

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6878607号  
(P6878607)

(45) 発行日 令和3年5月26日(2021.5.26)

(24) 登録日 令和3年5月6日(2021.5.6)

|                                |                       |
|--------------------------------|-----------------------|
| (51) Int. Cl.                  | F I                   |
| <b>C 1 2 N 15/63 (2006.01)</b> | C 1 2 N 15/63 Z N A Z |
| <b>C 1 2 P 21/00 (2006.01)</b> | C 1 2 P 21/00 C       |
| <b>C 1 2 N 1/15 (2006.01)</b>  | C 1 2 N 1/15          |
| <b>C 1 2 N 1/19 (2006.01)</b>  | C 1 2 N 1/19          |
| <b>C 1 2 N 1/21 (2006.01)</b>  | C 1 2 N 1/21          |

請求項の数 10 (全 133 頁) 最終頁に続く

|   |   |
|---|---|
| (21) 出願番号 特願2019-545293 (P2019-545293)  | (73) 特許権者 507189666<br>デューク ユニバーシティ<br>アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 2<br>7705, ダラム, アーウィン ロード<br>2812 スイート 306 |
| (86) (22) 出願日 平成30年2月21日 (2018.2.21)    |   |
| (65) 公表番号 特表2020-508050 (P2020-508050A) | (74) 代理人 100107364<br>弁理士 斉藤 達也   |
| (43) 公表日 令和2年3月19日 (2020.3.19)          | (72) 発明者 リンチ, マイケル デヴィッド<br>アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 2<br>7705 ダラム, サンセット アベニュー<br>2117                    |
| (86) 国際出願番号 PCT/US2018/019040           |   |
| (87) 国際公開番号 W02018/156646               |   |
| (87) 国際公開日 平成30年8月30日 (2018.8.30)       |   |
| 審査請求日 令和1年10月16日 (2019.10.16)           |   |
| (31) 優先権主張番号 62/461,436                 |   |
| (32) 優先日 平成29年2月21日 (2017.2.21)         |   |
| (33) 優先権主張国・地域又は機関<br>米国 (US)           |   |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ロバストな動的な代謝コントロールの為の組成物及び方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

遺伝子組み換え微生物から製品を生産するための多段階発酵バイオプロセスであって：  
製品を生産するための遺伝子組み換え微生物を提供することと；  
提供された前記遺伝子組み換え微生物を、増殖期の培地で育てることであり、

前記遺伝子組み換え微生物は、

- i 前記製品の生合成のための少なくとも1つの生産酵素を含む生産経路と、
- i i 合成代謝調節弁が誘導された時に、GMO内の複数の代謝経路を通るフラックスを削減または排除するための1つ以上の前記合成代謝調節弁と、を含む、

前記1つ以上の合成代謝調節弁が、

- a) 酵素をコードする遺伝子の遺伝子発現をサイレンシングする少なくとも1つのサイレンシングSMVと、
- b) 酵素のタンパク質分解を制御する少なくとも1つのタンパク質分解SMVと、を含む、ことと；

生産的な固定相に移行することであって、前記生産経路または前記1つ以上の合成代謝調節弁を欠く微生物と比較して、遺伝子組み換え微生物の成長が遅くなるか停止して製品の生産が促進され、前記1つ以上の合成代謝調節弁を誘導することにより、前記生産的な固定相に移行することと；

前記製品を生産することと、

を含む多段階発酵バイオプロセス。

【請求項 2】

前記製品が、アミノ酸、酢酸、アセトイン、アセトン、アクリル、リンゴ酸塩、脂肪酸エチルエステル、イソプレノイド、グリセロール、エチレングリコール、エチレン、プロピレン、ブチレン、イソブチレン、酢酸エチル、酢酸ビニル、1,4-ブタンジオール、2,3-ブタンジオール、ブタノール、イソブタノール、sec-ブタノール、ブチレート、イソブチレート、2-OH-イソブチレート、3-OH-ブチレート、エタノール、イソプロパノール、D-乳酸、L-乳酸、ピルビン酸、イタコネート、レブリン酸、グルカレート、グルタル酸、カプロラクタム、アジピン酸、プロパノール、イソプロパノール、縮合アルコール、1,2-プロパンジオール、1,3-プロパンジオール、ギ酸塩、フマル酸、プロピオン酸、コハク酸、吉草酸、マレイン酸、及びポリヒドロキシ酪酸、からなる群から選択される、

10

請求項 1 に記載の多段階発酵バイオプロセス。

【請求項 3】

前記サイレンシング代謝調節弁によってサイレンシングされる前記酵素と、前記タンパク質分解合成代謝調節弁によるタンパク質分解を受ける前記酵素が、それぞれ、fabI、gltA、ldp、zwf、及びudhA、からなる群から選択された遺伝子によってエンコードされ、あるいは、

前記サイレンシング代謝調節弁は、遺伝子発現とガイドRNA 遺伝子の配列を含む C A S C A D E プラスミドの発現との C R I S P R 干渉によって特徴付けられ、あるいは、

20

前記タンパク質分解合成代謝調節弁は、N 末端または C 末端タグに機能的に連結されたタンパク質分解酵素の発現によって特徴付けられ、制御されたタンパク質分解は、合成代謝弁の誘導時に N 末端または C 末端タグを含む酵素に対して選択的である、

請求項 1 に記載の多段階発酵バイオプロセス。

【請求項 4】

製品を生産するための遺伝子組み換え微生物を提供するステップは、

複数の異なる遺伝子組み換え微生物の提供することであり、

それぞれの遺伝子組み換え微生物は、

- i 前記製品の生合成のための少なくとも 1 つの生産酵素を含む生産経路と、
- ii 合成代謝調節弁が誘導された時に、前記遺伝子組み換え微生物内の複数の代謝経路を通るフラックスを削減または排除するための 1 つ以上の合成代謝調節弁と、を含み、

30

前記 1 つ以上の合成代謝調節弁が、

- a) 酵素をコードする遺伝子の遺伝子発現をサイレンシングするサイレンシング S M V と、
- b) 酵素のタンパク質分解を制御するタンパク質分解 S M V と、を含み、

前記複数の遺伝子組み換え微生物のそれぞれは、1 つ以上の生産酵素、サイレンシングされる前記酵素、あるいはタンパク質分解される前記酵素によって、その中で区別される、ことと；

増殖期にある培地で前記複数の遺伝子組み換え微生物のそれぞれを独立して増殖させることと；

40

前記生産経路または前記 1 つ以上の合成代謝調節弁を欠く微生物と比較して、遺伝子組み換え微生物の成長が遅くなるか停止して製品の生産が促進される、生産的な固定相に移行することとあって、前記合成代謝調節弁を誘導することにより、前記生産的な固定相に移行することと；

前記製品を生産することと、

一定期間後、前記複数の遺伝子組み換え微生物のそれぞれについて、生産段階で生産された製品のレベルを測定することと；

生産された製品のレベルに基づいて、発酵プロセスに提供される遺伝子組み換え微生物を選択することと；を含む

50

請求項 1 に記載の多段階発酵バイオプロセス。

【請求項 5】

前記製品はアラニンであり、

前記生産酵素または前記生産酵素をコードする遺伝子に作動可能に連結された遺伝子のプロモーター配列は、前記遺伝子組み換え微生物が由来する種に対して異種であり、

アラニン生産の異種酵素は、NADPH 依存性アラニンデヒドロゲナーゼ (ald)、アラニンエキスポーター (alaE)、グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ (gapN)、またはそれらの組み合わせの 1 つである、

請求項 1 に記載の多段階発酵バイオプロセス。

【請求項 6】

前記製品はメバロン酸塩または 3 - HP であり、

前記生産酵素または前記生産酵素をコードする遺伝子に作動可能に連結された遺伝子のプロモーター配列は、前記遺伝子組み換え微生物が由来する種に対して異種であり、

メバロン酸塩または 3 - HP 生産の異種酵素は、NADPH 依存性 3 - ヒドロキシプロピオン酸デヒドロゲナーゼ、アセチル CoA アセチルトランスフェラーゼ、NADPH 依存性 HMG - CoA レダクターゼ、HMG - CoA シンターゼ、またはそれらの組み合わせの 1 つである、

請求項 1 に記載の多段階発酵バイオプロセス。

【請求項 7】

遺伝子組み換え微生物株であって、

i 製品の生合成のための少なくとも 1 つの生産酵素を含む生産経路と；

ii 1 つ以上の合成代謝調節弁が誘導された場合に、遺伝子組み換え微生物内の複数の代謝経路を通るフラックスを低減または排除できる前記 1 つ以上の合成代謝調節弁の組み合わせであり、

前記 1 つ以上の合成代謝調節弁が、

a) 酵素をコードする遺伝子の遺伝子発現をサイレンシングする少なくとも 1 つのサイレンシング SMV と、

b) 酵素のタンパク質分解を制御するタンパク質分解 SMV と、を含み、

前記 1 つ以上の合成代謝調節弁の誘導により、遺伝子組み換え微生物の成長が遅くなるか停止して製品の生産が促進され、

前記サイレンシング代謝調節弁によってサイレンシングされる前記酵素と、前記タンパク質分解合成代謝調節弁によるタンパク質分解を受ける前記酵素が、それぞれ、fabI、gltA、ldp、zwf、及びudhA、からなる群から選択された遺伝子によってエンコードされる、

遺伝子組み換え微生物株。

【請求項 8】

前記製品はアラニンであり、

前記生産経路の前記酵素は、NADPH 依存性アラニンデヒドロゲナーゼ (ald)、アラニンエキスポーター (alaE)、グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ (gapN)、またはそれらの組み合わせの 1 つであり、

前記合成代謝調節弁は、fabI、gltA1、またはgltA2の遺伝子発現のサイレンシングと、fabIまたはudhAの制御されたタンパク質分解の組み合わせを含む、

請求項 7 に記載の遺伝子組み換え微生物株。

【請求項 9】

前記製品はメバロン酸塩または 3 - HP であり、

前記生産経路の前記酵素は、NADPH 依存性 3 - ヒドロキシプロピオン酸デヒドロゲナーゼ、アセチル CoA アセチルトランスフェラーゼ、NADPH 依存性 HMG - CoA レダクターゼ、HMG - CoA シンターゼ、またはそれらの組み合わせの 1 つであり、

前記合成代謝調節弁は、fabI、gltA1、またはgltA2の遺伝子発現のサイ

10

20

30

40

50

レンシングと、fabIまたはudhAの制御されたタンパク質分解の組み合わせを含む、

請求項7に記載の遺伝子組み換え微生物株。

【請求項10】

複数の約50から約500の遺伝子組み換え微生物株であり、

複数の遺伝的に改変された微生物のそれぞれは、生産酵素、サイレンシングされる酵素、またはタンパク質分解される酵素のうちの一つ以上によって区別される、

請求項7に記載の遺伝子組み換え微生物株。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、ロバストな動的な代謝コントロールの為の組成物及び方法に関する。

【0002】

相互参照

本願は、2017年2月21日出願の米国仮出願第62/461,436号の利益を請求し、此の出願は其の全体が参照に依って本願に組み込まれる。

【0003】

連邦出資の研究についての陳述

本発明は、夫々DOD/DARPA、NAVY/ONR、及びNSFに依って授与された連邦補助金第HR0011-14-C-0075、12043956、及び1445726号に依る政府の援助に依って成された。政府は本発明に何らかの権利を有する。

20

【0004】

配列表の参照

本願は配列表を含有し、これはASCIIフォーマットで電子的に提出されており、其の全体が参照に依って此処で組み込まれる。2018年2月21日に作成された前記ASCIIコピーは52240\_702\_601\_SL.txtの名称であり、サイズが81,697バイトである。

【背景技術】

【0005】

バイオ医薬品及び低分子治療薬からスペシャリティー、バルク、及びコモディティーケミカル迄のあらゆる物、並びに次世代バイオ燃料をさえも生産する為のバイオテクノロジーに基づく発酵プロセスが、首尾良く開発されて来た。発酵科学及び合成生物学並びに代謝及び酵素工学の分野に於けるテクノロジー開発が原因で、此れ等のプロセスは近年に於いて急速な進歩をして来た。此れ等の実質的な進展にも関わらず、合理的で指向的な工学アプローチの最も首尾良い例も又、多数の且つ多くの場合に長長しい試行錯誤のサイクルに大いに依拠して来た。本開示は、同時に問題の複雑さ（及び然るべき設計領域のサイズ）を縮減し乍ら、環境条件に対する代謝応答をも又最小化する戦略を提供し、操作された株のロバスト性及びスケラブル性を増大させる。

30

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

40

【0006】

部分的には、本開示は、生産微生物株の迅速な開発を可能にする高スループットな工学プラットフォームを提供する。

【0007】

一つの態様に於いて、本開示は産物を生成する為の細胞を提供し、細胞は：代謝経路の酵素の発現のコントロールされた縮減の為の異種的なポリヌクレオチド（酵素の発現のコントロールされた縮減は細胞の静止期を誘導する）と；産物の生成の為の生産酵素の発現のコントロールされた増大を媒介する為の異種的な生産ポリヌクレオチドと；を含み、酵素を欠く細胞と比較して、静止期の間の産物の生産の速度は環境条件の変化に应答してより縮減されない。

50

## 【0008】

幾つかの実施形態に於いて、異種的なポリヌクレオチドは代謝経路のフラックスを縮減する。幾つかの実施形態に於いて、酵素はエノイルACP/CoAレダクターゼ、グルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ、リポアミドデヒドロゲナーゼ、クエン酸シンターゼ、可溶性トランスヒドロゲナーゼ、及びNADH依存性グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼから成る群から選択される。幾つかの実施形態に於いて、生産酵素はNADPH依存性アラニンデヒドロゲナーゼ、アラニン排出輸送体、及びNADPH依存性グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼから成る群から選択される。幾つかの実施形態に於いて、環境条件の変化は、細胞に接触する培養培地の糖の濃度を増大又は減少させる事を含む。幾つかの実施形態に於いて、糖はグルコースである。幾つかの実施形態に於いて、環境条件の変化は、細胞に接触する培養培地の酸素供給を増大又は減少させる事を含む。幾つかの実施形態に於いて、産物は3-ヒドロキシプロピオン酸を含む。

10

## 【0009】

幾つかの実施形態に於いて、産物はアミノ酸を含む。幾つかの態様に於いて、アミノ酸はアラニンを含む。幾つかの態様に於いて、細胞は培養に依って増殖させられ、培養に依るアラニンの生産の速度は少なくとも0.5g/L/時間である。幾つかの態様に於いて、アラニンの生産の速度は少なくとも1.0g/L/時間である。幾つかの態様に於いて、アラニンの生産の速度は少なくとも1.5g/L/時間である。幾つかの態様に於いて、アラニンの生産の速度は少なくとも1.6g/L/時間である。幾つかの態様に於いて、培養は少なくとも80g/Lのアラニンを生産する。幾つかの態様に於いて、培養は少なくとも100g/Lのアラニンを生産する。幾つかの態様に於いて、培養は少なくとも120g/Lのアラニンを生産する。幾つかの態様に於いて、培養は少なくとも140g/Lのアラニンを生産する。幾つかの態様に於いて、生産ポリヌクレオチドはアラニン排出輸送体をコードする。幾つかの態様に於いて、アラニン排出輸送体はalaEである。

20

## 【0010】

幾つかの実施形態に於いて、産物はメバロン酸を含む。幾つかの実施形態に於いて、細胞は培養に依って増殖させられ、培養に依るメバロン酸の生産の速度は少なくとも0.5g/L/時間である。幾つかの実施形態に於いて、メバロン酸の生産の速度は少なくとも1.0g/L/時間である。幾つかの実施形態に於いて、メバロン酸の生産の速度は少なくとも1.2g/L/時間である。幾つかの実施形態に於いて、メバロン酸の生産の速度は少なくとも1.25g/L/時間である。幾つかの態様に於いて、細胞は培養に依って増殖させられ、培養は少なくとも50g/Lのメバロン酸を生産する。幾つかの実施形態に於いて、培養は少なくとも70g/Lのメバロン酸を生産する。幾つかの実施形態に於いて、培養は少なくとも90g/Lのメバロン酸を生産する。幾つかの実施形態に於いて、培養は少なくとも95g/Lのメバロン酸を生産する。幾つかの実施形態に於いて、異種的なポリヌクレオチドは：酵素をコードする遺伝子の転写を抑制する為のサイレンシングポリヌクレオチド；及び酵素の細胞性の分解を媒介する為の分解ポリヌクレオチドから成る群から選択される。

30

## 【0011】

幾つかの態様に於いて、異種的なポリヌクレオチドはサイレンシングポリヌクレオチドを含み、サイレンシングポリヌクレオチドは、酵素をコードする遺伝子のプロモーターを認識するgRNA配列を含むガイドRNA(gRNA)を含む。幾つかの態様に於いて、異種的なポリヌクレオチドはCRISPR酵素をコードし、CRISPR酵素はgRNAに結合した時にプロモーター配列に特異的に結合する。幾つかの態様に於いて、CRISPR酵素は触媒的に不活性である。幾つかの態様に於いて、異種的なポリヌクレオチドは分解ポリヌクレオチドを含み、分解ポリヌクレオチドは分解タグをコードする配列を含み、分解タグは酵素の分解を媒介する。幾つかの実施形態に於いて、異種的なポリヌクレオチドの発現は細胞中の利用可能な磷酸量に依って制御される。幾つかの実施形態に於いて、生産ポリヌクレオチドの発現は細胞中の利用可能な磷酸量に依って制御される。幾つかの実施形態に於いて、細胞はE.coli細胞である。

40

50

## 【 0 0 1 2 】

別の態様に於いては、方法が本願に於いて開示され：細胞の複数の株を独立して培養する事（各株は、（ i ）代謝経路の酵素の発現のコントロールされた縮減を媒介する為の異種的なポリヌクレオチド（酵素の発現のコントロールされた縮減は、細胞の静止期を誘導する）と；（ i i ）産物の生成の為の生産酵素の発現のコントロールされた増大を媒介する為の異種的な生産ポリヌクレオチドと；を含み、複数の株の各株は、異種的なポリヌクレオチド又は異種的な生産ポリヌクレオチドの少なくとも1つの配列が別の株とは異なる）と；複数の株を静止期迄増殖させる事と；複数の株から或る株を選択する事（静止期の間を選択された株に依って生産される産物のレベルに基づく）とを含む。

## 【 0 0 1 3 】

幾つかの実施形態に於いて、方法は、産物のレベルを決定する事を含む。幾つかの実施形態に於いて、方法は、選択された株を増殖させる事を含む。幾つかの実施形態に於いて、選択された株はバイオリクターに依って増殖させられる。幾つかの実施形態に於いて、選択された株を含む培養培地は少なくとも500mlの体積を有する。幾つかの実施形態に於いて、培養培地は少なくとも1Lの体積を有する。幾つかの実施形態に於いて、異種的なポリヌクレオチドは：酵素をコードする遺伝子の転写を抑制する為のサイレンシングポリヌクレオチド；及び酵素の細胞性の分解を媒介する為の分解ポリヌクレオチドから成る群から選択される。幾つかの実施形態に於いて、複数の株の第1及び第2の株はサイレンシングポリヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態に於いて、サイレンシングポリヌクレオチドは、酵素をコードする遺伝子のプロモーター配列を認識するgRNA配列を含むガイドRNA（gRNA）を含む。幾つかの実施形態に於いて、gRNA配列は第1及び第2の株間で異なる。幾つかの実施形態に於いて、複数の株の第1及び第2の株は分解ポリヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態に於いて、分解ポリヌクレオチドは第1及び第2の株間で異なる。幾つかの実施形態に於いて、酵素はエノイルACP/CoAレダクターゼ、グルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ、リポアミドデヒドロゲナーゼ、クエン酸シンターゼ、可溶性トランスヒドロゲナーゼ、及びNADH依存性グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼから成る群から選択される。幾つかの実施形態に於いて、生産酵素はNADPH依存性アラニンデヒドロゲナーゼ、アラニン排出輸送体、及びNADPH依存性グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼから成る群から選択される。幾つかの実施形態に於いて、産物はメバロン酸、3-ヒドロキシプロピオン酸、及びアミノ酸から成る群から選択される。

## 【 0 0 1 4 】

幾つかの実施形態に於いて、産物はアミノ酸であり、アミノ酸はアラニンである。幾つかの実施形態に於いて、異種的なポリヌクレオチドを欠く細胞と比較して、選択された株の細胞、静止期の間産物の生産の速度は環境条件の変化に依って縮減されない。幾つかの実施形態に於いて、環境条件の変化は、細胞に接触する培養培地の糖の濃度の変化を含む。幾つかの実施形態に於いて、環境条件の変化は、細胞に接触する培養培地の酸素供給の変化を含む。

## 【 0 0 1 5 】

別の態様に於いては、細胞性の産物を生成する為の方法が本願に於いて開示され：培養培地に依って異種的な細胞を培養する事を含み、異種的な細胞は：（ i ）代謝経路の酵素の発現のコントロールされた縮減を媒介する為の異種的なポリヌクレオチド（酵素の発現のコントロールされた縮減は細胞の静止期を誘導する）と；（ i i ）産物の生成の為の生産酵素の発現のコントロールされた増大を媒介する為の異種的な生産ポリヌクレオチドと；を含み、酵素を欠く細胞と比較して、静止期の間産物の生産の速度は環境条件の変化に依って縮減されない。

## 【 0 0 1 6 】

1つの実施形態に於いて、方法は環境条件を変化させる事を更に含む。1つの実施形態に於いて、環境条件は培養培地の糖の濃度を含み、環境条件を変化させる事は濃度を増大又は減少させる事を含む。幾つかの実施形態に於いて、糖はグルコースである。幾つかの

10

20

30

40

50

実施形態に於いて、環境条件は培養培地の酸素濃度を含み、環境条件を変化させる事は酸素濃度を増大又は減少させる事を含む。幾つかの実施形態に於いて、培養する事は、バイオリアクターに依って実施される。幾つかの実施形態に於いて、培養培地は少なくとも500mlの体積を有する。幾つかの実施形態に於いて、培養培地は少なくとも1Lの体積を有する。幾つかの実施形態に於いて、産物は3-ヒドロキシプロピオン酸を含む。幾つかの実施形態に於いて、産物はアミノ酸を含む。幾つかの実施形態に於いて、アミノ酸はアラニンを含む。幾つかの実施形態に於いて、アラニンの生産の速度は少なくとも0.5g/L/時間である。幾つかの実施形態に於いて、アラニンの生産の速度は少なくとも1.0g/L/時間である。幾つかの実施形態に於いて、アラニンの生産の速度は少なくとも1.5g/L/時間である。幾つかの実施形態に於いて、アラニンの生産の速度は少なくとも1.6g/L/時間である。幾つかの実施形態に於いて、生産ポリヌクレオチドはアラニン排出輸送体をコードする。幾つかの実施形態に於いて、アラニン排出輸送体はalaEである。

10

## 【0017】

幾つかの実施形態に於いて、産物はメバロン酸を含む。幾つかの実施形態に於いて、メバロン酸の生産の速度は少なくとも0.5g/L/時間である。幾つかの実施形態に於いて、メバロン酸の生産の速度は少なくとも1.0g/L/時間である。幾つかの実施形態に於いて、メバロン酸の生産の速度は少なくとも1.2g/L/時間である。幾つかの実施形態に於いて、メバロン酸の生産の速度は少なくとも1.25g/L/時間である。幾つかの実施形態に於いて、異種的なポリヌクレオチドは：酵素をコードする遺伝子の転写を抑制する為のサイレンシングポリヌクレオチド；及び酵素の細胞性の分解を媒介する為の分解ポリヌクレオチドから成る群から選択される。幾つかの実施形態に於いて、異種的なポリヌクレオチドはサイレンシングポリヌクレオチドを含み、サイレンシングポリヌクレオチドは、酵素をコードする遺伝子のプロモーター配列を認識するgRNA配列を含むガイドRNA(gRNA)を含む。幾つかの実施形態に於いて、異種的なポリヌクレオチドはCRISPR酵素をコードし、CRISPR酵素は、gRNAに結合した時にプロモーター配列に特異的に結合する。幾つかの実施形態に於いて、CRISPR酵素は触媒的に不活性である。幾つかの実施形態に於いて、異種的なポリヌクレオチドは分解ポリヌクレオチドを含み、分解ポリヌクレオチドは分解タグをコードする配列を含み、分解タグは酵素の分解を媒介する。幾つかの実施形態に於いて、異種的なポリヌクレオチドの発現は細胞中の利用可能な燐酸量に依って制御される。幾つかの実施形態に於いて、生産ポリヌクレオチドの発現は細胞中の利用可能な燐酸量に依って制御される。幾つかの実施形態に於いて、細胞はE.coli細胞である。

20

30

## 【0018】

別の態様に於いては、アラニンの生産の為の細胞が本願に於いて開示され、細胞は：(i)代謝経路の酵素の発現のコントロールされた縮減の為の異種的なポリヌクレオチド(酵素はエノイルACP/CoAレダクターゼ、グルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ、リポアミドデヒドロゲナーゼ(lpd)、クエン酸シンターゼ(gltA)、可溶性トランスヒドロゲナーゼ、及びNADH依存性グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼから成る群から選択される)と；(ii)アラニン排出輸送体(アラニン排出輸送体は、野生型細胞と比較して増大したレベルで発現される)とを含む。

40

## 【0019】

幾つかの実施形態に於いて、アラニン排出輸送体はalaE遺伝子に依ってコードされる。幾つかの実施形態に於いて、酵素の発現のコントロールされた縮減は細胞の静止期を誘導する。幾つかの実施形態に於いて、細胞は、アラニンの生成の為の生産酵素の発現のコントロールされた増大の為の異種的な生産ポリヌクレオチドを更に含む。幾つかの実施形態に於いて、生産酵素はNADPH依存性アラニンデヒドロゲナーゼ及びNADPH依存性グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼから成る群から選択される。幾つかの実施形態に於いて、異種的なポリヌクレオチドは：酵素をコードする遺伝子の転写抑制を媒介する為のサイレンシングポリヌクレオチド；及び酵素の細胞性の分解を媒介する為の

50

分解ポリヌクレオチドから成る群から選択される。幾つかの実施形態に於いて、異種的なポリヌクレオチドはサイレンシングポリヌクレオチドを含み、サイレンシングポリヌクレオチドは、酵素をコードする遺伝子のプロモーター配列を認識するgRNA配列を含むガイドRNA(gRNA)を含む。幾つかの実施形態に於いて、ポリヌクレオチドはCRISPR酵素を更にコードし、CRISPR酵素はgRNAに結合した時にプロモーター配列に特異的に結合する。幾つかの実施形態に於いて、CRISPR酵素は触媒的に不活性である。幾つかの実施形態に於いて、異種的なポリヌクレオチドは分解ポリヌクレオチドを含み、分解ポリヌクレオチドは分解タグをコードする配列を含み、分解タグは酵素の分解を媒介する。幾つかの実施形態に於いて、ポリヌクレオチドは細胞中の利用可能な磷酸量に依って制御される。幾つかの実施形態に於いて、生産ポリヌクレオチドは細胞中の利用可能な磷酸量に依って制御される。幾つかの実施形態に於いて、細胞はE. coli細胞である。

