; C12P 7/40; C12P 7/16; C12P 7/46; C12N 15/09		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: engineered, microorganism, glyoxylate pathway, PCK, PYK, succinic acid		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009-011974 A1 (Microbia Precision Engineering, Inc. and Tate & Lyle Ingredients Americas, Inc.) 22 January 2009 See Abstract, Claims 1, 11, Paragraphs 0019, 0136, 0178	1-6, 11-13, 15-20
A	WO 2009-061429 A2 (Massachusetts Institute of Technology) 14 May 2009 See Abstract, Claims 1, 25	1-6, 11-13, 15-20
A	US 2009-0186392 A1 (Ramon Gonzalez) 23 July 2009 See Abstract, Page 7, Claims 1, 21, 22	1-6, 11-13, 15-20
A	US 2006-0046288 A1 (San Ka-Yiu et al.) 02 March 2006 See Abstract, Claims 6-11	1-6, 11-13, 15-20
A	Sang Jun Lee et al., 'Metabolic Engineering of Escherichia coli for Enhanced Production of Succinic Acid, Based on Genome Comparison and In Silico Gene Knockout Simulation', Appl Environ Microbiol., Vol. 71(12), pp. 7880-7887 (December 2005) See Abstract, Figure 1, Pages 7880, 7883-7885	1-6, 11-13, 15-20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified) "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 "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 "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 "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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 SEPTEMBER 2011 (23.09.2011)		Date of mailing of the international search report 23 SEPTEMBER 2011 (23.09.2011)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer PARK, Yeong-Gwan Telephone No. 82-42-481-8407 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2010/057119

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 7-10
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:

Claim 7 refers to claim 7 itself, so there is unclarity.
Since claims 8-10 are referring to unsearchable claim 7 directly or indirectly, there is unclarity, too.

3. ☐ 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)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Claims 1-13, 15-16(partially), 17, 18-20(partially)(Group 1),
Claims 14, 15-16(partially), 18-20(partially), 21 (Group 2), and
Claim 23 (Group 3).

Since the above mentioned groups of claims do not share any of the technical feature identified, a technical special relationship between the inventions does not exist.

Accordingly the claims do not relate to one invention or to a single inventive concept, under PCT Rules 13.1 and 13.2.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ 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. ☒ 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.:
Group 1: Claims 1-13, 15-16(partially), 17 and 18-20(partially)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ 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.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2010/057119

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Cynthia Sanville Millard et al., 'Enhanced production of succinic acid by overexpression of phosphoenolpyruvate carboxylase in escherichia coli', Appl Environ Microbiol., Vol. 62(5), pp. 1808-1810 (May 1996) See Abstract, Figure 1, Page 1808	1-6,11-13,15-20
A	Maris Laivenieks et al., 'Cloning, sequencing, and overexpressing of the anaerobiospirillum succiniciproducens phosphoenolpyruvate carboxykinase gene', Appl Environ Microbiol., Vol. 63(6), pp. 2273-2280 (June 1997) See Abstract, Pages 2273, 2279	1-6,11-13,15-20
A	Mark I. Donnelly, et al., 'A novel fermentation pathway in an escherichia coli mutant producing succinic acid, acetic acid, and ethanol', Appl Environ Microbiol., Vol.70-72, pp.187-196 (31 December 1998) See Abstract, Figure1, Table 3, Pages187, 188, 190-192	1-6,11-13,15-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2010/057119

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009-011974 A1	22.01.2009	EP 2158323 A1 US 2011-0039327 A1	03.03.2010 17.02.2011
WO 2009-061429 A2	14.05.2009	US 2010-0330614 A1 WO 2009-061429 A3	30.12.2010 06.08.2009
US 2009-0186392 A1	23.07.2009	CN 101415830 A EP 2002009 A2 JP 2009-532037 A JP 2009-532037 T KR 10-2008-0109787 A WO 2007-115228 A2 WO 2007-115228 A3	22.04.2009 17.12.2008 10.09.2009 10.09.2009 17.12.2008 11.10.2007 19.06.2008
US 2006-0046288 A1	02.03.2006	CN 101044245 A0 EP 1781797 A2 JP 2008-516585 A KR 10-2007-0053716 A US 2007-0184539 A1 US 7223567 B2 US 7790416 B2 WO 2006-031424 A2 WO 2006-031424 A3	26.09.2007 09.05.2007 22.05.2008 25.05.2007 09.08.2007 29.05.2007 07.09.2010 23.03.2006 23.03.2006

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/00 1 0 1

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

(74)代理人 100170520

弁理士 澤本 真奈美

(72)発明者 ゴン・ウェイ

アメリカ合衆国 0 1 8 0 1 マサチューセッツ州ウバーン、ミル・ストリート 7 0 0 番、アパートメント・ナンバー 1 2

(72)発明者 スドハンシュ・ドール

アメリカ合衆国 0 1 8 4 5 マサチューセッツ州ノース・アンドーバー、ロイヤル・クレスト・ドライブ 5 番、ユニット・ナンバー 1 0

(72)発明者 タミー・グレイバー

アメリカ合衆国 0 1 8 6 7 マサチューセッツ州リーディング、アーチストーン・サークル 3 番、ナンバー 1 0

(72)発明者 アンドリュー・クリストファー・コラード

アメリカ合衆国 0 2 1 4 5 マサチューセッツ州ソマービル、ブロードウェイ 5 9 7 番、アパートメント・ナンバー 5

(72)発明者 ジャニス・ジー・ペロ

アメリカ合衆国 0 2 4 2 0 マサチューセッツ州レキシントン、ソロモン・ピエール・ロード 2 0 番

(72)発明者 アール・ロジャース・ヨキウム

アメリカ合衆国 0 2 4 2 0 マサチューセッツ州レキシントン、オーチャード・レイン 4 番

F ターム(参考) 4B024 AA03 AA20 BA80 CA04 CA20 DA06 EA04 GA14

4B064 AD15 CA02 CA19 CC24 CD02 CD09 CD12 CD20 CD21

4B065 AA01X AA26X AA57X AA72X AA87X AB01 AC14 BA03 BB02 BB03

BB12 BB15 BB16 BB19 BB20 BB29 BB37 BC03 CA10