10

#### 【0020】

幾つかの実施形態に於いて、培養は細胞を含む。幾つかの実施形態に於いて、培養に依るアラニンの生産の速度は少なくとも0.5g/L/時間である。幾つかの実施形態に於いて、培養に依るアラニンの生産の速度は少なくとも1.0g/L/時間である。幾つかの実施形態に於いて、培養に依るアラニンの生産の速度は少なくとも1.5g/L/時間である。幾つかの実施形態に於いて、培養に依るアラニンの生産の速度は少なくとも1.6g/L/時間である。幾つかの実施形態に於いて、培養は少なくとも100g/Lのアラニンを生産する。幾つかの実施形態に於いて、培養は少なくとも120g/Lのアラニンを生産する。幾つかの実施形態に於いて、培養は少なくとも140g/Lのアラニンを生産する。

20

#### 【0021】

幾つかの態様に於いては、アラニンの生産の方法が本願に於いて開示され、(i)代謝経路の酵素の発現のコントロールされた縮減の為の異種的なポリヌクレオチド(酵素はエノイルACP/CoAレダクターゼ、グルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ、リポアミドデヒドロゲナーゼ、クエン酸シンターゼ、可溶性トランスヒドロゲナーゼ、及びNADH依存性グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼから成る群から選択される)と;(ii)アラニン排出輸送体(アラニン排出輸送体は、野生型細胞と比較して増大したレベルで発現される)とを含む細胞を、培養培地に依って増殖させる事を含む。

30

#### 【0022】

幾つかの実施形態に於いて、酵素の発現のコントロールされた縮減は細胞の静止期を誘導する。幾つかの実施形態に於いて、方法は、静止期の間の培養培地の酸素供給レベル又は糖濃度を減少させる事を更に含み、異種的なポリヌクレオチドを欠く細胞と比較して、細胞性の産物の生産の速度は減少させる事に対して応答してより縮減されない。幾つかの実施形態に於いて、糖はグルコースである。幾つかの実施形態に於いて、アラニン排出輸送体はalaE遺伝子に依ってコードされる。幾つかの実施形態に於いて、細胞は、アラニンの生成の為の生産酵素の発現のコントロールされた増大の為の異種的な生産ポリヌクレオチドを更に含む。幾つかの実施形態に於いて、生産酵素は:NADPH依存性アラニンデヒドロゲナーゼ及びNADPH依存性グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼから成る群から選択される。幾つかの実施形態に於いて、異種的なポリヌクレオチドは:酵素をコードする遺伝子の転写抑制を媒介する為のサイレンシングポリヌクレオチド;及び酵素の細胞性の分解を媒介する為の分解ポリヌクレオチドから成る群から選択される。幾つかの実施形態に於いて、異種的なポリヌクレオチドはサイレンシングポリヌクレオチドを含み、サイレンシングポリヌクレオチドは、酵素をコードする遺伝子のプロモーター配列を認識するgRNA配列を含むガイドRNA(gRNA)を含む。幾つかの実施形態に於いて、異種的なポリヌクレオチドはCRISPR酵素をコードし、CRISPR酵素はgRNAに結合した時にプロモーター配列に特異的に結合する。幾つかの実施形態に於いて、CRISPR酵素は触媒的に不活性である。幾つかの実施形態に於いて、異種的なポリヌクレオチドは分解ポリヌクレオチドを含み、分解ポリヌクレオチドは分解タグをコ

40

50



ードする配列を含み、分解タグは酵素の分解を媒介する。

【0023】

幾つかの実施形態に於いて、異種的なポリヌクレオチドの発現は細胞中の利用可能な磷酸量に依って制御される。幾つかの実施形態に於いて、生産ポリヌクレオチドは細胞中の利用可能な磷酸量に依って制御される。幾つかの実施形態に於いて、細胞は *E. coli* 細胞である。幾つかの実施形態に於いて、アラニンの生産の速度は少なくとも  $0.5 \text{ g/L/時間}$  である。幾つかの実施形態に於いて、アラニンの生産の速度は少なくとも  $1.0 \text{ g/L/時間}$  である。幾つかの実施形態に於いて、アラニンの生産の速度は少なくとも  $1.5 \text{ g/L/時間}$  である。幾つかの実施形態に於いて、アラニンの生産の速度は少なくとも  $1.6 \text{ g/L/時間}$  である。

10

【0024】

参照に依る組み込み

本明細書に於いて挙げられている全ての刊行物、特許、及び特許出願は、各個々の刊行物、特許、又は特許出願が参照に依って組み込まれる事を具体的に且つ個々に指示される場合と同じ程度に、参照に依って本願に組み込まれる。

【0025】

本発明の新規の特徴は添付の請求項に正確に提示されている。本発明の特徴及び利点のより良好な理解は、本発明の原理が利用される例示的な実施形態を提示する次の詳細な記載、及び付随する図面の参照に依って得られるであろう。

【図面の簡単な説明】

20

【0026】

【図1】図1Aは2段階発酵に於ける動的な代謝コントロールの概観を図示している。図1Bは株及びバイオプロセス最適化を図示している。

【図2A】乃至

【図2D】*E. coli* に於ける2段階の合成的な代謝調節弁 (SMV) の実装の例を図示している。

【図3A】乃至

【図3K】2段階の動的コントロールを利用する *E. coli* に於けるアラニン生産の例を図示している。

【図4A】乃至

30

【図4F】2段階及び増殖連動型アプローチ間の例のロバスト性比較を図示している。

【図5A】乃至

【図5J】マイクロ発酵及び1L発酵に依る「調節弁」及び増殖連動型アラニン生産の例の比較を図示している。

【図6A】乃至

【図6H】2段階の動的コントロールを利用する *E. coli* に於けるメバロン酸生産の例を図示している。

【図7】磷酸欠乏プロモーターキャラクタリゼーションの例を図示している。

【図8】インスレーター付き磷酸欠乏プロモーターキャラクタリゼーションの例を図示している。

40

【図9】インスレーター付き恒常的プロモーターキャラクタリゼーションの例を図示している。

【図10】2段階発酵に於ける最適な3-HPフラックスの為の代謝モデル化結果の例を図示している。

【図11】染色体改変の例を図示している。

【図12】1LのFGM10最少培地発酵に於ける出発ホスト株の平均最大増殖速度の例を図示している。  $n = 2$ 。

【図13A】乃至

【図13E】1Lの標準的な最少培地発酵に於いて出発ホスト株の増殖期の間利用されるグルコースの分配の例を図示している。

50

- 【図14】 p C A S C A D E - c o n t r o l プラスミド構築スキームを図示している。
- 【図15A】乃至
- 【図15B】 p C A S C A D E 構築スキームを図示している。
- 【図16A】乃至
- 【図16C】 マイクロ発酵プロセスの概観を図示している。
- 【図17】 異なるインスレーター付き燐酸プロモーターを D L F \_ 0 0 2 5 株に用いた L - アラニン生産の為にマイクロ発酵を図示している。
- 【図18】 g a p N / g a p A 株に依る L - アラニン生産のヒートマップを図示している。
- 【図19A】乃至
- 【図19D】 マイクロ発酵に於ける異なる O T R 及びグルコース濃度に対して応答したアラニン生産を、ロバスト性について評価された4つの株について図示している。
- 【図20A】乃至
- 【図20D】 マイクロ発酵に於ける異なる O T R 及びグルコース濃度に対して応答したアラニン生産を、ロバスト性について評価された4つの株について図示している。
- 【図21A】乃至
- 【図21D】 マイクロ発酵に於ける異なる O T R 及びグルコース濃度に対して応答したアラニン生産を、ロバスト性について評価された4つの株について図示している。
- 【図22A】乃至
- 【図22D】 マイクロ発酵に於ける異なる O T R 及びグルコース濃度に対して応答したアラニン生産を、ロバスト性について評価された4つの株について図示している。
- 【図23A】乃至
- 【図23D】 マイクロ発酵に於ける異なる O T R 及びグルコース濃度に対して応答したアラニン生産を、ロバスト性について評価された4つの株について図示している。
- 【図24A】乃至
- 【図24D】 マイクロ発酵に於ける異なる O T R 及びグルコース濃度に対して応答したアラニン生産を、ロバスト性について評価された4つの株について図示している。
- 【図25A】乃至
- 【図25D】 マイクロ発酵に於ける異なる O T R 及びグルコース濃度に対して応答したアラニン生産を、ロバスト性について評価された4つの株について図示している。
- 【図26A】乃至
- 【図26D】 マイクロ発酵に於ける異なる O T R 及びグルコース濃度に対して応答したアラニン生産を、ロバスト性について評価された4つの株について図示している。
- 【図27A】乃至
- 【図27D】 マイクロ発酵に於ける異なる O T R 及びグルコース濃度に対して応答したアラニン生産を、ロバスト性について評価された4つの株について図示している。
- 【図28A】乃至
- 【図28D】 マイクロ発酵に於ける異なる O T R 及びグルコース濃度に対して応答したアラニン生産を、ロバスト性について評価された4つの株について図示している。
- 【図29A】乃至
- 【図29D】 マイクロ発酵に於ける異なる O T R 及びグルコース濃度に対して応答したアラニン生産を、ロバスト性について評価された4つの株について図示している。
- 【図30A】乃至
- 【図30D】 マイクロ発酵に於ける異なる O T R 及びグルコース濃度に対して応答したアラニン生産を、ロバスト性について評価された4つの株について図示している。
- 【図31A】乃至
- 【図31D】 マイクロ発酵に於ける異なる O T R 及びグルコース濃度に対して応答したアラニン生産を、ロバスト性について評価された4つの株について図示している。
- 【図32】 マイクロ発酵に於ける異なる O T R 及びグルコース濃度に対して応答したアラニン生産を、ロバスト性について評価された1つの株について図示している。

10

20

30

40

50

【図 3 3 A】乃至

【図 3 3 B】本文書に於いて評価した 1 L スケールの全ての調節弁及び増殖連動型株の増殖プロファイルを図示している。

【図 3 4】文献からの最も高いメバロン酸力価を有する株及び此の仕事に於いて評価したメバロン酸株 1 について、比生産性 ( S P ) 比較を図示している。

【図 3 5】MS 測定からのアラニン標準曲線を図示している。トリプリケートの標準的な測定からの質量分析応答の平均及び標準偏差をプロットした。

【図 3 6 A】乃至

【図 3 6 B】R I 測定からのグルコース及びエタノール標準曲線を図示している。

【図 3 7】T U V 測定からの 3 - ヒドロキシプロピオン酸標準曲線を図示している。

10

【図 3 8 A】乃至

【図 3 8 D】L - アラニン、D - アラニン、メバロン酸、及びメバロノラク톤の T U V 標準曲線を図示している。

【発明を実施するための形態】

【0027】

定義

文脈が明瞭に別様に命じていない限り、明細書及び請求項に於いて用いられる単数形「a」、「an」、及び「the」は複数の指示物を包含する。其れ故に、例えば、「発現ベクター」と言う事は、単一の発現ベクター、及び同じ（例えば同じオペロン）か又は異なるか何方かの複数の発現ベクターを包含する；「微生物」と言う事は、単一の微生物及び複数の微生物を包含する；並びに同類である。

20

【0028】

本願に於いて用いられる「縮減された酵素活性」、「酵素活性を縮減する事」、及び同類が意味する事は、微生物細胞の又は単離された酵素が、同じ生物種の同等の細胞又は其の天然酵素に於いて測定される物よりも低いレベルの活性を見せると言う事を指示する事である。詰まり、其の酵素の公知の標準的な条件に於ける指示されている基質（単数又は複数）から指示されている産物（単数又は複数）への酵素的変換は、標準的な所定の条件に於ける天然（非改変）酵素に依る同じ生化学的変換の酵素活性よりも、少なくとも 10、少なくとも 20、少なくとも 30、少なくとも 40、少なくとも 50、少なくとも 60、少なくとも 70、少なくとも 80、又は少なくとも 90 パーセント少ない。此の用語は其の酵素活性の除去をも又包含し得る。酵素の縮減された酵素活性を有する細胞は、当分野に於いて公知の何れかの方法を用いて同定され得る。例えば、縮減された酵素活性を有する細胞を同定する為に、酵素活性アッセイが用いられ得る。例えば、「酵素命名法 ( Enzyme Nomenclature ) 」, アカデミック・プレス社 ( Academic Press, Inc. ) , ニューヨーク, 2007 年を見よ。

30

【0029】

本願に於いて用いられる用語「異種的な DNA」、「異種的な核酸配列」、及び同類は、次の少なくとも 1 つが真である核酸配列を言う：( a ) 所与の宿主微生物にとって外来性の（即ち、其れに天然に見出されない）核酸の配列；( b ) 配列は所与の宿主微生物に天然に見出され得るが、不自然な（例えば、予期されるよりも多大な）量である；又は ( c ) 核酸の配列が、天然に於いて互いに対して同じ関係では見出されない 2 つ以上の部分配列を含む。例えば、場合 ( c ) に関して、組み換え的に生産される異種的な核酸配列は、遺伝子発現を駆動する非天然のプロモーター等の新たな機能核酸を作る様に配列された無関係な遺伝子同士からの 2 つ以上の配列を有するであろう。

40

【0030】

本願に於いて用いられる用語「合成的な代謝調節弁」及び同類は、代謝フラックスを変改する為の、コントロールされた蛋白質分解、遺伝子サイレンシング、又は蛋白質分解及び遺伝子サイレンシング両方の組み合わせ何方かの使用を言う。

【0031】

後者の用語が当分野に於いて一般的に用いられる通り、用語「異種的」は用語「外因性

50

」を包含する事を意図されている。異種的な核酸配列の導入に先立つ宿主微生物のゲノムを参照すると、酵素をコードする核酸配列は異種的である（異種的な核酸配列が其のゲノムに導入されるか否かに関わらない）。

【 0 0 3 2 】

本願に於いて用いられる用語「遺伝子破壊」又は其の文法的な均等物（且つ「酵素機能を破壊する事」、「酵素機能の破壊」、及び同類を包含する）は、其の様に改変されていない微生物細胞の又は其れからのポリペプチド活性と比較して縮減されたポリペプチド活性を有する様にコードされる遺伝子産物を返す、微生物の遺伝子改変を意味する事を意図される。例えば、遺伝子改変は、遺伝子全体の欠失、転写若しくは翻訳に要求される制御配列の欠失若しくは他の改変、短縮型の遺伝子産物（例えば酵素）を齎す遺伝子の部分の欠失、又はコードされる遺伝子産物の活性を縮減する種々の変異戦略の何れか（検出可能な活性レベル無し迄活性を縮減する事を包含する）であり得る。破壊は、酵素をコードする核酸配列の全て又は一部の欠失を幅広く包含し得、他の型の遺伝子改変、例えば、終止コドンの導入、フレームシフト変異、遺伝子の部分の導入又は取り除き、並びに分解シグナルの導入、mRNA転写レベル及び/又は安定性を左右する遺伝子改変、並びに酵素をコードする遺伝子の上流のプロモーター又はリプレッサーを変改する事をも又包含するが、此れ等に限定されない。

10

【 0 0 3 3 】

本願に於いて用いられるバイオプロダクション又は発酵は好氣的、微好氣的、又は嫌氣的であり得る。

20

【 0 0 3 4 】

請求項を包含する本願に於いて、遺伝子産物、例えば酵素の遺伝子改変と言われる時には、遺伝子改変は、述べられている遺伝子産物、例えば酵素を通常コードする遺伝子等の又は其れを包含する核酸配列についてである事が理解される。

【 0 0 3 5 】

本願に於いて用いられる用語「代謝フラックス」及び同類は、産物及び/又は副産物形成の変化に至る代謝の変化を言い、所与の基質からの生産速度、生産力価、及び生産収量を包含する。

【 0 0 3 6 】

生物種及び他の生物系統的な識別は、微生物学の業者に公知の分類に従う。

30

【 0 0 3 7 】

本願に於いては、酵素はユニバーサル・プロテイン・リソース (Universal Protein Resource) (UniProt) 識別番号を参照して挙げられており、此れは当業者には周知であろう (UniProtはUniProtコンソーシアムに依って維持されており且つ利用可能である)。

【 0 0 3 8 】

本願に記載される方法及びステップが、何らかの順序で特定の事象同士が起こる事を指示している時には、当業者は、特定のステップ同士の並びが改変され得ると言う事と、斯かる改変が本発明の変形に従うと言う事とを認識するであろう。加えて、特定のステップ同士は、逐次的に実施され得るのは勿論、可能な時には並行したプロセスに依って同時に実施され得る。

40

【 0 0 3 9 】

略語の意味は次の通りである：「C」は其の慣用法から明瞭である通りセルシウス又はセルシウス度を意味し、DCWは乾燥細胞重量を意味し、「s」は秒（単数又は複数）を意味し、「min」は分（単数又は複数）を意味し、「h」、「hr」、又は「hrs」は時間（単数又は複数）を意味し、「psi」はポンド毎平方インチを意味し、「nm」はナノメートルを意味し、「d」は日（単数又は複数）を意味し、「μL」又は「uL」又は「ul」はマイクロリットル（単数又は複数）を意味し、「mL」はミリリットル（単数又は複数）を意味し、「L」はリットル（単数又は複数）を意味し、「mm」はミリメートル（単数又は複数）を意味し、「nm」はナノメートルを意味し、「mM」はミリ

50

モーターを意味し、「 $\mu\text{M}$ 」又は「 $\text{uM}$ 」はマイクロモーターを意味し、「 $\text{M}$ 」はモーターを意味し、「 $\text{mmol}$ 」はミリモル（単数又は複数）を意味し、「 $\mu\text{mol}$ 」又は「 $\text{uMol}$ 」はマイクロモル（単数又は複数）を意味し、「 $\text{g}$ 」はグラム（単数又は複数）を意味し、「 $\mu\text{g}$ 」又は「 $\text{ug}$ 」はマイクログラム（単数又は複数）を意味し、「 $\text{ng}$ 」はナノグラム（単数又は複数）を意味し、「 $\text{PCR}$ 」はポリメラーゼ連鎖反応を意味し、「 $\text{OD}$ 」は光学密度を意味し、「 $\text{OD}_{600}$ 」は $600\text{nm}$ の光子波長に於いて測定される光学密度を意味し、「 $\text{kDa}$ 」はキロダルトンを意味し、「 $\text{g}$ 」は重力定数を意味し、「 $\text{bp}$ 」は塩基対（単数又は複数）を意味し、「 $\text{kbp}$ 」はキロ塩基対（単数又は複数）を意味し、「 $\%w/v$ 」は重量/体積パーセントを意味し、「 $\%v/v$ 」は体積/体積パーセントを意味し、「 $\text{IPTG}$ 」はイソプロピル- $\mu$ -D-チオガラクトピラノシドを意味し、「 $\text{ATC}$ 」はアンヒドロテトラサイクリンを意味し、「 $\text{RBS}$ 」はリボソーム結合部位を意味し、「 $\text{rpm}$ 」は回転毎分を意味し、「 $\text{HPLC}$ 」は高速液体クロマトグラフィーを意味し、「 $\text{GC}$ 」はガスクロマトグラフィーを意味する。

10

【0040】

概観

生産微生物株の迅速な最適化を可能にする高スループットな代謝工学プラットフォームが本願に於いて提供される。プラットフォームは活性な代謝ネットワークの動的な最小化に依拠しており、これは現行のインピボ及びインピトロのバイオプロダクションアプローチの間のギャップを橋渡しする。動的な代謝ネットワーク最小化は、必須の中央代謝の複数の酵素の活性を縮減する為に $\text{CRISPR}$ 干渉及びコントロールされた蛋白質分解の組み合わせを用いて成し遂げられ得る。最小化は、標準化された2段階バイオプロセスの文脈に於いて実装され得る。此のアプローチは、大いに縮減された複雑さを有する設計領域のみならず、増大した代謝フラックス及び生産速度、並びに環境条件に対してロバストである株をも又、齎し得る。ロバスト性は、高スループットな小スケールスクリーニング又は「マイクロ発酵」から完全計装化バイオリクターへの予測可能なスケラブル性に至り得る。合成生物学の急速に増大して行くスループット及び減少して行くコストを真に活用する為には、予測性がある高スループットなアプローチが代謝工学プログラムにとって決定的であり得る。本願に於いて提供される例は、此のアプローチの原理証明を普通の産業微生物： $\text{E. coli}$ に依って実証したのみならず、2つの重要な産業ケミカル：アラニン及びメバロン酸を商業的に意味がある速度、力価（夫々 $147\text{g/L}$ 及び $97\text{g/L}$ ）、及び収量で生産する $\text{E. coli}$ 株の迅速な最適化に依って此のアプローチを検証した。

20

30

【0041】

高スループットな様式のケミカル生産の為の微生物を迅速に最適化する為のシステム及び方法も又本願に於いて提供される。

【0042】

ケミカル生産の為の開示されるプラットフォーム及び/又は方法に用いられ得る微生物も又、本願に於いて提供される。

【0043】

合成的な代謝調節弁（ $\text{SMV}$ ）

本開示は、次の1つ以上又は組み合わせを含む合成的な代謝調節弁（ $\text{SMV}$ ）の構築を記載する：コントロールされた遺伝子サイレンシング及びコントロールされた蛋白質分解。遺伝子サイレンシング及びコントロールされた蛋白質分解の為の幾つかの方法論を当業者が知っていると言う事は了解される。

40

【0044】

$\text{SMV}$ を利用するプラットフォーム微生物株の開発は、増殖を産物形成から切り離し得る。此れ等の株は代謝経路の動的コントロールを可能にし、変改された時に微生物増殖への負の効果を有する物を包含する。代謝の動的コントロールは、転写サイレンシング及びコントロールされた酵素蛋白質分解を包含するが此れ等に限定されない方法論の組み合わせに依って成し遂げられる。此れ等の微生物株は多段階バイオプロセスに利用され、少なくとも2つの段階、微生物が増殖させられ且つ代謝が微生物増殖にとって最適化され得る第

50

1の段階と、増殖がゆっくりには又は終止させられ得、且つ代謝の動的な変化が成されてケミカル又は燃料等の所望の産物の生産を改善し得る少なくとも1つの他の段階とを包摂する。段階間の増殖している培養の遷移と代謝フラックスの操作とは、人工ケミカル誘導因子に依って又は好ましくは鍵と成る制限栄養素のレベルをコントロールする事に依ってコントロールされ得る。加えて、1つ以上のケミカル又は燃料産物の生合成の為の代謝経路を提供する為の遺伝子改変が成され得る。グルコース、スクロース、キシロース、アラビノース、マンノース、及びラクトース等の糖、オイル、二酸化炭素、一酸化炭素、メタン、メタノール、並びにホルムアルデヒドを包含するが此れ等に限定されない、種々の炭素フィードストックの利用を可能にする為の遺伝子改変も又成され得る。

#### 【0045】

此のアプローチは生産期の中の代謝フラックス及び生理学的要求のより単純なモデルを許し、増殖している細胞を静止期生体触媒へと換える。此れ等の合成的な代謝調節弁は、必須遺伝子をオフにし、炭素、電子、及びエネルギーフラックスを産物形成へと方向転換する為に、多段階発酵プロセスに於いて用いられ得る。次の1つ以上は此れ等の合成的な調節弁を可能にする：2)誘導性の酵素分解及び3)静止又は非分裂細胞状態を誘導する為の栄養素制限との組み合わせで、1)転写遺伝子サイレンシング又は抑制テクノロジー。SMVは何れかの経路及び微生物ホストへと一般化可能である。此れ等の合成的な代謝調節弁は、全細胞触媒作用に依って生産され得る再生可能なケミカル及び燃料並びに何れかの産物の生産に有用な、新規の迅速な代謝工学戦略を許す。

#### 【0046】

種々のケースでは、1つのSMVは1つの遺伝子(又は其の蛋白質産物)の操作を言い得る。操作は遺伝子のコントロールされたサイレンシング及び/又は其の蛋白質産物のコントロールされた分解であり得る。特定のケースでは、SMVの組み合わせが収量、速度、及び/又はロバスト性の改善された生産に至り得、此れは2つの遺伝子(又は其れ等の蛋白質産物)の操作を包含する。幾つかのケースでは、操作された微生物は少なくとも1つのSMVを含む。幾つかのケースでは、操作された微生物は1つよりも多くのSMVを含む。幾つかのケースでは、操作された微生物は2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、若しくは10個、又はより多くのSMVを含む。

#### 【0047】

バイオプロダクションの為の方法及びシステム

本願に於いては、バイオ医薬品及び低分子治療薬からスペシャリティー、バルク、及びコモディティーケミカル、並びにバイオ燃料迄の分子のロバストな大スケール生産の為の方法又はシステムが提供される。本願に於いて提供される方法又はシステムは、限定された一連の代謝酵素を含む操作された微生物を用いる事を含む。幾つかの実施形態に於いて、操作された微生物は、縮減されたレベル又は活性を有する少なくとも1つの代謝酵素を含む。幾つかの実施形態に於いて、操作された微生物は、縮減されたレベル又は活性を有する2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、若しくは10個、又はより多くの代謝酵素を含む。本願に於いて提供される方法及びシステムは環境条件に対する代謝応答を縮減し得、小スケール(例えばmg/s)生産から大スケール(例えばkg/s)生産へと容易に移入され得る。本願に於いて提供される方法及びシステムは、小スケール(例えばmg/s)から大スケール(例えばkg/s)生産への移行に関連する時間及びコストを縮減し得る。

#### 【0048】

遺伝子改変微生物は本開示の範囲内であり、微生物は、マロニルCoA、ピルビン酸、オキサロ酢酸、エリトローズ-4-リン酸、キシロース-5-リン酸、アルファ-ケトグルタル酸、及びクエン酸を包含するが此れ等に限定されない何れかの鍵と成る代謝中間体由来する産物を、0.05g/gDCW-hrよりも多大、0.08g/gDCW-hr、0.1g/gDCW-hrよりも多大、0.13g/gDCW-hrよりも多大、0.15g/gDCW-hrよりも多大、0.175g/gDCW-hrよりも多大、0.2g/gDCW-hrよりも多大、0.25g/gDCW-hrよりも多大、0.3g/g

10

20

30

40

50

DCW - hr よりも多大、0.35 g / g DCW - hr よりも多大、0.4 g / g DCW - hr よりも多大、0.45 g / g DCW - hr よりも多大、又は0.5 g / g DCW - hr よりも多大な速度から選択される具体的な速度で生産する事が出来る。

【0049】

種々の実施形態に於いて、本発明は、水系培地中の炭素源と遺伝子改変微生物とを含む培養システムを包含し、前記遺伝子改変生物は、0.05 g DCW / L よりも多大、0.1 g DCW / L、1 g DCW / L よりも多大、5 g DCW / L よりも多大、10 g DCW / L よりも多大、15 g DCW / L よりも多大、又は20 g DCW / L よりも多大から選択される量で存在し、例えば、此の時に、水系培地の体積は5 mL よりも多大、100 mL よりも多大、0.5 L よりも多大、1 L よりも多大、2 L よりも多大、10 L よりも多大、250 L よりも多大、1000 L よりも多大、10,000 L よりも多大、50,000 L よりも多大、100,000 L よりも多大、又は200,000 L よりも多大から選択され、例えば、此の時に、水系培地の体積は250 L よりも多大であり且つスチールベッセル内に含有される。

10

【0050】

炭素源

本発明に於いて組み換え体微生物に用いられるバイオプロダクション培地は、増殖及び生産段階両方の為の好適な炭素源又は基質を含有しなければ成らない。好適な基質は、グルコース、スクロース、キシロース、マンノース、アラビノース、オイル、二酸化炭素、一酸化炭素、メタン、メタノール、ホルムアルデヒド、及びグリセロールを包含し得るが、此れ等に限定されない。上で挙げられている炭素基質及び其れ等の混合物の全ては本発明に於いて炭素源（単数又は複数）として好適である事が企図される。

20

【0051】

微生物

本願に於いて記載及び請求される特徴は、1つ以上の天然の、導入された、又は強化された産物バイオプロダクション経路をも又含む、本願のリストから選択される微生物又は別の好適な微生物に依って提供され得る。其れ故に、幾つかの実施形態に於いて、微生物（単数又は複数）は内在性の産物生産経路（幾つかの斯かる実施形態では、此れは強化され得る）を含むが、他の実施形態に於いては、微生物は内在性の産物生産経路を含まない。

30

【0052】

例は、特定の細菌及び真菌微生物の具体的な改変及び評価を記載している。本発明の範囲は、斯かる生物種には限定されず、広範な好適な微生物に一般的に応用可能である事が意味されている。

【0053】

バイオプロダクションの為の好適な宿主細胞又は宿主微生物は原核又は真核何方かであり得る。好適な宿主細胞又は宿主微生物は、細菌、例えばシトロバクター、エンテロバクター、クロストリジウム、クレブシエラ、エアロバクター、ラクトバシラス、アスペルギルス、サッカロマイセス、シゾサッカロマイセス、ジゴサッカロマイセス、ピチア、クルイベロマイセス、カンジダ、ハンゼヌラ、デバリオマイセス、ムコール、トルロプシス、メチロバクター、エシェリキア、サルモネラ、バシラス、ストレプトマイセス、及びシュードモナスであり得る。幾つかの実施形態に於いて、宿主細胞又は操作された細胞はE. coli である。幾つかの実施形態に於いて、宿主細胞又は操作された細胞はS. セレビスエである。

40

【0054】

特定の態様に於いては、本願に於いては、産物の生合成の為の少なくとも1つの酵素を含む生産経路と、複数の代謝経路のフラックスをコントロール可能に縮減又は除去する為の複数の合成的な代謝調節弁の組み合わせと：を含む様に遺伝子改変された微生物が提供される。幾つかの実施形態に於いて、複数の合成的な代謝調節弁の夫々は、(i) 少なくとも1つの遺伝子の遺伝子発現のコントロールされたサイレンシング又は(ii) 少なく

50

とも1つの蛋白質のコントロールされた蛋白質分解型の不活性化の為の、1つ以上の遺伝子を含む。幾つかの実施形態に於いて、産物の生合成の速度は栄養素の欠乏に依って生産的な静止期に於いて増大し、栄養素の欠乏は複数の合成的な代謝調節弁を誘導する。幾つかのケースでは、遺伝子発現のコントロールされたサイレンシングはRNA干渉、CRISPR干渉、又は転写抑制に依って成し遂げられる。幾つかのケースでは、コントロールされた蛋白質分解型の不活性化は、特異的プロテアーゼに依る蛋白質切断又は特異的ペプチドタグに依る標的化された分解に依って成し遂げられる。幾つかのケースでは、栄養素は燐酸、窒素、硫黄、マグネシウム、又は其れ等の組み合わせである。

【0055】

特定の態様に於いては、遺伝子改変微生物が本願に於いて提供され：次の代謝物質の1つからの産物の生合成の為の少なくとも1つの酵素を含む生産経路と：ピルビン酸、アセト乳酸、アセチルCoA、アセトアセチルCoA、又はマロニルCoA；複数の合成的な代謝調節弁の組み合わせとを含み、複数の合成的な代謝調節弁の夫々は、fabI、gltA、lpd、zwf、又はudhA遺伝子の1つを、(i)前記fabI、gltA、lpd、zwf、若しくはudhA遺伝子の対応する1つの遺伝子発現のコントロールされたサイレンシング又は(ii)前記fabI、gltA、lpd、zwf、若しくはudhA遺伝子の対応する1つに依ってコードされる蛋白質のコントロールされた蛋白質分解型の不活性化の為に含む。幾つかの実施形態に於いて、産物の生合成の速度は栄養素の欠乏に依って生産的な静止期に於いて増大し、栄養素の欠乏は複数の合成的な代謝調節弁を誘導する。幾つかの実施形態に於いて、産物はアラニン又は其れの誘導體である。幾つかの実施形態に於いて、産物はメバロン酸又は其れの誘導體である。幾つかの実施形態に於いて、産物はマロン酸又は其れの誘導體である。幾つかの実施形態に於いて、栄養素は燐酸、窒素、硫黄、マグネシウム、又は其れ等の組み合わせである。

【0056】

特定の態様に於いては、ピルビン酸からアラニンを生産する為の生産経路と；複数の合成的な代謝調節弁の組み合わせとを含む遺伝子改変微生物が本願に於いて提供され、複数の合成的な代謝調節弁の夫々は、fabI、gltA、lpd、zwf、又はudhA遺伝子の1つを、(i)前記fabI、gltA、lpd、zwf、若しくはudhA遺伝子の対応する1つの遺伝子発現のコントロールされたサイレンシング又は(ii)前記fabI、gltA、lpd、zwf、若しくはudhA遺伝子の1つに依ってコードされる蛋白質のコントロールされた蛋白質分解型の不活性化の為に含む。幾つかの実施形態に於いて、アラニンの生合成の速度は栄養素の欠乏に依って生産的な静止期に於いて増大し、栄養素の欠乏は複数の合成的な代謝調節弁を誘導する。幾つかの実施形態に於いて、栄養素は燐酸、窒素、硫黄、マグネシウム、又は其れ等の組み合わせである。

【0057】

幾つかのケースでは、遺伝子改変微生物は異種的な細胞である。幾つかのケースでは、産物を生成する為の異種的な細胞が本願に於いて提供される。幾つかのケースでは、異種的な細胞は、代謝経路に於いて作用する調節弁酵素の発現のコントロールされた縮減を媒介する為の操作された調節弁ポリヌクレオチドを含む。特定のケースでは、調節弁酵素の発現のコントロールされた縮減は代謝経路のフラックスを縮減し、調節弁酵素の発現のコントロールされた縮減は、異種的な細胞の静止期を誘導する。幾つかのケースでは、異種的な細胞は、産物の生成の為の生産酵素の発現のコントロールされた増大を媒介する為の操作された生産ポリヌクレオチドを更に含む。幾つかの状況では、異種的な細胞は、代謝経路に於いて作用する調節弁酵素の発現のコントロールされた縮減を媒介する為の操作された調節弁ポリヌクレオチドを含み、調節弁酵素の発現のコントロールされた縮減を欠く細胞と比較して、静止期の間の産物の生産の速度は環境条件の変化に依ってより縮減されない。

【0058】

幾つかのケースでは、産物を生成する為の異種的な細胞が本願に於いて提供され、前記細胞は：代謝経路に於いて作用する調節弁酵素の発現のコントロールされた縮減を媒介す

10

20

30

40

50



る為の操作された調節弁ポリヌクレオチド（前記調節弁酵素の発現の前記コントロールされた縮減は前記代謝経路のフラックスを縮減し、前記調節弁酵素の発現の前記コントロールされた縮減は前記細胞の静止期を誘導する）と；前記産物の生成の為の生産酵素の発現のコントロールされた増大を媒介する為の操作された生産ポリヌクレオチドと；を含み、前記調節弁酵素の発現の前記コントロールされた縮減を欠く細胞と比較して、前記静止期の間の前記産物の生産の速度は環境条件の変化に応答してより縮減されない。

【0059】

幾つかのケースでは、調節弁酵素の縮減された発現又は活性を含む細胞が本願に於いて提供され、調節弁酵素は、エノイルACP/CoAレダクターゼ（fabI）、グルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ（zwf）、リポアミドデヒドロゲナーゼ（lpd）、クエン酸シンターゼ（glta）、可溶性トランスヒドロゲナーゼ（udhA）、NADH依存性グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ（gapA）、及び其れ等の組み合わせから成る群から選択される酵素を含む。

10

【0060】

幾つかのケースでは、生産酵素を含む細胞が本願に於いて提供され、生産酵素は、NADPH依存性アラニンデヒドロゲナーゼ（ald）、アラニン排出輸送体（alaE）、NADPH依存性グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ（gapN）、及び其れ等の組み合わせから成る群から選択される酵素を含む。

【0061】

環境条件

20

環境条件は培地及び培養条件を含み得る。生産に影響し得る環境因子は温度、pH、酸性度、エタノール、亜硫酸、及び利用可能な栄養素量であり得る。

【0062】

例えば本願に於いて開示される型の1つから選択される適切な炭素源に加えて、バイオプロダクション培地は、本開示に依る培養の増殖とケミカル産物バイオプロダクションに必要な酵素経路の促進とに好適な、当業者に公知の好適なミネラル、塩、補因子、緩衝液、及び他の構成成分を含有し得る。本発明の別の態様は、本発明の遺伝子改変微生物及び任意に補助栄養素を含む培地及び培養条件に関する。

【0063】

典型的には、細胞は、適切な培地に依って約25 から約40 の範囲の温度、好熱性微生物では最高で70 に於いて増殖させられる。好適な増殖培地は当分野に於いては良くキャラクタリゼーションされており、公知である。

30

【0064】

バイオプロダクションの為の好適なpH範囲はpH2.0からpH10.0の間であり、此処で、初期条件では、pH6.0からpH8.0が典型的なpH範囲である。然し乍ら、具体的な実施形態の実際の培養条件は、此れ等のpH範囲に依って限定される事を意味していない。

【0065】

バイオプロダクションは好氣的、微好氣的、又は嫌氣的条件に於いて攪拌有り又は無しで実施され得る。

40

【0066】

幾つかのケースでは、環境条件の変化は、細胞に接触する培養培地の糖濃度の変化を含む。幾つかのケースでは、培養培地の糖濃度の変化は糖濃度の増大である。幾つかの他のケースでは、糖濃度の変化は糖濃度の減少である。幾つかの状況では、糖濃度の増大は、培養培地の元々の糖濃度と比較して、1%から2%、2%から3%、3%から4%、4%から5%、5%から10%、10%から15%、15%から20%、20%から30%、30%から40%、40%から50%、50%から60%、60%から70%、70%から80%、80%から90%、又は90%から100%多い糖である。幾つかの状況では、糖濃度の減少は、培養培地の元々の糖濃度と比較して、1%から2%、2%から3%、3%から4%、4%から5%、5%から10%、10%から15%、15%から20%、

50

20%から30%、30%から40%、40%から50%、50%から60%、60%から70%、70%から80%、80%から90%、又は90%から100%少ない糖である。

【0067】

幾つかのケースでは、環境条件の変化は、細胞に接触する培養培地の酸素供給の変化を含む。幾つかのケースでは、培養培地の酸素供給の変化は酸素供給の増大である。幾つかの他のケースでは、培養培地の酸素供給の変化は酸素供給の減少である。幾つかの状況では、酸素供給の増大は、培養培地に追加された酸素の元々の量よりも1%から2%、2%から3%、3%から4%、4%から5%、5%から10%、10%から15%、15%から20%、20%から30%、30%から40%、40%から50%、50%から60%、60%から70%、70%から80%、80%から90%、又は90%から100%多い酸素の追加である。幾つかの状況では、酸素供給の減少は、培養培地に追加された酸素の元々の量よりも1%から2%、2%から3%、3%から4%、4%から5%、5%から10%、10%から15%、15%から20%、20%から30%、30%から40%、40%から50%、50%から60%、60%から70%、70%から80%、80%から90%、又は90%から100%少ない酸素の追加である。

10

【0068】

バイオプロダクション反応器及びシステム

本発明に従う方法及び/又は組成物を利用する発酵システムも又、本発明の範囲内である。

20

【0069】

本願に於いて記載及び/又は参照される組み換え体微生物の何れかは、微生物が商業的に実行可能な工程に依って炭素源を産物に変換する産業バイオプロダクションシステムに導入され得る。バイオプロダクションシステムは、組み換え体微生物を増殖させる事と、基質分子の或る部分から選択されたケミカル産物への所望の変換を得る為に好適な時間に渡って好適な温度範囲(及び反応が好氣的又は微好氣的である場合には溶存酸素濃度範囲)内にバイオプロダクションシステムを維持する事に好適な、炭素源基質及びバイオプロダクション培地を有するバイオリアクターベッセルへの斯かる組み換え体微生物の導入を包含する。バイオプロダクションは、好氣的、微好氣的、又は嫌氣的条件に於いて攪拌有り又は無しで実施され得る。産業バイオプロダクションシステム及び其れ等の工程は化学工学及びバイオプロセス工学の業者には周知である。一般的に、バイオプロダクション培地に依って生産される産物の量は、当分野に於いて公知の数々の方法、例えば、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、ガスクロマトグラフィー(GC)、又はGC/質量分析(MS)を用いて決定され得る。

30

【0070】

遺伝子改変、ヌクレオチド配列、及びアミノ酸配列

本開示の実施形態は宿主微生物への発現ベクターの導入から齎され得、発現ベクターは、宿主微生物に通常見出される又はされない酵素をコードする核酸配列を含有する。

【0071】

宿主細胞を遺伝子改変する能力は何れかの遺伝子改変(組み換え体)微生物の生産に必須である。遺伝子移入テクノロジーのモードは、エレクトロポレーション、接合、トランスダクション、又は自然形質転換に依ってであり得る。幅広い範囲の宿主接合性プラスミド及び薬剤耐性マーカーが利用可能である。クローニングベクターは、其の宿主に於いて機能し得る抗生物質耐性マーカーの性質に基づいて、宿主生物に適合される。本願に於いて開示される通り、遺伝子改変(組み換え体)微生物は、其のゲノムDNAの改変を包含するプラスミド導入に依る以外の改変をも又含み得る。

40

【0072】

より一般的には、コントロール配列と適合する条件に於いて、E. coli等の微生物に於けるコード配列の発現を指令する1つ以上の(幾つかの)コントロール配列に動作可能に繋げられた酵素活性を有するポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド

50

を含む、核酸構築物が調製され得る。単離されたポリヌクレオチドは、ポリペプチドの発現を提供する様に操作され得る。ベクターへの其の挿入に先立つポリヌクレオチドの配列の操作は、発現ベクターに依存して望ましいか又は必要であり得る。組み換えDNA法を利用してポリヌクレオチド配列を改変する為の技術は当分野に於いては良く確立されている。

#### 【0073】

コントロール配列は、適切なプロモーター配列、本開示のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現の為に宿主細胞に依って認識されるヌクレオチド配列であり得る。プロモーター配列は、ポリペプチドの発現を媒介する転写コントロール配列を含有し得る。プロモーターは、選ばれた宿主細胞に於いて転写活性を示す何れかのヌクレオチド配列であり得、変異体、短縮型、及びハイブリッドプロモーターを包含し、宿主細胞に対して同種又は異種何れかの細胞外又は細胞内ポリペプチドをコードする遺伝子から得られ得る。組み換え体DNAプロモーター配列を改変及び利用する為の技術は当分野に於いては良く確立されている。

10

#### 【0074】

本発明の種々の実施形態では、遺伝子操作は、種々の遺伝子操作を包含する様に記載され得、夫々の経路の何れかに同定された酵素の制御、故に究極的な活性、又は酵素の酵素活性を変化させる事を指向した物を包含する。斯かる遺伝子改変は、選択及び/若しくは同定された培養条件に於ける酵素活性及び/若しくは選択性の変化を齎す転写、翻訳、及び翻訳後の修飾を、並びに/又は例えば産物生産に関する酵素のコピー数及び/若しくは変異体を増大させる為の追加の核酸配列の提供を指向し得る。斯かる遺伝子改変を達成する為の具体的な方法論及びアプローチは当業者に周知である。

20

#### 【0075】

種々の実施形態に於いて、より効率的に機能する為に、微生物は1つ以上の遺伝子欠失を含み得る。例えば、*E. coli*では、乳酸デヒドロゲナーゼ (*ldhA*)、燐酸アセチルトランスフェラーゼ (*pta*)、ピルビン酸オキシダーゼ (*poxB*)、ピルビン酸蟻酸リアーゼ (*pf1B*)、メチルグリオキサールシンターゼ (*mgxA*)、酢酸キナーゼ (*ackA*)、アルコールデヒドロゲナーゼ (*adhE*)、*clpXP*プロテアーゼ特異性強化因子 (*sspB*)、ATP依存性Lonプロテアーゼ (*lon*)、外膜プロテアーゼ (*ompT*)、*arcA*転写二重制御因子 (*arcA*)、及び*iclR*転写制御因子 (*iclR*)をコードする遺伝子が破壊され得、欠失を包含する。欠失を包含する斯かる遺伝子破壊は限定する事を意味せず、種々の実施形態に於いて種々の組み合わせで実装され得る。遺伝子欠失は当分野に於いて周知の多数の戦略に依って成し遂げられ得、外来性のDNAを宿主染色体に組み込む為の方法も同様である。

30

#### 【0076】

種々の実施形態に於いては、より効率的に機能する為に、微生物は1つ以上の合成的な代謝調節弁を含み得、コントロールされた蛋白質分解、発現サイレンシング、又はコントロールされた蛋白質分解及び発現サイレンシング両方の組み合わせの為に標的化された酵素から構成される。幾つかの実施形態に於いて、微生物は、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、若しくは10個、又はより多くの合成的な代謝調節弁を含み得る。例えば、*E. coli*の1つの遺伝子に依ってコードされる1つの酵素又は多数の遺伝子に依ってコードされる多数の酵素の組み合わせが、代謝を変改する及び産物形成を改善する為の合成的な代謝調節弁として設計され得る。*E. coli*の代表的な遺伝子は次を包含し得るが、此れ等に限定されない：*fab1*、*zwf*、*glxA*、*ppc*、*udhA*、*lpd*、*sucD*、*aceA*、*pfkA*、*lon*、*rpoS*、*tktA*、又は*tktB*。如何にして追加の微生物生物種に於ける此れ等の遺伝子及び/又は他の遺伝子のホモログを同定するかが当業者には周知であると言う事は了解される。

40

#### 【0077】

本願に於いて提供される全ての核酸及びアミノ酸配列については、其の種々の実施形態に於いて、此れ等の配列の保存的に改変されたバリエーションが包含され、本発明の範囲内で

50

あると言う事は了解される。良く当業者の技能の内である保存的に改変されたバリエーションとより大掛りに変えられた配列とを包含し得る、機能的に同等な核酸及びアミノ酸配列（機能的なバリエーション）、並びにこれ等を含む微生物も又本発明の種々の実施形態の範囲内であり、斯かる配列及び／又は微生物を含む方法及びシステムも同様である。

【0078】

従って、上の種々の節に記載されている本開示の幾つかの組成物、方法、及びシステムは、遺伝子改変微生物を提供する事を含み、これは、中心的な中間体から所望の産物を作る為の生産経路を、フラックスを再分配する為の合成的な代謝調節弁との組み合わせで両方含む。

【0079】

本発明の態様は、選択された炭素源を選択された産物に変換する際の微生物の総体的な有効性を改善する為の複数の遺伝子改変の提供にも又関する。遺伝子改変のより基本的な組み合わせよりも比生産性、体積当りの生産性、力価、及び収量を実質的に増大させる為の具体的な組み合わせが、例えば実施例に於いて示されている。上に記載されている遺伝子改変に加えて、種々の実施形態に於いては、産物の生産に消費され得る補因子NADPH及び／又はNADHのプール及び利用可能な量を増大させる為の遺伝子改変も又提供され、合成的な代謝調節弁を包含する。

【0080】

より一般的に、且つ遺伝子改変の為に選択される微生物の具体的な代謝経路に依存して、遺伝子改変の何れかの部分群が作成されて、酢酸、アセトイン、アセトン、アクリル、マレイン酸、脂肪酸エチルエステル、イソプレノイド、グリセロール、エチレングリコール、エチレン、プロピレン、ブチレン、イソブチレン、酢酸エチル、酢酸ビニル、他の酢酸エステル、1,4-ブタンジオール、2,3-ブタンジオール、ブタノール、イソブタノール、sec-ブタノール、酪酸、イソ酪酸、2-OH-イソ酪酸、3-OH酪酸、エタノール、イソプロパノール、D-乳酸、L-乳酸、ピルビン酸、イタコン酸、レブリン酸、グルカル酸、グルタル酸、カプロラクタム、アジピン酸、プロパノール、イソプロパノール、フーゼアルアルコール、及び1,2-プロパンジオール、1,3-プロパンジオール、蟻酸、フマル酸、プロピオン酸、琥珀酸、吉草酸、マレイン酸、及びポリヒドロキシ酪酸から成る群から選択される所望の発酵産物以外の発酵産物（単数又は複数）の細胞性の生産を減少させ得る。遺伝子欠失は本願に於いて一般的に開示される通り成され得る。且つ、所望の産物以外の選択された発酵産物の所望の減少した細胞性の生産を達成する為には、他のアプローチも又用いられ得る。

【0081】

#### VI. A 遺伝子サイレンシング

具体的には、本発明は、コントロールされた多段階発酵プロセスに於ける代謝フラックスのコントロールを可能にする事を助ける為の、コントロールされた遺伝子サイレンシングの使用を記載する。コントロールされた遺伝子サイレンシングの為の当分野に於いて公知の幾つかの方法論があり、mRNAサイレンシング又はRNA干渉、転写リプレッサーに依るサイレンシング、及びCRISPR干渉を包含するが、これ等に限定されない。

【0082】

幾つかのケースでは、調節弁ポリヌクレオチドは、前記調節弁酵素をコードする遺伝子の転写を抑制する為のサイレンシングポリヌクレオチド；前記調節弁酵素の細胞性の分解を媒介する為の分解ポリヌクレオチド；及び其れ等の組み合わせから成る群から選択される、ポリヌクレオチドを含む。

【0083】

幾つかのケースでは、調節弁ポリヌクレオチドはサイレンシングポリヌクレオチドを含み、前記サイレンシングポリヌクレオチドは、前記調節弁酵素をコードする遺伝子のプロモーターを認識するgRNA配列を含むガイドRNA（gRNA）を含む。

【0084】

幾つかのケースでは、調節弁ポリヌクレオチドはCRISPR酵素を更にコードし、前

10

20

30

40

50

記CRISPR酵素は前記gRNAに結合した時に前記プロモーター配列に特異的に結合する。幾つかのケースでは、CRISPR酵素は触媒的に不活性である。

【0085】

幾つかのケースでは、調節弁ポリヌクレオチドは分解ポリヌクレオチドを含み、前記分解ポリヌクレオチドは分解タグをコードする配列を含み、前記分解タグは前記調節弁酵素の分解を媒介する。幾つかのケースでは、調節弁ポリヌクレオチドの発現は細胞中の利用可能な燐酸量に依って制御される。幾つかのケースでは、生産ポリヌクレオチドの発現は細胞中の利用可能な燐酸量に依って制御される。特定のケースでは、細胞は*E. coli*細胞である。

【0086】

コントロールされた蛋白質分解

具体的には、本開示は、コントロールされた多段階発酵プロセスに於ける代謝フラックスのコントロールを可能にする事を助ける為の、コントロールされた蛋白質の分解又は蛋白質分解の使用を記載する。コントロールされた蛋白質の分解の為の当分野に於いて公知の幾つかの方法論があり、特異的プロテアーゼに依る標的化された蛋白質切断と、特異的ペプチドタグに依る分解への蛋白質のコントロールされた標的化とを包含するが、此れ等に限定されない。コントロールされた蛋白質の分解の為の*E. coli*のc1pXPプロテアーゼの使用の為のシステムが用いられ得る。此の方法論はDAS4（又はDAS+4）タグ等の特異的なC末端ペプチドタグを追加する事に依拠している。此のタグを有する蛋白質は、特異性強化シャペロンsspBが発現される迄はc1pXPプロテアーゼに依って分解されない。sspBはc1pXPプロテアーゼに依るDAS4タグ付き蛋白質の分解を誘導する。加えて、多数の部位特異的プロテアーゼシステムが当分野に於いて周知である。蛋白質は、所与のプロテアーゼの特異的な標的部位を含有する様に操作され得、其れから、プロテアーゼのコントロールされた発現後に切断され得る。幾つかの実施形態に於いて、切断は蛋白質不活性化又は分解に至ると予期され得る。例えば、c1pS依存性のc1pAP分解を可能にする様に、N末端配列が関心の蛋白質に追加され得る。加えて、更に、此の配列は追加のN末端配列に依って標識され得、此れが例えばULPヒドロラーゼに依ってコントロール可能に切断され得る。此れはヒドロラーゼ発現に依存するコントロールされたN末端則分解を許す。故に、コントロールされた蛋白質分解の為、N末端又はC末端何方かに於いて蛋白質をタグ付けする事が可能である。

【0087】

N末端対C末端タグを用いる好ましさは、分解のコントロールされた始まりに先立って、何方かのタグが蛋白質機能を左右するかどうか大きく依存するであろう。本発明は、*E. coli*に於いて、コントロールされた多段階発酵プロセスに於ける代謝フラックスのコントロールを可能にする事を助ける為の、コントロールされた蛋白質の分解又は蛋白質分解の使用を記載する。広範なグラム陰性及びグラム陽性細菌、酵母、並びに古細菌をさえも包含する他の微生物ホストに於けるコントロールされた蛋白質の分解の為、当分野に於いて公知の幾つかの方法論がある。具体的には、コントロールされた蛋白質分解の為のシステムが天然の微生物ホストから移入され得、非天然のホストに用いられ得る。

【0088】

合成的な代謝調節弁コントロール

具体的には、本開示は、多段階発酵プロセスに於いて代謝フラックスをコントロールする為の合成的な代謝調節弁の使用を記載する。発現を誘導する為の当分野に於いて公知の多数の方法論があり、此れ等は多段階発酵に於ける段階間の遷移に於いて用いられ得る。此れ等は、テトラサイクリン、アンヒドロテトラサイクリン、ラクトース、IPTG（イソプロピル-ベータ-D-1-チオガラクトピラノシド）、アラビノース、ラフィノース、トリプトファン、及び多数の他の物を包含する人工ケミカル誘導因子を包含するが、此れ等に限定されない。多段階発酵プロセスに於ける増殖及び生産期の間の遷移をコントロールする為、此れ等の周知の誘導因子の使用を遺伝子発現サイレンシングのコントロール及び/又はコントロールされた蛋白質分解に繋げるシステムが、遺伝子改変微生物シ

10

20

30

40

50

テムに一体化され得る。

【 0 0 8 9 】

加えて、増殖の間に消費される1つ以上の制限栄養素の欠乏に依って、多段階発酵に於ける増殖及び生産の間の遷移をコントロールする事が望ましくあり得る。制限栄養素は：燐酸、窒素、硫黄、及びマグネシウムを包含し得るが、此れ等に限定されない。此れ等の栄養素制限に応答する天然の遺伝子発現システムは、遺伝子発現サイレンシングのコントロール及び/又はコントロールされた蛋白質分解を多段階発酵プロセスに於ける増殖及び生産期の間の遷移に動作可能に繋げる様に用いられ得る。

【 0 0 9 0 】

産物

幾つかの実施形態に於いて、産物を生産する為の微生物又は細胞が本願に於いて提供される。幾つかのケースでは、産物は3-ヒドロキシプロピオン酸を含む。幾つかのケースでは、産物はアミノ酸を含む。幾つかのケースでは、アミノ酸はアラニンを含む。幾つかのケースでは、アラニンはL-アラニンである。幾つかのケースでは、アラニンはD-アラニンである。幾つかのケースでは、アラニンの生産の速度は少なくとも0.1 g/L/hr、0.2 g/L/hr、0.3 g/L/hr、0.4 g/L/hr、0.5 g/L/hr、0.6 g/L/hr、0.7 g/L/hr、0.8 g/L/hr、0.9 g/L/hr、1.0 g/L/hr、1.1 g/L/hr、1.2 g/L/hr、1.3 g/L/hr、1.4 g/L/hr、1.5 g/L/hr、1.6 g/L/hr、1.7 g/L/hr、1.8 g/L/hr、1.9 g/L/hr、2.0 g/L/hr、2.5 g/L/hr、3.0 g/L/hr、3.5 g/L/hr、4.0 g/L/hr、4.5 g/L/hr、5.0 g/L/hr、5.5 g/L/hr、6.0 g/L/hr、7.0 g/L/hr、8.0 g/L/hr、9.0 g/L/hr、又は少なくとも10 g/L/hrである。

【 0 0 9 1 】

幾つかのケースでは、24時間後のアラニン力価は0から0.5 g/L、0.5 g/Lから1 g/L、1 g/Lから1.5 g/L、1.5 g/Lから2 g/L、2 g/Lから2.5 g/L、2.5 g/Lから3 g/L、3 g/Lから3.5 g/L、3.5 g/Lから4 g/L、4 g/Lから4.5 g/L、4.5 g/Lから5 g/L、又は5 g/Lから10 g/Lであり得る。SMVに依ってオフアーされるアラニン生産のダイナミックレンジは、単に(プロモーターを変化させる事に依って)生産経路酵素の発現レベルを変改する事に依ってオフアーされる物と比較して最高で4倍の増大であり得る。幾つかのケースでは、SMVに依ってオフアーされるアラニン生産のダイナミックレンジは、単に生産経路酵素の発現レベルを変改する事に依ってオフアーされる物と比較して最高で2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、又は10倍の増大であり得る。

【 0 0 9 2 】

幾つかのケースでは、微生物の生産ポリヌクレオチドはアラニン排出輸送体をコードする。幾つかのケースでは、アラニン排出輸送体はalaEである。

【 0 0 9 3 】

幾つかのケースでは、産物はメバロン酸を含む。幾つかのケースでは、メバロン酸の生産の速度は少なくとも0.1 g/L/hr、0.2 g/L/hr、0.3 g/L/hr、0.4 g/L/hr、0.5 g/L/hr、0.6 g/L/hr、0.7 g/L/hr、0.8 g/L/hr、0.9 g/L/hr、1.0 g/L/hr、1.1 g/L/hr、1.2 g/L/hr、1.3 g/L/hr、1.4 g/L/hr、1.5 g/L/hr、1.6 g/L/hr、1.7 g/L/hr、1.8 g/L/hr、1.9 g/L/hr、2.0 g/L/hr、2.5 g/L/hr、3.0 g/L/hr、3.5 g/L/hr、4.0 g/L/hr、4.5 g/L/hr、5.0 g/L/hr、5.5 g/L/hr、6.0 g/L/hr、7.0 g/L/hr、8.0 g/L/hr、9.0 g/L/hr、又は少なくとも10 g/L/hrである。

【 0 0 9 4 】

10

20

30

40

50

## 方法

操作された微生物に依って大スケールで産物を生産する為の方法が本願に於いて提供される。高スループットな様式の産物の大スケール生産の為に微生物を操作する為の方法も又本願に於いて提供される。

## 【0095】

幾つかのケースでは、方法が本願に於いて提供され：細胞の複数の株を培養する事（前記複数の株の各株は、（i）代謝経路に於いて作用する調節弁酵素の発現のコントロールされた縮減を媒介する為の操作された調節弁ポリヌクレオチド（前記調節弁酵素の発現の前記コントロールされた縮減は前記代謝経路のフラックスを縮減する）と；（ii）前記産物の生成の為に生産酵素の発現のコントロールされた増大を媒介する為の操作された生産ポリヌクレオチドと；を含み、前記複数の株の各株は、前記操作された調節弁ポリヌクレオチド又は前記操作された生産ポリヌクレオチドの少なくとも1つの配列が別の株とは異なる）と；前記複数の株の夫々に依って生成される前記産物のレベルを測定する事と；前記産物の前記レベルに基づいて或る株を選択する事を含む。幾つかの実施形態に於いて、方法は、前記選択された株をバイオリアクターに依って増殖させる事を更に含む。幾つかの実施形態に於いて、前記選択された株を含む培養培地は、少なくとも100ml、200ml、300ml、400ml、500ml、600ml、700ml、800ml、900ml、又は少なくとも1000mlの体積を有する。幾つかの実施形態に於いて、培養培地は少なくとも1Lの体積を有する。

## 【0096】

幾つかの実施形態に於いて、調節弁ポリヌクレオチドは：前記調節弁酵素をコードする遺伝子の転写を抑制する為のサイレンシングポリヌクレオチド；前記調節弁酵素の細胞性の分解を媒介する為の分解ポリヌクレオチド；及び其れ等の組み合わせから成る群から選択されるポリヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態に於いて、前記複数の株の第1及び第2の株はサイレンシングポリヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態に於いて、サイレンシングポリヌクレオチドは、前記調節弁酵素をコードする遺伝子のプロモーターを認識するgRNA配列を含むガイドRNA（gRNA）を含む。幾つかの実施形態に於いて、gRNA配列は前記第1及び第2の株間で異なる。幾つかの実施形態に於いて、前記gRNAに依って認識されるプロモーターは前記第1及び第2の株間で異なる。幾つかの実施形態に於いて、第1の株は前記サイレンシングポリヌクレオチド及び前記分解ポリヌクレオチドを含み、第2の株は、前記サイレンシングポリヌクレオチドを含むが、前記分解ポリヌクレオチドを含まない。幾つかの実施形態に於いて、産物のレベルは前記第2の株に於いて前記第1の株よりも多大である。幾つかの実施形態に於いて、産物のレベルは前記第1の株に於いて前記第2の株よりも多大である。幾つかの実施形態に於いて、調節弁酵素は、エノイルACP/CoAレダクターゼ（fabI）、グルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ（zwf）、リポアミドデヒドロゲナーゼ（lpd）、クエン酸シンターゼ（glta）、可溶性トランスヒドロゲナーゼ（udhA）、NADH依存性グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ（gapA）、及び其れ等の組み合わせから成る群から選択される酵素を含む。幾つかの実施形態に於いて、生産酵素は、NADPH依存性アラニンデヒドロゲナーゼ（ald）、アラニン排出輸送体（alaE）、NADPH依存性グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ（gapN）、及び其れ等の組み合わせから成る群から選択される酵素を含む。

## 【0097】

幾つかの実施形態に於いて、産物は、メバロン酸、3-ヒドロキシプロピオン酸、アミノ酸、及び其れ等の組み合わせから成る群から選択される。幾つかの実施形態に於いて、アミノ酸はアラニンである。幾つかの実施形態に於いて、アラニンはL-アラニンである。幾つかの実施形態に於いて、アラニンはD-アラニンである。

## 【0098】

幾つかの実施形態に於いて、前記調節弁酵素の発現の前記コントロールされた縮減を欠く細胞と比較して、前記静止期の間の産物の生産の速度は環境条件の変化に应答してより

10

20

30

40

50

縮減されない。

【0099】

幾つかの実施形態に於いて、環境条件の変化は、前記細胞に接触する培養培地の糖濃度の変化を含む。

【0100】

幾つかの実施形態に於いて、環境条件の変化は、前記細胞に接触する培養培地の酸素供給の変化を含む。

【0101】

幾つかのケースでは、細胞性の産物を生成する方法が本願に於いて提供され：培養培地に依って異種的な細胞を培養する事を含み、前記異種的な細胞は：(i)代謝経路に於いて作用する調節弁酵素の発現のコントロールされた縮減を媒介する為の操作された調節弁ポリヌクレオチド(前記調節弁酵素の発現の前記コントロールされた縮減は前記代謝経路のフラックスを縮減し、前記調節弁酵素の発現の前記コントロールされた縮減は前記細胞の静止期を誘導する)と；(ii)前記産物の生成の為の生産酵素の発現のコントロールされた増大を媒介する為の操作された生産ポリヌクレオチドと；を含み、前記調節弁酵素の発現の前記コントロールされた縮減を欠く細胞と比較して、前記静止期の間の前記産物の生産の速度は環境条件の変化に应答してより縮減されない。幾つかの実施形態に於いて、方法は、前記環境条件を変化させる事を更に含む。幾つかの実施形態に於いて、環境条件は前記培養培地の糖濃度を含み、前記環境条件を変化させる事は、前記糖濃度を増大又は減少させる事を含む。幾つかのケースでは、前記糖はグルコース、スクロース、ラクトース、マルトース、キシロース、マンニトール、又は其れ等の組み合わせである。幾つかのケースでは、前記糖はグルコースである。幾つかのケースでは、環境条件は前記培養培地の酸素濃度を含み、前記環境条件を変化させる事は、前記酸素濃度を増大又は減少させる事を含む。幾つかのケースでは、前記培養する事は、バイオリクターに依って実施される。

【0102】

幾つかのケースでは、前記培養培地は少なくとも100ml、200ml、300ml、400ml、500ml、600ml、700ml、800ml、900ml、又は少なくとも1000の体積を有する。幾つかのケースでは、前記培養培地は少なくとも1Lの体積を有する。幾つかのケースでは、前記産物は3-ヒドロキシプロピオン酸を含む。幾つかのケースでは、前記産物はアミノ酸を含む。幾つかのケースでは、前記アミノ酸はアラニンを含む。

【0103】

幾つかのケースでは、前記アラニンの生産の速度は、少なくとも0.1g/L/hr、0.2g/L/hr、0.3g/L/hr、0.4g/L/hr、0.5g/L/hr、0.6g/L/hr、0.7g/L/hr、0.8g/L/hr、0.9g/L/hr、1.0g/L/hr、1.1g/L/hr、1.2g/L/hr、1.3g/L/hr、1.4g/L/hr、1.5g/L/hr、1.6g/L/hr、1.7g/L/hr、1.8g/L/hr、1.9g/L/hr、2.0g/L/hr、2.5g/L/hr、3.0g/L/hr、3.5g/L/hr、4.0g/L/hr、4.5g/L/hr、5.0g/L/hr、5.5g/L/hr、6.0g/L/hr、7.0g/L/hr、8.0g/L/hr、9.0g/L/hr、又は少なくとも10g/L/hrである。幾つかのケースでは、前記生産ポリヌクレオチドはアラニン排出輸送体をコードする。幾つかのケースでは、前記アラニン排出輸送体はalaEである。幾つかのケースでは、前記培養する事は、20時間よりも少し、30時間、40時間、50時間、60時間、70時間、80時間、90時間、又は100時間よりも少しに渡って起こる。幾つかのケースでは、前記培養する事は、10時間よりも少し、15時間、20時間、25時間、30時間、35時間、40時間、又は45時間よりも少しに渡って起こる。幾つかのケースでは、前記培養する事は30時間よりも少しに渡って起こる。

【0104】

10

20

30

40

50



幾つかのケースでは、前記産物はメバロン酸を含む。幾つかのケースでは、前記メバロン酸の生産の速度は、少なくとも  $0.1 \text{ g/L/hr}$ 、 $0.2 \text{ g/L/hr}$ 、 $0.3 \text{ g/L/hr}$ 、 $0.4 \text{ g/L/hr}$ 、 $0.5 \text{ g/L/hr}$ 、 $0.6 \text{ g/L/hr}$ 、 $0.7 \text{ g/L/hr}$ 、 $0.8 \text{ g/L/hr}$ 、 $0.9 \text{ g/L/hr}$ 、 $1.0 \text{ g/L/hr}$ 、 $1.1 \text{ g/L/hr}$ 、 $1.2 \text{ g/L/hr}$ 、 $1.3 \text{ g/L/hr}$ 、 $1.4 \text{ g/L/hr}$ 、 $1.5 \text{ g/L/hr}$ 、 $1.6 \text{ g/L/hr}$ 、 $1.7 \text{ g/L/hr}$ 、 $1.8 \text{ g/L/hr}$ 、 $1.9 \text{ g/L/hr}$ 、 $2.0 \text{ g/L/hr}$ 、 $2.5 \text{ g/L/hr}$ 、 $3.0 \text{ g/L/hr}$ 、 $3.5 \text{ g/L/hr}$ 、 $4.0 \text{ g/L/hr}$ 、 $4.5 \text{ g/L/hr}$ 、 $5.0 \text{ g/L/hr}$ 、 $5.5 \text{ g/L/hr}$ 、 $6.0 \text{ g/L/hr}$ 、 $7.0 \text{ g/L/hr}$ 、 $8.0 \text{ g/L/hr}$ 、 $9.0 \text{ g/L/hr}$ 、又は少なくとも  $10 \text{ g/L/hr}$  である。幾つかのケースでは、前記培養する事は、20時間よりも少し、30時間、40時間、50時間、60時間、70時間、80時間、90時間、又は100時間よりも少しに渡って起こる。幾つかのケースでは、前記培養する事は80時間よりも少しに渡って起こる。

10

#### 【0105】

幾つかの実施形態に於いて、調節弁ポリヌクレオチドは：前記調節弁酵素をコードする遺伝子の転写を抑制する為のサイレンシングポリヌクレオチド；前記調節弁酵素の細胞性の分解を媒介する為の分解ポリヌクレオチド；及び其れ等の組み合わせから成る群から選択されるポリヌクレオチドを含む。幾つかのケースでは、調節弁ポリヌクレオチドはサイレンシングポリヌクレオチドを含み、前記サイレンシングポリヌクレオチドは、前記調節弁酵素をコードする遺伝子のプロモーターを認識する gRNA 配列を含むガイドRNA (gRNA) を含む。幾つかのケースでは、調節弁ポリヌクレオチドはCRISPR酵素を更にコードし、前記CRISPR酵素は前記gRNAに結合した時に前記プロモーター配列に特異的に結合する。幾つかのケースでは、CRISPR酵素は触媒的に不活性である。幾つかのケースでは、調節弁ポリヌクレオチドは分解ポリヌクレオチドを含み、前記分解ポリヌクレオチドは分解タグをコードする配列を含み、前記分解タグは前記調節弁酵素の分解を媒介する。幾つかのケースでは、前記調節弁ポリヌクレオチドの発現は磷酸に依って制御される。幾つかのケースでは、前記生産ポリヌクレオチドの発現は磷酸に依って制御される。幾つかのケースでは、前記細胞はE. coli細胞である。

20

#### 【0106】

バイオプロダクションの最適化

30

バイオ医薬品及び低分子治療薬からスペシャリティー、バルク、及びコモディティーケミカル迄のあらゆる物、並びに次世代バイオ燃料をさえも生産する為のバイオテクノロジーに基づく発酵プロセスが首尾良く開発されて来た<sup>1-3</sup>。多数のテクノロジー開発が原因で、此れ等のプロセスは近年に於いて急速な進歩をして来た<sup>4,5</sup>。合成生物学を用いて新たな分子を生産する事は曾て無く容易である。此れ等の進展にも関わらず、分子を概念実証(POC)から商業的に意味があるレベルに迄持って行く事には深刻な課題が残っている。株最適化、又は「mg」から「kg」へのハードルを克服する事は、バイオプロセスの首尾良い商業化にとって鍵と成る障害のまま残っている。通例、POCの実証後には、首尾良いバイオプロセス開発は微生物株及び発酵最適化両方の長長しい繰り返しを要求する<sup>6-8</sup>(図1B)。多くの場合に、此れ等の最適化作業は関心の産物又はホスト株に特異的である。部分的には、操作された微生物株の意味ある標準化された最適化を高スループットな様式で実施する為の幅広く有用なツールの欠如が原因で、合成生物学のスループットは代謝工学の物を追い越してしまっている<sup>9</sup>。

40

#### 【0107】

株最適化とPOCレベルの先へ展開する事とは多数の課題があり、取り分け、予想される設計領域のサイズ及び複雑さである。電気回路モデルが適用可能なより単純な遺伝子回路とは対照的に<sup>10-12</sup>、代謝ネットワークは高度に相互接続されている。各代謝物質及び/又は酵素は果てしない他の物と相互作用し得る。此の組み合わせの複雑さは巨大な予想される設計領域を齎し、此れは、標準化された設計原理の開発に要求される種類の系統的な実験法の手には負えない(補足資料表1)。新たな高スループットなDNAアセ

50

ンブリ及び微生物株構築法に至ったDNAを読み書きする事の劇的な進展及び減少したコストにも関わらず、斯かる大きい設計領域に対処する事に於ける課題は引き続いている<sup>13-16</sup>。多くの場合に、株操作を使用する新たな合成生物学テクノロジーが、容易にスクリーニング又は選択される表現型に依って実証されると言う事は意外ではない<sup>13, 17-19</sup>。此れ等の殆どは、限定された一連の経路特異的な酵素を最適化する事への専念に限定されている。

#### 【0108】

此の課題の複雑さを克服する為の1つのアプローチはバイオプロダクションの為のインビトロシステムの使用であり、これは限定された一連の代謝酵素を含む。然し乍ら、此れ等のアプローチは、補因子リサイクル及びエネルギー生成を包含するインビボシステムの鍵と成る利点を複製する事に課題を有する<sup>20, 21</sup>。此の複雑さに取り組む為の別のアプローチは、株評価の為のより高速のスクリーニング方法を開発する事である<sup>22</sup>。然し乍ら、増大したスループット単独は、予想される設計領域の完全な複雑さを決して評価し得ない。加えて、多くの場合に、高スループット研究から得られる結果は同じ微生物に於いてさえも異なる環境に当て嵌まらない<sup>20, 23, 24</sup>。小スケールスクリーニングは直ちにはより大スケールの生産プロセスに当て嵌まらず、株最適化の上に、プロセス最適化の繰り返しに至る(図1B)。これは、代謝が高度に制御されており、環境条件の変化に対して場合に依っては劇的に応答し得るからである<sup>25, 20, 26-28</sup>。従来的には、環境的なロバスト性の欠如が、発酵に基づくプロセスのスケールアップを困難にする1つの因子である。此の問題は、スループットの控えめな改善のみをオファーするスケールダウンの為の特別な複雑なマイクロリアクターシステムの開発に至った<sup>20, 29-31</sup>。

#### 【0109】

「mg/s」から「kg/s」に移行する時間及びコストを大いに縮減する為の、幅広く応用可能な迅速でロバストなアプローチの有意な必要が残っている。理想的には、アプローチは、複数の産物及び生産ホストが適用可能であるべきである。真にスケラブルな標準化された発酵プロセスの使用を可能にする一般化可能な高スループットな株最適化アプローチの開発が本願に於いて提供される。図1Bパネルbに略示されている此のアプローチは、活性な代謝ネットワークの動的な最小化を使用し<sup>32</sup>、これはインビボの生合成の利益を維持し乍ら、インビトロアプローチに共通のより小さい設計領域の利益を組み合わせる<sup>20</sup>。我々は、生産に要求される最小限の代謝ネットワークを単離し、此れに専念し得る。合成的な代謝調節弁(SMV)<sup>32, 33</sup>の組み合わせを利用して(図2A~D)、我々は代謝ネットワークを動的に最小化し、標準化された2段階発酵プロセスの文脈に於いて代謝フラックスを方向転換し得る<sup>20</sup>。

#### 【0110】

此のアプローチは問題の複雑さ及び然るべき設計領域のサイズを縮減し得、最適化を大いにスピードアップする。種々の実施形態に於いては、動的な代謝ネットワーク最小化が、生産経路改変単独に依って達成可能な物よりも経路フラックスを改善し得ると言う事が本願に於いて実証される(図3A~K及び6A~H)。同時に、我々は、動的なネットワーク最小化が環境条件に対する代謝応答を縮減し、これが、操作された株のロバスト性及びスケラブル性を増大させる(図3A~K及び5A~J)事を実証する。

#### 【実施例】

#### 【0111】

E. coli に於ける2段階の合成的な代謝調節弁

第1に、我々は、改善された合成的な代謝調節弁(SMV)をE. coli に於いて開発した。此れ等は2段階プロセスに於ける蛋白質レベルの動的な縮減を可能にする。此れ等のSMVは、鍵と成る代謝酵素のレベルを縮減する(又は鍵と成る代謝酵素の酵素活性を縮減する)為に用いられ得、コントロールされた蛋白質分解若しくはCRISPRに基づく遺伝子サイレンシング、又は組み合わせの蛋白質分解及びサイレンシング両方に依拠する(図2A~D)<sup>32-35</sup>。細胞増殖及び動的な代謝コントロールは、燐酸欠乏を環

10

20

30

40

50

境トリガーとして用いて実装され得る。最少培地の最も割高な構成成分の1つとして、磷酸はトリガーとして理想的な候補であり得る。加えて、*E. coli*に於いて磷酸欠乏に依って誘導される静止期は、保持された解糖系取り込み及び増大した蛋白質発現を有する<sup>31, 36</sup>。磷酸に対して応答する多数のプロモーターシステムが、*E. coli*、及び*S. cerevisiae*を包含する他の微生物に於いて良くキャラクタリゼーションされている<sup>37</sup>。磷酸応答性プロモーターバリエーションを評価し(補足資料第1節)、爾後に2段階のコントロールに用いた。

#### 【0112】

両方とも以前に実証されている通り、誘導された遺伝子サイレンシングの為に天然のI-E型Cascade-CRISPRシステムを用いて、SMVを*E. coli*に実装し乍ら<sup>34, 38</sup>、C末端タグを標的蛋白質に組み込む事に依って、コントロールされた蛋白質分解を誘導した<sup>63, 33</sup>(図2A)。此れ等のシステムを、最小限の副産物形成並びに高いバイオマス収量及び増殖速度の為に初期操作された宿主株に導入した(*E. coli*株DLF\_0025、補足資料第3節)<sup>24, 27, 28, 39</sup>。図2A~Dが実証している通り、最少培地の磷酸欠乏に依ってGFPuvを「オン」に、mCherry蛍光蛋白質を「オフ」にする事に依って例証される通り、此のアプローチを用いて、蛋白質レベルを2段階プロセスに於いてコントロールし得る。蛋白質分解との遺伝子サイレンシングの組み合わせは、蛋白質の分解の最も大きい速度を齎す(図2C~D)。減衰速度への遺伝子サイレンシング及び蛋白質分解の具体的なインパクトは、蓋然的には、宿主、標的遺伝子/酵素、並びに其の具体的な天然のターンオーバー速度及び発現レベルに依存して変わるであろう<sup>40, 41</sup>。

#### 【0113】

代謝ネットワーク最小化は改善されたフラックスに至る

2段階プロセスに於ける蛋白質レベルの動的コントロールの首尾良い実証に依って、我々は、単独及び組み合わせの鍵と成る中央代謝酵素のコントロールされた縮減に依る*E. coli*の代謝フラックスの動的コントロールを検討する事に転じた。ネットワーク内の熱力学的に有利な「初発」反応のフラックスを縮減する事は、ネットワーク代謝物質プールの増大(補足資料第5節)、及び結果として経路フラックスの変化に至る事が予期される。中央代謝経路の鍵と成る初発ステップの酵素を同定し、初期のSMV標的として選び、アラニンを初期の試験産物として選んだ(図3A~K)。NADPH依存性アラニンドヒドロゲナーゼ(aldehyde)を含むアラニン生産の為に一連の株を構築した(図3A)<sup>42</sup>。蛋白質分解若しくは遺伝子サイレンシング又は組み合わせで両方を誘導する為の改変何方かに依って、中央代謝酵素のSMVの複数の組み合わせを有するバリエーションを作った(補足資料第3節)。一緒に成って、2段階プロセスに於いて評価したSMVを有する一連の株は「調節弁」株として識別される。標準化された2段階の96ウェルプレートに基づくマイクロ発酵に於けるアラニン生産について、アラニン「調節弁」株のパネル(合計~500株)を評価した(補足資料第7節)。24時間の生産後のアラニン力価が図3B~Cに依って与えられている。手短には、24時間後のアラニン力価は~0g/Lから~4.7g/L迄の範囲であり、予期される通り、SMVの数及び組み合わせについて有意に変わった; SMV無し及びアラニン経路単独に依るコントロールと比較した時に、殆どのSMV組み合わせは改善された性能に至る。幾つかのケースでは、24時間後のアラニン力価は、0から0.5g/L、0.5g/Lから1g/L、1g/Lから1.5g/L、1.5g/Lから2g/L、2g/Lから2.5g/L、2.5g/Lから3g/L、3g/Lから3.5g/L、3.5g/Lから4g/L、4g/Lから4.5g/L、4.5g/Lから5g/L、又は5g/Lから10g/Lであり得る。SMVに依ってオフアされるアラニン生産のダイナミックレンジは、単に(プロモーターを変化させる事に依って)生産経路酵素の発現レベルを変改する事に依ってオフアされる物と比較して最高で4倍の増大であり得る(補足資料第7節)。幾つかのケースでは、SMVに依ってオフアされるアラニン生産のダイナミックレンジは、単に生産経路酵素の発現レベルを変改する事に依ってオフアされる物と比較して最高で2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、

7倍、8倍、9倍、又は10倍の増大であり得る。重要な事に、単独及び/又は組み合わせの蛋白質分解又はサイレンシングの使用は、生産への有意なインパクトを有し、各酵素について、SMVを用いる活性のファインチューニングが決定的である事を指示した。其れから、マイクロ発酵からの最も良好な実施株の1つを10gd cw/Lのバイオマスに依る最少培地の2段階の1L発酵に依って評価した(図3F)。此れは、48時間の生産後に0.8g/gの収量で80g/Lの100%L-アラニンを生産した。アラニン排出輸送体(E. coliのalaE遺伝子に依ってコードされる<sup>43</sup>)を過剰発現する事に依る此の株の更なる操作は、27時間の生産後に理論収量~1g/gの誤差以内の収量で147g/Lの100%L-アラニンを生産した(図3G)。

【0114】

マイクロ発酵ロバスト性

中心的な仮説は、生産段階に於ける代謝を規制する事に依って、株性能が改善され得るのみならず、環境(プロセス)条件に対してよりロバストであるであろうと言う事であった。単純に表現すると、最小化された代謝ネットワークに依って炭素フローが規制され、最早此れは環境に対する細胞応答に依って適応し得ない。此の仮説を試験する為に、株を異なる「マイクロ発酵」プロセス条件に於いて評価した。グルコース濃度及び酸素移動速度(従来の発酵に於いて株性能にインパクトを及ぼす、鍵と成るプロセス変数<sup>26</sup>)を変え(図3D、補足資料第8節)、アラニン生産を測定した。環境的なロバスト性を定量する為に、ロバスト性スコア(RS)を開発した。より大きいRSスコアはよりロバストな株を指示する。相対標準偏差(RSD)はロバスト性の1つの指標であるが、我々は、全てのプロセス条件に於いて株が有する最大偏差(Max Dev)をも又組み込むロバスト性のより厳密な尺度を組み込む事を欲した(RS、式(1))。

【数1】

$$\text{式(1): } RS = 100 - \frac{\text{average}(RSD) + \max(Dev)}{2} * 100$$

【0115】

48個のアラニン「調節弁」株の部分集合のロバスト性スコアが図3Eに依って与えられている。此れ等の実験研究からの結果は補足資料第8節に於いて表にしている。ロバスト性のRS>0.6のカットオフを用いるカイ<sup>2</sup>分析を用いて、プロセスロバスト性に統計的に寄与する鍵と成るSMVを同定した。fabIの蛋白質分解型の分解はロバスト性への主要な寄与因子であり(カイ<sup>2</sup>=13.85、P値<0.001)、結果として、fabIの蛋白質分解型の分解を有する「調節弁」株を更なる研究に用いた。加えて、gltAの蛋白質分解型の分解並びに/又はfabI及びgltAの蛋白質分解型の分解の組み合わせを有する「調節弁」株も又、大きいP値ではあるが、ロバスト性の有意な寄与因子である事が見出された。

【0116】

従来の増殖連動型株と比較した2段階「調節弁」株

SMVに依って可能にされる2段階アプローチをより従来の増殖連動型プロセスと比較する為に、我々は、アラニンの増殖連動型生産が可能な、恒常的に発現されるアラニンデヒドロゲナーゼ(al d\*)を有する5つの株を構築した。此れ等の増殖連動型株は、al d\*発現を駆動する為に用いたプロモーターの強さが変わるが<sup>44</sup>(補足資料第2節)、依然として同じ共通の調節弁無しのコントロールホスト株を利用した。図5は、マイクロタイター(図5A~D)及び1L(図5E~J)スケールに於いて従来の発酵の「増殖連動型(GA)」株と比較した2段階プロセスに於ける「調節弁」株の直接的比較の結果を例示している。マイクロ発酵では、2段階「調節弁」株は力価及びプロセスロバスト性についてGA株を凌いだ。変えられたプロセス条件に依る1L発酵に於いて、マイクロ発酵分析からの最もロバストなGA株(最も高い生産レベルをも又有する)をロバストな「調節弁」株と比較した。マイクロ発酵からの結果と一貫して、「調節弁」株は評価し

10

20

30

40

50

た全てのプロセス条件に於いて一貫した性能を示した(図5E)。此処で、GA株はプロセスに依存する有意な性能変動性を有した。我々は、「マイクロ」及び1Lスケール発酵両方に於いて「調節弁」株について観察された増大した環境ロバスト性が、予測可能なスケールアップに至るであろうと言う仮説を立てた。此処では、高スループットなマイクロ発酵に於ける改善された性能を有する株は、コントロールされたバイオリアクターに於ける改善された性能を確実に有するであろう。システムのスケラブル性を評価する為に、マイクロ発酵に於いて統計的に区別される性能(P値<0.001)を有する「調節弁」アラニン株を、標準化された2段階の1L発酵に於いて評価し、全てのGA株と比較した。「マイクロ発酵」に於いて観察された統計的に異なる性能は、2段階「調節弁」株については1L発酵へと予測可能にスケリングした。これは、マイクロ発酵と1L性能との間の相関が観察されなかったGA株に依って得られた結果とは対照的である(図5G~H)。

10

#### 【0117】

##### 産物の融通性

1Lの完全計装化発酵へのアラニン株の首尾良い予測可能なスケールアップに依って、我々は、テクノロジープラットフォームを追加の産物：メバロン酸について検証する事へと展開した。此の目的には、メバロン酸生合成の為に追加の動的な生産経路を構築した(図6A)。3つの酵素機能をコードする一連の2遺伝子生産経路プラスミドはメバロン酸生産の為に構築し、二機能性アセチルCoAアセチルトランスフェラーゼ/NADPH依存性HMG-CoAレダクターゼ及びHMG-CoAシンターゼを夫々コードするE.フェカリスのmvaE及びmvaS遺伝子から成った。変異体mvaS遺伝子の、より高い活性を有するmvaS(A110G)を用いた<sup>45, 46</sup>。生産プラスミドをコントロール株に於けるメバロン酸生産について初期評価した(図6B)。其れから、最も良好な生産プラスミドを種々の操作された「調節弁」株に導入し、マイクロ発酵に依って評価した(図6C)。其れから、統計的に区別される株の部分集合を1L発酵に依って評価して、スケラブル性を評価した(図6D)。これは、アラニンのケースと同様に予測性があった。幾つかのケースでは、実施株は、78hrsの生産に依って0.46g/gの収量(理論収量の84%)で97g/Lと言う、意味がある力価及び収量を生産した(図6E)。此のメバロン酸株の比生産性は、最も良好な以前に報告された結果よりも4倍超高い<sup>47</sup>(補足資料第9節)。

20

30

#### 【0118】

##### 考察

歴史的に、低分子の生産を代謝的に操作する為の最も首尾良い作業の幾つかは、嫌氣的代謝の力を借りて、産物形成を増殖と連結させている。これは、エタノール、琥珀酸、乳酸、及びイソブタノールを包含する多くの産物を生産する為の産業株の古典的な設計及びセレクションを許した。これは、進化及びセレクションの力を借りて、操作されたネットワークに於ける最適な代謝フラックスに達している<sup>48, 49</sup>。増殖連動型生産は嫌氣的代謝に厳密に繋がられてはいないが、増殖連動は、合成生物学を用いて作られ得る異なる分子の数及び多様性を大いに限定する。一般的なロバストでアクセスし易い非増殖連動型プラットフォームは、膨大な数の産物の最適化及びスケールアップを大いに単純化するであろう。

40

#### 【0119】

生産改善の為に環境トリガーに対する天然の代謝応答に依拠して来た殆どの既存の2段階プロセスとは対照的に、我々は、必須の代謝ネットワークを積極的に最小化し、代謝物質を関心の産物へと方向転換すると言う次のステップに進んだ。此の仕事に於ける標的化された必須の中央代謝経路の多くは、従来的には操作戦略にとってのオフリミットであった。何故なら、必須酵素を欠失させる事は従来的な発酵に於ける増殖及び増殖連動型生産とは相容れないからである。動的に最小化された代謝ネットワークは、環境変数に対する強化されたロバスト性をも又齎し、高スループットな小スケール研究からより大きい計装化発酵への忠実なトランスレーションを可能にする。当分野に於ける現行のパラダイムは

50

、強化されたプロセスコントロールの為の小スケールのカスタム設計されたマイクロリアクターを開発する事に依って、然るべき株評価のスループットを改善する事である。対照的に、我々のアプローチは新たな方向への展開であり、プロセス変化に対してより感受性でない様に微生物代謝を操作する事を使用し、高スループットな実験法を単純化する。

#### 【0120】

ロバスト性の他に、特に生産経路発現レベル単独を変改する事と比較した時に、我々は、最小限の代謝ネットワークの必須酵素への組み合わせの改変が生産の有意な改善に至り得る事を実証した。性能の此れ等の大きい変動は、鍵と成る中央代謝ノードの限定された部分集合の変化が原因であり、蓋然的には変改された代謝物質レベルを齎す。酵素レベルを動的にコントロールする為の以前のアプローチと比較して、我々は、遺伝子サイレンシング及び蛋白質分解の組み合わせに依る蛋白質レベルのファインチューニングについて、改善されたポテンシャルを実証している<sup>50</sup>。静止期細胞は細胞分裂に依って既存の蛋白質を希釈し得ないので、此の二重のアプローチは意味を成す。当然の事乍ら、何れかの所与の酵素のレベルの特異的コントロールは天然のターンオーバーメカニズムにも又依存するであろう。一緒に成った遺伝子サイレンシング及び蛋白質分解両方の組み合わせは改善された性能を必ずしも齎す訳ではない、即ち「過ぎたるは猶及ばざるが如し」と言う事は、一見尚も意外であり得る。此れ等の結果を説明する為には、将来的な作業が必要とされ得る。此れ等は、より大きいネットワークに於いて最小限のフラックスを維持すると言う要件が原因か、又は最小限のネットワークの一部ではないが依然としてネットワーク活性に影響する鍵と成る制御代謝物質のレベルの変化の帰結か、何方かであり得る。

#### 【0121】

実証されているアプローチは殆どのバイオプロダクションプロセスに共通の多くの問題に対処し得るが、多くの産物特異的な課題が残っている。産物又は経路代謝物質の毒性は力価又は生産速度を限定し得る。低い力価に於いて最適であり得る最小限のネットワークは、高まった力価に於いては最適ではあり得ない。加えて、多くの場合に、改善された酵素の操作は多くの「mg」から「kg」へのプロジェクトに於ける課題である。

#### 【0122】

此のアプローチを他の微生物ホストに適応する事の実現可能性が予期される。新たなホストの鍵と成る要件は、迅速でロバストな増殖期、蛋白質レベルの動的コントロールを操作する能力、及び代謝的に活性な静止期を包含する。多数の微生物は、生産的な静止期代謝の為の良くキャラクタリゼーションされた栄養素トリガーを有し<sup>36</sup>、例えばラルストニア種、ヤロウィア種、及び他の物に於いては窒素制限である<sup>51, 52</sup>。此れ等の要件が天然に満たされない時でさえも、其れ等はS.セレビシエ又は他の微生物等のホスト内へと操作され得、予想される各ホストは固有の課題と対応する解決策とを提出する。

#### 【0123】

将来的な作業は、より複雑な生産経路を有する分子について此のプラットフォームを応用する事を狙いとし得る。此のアプローチは、POCレベルの先へ展開する事を願い、産業的により然るべき速度、力価、及び収量で問題に立ち向かい始めている代謝工学者及び合成生物学者に、迅速な最適化の為の御し易いルートをオファーし得る。

#### 【0124】

方法

試薬及び培地

別様に述べられていない限り、全ての材料及び試薬は可能な最も高いグレードであり、シグマアルドリッチ・コーポレーション(Sigma-Aldrich Corporation)(セントルイス, MO)から購入した。C13標識されたアラニン(2, 3-13C2, 99%) (品# CLM-2734-PK)はケンブリッジアイソトープラボラトリーズ・インク(Cambridge Isotope Laboratories, Inc.)(テュークスベリー, MA)から購入した。通例の株及びプラスミドの増殖及び構築にはルリアブrosを用いた。抗生物質の使用濃度は次の通りであった: アンピシリン(100 µg/mL)、カナマイシン(35 µg/mL)、クロラムフェニコール(35 µg/mL)、スペクチノマイシン(100 µg/mL)、ゼ

10

20

30

40

50

オシン (50 µg/mL)、ゲンタマイシン (10 µg/mL)、プラストサイジン (100 µg/mL)、ピューロマイシン (150 µg/mL)、テトラサイクリン (5 µg/mL)。低塩のルリアブロス (レノックス処方) を用いてゼオシン、プラストサイジン、及びピューロマイシン耐性クローンについてセレクションした。加えて、ピューロマイシンセレクションでは、燐酸緩衝液 (pH = 8.0) を 50 mM の終濃度迄、LBレノックスに追加した。ストック溶液を包含する培地処方 は 補足資料第 7 節 に記載されている。

#### 【0125】

##### E. coli 株構築

株構築及び確認に用いたオリゴヌクレオチド及び合成線状DNA (Gblocks (商標)) は全て補足資料第 3 節に於いて与えられており、其れ等はインテグレートドDNAテクノロジー (Integrated DNA Technologies) (IDT, コーラルビル, IA) から得た。株 BW25113 はイェール大学遺伝子ストックセンター (CGSC, <http://cgs.cbiology.yale.edu/>) から得た。株 BWap1df はジョージ・チェン (George Chen) (清華大学) からの厚意に依り供与された<sup>6 2</sup>。染色体改変は、抗生物質耐性カセットを保有する C 末端 D A S + 4 タグのケースでは直接的な抗生物質カセットインテグレーションに依って、又は厳密にリ (Li) 等のプロトコル<sup>6 4</sup> を踏襲した痕跡無しの tet-sacB セレクション及びカウンターセレクションに依って何方かで、標準的な組み換え工学方法論<sup>6 3</sup> を用いて成された。組み換え工学プラスミド pSIM5 及び tet-sacB セレクション/カウンターセレクションマーカーカセットはドナルド・コート (Donald Court) (NCI, <https://redrecombineering.ncifcrf.gov/court-lab.html>) からの厚意に依り供与された。手短には、~ 50 bp の相同性フランキンク配列を供給する適切なオリゴを用いて、Econotaq (ルシジェン・コーポレーション (Lucigen Corporation), ミドルトン, WI) を製造者の説明書に従って用いて、94 に於ける初期の 10 分の変性、次に 35 サイクルの 94 15 秒、52 15 秒、及び 72 5 分に依って、tet-sacB セレクション/カウンターセレクションカセットを増幅した。tet-sacB カセットの「キュアリング」又は直接的インテグレーション (抗生物質マーカーが存在する時) に用いられるカセットは、IDT から gBlocks として得た。sspB 遺伝子欠失のケースでは、カナマイシン耐性に依って置き換えられたオープンリーディングフレーム欠失を Keio コレクション株 JW3197-1 から増幅し<sup>6 5</sup>、標準的な方法論を用いて適切なバックグラウンド株に移動した。カナマイシン耐性カセットは pCP20 プラスミドを用いてキュアリングされ、frt 痕跡を残した<sup>6 3, 6 5</sup>。染色体改変は、PCR 増幅及びシーケンシング (イートンバイオサイエンス・インク (Eton Bioscience Inc.)) に依って確認し、領域全体をフランキンクする一対のオリゴヌクレオチド、又は D A S + 4 タグ挿入のケースでは挿入の 5' のオリゴ及び耐性カセットの内部の物を何方かを用いた。

#### 【0126】

##### E. coli プラスミド構築

CASCADE ガイドアレイの設計及び構築に用いたプライマーは補足資料第 6 節に挙げた。遺伝子サイレンシングガイドアレイは一連の pCASCADE プラスミドから発現した。pCASCADE-control プラスミドは、pcrRNA.Tet<sup>7 3</sup> の pTet プロモーターをインスレーター付きの低燐酸に依って誘導される ugpb プロモーター<sup>7 4</sup> に取り替える事に依って調製した。全ての遺伝子のプロモーター配列は Ecocyc データベースから得た (<https://ecocyc.org/>)。CASCADE ガイドアレイを設計する為に、関心のプロモーターの - 35 又は - 10 ボックスの近くの CASCADE の PAM 部位を同定し、PAM 部位の 3' 末端の 30 bp をガイド配列として選択し、製造者のプロトコルを踏襲して Q5 部位特異的変異導入 (ニュー・イングランド・バイオラボ・インク (New England Biolabs Inc.), MA) を用いて pCASCADE プラスミドにクローニングした。5% v/v の DMSO を Q5 PCR 反応に追加したと言う変更を有した。PCR サイクルは次の通りであった: 増幅は、30 秒の 98 に於ける初期の変性ステップ、次に 25 サイクルの 98 10 秒、72 30 秒、及び 72 1.5 min (

10

20

30

40

50

伸長速度は30秒/kbであった)に於けるサイクル運転、其れから72に於ける2minの最終伸長を使用した。PCR混合物の2 $\mu$ Lを10 $\mu$ LのKLD反応に使い、此れは室温で1時間に渡って進行した。此れの後、1 $\mu$ LのKLD混合物をエレクトロポレーションに用いた。

#### 【0127】

pCASCADEGUIDEガイドプラスミドは、より小さい各ガイドプラスミドの相補的な半分ずつをPCRに依って逐次的に増幅する事、次に爾後のDNAアセンブリに依って調製した。pCASCADECONTROLベクターを鋳型として用いた。2つ以上のガイドのアレイを有するpCASCADEPラスミドはQ5ハイフィデリティー2xマスターミックス(ニュー・イングランド・バイオラボ・インク(New England Biolabs Inc.))、MA)を用いて調製した。PCRサイクルは次の通りであった：増幅は、30秒の98に於ける初期の変性ステップ、次に35サイクルの9810秒、6630秒、及び7245秒(伸長速度は30秒/kbであった)に於けるサイクル運転、其れから72に於ける2minの最終伸長を使用した。PCR産物はゲル抽出に依って精製し、20 $\mu$ Lの超純水を用いて50 $\mu$ LのPCR反応精製を溶出した。溶出した各PCR産物の1 $\mu$ Lを10 $\mu$ Lのギブソンアセンブリ(ニュー・イングランド・バイオラボ・インク(New England Biolabs Inc.))、MA)に使い、此れは15minの50に於けるインキュベーションに依って完了した。1 $\mu$ Lのギブソンアセンブリミックスをエレクトロポレーションに用いた。

#### 【0128】

生産経路酵素は低燐酸誘導性プロモーターに依って高コピープラスミドから発現した。生産経路遺伝子配列はIDTウェブサイトからのコドン最適化ツールを用いてコドン最適化し、各経路について、燐酸化されたG-blocks(商標)をIDTから設計及び購入した。製造者のプロトコールを踏襲してNEBuilder(登録商標)HiFiDNAアセンブリマスターミックスを用いてプラスミドをアセンブリした(ニュー・イングランド・バイオラボ・インク(New England Biolabs Inc.))、MA)。pSMART-HC-Kan(ルシジェン・コーポレーション(Lucigen Corporation))、WI)を全ての経路プラスミドのバックボーンとして用いた。全てのプラスミド配列はDNAシーケンシング(イートンバイオサイエンス・インク(Eton Bioscience Inc.))、NC)に依って確認し、アドジーン(Addgene)に寄託した。

#### 【0129】

##### E.coliのBiolector

各株のシングルコロニーを適切な抗生物質を有する5mLのLBに接種し、37、220rpmで9時間に渡って又はOD600が>2に達する迄培養した。培養の500 $\mu$ Lを適切な抗生物質を有する10mLのSM10培地に接種し、スクエア振盪フラスコ(CAT#:25-212、ジェネシー・サイエンティフィック・インク(Genesee Scientific, Inc.))、サンディエゴ、CA)に依って37、220rpmで16時間に渡って培養した。細胞を遠心に依ってペレット化し、FGM3培地を用いて培養密度をOD600=5に正規化した。増殖及び蛍光測定は、高物質移動FlowerPlate(CAT#:MTP-48-B、エムツーピーラプス・ゲーエムベーハー(m2p-labs GmbH))、独国)を用いてBiolector(エムツーピーラプス・ゲーエムベーハー(m2p-labs GmbH))、ベスヴァイラー、独国)に依って得た。OD正規化した培養の40 $\mu$ Lを適切な抗生物質を有する760 $\mu$ LのFGM3培地に接種した。Biolector設定は次の通りであった：RFPゲイン=100、GFPゲイン=20、バイオマスゲイン=20、振盪スピード=1300rpm、温度=37、湿度=85%。あらゆる株はトリPLICATEで分析した。

#### 【0130】

##### E.coliマイクロ発酵

プラスミドはエレクトロポレーションに依って宿主株に形質転換した。製造者のプロトコールを踏襲してECM630高スループットエレクトロポレーションシステム(ハー

10

20

30

40

50



バードアパラタス・インク (Harvard Apparatus, Inc.) , ホリストン , M A ) を用いるか、又は個々のエレクトロポレーションキュベットを用いた。等体積の無菌 20 % グリセロールを追加する事に依って、各形質転換プレートについてグリセロールストックを調製し、3  $\mu$  L を用いて、適切な抗生物質を有する 150  $\mu$  L の S M 10 + + 培地に一晚培養を接種した。プレートをサンドイッチカバー (モデル # C R 1596。エンザイスクリーン・ビーブイ (EnzyScreen BV) , ハールレム , オランダから得た) に依ってカバーした。此れ等のカバーは、インキュベーションの間の最小限の蒸発損失を保証した。別様に述べられていない限り、96 ウェルプレートは 37 、 400 r p m で 16 時間に渡って培養した。シェーカー軌道は 25 mm である。必要とされる物質移動係数を得、十分な培養酸素供給を可能にする為には、軌道及び最小限の振盪スピードの此の組み合わせが要求される。

10

## 【 0 1 3 1 】

16 時間の増殖後に、細胞を遠心に依ってペレット化し、過剰な培地を取り除き、細胞を 150  $\mu$  L の F G M 3 洗浄溶液に再懸濁した。爾後に、細胞をもう一度ペレット化し、再び過剰な培地を取り除き、ペレットを適切な抗生物質を含有する 50  $\mu$  L の燐酸無し F G M 3 培地に再懸濁した。標準的な平底 96 ウェルプレートを用いる O D 600 測定の為に、再懸濁した培養の 5  $\mu$  L を 195  $\mu$  L の水に追加した。150  $\mu$  L の総体積で標準的な 96 ウェルプレートを用いて、適切な抗生物質を含有する燐酸無し F G M 3 培地を用いて、生産の O D 600 を O D 600 = 1 に正規化した。プレートをサンドイッチカバー (モデル # C R 1596。エンザイスクリーン・ビーブイ (EnzyScreen BV) , ハールレム , オランダから得た) に依ってカバーし、96 ウェルプレート培養を 37 、 400 r p m で 24 時間に渡ってインキュベーションした。24 時間の生産後に、各ウェルからの全てのサンプルを遠心に依ってペレット化し、爾後の分析的な測定の為に上清を収集した。トリプリケートのマイクロ発酵を各株について実施した。

20

## 【 0 1 3 2 】

増殖連動型アラニンマイクロ発酵の為に、グリセロールストック調製及び S M 10 + + に依る 16 時間の一晚培養は上に記載されている通り進行した。S M 10 + + 培地に依る 16 時間の増殖後に、一晚培養の 5  $\mu$  L を、適切な抗生物質を含有する 40 m M 燐酸を有する 150  $\mu$  L の F G M 3 に接種した。プレートをサンドイッチカバー (モデル # C R 1596。エンザイスクリーン・ビーブイ (EnzyScreen BV) , ハールレム , オランダから得た) に依ってカバーし、96 ウェルプレート培養を 37 、 400 r p m で 24 時間に渡ってインキュベーションした。24 時間の生産後に、O D 600 を記録し、其れから、各ウェルからの全てのサンプルを遠心に依ってペレット化し、爾後の分析的な測定の為に上清を収集した。トリプリケートのマイクロ発酵を各株について実施した。

30

## 【 0 1 3 3 】

マイクロ発酵のロバスト性評価は補足資料第 8 節に記載されている通り執り行った。

## 【 0 1 3 4 】

## 1 L 発酵シード

形質転換プレートからのシングルコロニーを適切な抗生物質を有する 5 m L の L B に接種し、37 、 220 r p m で 16 時間に渡って培養した。L B 培養の 500  $\mu$  L をスクエア振盪フラスコ (C A T # : 25 - 214 , ジェネシー・サイエンティフィック・インク (Genesee Scientific, Inc.) , サンディエゴ , C A ) 中の適切な抗生物質を有する 50 m L の S M 10 培地に接種し、培養を 37 に於いて 220 r p m の振盪スピードで 24 時間に渡ってインキュベーションした。此の時に、O D 600 は通常は 3 及び 10 の間である。培養を 4000 r p m に於ける 15 m i n の遠心に依って収穫し、上清を捨て、S M 10 培地を用いて細胞培養を O D 600 = 10 に正規化した。1 L 発酵シードでは、正規化された O D 600 = 10 培養の 6 m L をクライオバイアル中の 1 . 5 m L の 50 % グリセロールに追加し、- 80 で保存した。

40

## 【 0 1 3 5 】

## 1 L 発酵

50

インフォース - H T ( Infors-HT ) の M u l t i f o r s ( ローレル , M D , 米国 ) パラレルバイオリクターシステムを用いて、1 L 発酵を実施した。空気、酸素、及び窒素ガスの為に配設された3つのガス接続マスフローコントローラーを包含した。用いたベッセルは1400 mL の総体積及び最高で1 L の使用体積を有した。オンラインのpH及びpO<sub>2</sub>モニタリング及びコントロールはハミルトン・カンパニー ( Hamilton company ) プローブに依って成し遂げられた。オフガス分析は多重Blue - i n - O n eブルーセンス・ガスアナライザー ( ブルーセンス・コーポレーション ( BlueSens Corporation ) , ノースブルック , I L , 米国 ) に依って成し遂げられた。培養密度は225 mm のオプテックODプローブ ( オプテックダヌラット・インク ( optek-Danulat Inc. ) , ジャーマンタウン , W I , 米国 ) を用いて継続的にモニタリングした。用いたシステムはI r i s V 6 . 0 コマンド及びコントロールソフトウェアを実行し、S e g - f l o w 自動サンプリングシステム ( フローナミクス・アナリティカルインストゥルメンツ・インク ( Flownamics Analytical Instruments, Inc. ) , ロデオ , C A , 米国 ) と一体化しており、F I S P セルフリーサンプリングプローブ、S e g m o d 4 8 0 0、及びF l o w F r a c t i o n 9 6 ウェルプレートフラクションコレクターを包含した。

#### 【 0 1 3 6 】

~ 1 0 g c d w / L バイオマスに依る標準化された2段階プロセスでは、E . c o l i バイオマス終濃度 ~ 1 0 g c d w / L を標的化する為の十分な燐酸を有する800 mL の F G M 1 0 培地を槽に充填した。抗生物質を適切に追加した。凍結シードバイアルを氷上で融解し、シード培養の7 . 5 mL を用いて槽に接種した。接種後に、5 M 水酸化アンモニウム及び1 M 塩酸を滴定剤として用いて、槽を37 且つpH 6 . 8 にコントロールした。図3Gの発酵の実行には10 M 水酸化アンモニウムを用いた。次の酸素コントロールスキームを用いて、所望の溶存酸素設定点を維持した。第1に、ガス流量を最小値の0 . 3 L / m i n の空気から0 . 8 L / m i n の空気迄増大させ、爾後に、より多くの通気が必要とされる場合には、攪拌を最小値の300 r p m から最大値の1000 r p m 迄増大させた。最後に、設定点を達成する為により多くの酸素が要求される場合には、一体化されたマスフローコントローラーを用いる酸素補給を包含した。出発グルコース濃度は25 g / L であった。一度攪拌が800 r p m に達したら、一定した無菌濾過済み濃縮グルコースフィード ( 500 g / L ) を所定の速度、即ち2 g / h で槽に追加した。フィード速度又は溶存酸素含量がロバスト性研究の為に変えられる事を必要としたケースでは、変化は細胞が静止期に進入した後で成された。発酵の実行は静止期への進入後に最高で~ 50 時間に渡って伸ばし、3時間毎にサンプルを自動的に抜き出した。サンプルは爾後の分析的な測定の為に保管した。

#### 【 0 1 3 7 】

増殖連動型発酵プロセスのケースでは、槽に40 mM 燐酸を有する800 mL の F G M 1 0 培地を充填した。此れは多大に過剰であり、燐酸欠乏が増殖連動型発酵プロセスでは発生しないと言う事を保証した。抗生物質を適切に追加した。凍結シードバイアルを氷上で融解し、シード培養の7 . 5 mL を用いて槽に接種した。接種後に、5 M 水酸化アンモニウム及び1 M 塩酸を滴定剤として用いて、槽を37 且つpH 6 . 8 にコントロールした。次の酸素コントロールスキームを用いて、所望の溶存酸素設定点を維持した。第1に、ガス流量を最小値の0 . 3 L / m i n の空気から0 . 8 L / m i n の空気迄増大させ、爾後に、より多くの通気が必要とされる場合には、攪拌を最小値の300 r p m から最大値の1000 r p m 迄増大させた。最後に、設定点を達成する為により多くの酸素が要求される場合には、一体化されたマスフローコントローラーを用いる酸素補給を包含した。出発グルコース濃度は25 g / L であった。一度攪拌が800 r p m に達したら、一定した無菌濾過済み濃縮グルコースフィード ( 500 g / L ) を所定の速度、即ち2 g / h で槽に追加した。フィード速度及び溶存酸素濃度を始めに所望の値に設定し、発酵プロセスの間は維持した。発酵の実行は最高で~ 50 時間に渡って続け、3時間毎にサンプルを自動的に抜き出した。サンプルは爾後の分析的な分析の為に保管した。

#### 【 0 1 3 8 】

## 分析方法

定量した全ての化合物のサンプル標準曲線が補足資料第10節に示されている。

## 【0139】

グルコース及びエタノール定量：ウォータース2414屈折率(RI)検出器と一体化したAcquity-HクラスUPLC(ウォータースコーポレーション(Waters Corporation), ミルフォード, MA, 米国)を用いて、グルコース及びエタノール濃度の同時定量の為に、UPLC-RI法を開発した。クロマトグラフィー分離はバイオラッドFast Acid分析HPLCカラム(100×7.8mm, 9µm粒径; CAT#: #1250100, バイオラッドラボラトリーズ・インク(Bio-Rad Laboratories, Inc.), ハーキュリーズ, CA)を用いて65 に於いて実施した。5mM硫酸を溶離液として用いた。イソクラティック溶出は次の通りであった：0~0.1min, 流量を0.4mL/minから0.42mL/min迄増大、0.1~1.2min, 0.48mL/minの流量。サンプル注入体積は10µLであった。UPLC法開発は分析成分の標準的なストック水溶液を用いて行った。ピーク積分及び更なる分析はMasslynx-v4.1ソフトウェアを用いて実施した。用いた直線範囲はグルコースでは1~10g/Lであり、エタノールでは1~20g/Lであった。必要に応じて、正しい直線範囲内である様にサンプルを希釈した。希釈は超純水を用いて実施した。

10

## 【0140】

アラニン定量：逆相UPLC-MS/MS法をアラニンについて開発した。クロマトグラフィー分離はレステックウルトラAQ-C18カラム(150mm×2.1i.d., 3µm; CAT#: 9178362, レステックコーポレーション(Restek Corporation), ペルフォンテ, PA)を用いて70 に於いて実施した。次の溶離液を用いた：溶媒A：H<sub>2</sub>O、0.2%蟻酸、及び0.05%アンモニウム(v/v)；溶媒B：MeOH、0.2%蟻酸、及び0.05%アンモニウム(v/v)。勾配溶出は次の通りであった：0~0.1min, イソクラティックな5%B、流量を0.65mL/minから0.75mL/min迄増大；0.1~0.3min, 0.75mL/minで5%から95%B迄直線的；0.3~0.9min, 0.75mL/minでイソクラティックな95%B；及び0.9~1.2min, 0.75mL/minで95%から5%B迄直線的；1.2~1.3min, 0.75mL/minでイソクラティックな5%B。サンプル注入体積は5µLであった。UPLC法開発は分析成分の標準的なストック水溶液を用いて行った。分離はXevo(商標)TQD質量分析計と一体化したAcquity-HクラスUPLCを用いて実施した(ウォータースコーポレーション(Waters Corporation), ミルフォード, MA, 米国)。MRMトランジションを包含するMS/MSパラメータは各分析成分についてチューニングした。表22に挙げられている。アラニン(2, 3-13C2, 99%)をアラニンの内部標準として5mg/Lの濃度で用いた。ピーク積分及び更なる分析はMasslynx-v4.1ソフトウェアを用いて実施した。アラニンの直線範囲は1~100mg/Lであった。必要に応じて、正しい直線範囲内である様にサンプルを希釈した。希釈は超純水を用いて実施し、10倍の最終希釈は溶媒Aを用いて実施し、5mg/LのC13アラニン(2, 3-13C2, 99%)を有した。

20

30

## 【0141】

メバロン酸定量：メバロン酸及びメバロノラク톤の同時定量の為に、逆相UPLC-TUV法を開発した。クロマトグラフィー分離はレステックウルトラAQ-C18カラム(150mm×2.1i.d., 3µm; CAT#: 9178362, レステックコーポレーション(Restek Corporation), ペルフォンテ, PA)を用いて30 に於いて実施した。20mM燐酸を溶離液として用いた。イソクラティック溶出は次の通りであった：1mL/minに於ける0~3minのイソクラティック。サンプル注入体積は10µLであった。吸光度を210nmでモニタリングした。UPLC法開発は分析成分の標準的なストック水溶液を用いて行った。分離はAcquity-HクラスUPLC(ウォータースコーポレーション(Waters Corporation), ミルフォード, MA, 米国)を用いて実施した。ピーク積分及び更なる分析はMasslynx-v4.1ソフトウェアを用いて実

40

50

施した。メバロン酸及びメバロノラク톤の直線範囲は0.01~0.1g/Lであった。必要に応じて、正しい直線範囲内である様にサンプルを希釈した。20mM 燐酸に依って希釈したメバロン酸は自発的にメバロノラク톤に変換するであろう<sup>80</sup>。其れ故に、メバロン酸及びメバロノラク톤両方の定量が発酵サンプルに必要であった。メバロン酸及びメバロノラク톤の標準は毎回新しく調製し、即座にUPLCに流した。希釈は超純水を用いて実施し、10倍の最終希釈は20mM 燐酸を用いて実施した。

#### 【0142】

アラニン立体異性体定量：L- / D- アラニンの同時定量及び区別の為に逆相UPLC-TUV法を開発した。クロマトグラフィー分離はChirex 3126 (D) - ペニシラミンカラム (150 x 4.6 mm, 5 μm; フェノメネックス・インク (Phenomenex Inc.)), トーランス, CA) を用いて50 に於いて実施した。2mM 硫酸銅を溶離液として用いた。イソクラティック溶出は次の通りであった：0.75 mL/min に於いて0~10 min。サンプル注入体積は10 μLであった。吸光度を254 nmでモニタリングした。UPLC法開発は分析成分の標準的なストック水溶液を用いて行った。分離はAcquity-HクラスUPLC (ウォーターズコーポレーション (Waters Corporation), ミルフォード, MA, 米国) を用いて実施した。ピーク積分及び更なる分析はMasslynx-v4.1ソフトウェアを用いて実施した。L- / D- アラニンの直線範囲は0.1~1g/Lであった。必要に応じて、正しい直線範囲内である様にサンプルを希釈した。希釈は超純水を用いて実施した。

#### 【0143】

補足資料

#### 【表1】

表1：代謝ネットワークの組み合わせの複雑さ。

| 組み合わせ# | E. coli 遺伝子ネットワーク全体  | 縮減された中央代謝ネットワーク               |
|--------|----------------------|-------------------------------|
|        |                      | 実験数                           |
| 1      | 4500                 | ~45 (解糖系、TCA、PPP、及びETC 遺伝子のみ) |
| 2      | 1.0×10 <sup>6</sup>  | 990                           |
| 3      | 1.5×10 <sup>10</sup> | 14,190                        |
| 4      | 1.7×10 <sup>13</sup> | 148,995                       |
| 5      | 1.5×10 <sup>16</sup> | 1.2×10 <sup>6</sup>           |

#### 【0144】

##### 第1節：燐酸プロモーター

燐酸プロモーター配列はPhoBに依って制御されるプロモーターのEcoCycデータベース<sup>81</sup>から得た (<https://ecocyc.org/>, 表2)。我々は、燐酸欠乏に対して応答する事が以前にキャラクター化されたプロモーターの相対的強さのみならず、加えて、燐酸リッチな条件に於ける相対的な漏れ易さを評価しようとした。此の狙いの為に、我々は一連の蛍光レポータープラスミドを構築した。我々はpSMART-HC-Kan (ルシジェン・コーポレーション (Lucigen Corporation), WI) バックボーン上の一連の12個の燐酸依存性プロモーターの後ろに紫外励起可能なGFPUV遺伝子をクローニングした。此れ等のレポーター株をエムツーピーラプス・ゲーエムベーハー (m2p-labs GmbH) Biolector (商標) に依って2段階マイクロ発酵プロトコールで評価した。結果は図7に例示されている。発現カセットが染色体インテグレーションされる時の高レベルの緊密にコントロールされた発現の為に、又はガイドアレイの誘導性の発現の為に、多くの場合にはugpB遺伝子プロモーターを選んだ。

#### 【0145】

インスレーター-82を燐酸プロモーターの部分集合の5'及び3'末端両方に追加して (表3)、異なる配列文脈に於ける一貫した性能を助けた。リードスルー転写を縮減する

為に、固有のターミネーターを各インスレーター付きプロモーターの5'末端に追加した。ターミネーター配列は<http://parts.igem.org/Terminators/Catalog>からであった。GFPuv発現を用いて、エムツーピーラプス・ゲーエムベーパー (m2p-labs GmbH) Biololector (商標) に依って、インスレーター付き燐酸プロモーターを類似にキャラクタリゼーションした (図8)。

【0146】

【表2】

表2：評価した燐酸誘導性プロモーター配列。リボソーム結合部位には下線を引き、遺伝子 (GFPuv) の開始コドンは緑で示されている。

| プロモーター名称 | 配列   | 配列番号 |
|----------|--|------|
| ugpBp    | TCTTTCTGACACCTTACTATCTTACAAATGTAACAAAAAAGTT<br>ATTTTCTGTAATTCGAGCATGTCATGTTACCCCGCGAGCATA<br>AAACGCGTGTGTAGGAGGATAATCTATG  | 1    |
| yibDp    | GTGCGTAATTGTGCTGATCTCTTATATAGCTGCTCTCATTATC<br>TCTCTACCCTGAAGTGAAGTCTCTCACCTGTAAAAATAATATCT<br>CACAGGCTTAATAGTTTCTTAATACAAAGCCTGTAAAACGTCA<br>GGATAACTTCTGTGTAGGAGGATAATCTATG                  | 2    |
| phoAp    | CGATTACGTAAAGAAGTTATTGAAGCATCCTCGTCAGTAAAA<br>AGTTAATCTTTTCAACAGCTGTCATAAAGTTGTCACGGCCGA<br>GACTTATAGTCGCTTTGTTTTTATTTTTTAATGTATTTGTAGT<br>GTAGGAGGATAATCTATGGCTAGCAAAGGAGAAGAACTTTTC<br>ACATG | 3    |
| phoBp    | GCCACGGAAATCAATAACCTGAAGATATGTGCGACGAGCTTT<br>TCATAAATCTGTCATAAATCTGACGCATAATGACGTCGCATTA<br>ATGATCGCAACCTATTTATTGTGTAGGAGGATAATCTATGGCT<br>AGCAAAGGAGAAGAACTTTTCACATG                         | 4    |
| amnp     | AGACAGTCAACGCGCTTGATAGCCTGGCGAAGATCATCCGAT<br>CTTCGCCTTACACTTTTGTTCACATTTCTGTGACATACTATC<br>GGATGTGCGGTAATTGTATAGGAGGATAATCTATG  | 5    |
| ydfHp    | GCTATGCCGACTGAATGTCCACCGTCAGTAATTTTTTATACCC<br>GGCGTAACTGCCGGGTATTGCTTGTACAAAAAAGTGGTAG<br>ACTCATGCAGTAACTCACTGTGTAGGAGGATAATCTATG   | 6    |

10

20

30

【表 3】

|       |  |    |    |
|-------|--|----|----|
| mipAp | CATCCATAAATTTTGCATAATTAATGTAAAGACCAGGCTCGCC<br>AGTAACGCTAAATTCATTTGGCTGTAAGCGCGGTGTCATCCG<br>CGTCAGGAAAATTAACAGTTACTTTAAAAAATGAAAACGTA<br>AAAAGGTTGGGTTTCGATGTATTGACGGGTAAACTTTGTCCG<br>CCGCTAAACATTTGTTTGTGTAGGAGGATAATCTATG  | 7  |    |
| phoHp | AATCCTGCTGAAAGCACACAGCTTTTTTCATCACTGTCATCAC<br>TCTGTATCTTTCCAGTAGAAACTAATGTCACCTGAAATGGTGT<br>TTTATAGTTAAATATAAGTAAATATATTGTTGCAATAAATGCG<br>AGATCTGTTGTACTIONTATTAAGTAGCAGCGGAAGTTCGTGTAG<br><u>GAGGATAATCTAT</u>   | 8  |    |
| yhjCp | CTACAGAGATGACGTGTAGAAAAATAGTTACCGATATAAATAG<br>TTACAGCTAAACGCCTGAAATTACATGTCGAGGGCACTATTT<br>AAAACAATTTTGAGGATTTCCCTTATATTGGTGGTTAGTACGCA<br>TGCAATTAATAATGAAATTCGCGACCCACAAGCCAAAATAAC<br>AAACGGCAAGGAGACAAAAATAAGCACAAATAGCCAACACGT<br>CCTCTGTTCACTTTAAAGGGAATCGCTGAAAAATACGCTCTGT<br>TTAAGGGGATTCACCTTTCTCAGAAAGCTATTCCGCCCTTTTC<br>CTGCTGAGAAATCGCCACATTCGGCATGACAACTTGTGAAA<br>GTGTAGGAGGATAATCTATG | 9  | 10 |
| phoUp | ACCGAACTGAAGCAGGATTACACCGTGGTGATCGTCACCCAC<br>AACATGCAGCAGGCTGCGCGTTGTTCCGACCACACGGCGTTT<br>ATGTACCTGGGCGAATTGATTGAGTTCAGCAACACGGACGAT<br>CTGTTACCCAGTGTAGGAGGATAATCTATG   | 10 |    |
| pstSp | AAGACTTTATCTCTCTGTACATAAACTGTCATATTCCTTACAT<br>ATAACTGTCACCTGTTTGTCCCTATTTTGTCTCTCGTAGCCAAC<br>AAACAATGCTTTATGAGTGTAGGAGGATAATCTATGGCTAGC<br>AAAGGAGAAGAACTTTTTCACATG  | 11 | 20 |
| phoEp | AGCATGGCGTTTTTGTGCGCGGGATCAGCAAGCCTAGCGGCA<br>GTTGTTTACGCTTTTATTACAGATTTAATAAATTACCACATTT<br>TAAGAATATTATTAATCTGTAATATATCTTTAACAATCTCAGG<br>TTAAAAACTTTCTGTTTTCAACGGGACTCTCCCCTGGTGTAG<br><u>GGAGGATAATCTATG</u>   | 12 |    |

【 0 1 4 7 】

【表 4】

表 3 : インスレーター付きプロモーター配列。インスレーター配列は斜体化されている。- 3 5  
及び- 1 0 ボックスは太字で強調し、下線を引いている。

| インスレーター付き<br>プロモーター | 配列  | 配列<br>番号 |
|---------------------|---|----------|
| BBa_B0015_IN_yibDp  | CCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTG<br>GGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTGCGGTGAACGCTCTCT<br>ACTAGAGTCACACTGGCTCACCTTCGGGTGGGCCTTTCTG<br>CGTTTATA <i>CACAGCTAACACCAGTCGTCCCTATCTGCTGC</i><br><i>CCTAGGTCTATGAGTGGTTGCTGGATAACGTGCGTAATTG</i><br>TGCTGATCTCTTATATAGCTGCTCTCATTATCTCTCTACCC<br>TGAAGT <b>GACT</b> CTCTCACCTGAAAAATAATATCTCACAGGC<br><b>TTAATA</b> GTTTCTTAATACAAAGCCTGAAAACGTCAGGATA<br>ACTTCT <i>ATATTCAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTACAA</i><br><i>ATAATTTTGTTTAACTTT</i> | 13       |
| BBa_B1002_IN_phoBp  | CGCAAAAACCCCGCTTCGGCGGGGTTTTTTTCGCACGTCT<br>CCATCGCTTGCCCAAGTTGTGAAG <i>CACAGCTAACACCACG</i><br><i>TCGTCCCTATCTGCTGCCCTAGGTCTATGAGTGGTTGCTG</i><br><i>GATAACGCCACGGAAATCAATAACCTGAAGATATGTGCGA</i><br>CGAGCTTT <b>TTTCATA</b> AAATCTGTCATAAAATCTGACG <b>CATAAT</b> G<br>CGTCGCATTAATGATCGCAACCTATTTATTATATTCAGGGA<br><i>GACCACAACGGTTTCCCTCTACAAATAATTTTGTTTAACTT</i><br><i>T</i>   | 14       |

30

40

【表 5】

|                    |  |    |
|--------------------|--|----|
| BBa_B1004_IN_mipAp | CGCCGAAAACCCCGCTTCGGCGGGGTTTTGCCGCACGTCT<br>CCATCGCTTGCCCAAGTTGTGAAG CACAGCTAACACCACG<br>TCGTCCCTATCTGCTGCCCTAGGTCTATGAGTGGTTGCTG<br>GATAACCATCCATAAATTTGCATAATTAATGTAAAGACCA<br>GGCTCGCCAGTAACGCTAAATTCATTTGGCTGTAAGCGCG<br>GTGTCATCCGCGTCAGGAAAATTAACAGTTACTTTAAAAA<br>ATGAAAACGTAAAAAGGTTGGGTTTCGATGTATTGACGGG<br><b>TAAAC</b> TTTGTGCCCCGCTAAACATTTGTTTATATTCAGGGA<br>GACCACAACGGTTTCCCTCTACAAATAATTTGTTTAACTT<br>T        | 15 |
| BBa_B1006_IN_phoUp | AAAAAAAAACCCCGCCCCTGACAGGGCGGGGTTTTTTTTTA<br>CGTCTCCATCGCTTGCCCAAGTTGTGAAG CACAGCTAACCA<br>CCACGTCGTCCCTATCTGCTGCCCTAGGTCTATGAGTGGT<br>TGCTGGATAACACCGAACTGAAGCAGGATTACACCGTGGT<br>GATCGTCACCCACAACATGCAGCAGGCTGCGCGTTGTTCC<br>GACCAC <b>CGGGCGT</b> TTATGTACCTGGGCGAATT <b>GATTGAGT</b><br>TCAGCAACACGGACGATCTGTTCCACCAATATTCAGGGAGA<br>CCACAACGGTTTCCCTCTACAAATAATTTGTTTAACTTT   | 16 |
| BBa_B1010_IN_phoHp | CGCCGCAAACCCCGCCCCTGACAGGGCGGGGTTTCGCCGC<br>ACGTCTCCATCGCTTGCCCAAGTTGTGAAG CACAGCTAAC<br>ACCA <b>CGTCGTCCCTATCTGCTGCCCTAGGTCTATGAGTGG</b><br><b>TTGCTGGATAACAATCCTGCTGAAAGCACACAGCTTTTTTC</b><br>ATCACTGTCATCACT <b>CTGTCATCTTTCCAGTAGAAAATAAT</b><br><b>GTCACTGAAATGGTGT</b> TTTTATAGTTAAATATAAGTAAATAT<br>ATTGTTGCAATAAATGCGAGATCTGTTGTACTTATTAAGTA<br>GCAGCGGAAGTTCATATTCAGGGAGACCACAACGGTTTCC<br>CTCTACAAATAATTTGTTTAACTTT | 17 |

10

20

## 【0148】

## 第2節：恒常的プロモーター

色々な強さの一連のインスレーター付き恒常的プロモーターが恒常的発現に用いられ、デビス (Davis) 等から直接的に取られ、proA、proB、proC、proDプロモーター<sup>8 2</sup>及びHCEpプロモーター<sup>8 3</sup>を包含した。インスレーターをHCEpプロモーターの5'及び3'に追加した。インスレーター付き燐酸プロモーターと類似に、固有のターミネーターを恒常的プロモーターの5'末端に追加した。これ等は、増殖連動型生産株に依る恒常的な経路発現を駆動する為に、及び恒常的な異種的な遺伝子発現が適切である株改変を成す為に用いた。これ等のプロモーター配列は下の表4に依って与えられており、プロモーターはGFPUV発現を用いてキャラクタリゼーションされている(図9)。

30

## 【0149】

## 【表 6】

表4：恒常的プロモーター配列。

| プロモーター         | 配列  | 配列番号 |
|----------------|---|------|
| BBa_B1004_proA | CGCCGAAAACCCCGCTTCGGCGGGGTTTTGCCGCACGTCT<br>CCATCGCTTGCCCAAGTTGTGAAGCACAGCTAACACCACG<br>TCGTCCCTATCTGCTGCCCTAGGTCTATGAGTGGTTGCTG<br>GATAACTTTACGGGCATGCATAAGGCTCGTAGGCTATATT<br>CAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTACAAATAATTTGTT<br>TAACTTT | 18   |

40

【表 7】

|                   |  |    |
|-------------------|--|----|
| BBa_B1006_proB    | AAAAAAAAACCCCGCCCCTGACAGGGCGGGGTTTTTTTTTA<br>CGTCTCCATCGCTTGCCCAAGTTGTGAAGCACAGCTAACA<br>CCACGTCGTCCCTATCTGCTGCCCTAGGTCTATGAGTGGT<br>TGCTGGATAACTTTACGGGCATGCATAAGGCTCGTAATAT<br>ATATTCAGGGAGACCACAACGGTTTTCCCTCTACAAATAATT<br>TTGTTTAACTTT  | 19 |
| BBa_B1010_proC    | CGCCGCAAACCCCGCCCCTGACAGGGCGGGGTTTCGCCGC<br>ACGTCTCCATCGCTTGCCCAAGTTGTGAAGCACAGCTAAC<br>ACCACGTCGTCCCTATCTGCTGCCCTAGGTCTATGAGTGG<br>TTGCTGGATAACTTTACGGGCATGCATAAGGCTCGTATGA<br>TATATTCAGGGAGACCACAACGGTTTTCCCTCTACAAATAAT<br>TTGTTTAACTTT   | 20 |
| BBa_B1002_proD    | CGCAAAAACCCCGCTTCGGCGGGGTTTTTTTCGCACGTCT<br>CCATCGCTTGCCCAAGTTGTGAAGCACAGCTAACACCACG<br>TCGTCCCTATCTGCTGCCCTAGGTCTATGAGTGGTGTGCT<br>GATAACTTTACGGGCATGCATAAGGCTCGTATAATATATTC<br>AGGGAGACCACAACGGTTTTCCCTCTACAAATAATTTTGT<br>AACTTT  | 21 |
| BBa_B0015_IN_HCEp | CCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTG<br>GGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTTCGGTGAACGCTCTCT<br>ACTAGAGTCACACTGGCTCACCTTCGGGTGGGCCTTTCTG<br>CGTTTATACACAGCTAACACCACGTCGTCCCTATCTGCTGC<br>CCTAGGTCTATGAGTGGTTGCTGGATAACCTCCTTCACAG<br>ATTCCCAATCTCTTGTAAATAACGAAAAAGCATCAATTA<br>AACCCATGTCTTTCTATATTCAGCAATGTTTTATAGGGGA<br>CATATTGATGAAGATGGGTATCACCTTAGTGAATTGCTATA<br>AGCTGCTCTTTTTTGTTCGTGATATACTGATAAATTGAATT<br>TTCACACTTCATATTCAGGGAGACCACAACGGTTTTCCCTCT<br>ACAAATAATTTTGTTTAACTTT | 22 |

10

20

## 【0150】

## 第3節：染色体改変されたホスト株

図11は各染色体改変を図示している。本研究に利用及び/又は構築した株は表5に挙げられている。表6及び7は株構築及び/又は確認に用いたオリゴヌクレオチド及び合成DNA配列を挙げている。図12及び図13A~Eは1L発酵に於けるコントロール株について増殖速度及び増殖の間のグルコース分配を示している。

30

## 【0151】

## 【表 8】

表5：染色体改変された株のリスト。

| 株            | 遺伝子型  | ソース  |
|--------------|---|------|
| BW25113 (wt) | F <sup>-</sup> , λ <sup>-</sup> , Δ(araD-araB)567, lacZ4787(del)::rrnB-3, rph-1, Δ(rhaD-rhaB)568, hsdR514 | CGSC |
| JW3197-1     | BW25113, sspB756(del)::kan  | 53   |
| Bwapldf      | BW25113, ΔackA-pta, ΔpoxB, ΔpflB, ΔldhA, ΔadhE  | 39   |

40



【表 9】

|           |  |     |
|-----------|--|-----|
| DLF_0001  | BWapldf, ΔiclR, ΔarcA  | 本研究 |
| DLF_0002  | BWapldf, ΔiclR, ΔarcA, ΔsspB::frt  | 本研究 |
| DLF_0025  | DLF_0002, Δcas3::tm-ugpb-sspB-pro-casA(N2S)  | 本研究 |
| DLF_0028  | DLF_0025, fabI-DAS+4-gentR   | 本研究 |
| DLF_0031  | DLF_0025, lpd-DAS+4-gentR  | 本研究 |
| DLF_0038  | DLF_0025, fabI-DAS+4-gentR, udhA-DAS+4-bsdR  | 本研究 |
| DLF_0039  | DLF_0025, fabI-DAS+4-gentR, gltA-DAS+4-zeoR  | 本研究 |
| DLF_0040  | DLF_0025, fabI-DAS+4-gentR, zwf-DAS+4-bsdR   | 本研究 |
| DLF_0041  | DLF_0025, lpd-DAS+4-gentR, gltA-DAS+4-zeoR   | 本研究 |
| DLF_0042  | DLF_0025, lpd-DAS+4-gentR, udhA-DAS+4-bsdR   | 本研究 |
| DLF_0043  | DLF_0025, gltA-DAS+4-zeoR  | 本研究 |
| DLF_0044  | DLF_0025, gltA-DAS+4-zeoR, zwf-DAS+4-bsdR  | 本研究 |
| DLF_0045  | DLF_0025, gltA-DAS+4-zeoR, udhA-DAS+4-bsdR   | 本研究 |
| DLF_0046  | DLF_0025, fabI-DAS+4-gentR, gltA-DAS+4-zeoR, zwf-DAS+4-bsdR                              | 本研究 |
| DLF_0047  | DLF_0025, fabI-DAS+4-gentR, gltA-DAS+4::zeoR, udhA-DAS+4-bsdR                            | 本研究 |
| DLF_0048  | DLF_0025, lpd-DAS+4-gentR, gltA-DAS+4-zeoR, zwf-DAS+4-bsdR                               | 本研究 |
| DLF_0049  | DLF_0025, lpd-DAS+4-gentR, gltA-DAS+4-zeoR, udhA-DAS+4-bsdR                              | 本研究 |
| DLF_0165  | DLF_0025, lpd-DAS+4-gentR, zwf-DAS+4-bsdR  | 本研究 |
| DLF_0763  | DLF_0025, udhA-DAS+4-bsdR  | 本研究 |
| DLF_01002 | DLF_0025, zwf-DAS+4-bsdR   | 本研究 |
| DLF_01517 | DLF_0012, Δcas3::pro-casA(N2S)   | 本研究 |
| DLF_01530 | DLF_0025, fabI-DAS+4-gentR, udhA-DAS+4-bsdR, zeoR-proDp-gapN-zeoR                        | 本研究 |
| DLF_01531 | DLF_0025, fabI-DAS+4-gentR, udhA-DAS+4-bsdR, gltA-DAS+4-purR                             | 本研究 |
| DLF_01532 | DLF_0025, fabI-DAS+4-gentR, udhA-DAS+4-bsdR, gapA-DAS+4-zeoR-proDp-gapN                  | 本研究 |
| DLF_01533 | DLF_0025, fabI-DAS+4-gentR, udhA-DAS+4-bsdR, gapA-DAS+4-zeoR-proDp-gapN, gltA-DAS+4-purR | 本研究 |
| DLF_01536 | DLF_0025, fabI-DAS+4-gentR, udhA-DAS+4-bsdR, zeoR-proDp-gapN, gltA-DAS+4-purR            | 本研究 |
| DLF_01537 | DLF_0025, fabI-DAS+4-gentR, udhA-DAS+4-bsdR, gapA-DAS+4-zeoR                             | 本研究 |

10

20

30

【表 10】

|           |   |     |
|-----------|---|-----|
| DLF_01538 | DLF_0025, fabI-DAS+4-gentR, gltA-DAS+4-zeoR, udhA-DAS+4-bsdR, gapA-DAS+4-zeoR | 本研究 |
|-----------|---|-----|

【 0 1 5 2 】

【表 1 1】

表 6：株構築に利用したオリゴヌクレオチド。

| オリゴ         | 配列  | 配列番号 |
|-------------|---|------|
| ilcR_tetA_F | TAACAATAAAAAATGAAAATGATTTCCACGATACAGAAAAAAGA<br>GACTGTCATCCTAATTTTTGTTGACACTCTATC | 23   |
| ilcR_sacB_R | TGCCACTCAGGTATGATGGGCAGAATATTGCCTCTGCCCGCCA<br>GAAAAAGATCAAAGGGAAAACGTCCATATGC    | 24   |
| iclR_500up  | CCGACAGGGATTCCATCTG   | 25   |
| iclR_500dn  | TATGACGACCATTTTTGTCTACAGTTC   | 26   |
| arcA_tetA_F | GGACTTTTGTACTTCCTGTTTCGATTTAGTTGGCAATTTAGGTA<br>GCAAACCTCCTAATTTTTGTTGACACTCTATC  | 27   |
| arcA_sacB_R | ATAAAAACGGCGCTAAAAAGCGCCGTTTTTTTTTGACGGTGGTA<br>AAGCCGAATCAAAGGGAAAACGTCCATATGC   | 28   |
| arcA_500up  | CCTGACTGTACTAACGGTTGAG  | 29   |
| arcA_500dn  | TGACTTTTATGGCGTTCCTTGTTTTTG   | 30   |
| sspB_kan_F  | CTGGTACACGCTGATGAACACC  | 31   |
| sspB_kan_R  | CTGGTCATTGCCATTTGTGCC   | 32   |
| sspB_conf_F | GAATCAGAGCGTTCCGACCC  | 33   |
| sspB_conf_R | GTACGCAGTTTGCCAACGTG  | 34   |
| cas3_tetA_F | AATAGCCCGCTGATATCATCGATAATACTAAAAAACAGGGAG<br>GCTATTATCCTAATTTTTGTTGACACTCTATC    | 35   |
| cas3_sacB_R | TACAGGGATCCAGTTATCAATAAGCAAATTCATTTGTTCTCCTT<br>CATATGATCAAAGGGAAAACGTCCATATGC    | 36   |
| cas3_conf_F | CAAGACATGTGTATATCACTGTAATTC   | 37   |
| cas3_500dn  | GCGATTGCAGATTTATGATTTGG   | 38   |
| fabI_conf_F | GCAAATGCTGGCTCATTG  | 39   |
| gapA_conf_F | GAACTGAATGGCAAACGACTG   | 40   |
| gapA_500dn  | TGGGGATGATCGACCACA  | 41   |
| gltA_conf_F | TATCATCCTGAAAGCGATGG  | 42   |
| lpd_conf_F  | ATCTCACCGTGTGATCGG  | 43   |
| udhA_conf_F | CAAAAGAGATTCTGGGTATTCCT   | 44   |
| zwf_conf_F  | CTGCTGGAAACCATGCG   | 45   |
| zwf_500dn   | AGAGCATGTCGTTATAGGAGGTGAT   | 46   |
| ampR_intR   | AGTACTCAACCAAGTCATTCTG  | 47   |
| bsdR_intR   | GAGCATGGTGATCTTCTCAGT   | 48   |

10

20

30

【表 1 2】

|            |                         |    |
|------------|-------------------------|----|
| gentR_intR | GCGATGAATGTCTTACTACGGA  | 49 |
| purR_intR  | GTCGCTGGGTAATCTGCAA     | 50 |
| tetA_intR  | ATCAACGCATATAGCGCTAGCAG | 51 |
| zeoR_intR  | ACTGAAGCCCAGACGATC      | 52 |

【 0 1 5 3 】



【表 1 4】

|  |                               |
|--|-------------------------------|
| <p>ATGAAAAGAAACAGATAGATTTTTAGTTCTTTAGGCCCGTAGTCTGCAAAT<br/> CCTTTTATGATTTTCTATCAAACAAAAGAGGAAAATAGACCAGTTGCAATCC<br/> AAACGAGAGTCTAATAGAATGAGGTCGAAAAGTAAATCGCGCGGGTTTGT<br/> ACTGATAAAGCAGGCAAGACCTAAAATGTGTAAAGGGCAAAGTGATACTT<br/> TGGCGTCACCCCTTACATATTTTAGGTCTTTTTTATTGTGCGTAACTA<br/> GCCATCTTCAAACAGGAGGGCTGGAAGAAGCAGACCCTAACACAGTACAT<br/> AAAAAAGGAGACATGAACGATGAACATCAAAAAGTTTGCAAAACAAGCAA<br/> CAGTATTAACCTTTACTACCGCACTGCTGGCAGGAGGCGCAACTCAAGCGTT<br/> TGCGAAAAGAAACGAACCAAAAAGCCATATAAGGAAACATACGGCATTCCCA<br/> TATTACACGCCATGATATGCTGCAAATCCCTGAACAGCAAAAAAATGAAAA<br/> ATATCAAGTTCTGAGTTCGATTTCGTCCACAATTAATAATATCTCTCTGCA<br/> AAAGGCTTGACGTTTGGGACAGCTGGCCATTACAAAACGCTGACGGCACT<br/> GTCGAAACTATCACGGCTACCACATCGTCTTTCATTAGCCGGAGATCCTA<br/> AAAATGCGGATGACACATCGATTTACATGTTCTATCAAAAAGTCGGCGAAA<br/> CTTCTATTGACAGCTGGAAAAACGCTGGCCCGCTTTAAAGACAGCGACA<br/> AATTCGATGCAAATGATTCTATCCTAAAAGACCAAACACAAGAATGGTCAG<br/> GTTTCAGCCACATTTACATCTGACGGAAAAATCCGTTTATTCTACACTGATT<br/> CTCCGGTAAACATTACGGCAAACAAACTGCAACTGCACAAGTTAACGT<br/> ATCAGCATCAGACAGCTCTTTGAACATCAACGGTGTAGAGGATTATAAATC<br/> AATCTTTGACGGTGACGGAAAAACGTATCAAAAATGTACAGCAGTTCATCGA<br/> TGAAGGCAACTACAGCTCAGGCGACAACCATACGCTGAGAGATCCTCACTA<br/> CGTAGAAGATAAAGGCCACAAATACTTAGTATTTGAAGCAAACACTGGAAC<br/> TGAAGATGGCTACCAAGGCGAAGAATCTTTATTTAACAAGCATACTATGG<br/> CAAAAACACATCATTCTCCGTCAAGAAAAGTCAAAAACCTTCTGCAAAGCGA<br/> TAAAAAACGCACGGCTGAGTTAGCAAACGGCGCTCTCGGTATGATTGAGCT<br/> AAACGATGATTACACACTGAAAAAAGTGATGAAACCGCTGATTGCATCTAA<br/> CACAGTAACAGATGAAATTGAACGCGGAACGCTTTTAAATGAACGGCAA<br/> ATGGTACCTGTTCACTGACTCCCGCGGATCAAAAATGACGATTGACGGCATT<br/> ACGTCTAACGATATTTACATGCTTGGTTATGTTTCTAATTTTAACTGGCCC<br/> ATACAAGCCGCTGAACAAAACCTGGCCTTGTGTTAAAAATGGATCTTGATCCT<br/> AACGATGTAACCTTTACTTACTCACACTTCGCTGTACCTCAAGCGAAAGGAA<br/> ACAATGTCGTGATTACAAGCTATATGACAAAACAGAGGATTCTACGCAGACA<br/> AACAAATCAACGTTTGCGCCAAGCTTCTGCTGAACATCAAAGGCAAGAAAA<br/> CATCTGTTGTCAAAGACAGCATCCTTGAACAAGGACAATTAACAGTTAACA<br/> AATAAAAAACGAAAAAGAAAATGCCGATATTGACTACCGGAAGCAGTGTGAC<br/> CGTGTGCTTCTCAAATGCCTGATTGAGGCTGTCTATGTGTGACTGTTGAGCT<br/> GTAACAAGTTGTCTCAGGTGTTCAATTTTCATGTTCTAGTTGCTTTGTTTACT</p> | <p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> |
|--|-------------------------------|

【表 15】

|  |    |    |
|--|----|----|
| GGTTTCACCTGTTCTATTAGGTGTTACATGCTGTTTCATCTGTTACATTGTCGA<br>TCTGTTTCATGGTGAACAGCTTTAAATGCACCAAAAACCTCGTAAAAGCTCTGA<br>TGTATCTATCTTTTTTACACCGTTTTTCATCTGTGCATATGGACAGTTTTCCCTT<br>TGAT  |    |    |
| <b><i>ΔiclR-cure</i></b>   |    |    |
| AAATGATTTCCACGATACAGAAAAAGAGACTGTCATGGGCAGAATATTGC<br>CTCTGCCCGCCAGAAAAAG  | 54 |    |
| <b><i>ΔarcA-cure</i></b>   |    |    |
| CTGTTTCGATTTAGTTGGCAATTTAGGTAGCAAACCTCGGCTTTACCACCGTC<br>AAAAAAAACGGCGCTTTT  | 55 | 10 |
| <b><i>Δcas3-pro-casA</i></b>   |    |    |
| CAAGACATGTTATATCACTGTAATTCGATATTTATGAGCAGCATCGAAAAA<br>TAGCCCGCTGATATCATCGATAATACTAAAAAAAACAGGGAGGCTATTACCA<br>GGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTTCGTTTTA<br>TCTGTTGTTTGTTCGGTGAACGCTCTCTACTAGAGTCACACTGGCTCACCTTCG<br>GGTGGGCCTTTCTGCGTTTATATCTTTCTGACACCTTACTATCTTACAAATGT<br>AACAAAAAAGTTATTTTTCTGTAATTCGAGCATGTCATGTTACCCCGCGAGC<br>ATAAAACGCGTGTGTAGGAGGATAATCTTTGACGGCTAGCTCAGTCCTAGGT<br>ACAGTGCTAGCCATATGAAGGAGAACAAATGAATTTGCTTATTGATAACTG<br>GATCCCTGTACGCCCGCAAACGGGGGAAAGTCCAAATCATAAATCTGCA<br>ATCGCTATAC   | 56 | 20 |
| <b><i>Δcas3::ugBp-sspB-pro-casA</i></b>  |    |    |
| CAAGACATGTTATATCACTGTAATTCGATATTTATGAGCAGCATCGAAAAA<br>TAGCCCGCTGATATCATCGATAATACTAAAAAAAACAGGGAGGCTATTACCA<br>GGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTTCGTTTTA<br>TCTGTTGTTTGTTCGGTGAACGCTCTCTACTAGAGTCACACTGGCTCACCTTCG<br>GGTGGGCCTTTCTGCGTTTATATCTTTCTGACACCTTACTATCTTACAAATGT<br>AACAAAAAAGTTATTTTTCTGTAATTCGAGCATGTCATGTTACCCCGCGAGC<br>ATAAAACGCGTGTGTAGGAGGATAATCTATGGATTTGTACAGCTAACACC<br>ACGTCGTCCCTATCTGCTGCGTGCATTCTATGAGTGGTTGCTGGATAACCAG<br>CTCACGCCGCACCTGGTGGTGGATGTGACGCTCCCTGGCGTGCAGGTTCCCTA<br>TGGAATATGCGCGTGACGGGCAAATCGTACTCAACATTGCGCCGCGTGCTGT<br>CGGCAATCTGGAACCTGGCGAATGATGAGGTGCGCTTTAACGCGCGCTTTGGT<br>GGCATTCCGCGTCAGGTTTTCTGTGCCGCTGGCTGCCGTGCTGGCTATCTACG<br>CCCGTAAAAATGGCGCAGGCACGATGTTTGAGCCTGAAGCTGCCTACGATG<br>AAGATACCAGCATCATGAATGATGAAGAGGCATCGGCAGACAACGAAACC<br>GTTATGTCGGTTATTGATGGCGACAAGCCAGATCACGATGATGACACTCATC | 57 | 30 |

【表 1 6】

|   |    |
|---|----|
| CTGACGATGAACCTCCGCAGCCACCACGCGGTGGTTCGACCGGCATTACGCG<br>TTGTGAAGTAATTGACGGCTAGCTCAGTCCTAGGTACAGTGCTAGCCATATG<br>AAGGAGAACAAATGAATTTGCTTATTGATAACTGGATCCCTGTACGCCCGCG<br>AAACGGGGGAAAGTCCAAATCATAAATCTGCAATCGCTATAC  |    |
| <b>fabI-DAS+4-gentR</b>   |    |
| CTATTGAAGATGTGGGTAACCTCTGCGGCATTCCTGTGCTCCGATCTCTCTGC<br>CGGTATCTCCGGTGAAGTGGTCCACGTIGACGGCGGTTTCAGCATIGCTGCA<br>ATGAACGAACCTGAACTGAAAGCGGCCAACGATGAAAACCTATTCTGAAAAC<br>TATGCGGATGCGTCTTAATAGGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAAGTATAGGAAC<br>TTCCGAATCCATGTGGGAGTTTATTCTTGACACAGATATTTATGATATAATA<br>ACTGAGTAAGCTTAACATAAGGAGGAAAAACATATGTTACGCAGCAGCAAC<br>GATGTTACGCAGCAGGGCAGTCGCCCTAAAACAAAGTTAGGTGGCTCAAGT<br>ATGGGCATCATTCGCACATGTAGGCTCGGCCCTGACCAAGTCAAATCCATGC<br>GGGCTGCTCTTGATCTTTTCGGTCTGTGAGTTCGGAGACGTAGCCACCTACTC<br>CCAACATCAGCCGACTCCGATTACCTCGGGAACCTTGCTCCGTAGTAAGACA<br>TTCATCGCGCTTGCTGCCTTCGACCAAGAAGCGGTTGTTGGCGCTCTCGCGG<br>CTTACGTTCTGCCAAGTTTGAGCAGCCGCGTAGTGAGATCTATATCTATGA<br>TCTCGCAGTCTCCGGCGAGCACCGGAGGCAGGGCATTGCCACCGCGCTCAT<br>CAATCTCTCAAGCATGAGGCCAACCGCTTGGTGTATGTGATCTACGTG<br>CAAGCAGATTACGGTACGATCCCGCAGTGGCTCTCTATACAAAGTTGGGC<br>ATACGGGAAGAAGTGATGCACCTTTGATATCGACCCAAGTACCGCCACCTAA<br>GAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACTTCCGTTCTGTTGGTAAAGAT<br>GGGCGGCGTTCTGCCGCCGTTATCTCTGTTATACCTTTCTGATATTTGTTAT<br>CGCCGATCCGTTCTTCTCCCTTCCCGCCTTGCGTCAGG | 58 |
| <b>gapA-DAS+4-zeoR-proDp-gapN</b>   |    |
| TCTCCAAAGCGGCCAACGATGAAAACCTATTCTGAAAACCTATGCGGATGCGT<br>CTTGATTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGTATAATGCTAGCAACTTTAAAATT<br>AAAGAGGTATATATTAATGACTAAGCAATATAAGAATTACGTAAATGGGGA<br>GTGGAAGCTTTCCGAGAATGAAATTAAGATCTATGAACCAGCCAGTGGGGC<br>GGAATTGGGGTCAGTCCCGCAATGTCCACTGAAGAAGTTGACTATGTCTAC<br>GCCTCGGCCAAAAAGCGCAGCCAGCATGGCGCTCGCTTTCCTATATTGAGC<br>GTGCGGCTATTTGCACAAAGTCGCAGACATCCTGATGCGTGACAAGGAGA<br>AAATTGGAGCGGTATTGTCCAAGGAAGTAGCGAAAGGCTACAAAATCCGCAG<br>TATCGGAGGTCGTCCGCACCGCCGAGATTATTAATTATGCGGCCGAAGAAG<br>GGCTTCGCATGGAGGGTGAAGTCTTGGAGGGCGGCAGTTTGGAGCGGCAT<br>CCAAGAAAAAATCGCTGTCGTCCGTCGCGAGCCGGTGGGACTTGTGCTTG<br>CTATTAGTCGTTCAATTACCCCGTGAATCTGGCCGGCTCCAAGATTGCCCC   | 59 |

10

20

30

【表 17】

|   |           |
|---|-----------|
| <p>TGCACTGATCGCGGGCAATGTAATCGCTTTTAAACCACCGACCCAAGGATCG<br/> ATTAGTGGACTTCTTTTAGCGGAGGCGTTTTCGGGAGGCAGGTCTTCCAGCCG<br/> GCGTATTCAATACCATCACGGGGCGTGAAGTAAAATCGGGGATTACATCG<br/> TGGAGCACCAGGCAGTAAATTTTCATCAACTTCACGGGTTCCACGGGGATCG<br/> GGGAGCGTATCGGTAAGATGGCTGGGATGCGTCCGATCATGTTGGAACCTG<br/> GCGGCAAGGATAGTGCATTGTGCTGGAAGACGCAGACTTGAATTGACAG<br/> CTAAAAACATTATCGCTGGAGCCTTCGGGTATAGTGGTCAACGTTGCACGGC<br/> AGTTAAGCGCGTCTTGTATTGAAAAGTGTTCGGGATGAATTGGTCGAGAA<br/> GATTCGCGAGAAAAGTGTAGCTCTTACGATTGGAAATCCAGAGGACGATGC<br/> TGACATCACTCCATTGATCGACACGAAATCCGCGGATTACGTCGAGGGGCT<br/> GATCAACGACGCGAACGATAAGGGAGCAGCGGCTTTGACCGAGATCAAACG<br/> CGAGGGGAACCTGATCTGCCCGATTCTTTTTGACAAAAGTCACAACTGACATG<br/> CGTTGGCATGGGAAGAACCCTTCGGCCCAGTCTTGCCTATTATCCGCGTTA<br/> CTAGCGTAGAGGAAGCAATTGAAATTTCCAATAAATCCGAATATGGGTTGC<br/> AAGCGAGTATCTTTACTAACGATTTTCCACGTGCCTTTGGTATTGCGGAACA<br/> GTTAGAAGTCGGGACAGTTCACATCAACAACAAGACGCAGCGCGGGACAGA<br/> TAACTTCCCCTTTTTGGGAGCAAAGAAGTCTGGGGCTGGAATCCAAGGGGT<br/> GAAATACTCCATCGAAGCCATGACGACGGTGAAGAGCGTTGTTTTGACATC<br/> AAGTAAAACATAAGGAGGAAAAACAGATGGCGAAAACCTGACCTCGGCGGTT<br/> CCGGTCTGACGGCACGTGATGTGGCGGGCGCGGTTGAATTTTGGACGGATC<br/> GTCTGGGCTTCAGTCGTGATTTTGTGGAAGATGACTTCGCAGGCGTGTTTCG<br/> CGATGACGTCACCCTGTTTATTTCCGCAGTTCAGGATCAAGTCGTGCCGGAC<br/> AACACGCTGGCTTGGGTGTGGGTTCTGTGGCCTGGATGAACTGTATGCGGAAT<br/> GGAGCGAAGTTGTCTCTACCAATTTCCGTGACGCGAGCGGTCCGGCCATGAC<br/> GGAAATCGGCGAACAGCCGTGGGGTCGCGAATTTGCTCTGCGTGACCCGGC<br/> TGGCAACTGTGTCCATTTCTGTGGCTGAAGAACAAGATTGAGTTGAGATGAC<br/> ACTGTGATCTAAAAAGAGCGACTTCGGTCGCTCTTTTTTTTACCTGA</p> |           |
| <p><b>gapA- zeoR-proDp-gapN</b></p>   |           |
| <p>ACGAAACCGGTTACTCCAACAAAGTTCTGGACCTGATCGCTCACATCTCCAA<br/> ATGATTGACAGCTAGCTCAGTCCAGGTATAATGCTAGCAACTTTAAAATTA<br/> AAGAGGTATATATTAATGACTAAGCAATATAAGAATTACGTAAATGGGGAG<br/> TGGAAGCTTTCGGAGAATGAAATTAAGATCTATGAACCAGCCAGTGGGGCG<br/> GAATTTGGGGTCAGTCCCAGCAATGTCCACTGAAGAAGTTGACTATGTCTACG<br/> CCTCGGCCAAAAAAGCGCAGCCAGCATGGCGCTCGCTTTCCTATATTGAGCG<br/> TGCGGCTTATTTGCACAAAGTCGCAGACATCCTGATGCGTGACAAGGAGAA<br/> AATTGGAGCGGTATTGTCCAAGGAAGTAGCGAAAGGCTACAAATCCGCAGT<br/> ATCGGAGGTCGTCCGCACCGCCGAGATTATTAATTATGCGGCCGAAGAAGG</p>  | <p>60</p> |

10

20

30

【表 1 8】

|   |    |
|---|----|
| GCTTCGCATGGAGGGTGAGGTCTTGGAGGGCGGCAGTTTTGAGGCGGCATC<br>CAAGAAAAAATCGTGTCTGTCGTCGCGAGCCGGTGGGACTTGTGCTTGCT<br>ATTAGTCGTTCAATTACCCGTGAATCTGGCCGGCTCCAAGATTGCCCTG<br>CACTGATCGCGGGCAATGTAATCGCTTTTAAACCACCGACCCAAGGATCGAT<br>TAGTGGACTTCTTTTAGCGGAGGCGTTTGCAGGAGCAGGCTTCCAGCCGGC<br>GTATTCAATACCATCACGGGGCGTGAAGTAAAATCGGGGATTACATCGTG<br>GAGCACCAGGCAGTAAATTTTCATCAACTTCACGGGTTCCACGGGGATCGGG<br>GAGCGTATCGGTAAGATGGCTGGGATGCGTCCGATCATGTTGGAAC TTGGC<br>GGCAAGGATAGTGCATTGTGCTGGAAGACGCAGACTTGAATTGACAGCT<br>AAAAACATTATCGCTGGAGCCTTCGGGTATAGTGGTCAACGTTGCACGGCA<br>GTAAAGCGCTTCTTGTATGAAAAGTGTGCGGGATGAATTGGTCGAGAAG<br>ATTCGCGAGAAAAGTGTAGCTTTACGATTGAAAATCCAGAGGACGATGCT<br>GACATCACTCCATTGATCGACACGAAATCCGCGGATTACGTCGAGGGGCTG<br>ATCAACGACCGAACGATAAGGGAGCAGCGGCTTTGACCGAGATCAAACGC<br>GAGGGGAACCTGATCTGCCGATTCTTTTGAACAAGTCACA ACTGACATGC<br>GCTTGGCATGGGAAGAACCCTTCGGCCAGTCTTGCCTATTATCCGCGTTAC<br>TAGCGTAGAGGAAGCAATTGAAAATTTCCAATAAATCCGAATATGGGTTGCA<br>AGCGAGTATCTTACTAACGATTTTCCACGTGCCTTTGGTATTGCGGAACAG<br>TTAGAAGTCGGGACAGTTACATCAACAACAAGACGCAGCGCGGGACAGAT<br>AACTTCCCTTTTTGGGAGCAAAGAAGTCTGGGGCTGGAATCCAAGGGGTG<br>AAATACTCCATCGAAGCCATGACGACGGTGAAGAGCGTTGTTTTTGACATCA<br>AGTAAAACATAAGGAGGAAAAACAGATGGCGAAACTGACCTCGGCGGTTC<br>GGTTCGACGGCACGTGATGTGGCGGGCGCGGTTGAATTTTGGACGGATCGT<br>CTGGGCTTCAGTCGTGATTTTGTGGAAGATGACTTCGCAGGCGTGGTTTCGCG<br>ATGACGTCACCCTGTTTATTTCCGAGTTCAGGATCAAGTCGTGCCGGACAA<br>CACGCTGGCTTGGGTGTGGGTTCTGTGCCTGGATGAACTGTATGCGGAATGG<br>AGCGAAGTTGTCTCTACCAATTTCCGTGACGCGAGCGGTCCGGCCATGACGG<br>AAATCGGCGAACAGCCGTGGGGTCGCGAATTTGCTCTGCGTGACCCGGCTG<br>GCAACTGTGTCCATTTCTGGCTGAAGAACAAGATTGAGTTGAGATGACACT<br>GTGATCTAAAAAGAGCGACTTCGGTCGCTTTTTTTTACCTGA |    |
| <b>gapA-DAS+4-zeoR</b>  |    |
| TCTACCGATTTCAACGGCGAAGTTTGCACCTCCGTGTTTCGATGCTAAAGCTG<br>GTATCGCTCTGAACGACAACCTTCGTGAAACTGGTATCCTGGTACGACAACGA<br>AACCGGTTACTCCAACAAAGTTCTGGACCTGATCGCTCACATCTCCAAAGCG<br>GCCAACGATGAAAATATTCTGAAAATATGCGGATGCGTCTTGATCCTGAC<br>GGATGGCCTTTTTGCGTTTCTACAAACTCTTTTTGTTATTTTTCTAAATACAT<br>TCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAAT   | 61 |

10

20

30



【表 19】

|  |    |    |
|--|----|----|
| <p>ATTGAAAAAGGAAGAGTAATGGCGAAACTGACCTCGGCGGTTCCGGTCTG<br/> ACGGCACGTGATGTGGCGGGCGCGGTTGAATTTTGGACGGATCGTCTGGGC<br/> TTCAGTCGTGATTTTGTGGAAGATGACTTCGCAGGCGTGGTTCGCGATGACG<br/> TCACCCTGTTTATTCCCGCAGTTCAGGATCAAGTCGTGCCGGACAACACGCT<br/> GGCTTGGGTGTGGGTTTCGTGGCCTGGATGAACTGTATGCGGAATGGAGCGA<br/> AGTTGTCTCTACCAATTTCCGTGACGCGAGCGGTCCGGCCATGACGGAAATC<br/> GGCGAACAGCCGTGGGGTTCGCGAATTTGCTCTGCGTGACCCGGCTGGCAAC<br/> TGTGTCCATTTTCGTGGCTGAAGAACAAGATTGAGTTGAGATGACACTGTGAT<br/> CTAAAAAGAGCGACTTCGGTTCGCTCTTTTTTTTACCTGATAAAATGAAGTTA<br/> AAGGACTGCGTCATGATTAAGAAAATTTTGGCCCTCCGGTCATCGAACAAA<br/> TCTCCCTGTCTCTCCCGTCGTAACCTGGATGAACTGGACCTCATTGTGGTC<br/> GATCATCCCCAGGTAAAAGCCTCT</p>   |    | 10 |
| <p><b>gltA-DAS+4-ampR</b></p>  |    |    |
| <p>GTATTCGGTCTTCCATGTTACCGTCAATTTTCGCAATGGCACGTACCGTTGGC<br/> TGGATCGCCACTGGAGCGAAATGCACAGTGACGGTATGAAGATTGCCCGT<br/> CCGCGTCAGCTGTATACAGGATATGAAAAACGCGACTTTAAAAGCGATATC<br/> AAGCGTGCGGCCAACGATGAAAACTATTCTGAAAACTATGCGGATGCGTCT<br/> TAATAGTCTGACGGATGGCCTTTTTGCGTTTCTACAAACTCTTTTTGTTTAT<br/> TTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATA<br/> AATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGT<br/> GTCGCCCTTATCCCTTTTTTGGCGCATTTTGCCTTCTGTTTTGCTCACCCA<br/> GAAACGCTGGTGAAGTAAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTG<br/> GGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCC<br/> CCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGC<br/> GGTATTATCCCGTGTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACA<br/> CTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAGTACAGAAAAGCATCTT<br/> ACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGT<br/> GATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAG<br/> CTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGATCGTT<br/> GGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATAACAAACGACGAGCGTGACACCACG<br/> ATGCCTACAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAAGTGGCGAACTA<br/> CTTACTCTAGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAA<br/> GTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTG<br/> ATAAATCTGGAGCCGGTGGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGG<br/> GGCCAGATGGTAAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTC<br/> AGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCAC<br/> TGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACTAATGGTTGATTGCTAAGTTGTAAAT</p> | 62 | 20 |
|  |    | 30 |



【表 2 1】

|  |    |    |
|--|----|----|
| GAGGTCGTGTCCACGAACTCCGGGACGCTCCGGGCCGGCCATGACCGAG<br>ATCGGCGAGCAGCCGTGGGGGCGGGAGTTCGCCCTGCGCGACCCGGCCGGC<br>AACTGCGTGCACTTTGTGGCAGAGGAGCAGGACTGAGGATAAGTAATGGTT<br>GATTGCTAAGTTGTAAATATTTTAACCCGCCGTTTCATATGGCGGGTTGATTTT<br>TATATGCCTAAACACAAAAAATTGTAATAAATAAATCCATTAACAGACCTA<br>TATAGATATTTAAAAAGAATAGAACAGCTCAAATTATCAGCAACCCAATAC<br>TTTCAATTA AAAA ACTTCATGGTAGTCGCATTATAACCCCTATGAAA   |    |    |
| <b>lpd-DAS+4-gentR</b>   |    |    |
| GCGGCGAGCTGCTGGGTGAAATCGGCCTGGCAATCGAAATGGGTTGTGATG<br>CTGAAGACATCGCACTGACCATCCACGCGCACCCGACTCTGCACGAGTCTGT<br>GGGCTGGCGGCAGAAAGTTCGAAGGTAGCATTACCGACCTGCCGAACCC<br>GAAAGCGAAGAAGAAGGCGGCCAACGATGAAAATATTCTGAAAATATG<br>CGGATGCGTCTTAATAGCGAATCCATGTGGGAGTTTATTCTTGACACAGATA<br>TTTATGATATAATAACTGAGTAAGCTTAACATAAGGAGGAAAAACATATGT<br>TACGCAGCAGCAACGATGTTACGCAGCAGGGCAGTCGCCCTAAAACAAAGT<br>TAGGTGGCTCAAGTATGGGCATCATTGCGACATGTAGGCTCGGCCCTGACCA<br>AGTCAAATCCATGCGGGCTGCTCTTGATCTTTTCGGTTCGTGAGTTCGGAGAC<br>GTAGCCACCTACTCCCAACATCAGCCGGACTCCGATTACCTCGGGAACCTTGC<br>TCCGTAGTAAGACATTCATCGCGCTTGCTGCCTTCGACCAAGAAGCGGTTGT<br>TGGCGCTCTCGCGCTTACGTTCTGCCAAGTTTGAGCAGCCGCGTAGTGAG<br>ATCTATATCTATGATCTCGCAGTCTCCGGCGAGCACCGGAGGCAGGGCATTG<br>CCACCGCGCTCATCAATCTCCTCAAGCATGAGGCCAACGCGCTTGGTGCTTA<br>TGTGATCTACGTGCAAGCAGATTACGGTGACGATCCCGCAGTGGCTCTCTAT<br>ACAAAAGTTGGGCATACGGGAAGAAGTGATGCACTTTGATATCGACCCAAGT<br>ACCGCCACCTAATTTTTCGTTTTGCCGGAACATCCGGCAATTA AAAA AAGCGGC<br>TAACCACGCCGCTTTTTTACGTCTGCAATTTACCTTTCCAGTCTTCTTGCTC<br>CACGTTTCAGAGAGACGTTTCGCATACTGCTGACCGTTGCTCGTTATTCAGCCT<br>GACAGTATGGTTACTGTC | 65 | 10 |
| <b>udhA-DAS+4-bsdR</b>   |    |    |
| TCTGGGTATTCAGTCTTTGGCGAGCGCGCTGCCGAAATTATTCATATCGGT<br>CAGGCGATTATGGAACAGAAAGGTGGCGGCAACACTATTGAGTACTTCGTC<br>AACACCACCTTTAACTACCCGACGATGGCGGAAGCCTATCGGGTAGCTGCG<br>TTAAACGGTTTTAAACCGCTGTTTTCGGCCAACGATGAAAATATTCTGAAA<br>ACTATGCGGATGCGTCTTAATAGTTGACAATTAATCATCGGCATAGTATATC<br>GGCATAGTATAATACGACTCACTATAGGAGGGCCATCATGAAGACCTTCAA<br>CATCTCTCAGCAGGATCTGGAGCTGGTGGAGGTCGCCACTGAGAAGATCAC<br>CATGCTCTATGAGGACAACAAGCACCATGTCCGGGCGGCCATCAGGACCAA  | 66 | 20 |
|  |    | 30 |

【表 2 2】

|  |    |    |
|--|----|----|
| GACTGGGGAGATCATCTCTGCTGTCCACATTGAGGCCTACATTGGCAGGGTC<br>ACTGTCTGTGCTGAAGCCATTGCCATTGGGTCTGCTGTGAGCAACGGGCAGA<br>AGGACTTTGACACCATTGTGGCTGTCAGGCACCCCTACTCTGATGAGGTGGA<br>CAGATCCATCAGGGTGGTCAGCCCCGTGGCATGTGCAGAGAGCTCATCTCT<br>GACTATGCTCCTGACTGCTTTGTGCTCATTGAGATGAATGGCAAGCTGGTCA<br>AAACCACCATTTAGGAACTCATCCCCCTCAAGTACACCAGGAACTAAAGTA<br>AAACTTTATCGAAATGGCCATCCATTCTTGCGCGGATGGCCTCTGCCAGCTG<br>CTCATAGCGGCTGCGCAGCGGTGAGCCAGGACGATAAACAGGCCAATAGT<br>GCGGCGTGGTTCCGGCTTAATGCACGG  |    |    |
| <b>zwf-DAS+4-bsdR</b>  |    |    |
| GAAGTGGAAGAAGCCTGGAAATGGGTAGACTCCATTACTGAGGCGTGGGCG<br>ATGGACAATGATGCGCCGAAACCGTATCAGGCCGGAACCTGGGGACCCGTT<br>GCCTCGTGGCGATGATTACCCGTGATGGTTCGTTCCCTGGAATGAGTTTGAGG<br>CGGCCAACGATGAAAATATTCTGAAAATATGCGGATGCGTCTTAATAGTT<br>GACAATTAATCATCGGCATAGTATATCGGCATAGTATAATACGACTCACTAT<br>AGGAGGGCCATCATGAAGACCTTCAACATCTCTCAGCAGGATCTGGAGCTG<br>GTGGAGGTGCGCACTGAGAAGATCACCATGCTCTATGAGGACAACAAGCAC<br>CATGTGCGGGCGGCCATCAGGACCAAGACTGGGGAGATCATCTCTGCTGTC<br>CACATTGAGGCCTACATTGGCAGGGTCACTGTCTGTGCTGAAGCCATTGCCA<br>TTGGGTCTGCTGTGAGCAACGGGCAGAAGGACTTTGACACCATTGTGGTGT<br>CAGGCACCCCTACTCTGATGAGGTGGACAGATCCATCAGGGTGGTCAGCCC<br>CTGTGGCATGTGCAGAGAGCTCATCTCTGACTATGCTCCTGACTGCTTTGTG<br>CTCATTGAGATGAATGGCAAGCTGGTCAAACACCATTGAGGAACTCATC<br>CCCCCAAGTACACCAGGAACTAAAGTAATATCTGCGCTTATCCTTTATGGT<br>TATTTTACCGGTAACATGATCTTGCGCAGATTGTAGAACAATTTTTACACTTT<br>CAGGCCTGTCGGATTACCCACGAGGCTTTTTTTATTACACTGACTGAAA<br>CGTTTTTGCCCTATGAGCTCCGGTTACAGGCGTTTCAGTCATAAATCCTCTGA<br>ATGAAACGCGTTGTGAATC | 67 | 10 |
| <b>dadX-DAS+4-purR</b>   |    |    |
| GCGTGCGCACCATGACGGTGGGGACCGTCTCGATGGATATGCTAGCGGTGCG<br>ATTTAACGCCTTGCCCGCAGGCGGGTATTGGTACGCCGGTTGAGCTGTGGGG<br>CAAGGAGATCAAAATTGATGATGTCGCCGCCGCTGCCGGAACGGTGGGCTA<br>TGAGTTGATGTGCGCGCTGGCGCTACGCGTCCCGGTTGTGACGGTGGCGGCC<br>AACGATGAAAATATTCTGAAAATATGCGGATGCGTCTTAATCCTGACGG<br>ATGGCCTTTTTGCGTTTCTACAAACTCTTTTTGTTATTTTTCTAAATACATTC<br>AAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATAT<br>TGAAAAGGAAGAGTATGACTGAATACAAGCCCACGGTACGCTTGGCGACG  | 68 | 20 |
|  |    | 30 |

## 【表 2 3】

|   |  |
|---|--|
| CGCGACGATGTTCCCCGCGCTGTTTCGTACATTAGCTGCGGCCTTTGCAGATT<br>ACCCAGCGACGCGCCATACGGTCGATCCGGACCGCCATATCGAGCGTGTCA<br>CAGAATTGCAGGAACTTTTCTTAACTCGCGTGGGCCTTGACATCGGAAAGGT<br>CTGGGTGGCTGACGATGGCGCTGCAGTGGCTGTTTGGACCACTCCGGAGAG<br>TGTAGAGGCTGGTGCAGTGTTCGCCGAAATTGGTCCTCGTATGGCCGAATTA<br>AGTGGAAGTCGTCTGGCAGCCCAACAACAATGGAAGGGTTGCTTGCGCC<br>CACCGTCCGAAAGAACCCGCGTGGTTCCTTGCCACCGTTGGAGTAAGCCCA<br>GATCACCAGGGGAAGGGTTTAGGATCTGCCGTAGTTTTACCAGGTGTGGAG<br>GCAGCAGAACGTGCGGGAGTTCGGCCCTTCTTGAGACGTCGGCGCCGCGC<br>AATTTACCGTTTTACGAACGTCTTGGATTCACCGTTACGGCGGACGTGGAGG<br>TGCCGGAGGGACCCCGTACTTGGTGTATGACTCGTAAACCGGGAGCCTGAT<br>AACTTGTTGTAAGCCGGATCGGAGGCAACGTCTTCTGGGTGCAAAAAAATC<br>ATCCATCCGGCTGGTCAGCAACTGTAGTTGTTAATGTGACAGAGCCATTGCC<br>CATGATAGTGTCCATTAAGGATGGACACTATTTCCCCGGAACCTGAACTC<br>ACCGCACAGGCGTTCTACATAAAACGCTTACGCTTCATTGTTGACTC |  |
|---|--|

10

## 【 0 1 5 4】

第 4 節：蛋白質レベルの動的コントロール。

蛍光蛋白質及びサイレンシングガイドを発現するプラスミドを、表 8 に挙げられている  
対応する宿主株に形質転換した。株をエムツーピーラプス・ゲーエムベーハー (m2p-lab  
bs GmbH) Biolector (商標) に依ってトリプリケートで評価した。これは、GFPuv  
及び mCherry レベルを包含する蛍光とバイオマスレベルとを同時に測定する。

20

## 【表 2 4】

表 8：蛋白質レベルの動的コントロールに用いた株

| 微生物     | 合成的な代謝調節弁     | プラスミド   | 宿主株       |
|---------|---------------|---|-----------|
| E. coli | RFP コントロール    | pCDF-mcherry1+pSMART-IN:yibDp-GFPuv               | DLF_0002  |
|         | 蛋白質分解         | pCDF-mcherry2+pSMART-IN:yibDp-GFPuv               | DLF_0025  |
|         | サイレンシング       | pCDF-mcherry1+pCASCADE-proD+pSMART-IN:yibDp-GFPuv | DLF_01517 |
|         | 蛋白質分解+サイレンシング | pCDF-mcherry2+pCASCADE-proD+pSMART-IN:yibDp-GFPuv | DLF_0025  |

30

## 【 0 1 5 5】

OD600 読取り値は下の式を用いて補正し、此处で OD600 はオフライン測定を言  
い、OD600\* は Biolector バイオマス読取り値を言い、t0 は始点を指示し  
、tf は終点を指示する。

## 【数 2】

$$\text{式 S1: } OD600_t = (OD600_t^* - OD600_{t_0}^*) * \frac{(OD600_{t_f} - OD600_{t_0})}{(OD600_{t_f}^* - OD600_{t_0}^*)} + 0.25$$

40

## 【 0 1 5 6】

第 5 節：代謝コントロール

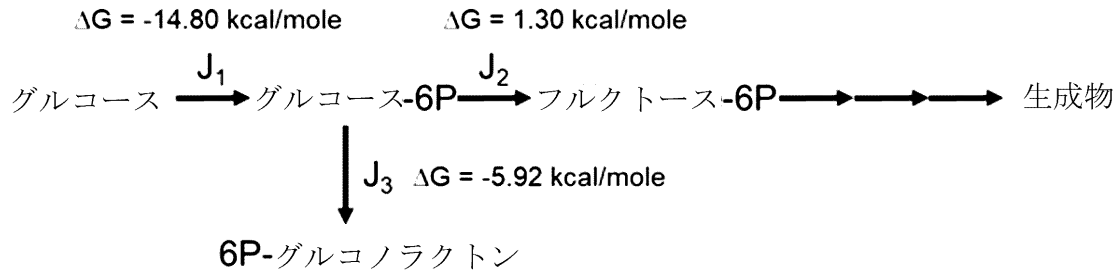
平衡に近い反応

平衡に近い反応の代謝物質プールへの調節弁のインパクトを、G6P ノードを例として  
用いて例示する。略語：Gluc, グルコース；G6P, グルコース 6 燐酸；F6P, フ  
ルクトース 6 燐酸；6PGl, グルコノラクトン 6 燐酸。

## 【 0 1 5 7】

調節弁無しの G6P ノード

【数3】



10

式 S2: 定常状態物質収支  $J_1 = J_2 + J_3$

式 S3: 正味フラックス  $= J_i = e^{\frac{-dG}{RT}} - 1$

式 S4:  $e^{\frac{-dG1}{RT}} - 1 = e^{\frac{-dG2}{RT}} - 1 + e^{\frac{-dG3}{RT}} - 1$

式 S5:  $e^{\frac{-dG1}{RT}} = e^{\frac{-dG2}{RT}} + e^{\frac{-dG3}{RT}} - 1$

20

式 S6:  $Keq1 = Keq2 + Keq3 - 1$

式 S7:  $Keq1 + 1 = Keq2 + Keq3$

式 S8:  $\frac{[G6P]}{[Gluc]} + 1 = \frac{[F6P]}{[G6P]} + \frac{[6PGI]}{[G6P]}$

30

式 S9:  $\frac{[G6P]}{[Gluc]} + 1 = \frac{[F6P] + [6PGI]}{[G6P]}$

式 S10:  $\frac{[G6P]^2}{[Gluc]} + [G6P] = [F6P] + [6PGI]$

式 S11:  $[F6P] = \frac{[G6P]^2}{[Gluc]} + [G6P] - [6PGI]$

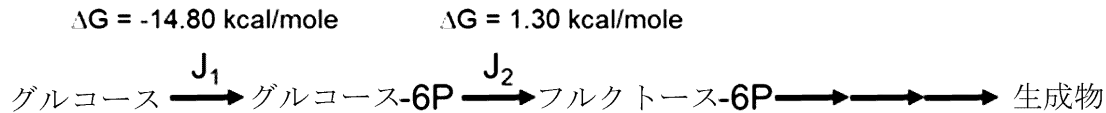
40

【0158】

調節弁有りの G6P ノード

z w f 調節弁が作動中である時に、 $J_3 = 0$ 。

【数4】



$$\text{式 S12: 定常状態物質収支 } J_1 = J_2$$

$$\text{式 S13: 正味フラックス} = J_i = e^{\frac{-dG}{RT}} - 1 \quad 10$$

$$\text{式 S14: } e^{\frac{-dG_1}{RT}} - 1 = e^{\frac{-dG_2}{RT}} - 1$$

$$\text{式 S15: } Keq_1 = Keq_2$$

$$\text{式 S16: } \frac{[G6P]}{[Gluc]} = \frac{[F6P]}{[G6P]}$$

20

$$\text{式 S17: } [F6P] = \frac{[G6P]^2}{[Gluc]}$$

【0159】

調節弁のインパクト

【数5】

$$\text{式 S11: } [F6P] \text{ ネットワーク} = \frac{[G6P]^2}{[Gluc]} + [G6P] - [6PGI]$$

30

$$\text{式 S17: } [F6P] \text{ 調節弁} = \frac{[G6P]^2}{[Gluc]}$$

平衡に近いので、 $[6PGI] > [G6P]$ 

【数6】

$$[F6P] \text{ 調節弁} \geq [F6P] \text{ ネットワーク}$$

40

平衡に近い熱力学的に有利な反応のネットワークからの取り除きは、増大した代謝物質プールを齎すであろう。

【0160】

第6節：遺伝子サイレンシングアレイ&amp;経路発現構築物

CASCADEガイド及びガイドアレイの設計及び構築は下で図14及び図15A~Bに例示されている。pCASCADE-controlプラスミドは、pCrRNA.Tet<sup>88</sup>のpTetプロモーターをインスレーター付きの低リン酸に依って誘導されるugpBプロモーター<sup>82</sup>に取り替える事に依って調製した。2つのプロモーターがglcA遺伝子を制御する事を担っており、両方のプロモーターについてsgRNAを設計し、ガ

50

イド *gltA1* (G1) 及び *gltA2* (G2) を齎した<sup>89</sup>。4つのプロモーターが *gapA* 遺伝子を制御する事を担っており、第1のプロモーターについて *sgRNA* を設計した。何故なら、指数増殖期の間には、*gapA* の *mRNA* は高度に効率的な *gapA* の P1プロモーターに於いて主に開始し、静止期の間には、他の3つの *gapA* プロモーターと比較して高い儘残ったからである<sup>90</sup>。1pd制御には1pd遺伝子上流の複数のプロモーターが使用されており (<https://ecocyc.org/gene?orgid=ECOLI&id=EG10543#tab=showAll>)、其れ故に、1pdのみの固有の有効な *sgRNA* の設計は可能ではなかった。*fabI*、*udhA*、及び *zwf* のプロモーター配列は *Ecocyc* データベース (<https://ecocyc.org/>) から得た。CASCAD Eガイドアレイを設計する為に、関心のプロモーターの -35又は-10ボックスの近くのCASCAD EのPAM部位を同定し、PAM部位の3'末端の30bpをガイド配列として選択し、製造者のプロトコルを踏襲してQ5部位特異的変異導入(ニュー・イングランド・バイオラボ・インク(New England Biolabs Inc.)、MA)を用いてpCASCAD Eプラスミドにクローニングした。5%v/v DMSOをQ5PCR反応に追加したと言う変更を有した。pCASCAD E-controlベクターを鋳型として用いた。図15A~Bに例示されている通り、2つ以上のガイドのアレイを有するpCASCAD Eプラスミドを調製した。pCASCAD Eガイドアレイプラスミドは、より小さい各ガイドプラスミドの相補的な半分ずつをPCRに依って逐次的に増幅する事、次に爾後のDNAアセンブリに依って調製した。表9は、*sgRNA* ガイド配列及び其れ等を構築する為に用いたプライマーを挙げている。全てのpCASCAD Eサイレンシングプラスミドは下の表10に挙げられており、アドジーン(Addgene)に於いて利用可能である。

10

20

【0161】



【表 2 5】

表 9 : sgRNAガイド配列及び其れ等を構築する為に用いたプライマーのリスト。  
 スペーサーは斜体化されている。

| sgRNA/<br>プライマー名称 | 配列   | 配列<br>番号 | 誘型               |
|-------------------|--|----------|------------------|
| fabI              | <i>TCGAGTTC</i> CCCGCGCCAGCGGG<br>GATAAACCGTTGATTATAATAA<br>CCGTTTATCTGTTTCGTATCGAG<br><i>TTCCCGCGCCAGCGGGGATAA</i><br><i>ACCG</i>   | 69       |                  |
| fabI-FOR          | GTTTATCTGTTTCGTATCGAGTT<br>CCCGCGCCAGCGGGGATAAAC<br>CGAAAAAAAAACCC   | 70       | pCASCADE control |
| fabI-REV          | GGTTATTATAATCAACGGTTTA<br>TCCCGCTGGCGCGGGGAAC<br>CGAGGTGGTACCAGATC   | 71       |                  |
| gapA1             | <i>TCGAGTTC</i> CCCGCGCCAGCGGG<br>GATAAACCGGTTTTTGTAATTT<br>ACAGGCAACCTTTTATTCGAGT<br><i>TCCCGCGCCAGCGGGGATAAA</i><br><i>CCG</i>     | 72       |                  |
| gapA1-FOR         | CAGGCAACCTTTTATTCGAGTT<br>CCCGCGCCAGCGGGGATAAAC<br>CGAAAAAAAAACCC  | 73       | pCASCADE control |
| gapA1-REV         | TAAAATTACAAAAACCGGTTT<br>ATCCCGCTGGCGCGGGGAAC<br>TCGAGGTGGTACCAGATC  | 74       |                  |
| gltA1             | <i>TCGAGTTC</i> CCCGCGCCAGCGGG<br>GATAAACCGAAAAGCATATAAT<br>GCGTAAAAGTTATGAAGTTCG<br><i>AGTTC</i> CCCGCGCCAGCGGGGAT<br><i>AAACCG</i> | 75       |                  |
| gltA1-FOR         | GCGTAAAAGTTATGAAGTTCG<br><i>AGTTC</i> CCCGCGCCAGCGGGGAT<br><i>AAACCG</i> AAAAAAAAACCC  | 76       | pCASCADE control |
| gltA1-REV         | ATTATATGCTTTTCGGTTTATC   | 77       |                  |

10

20

30

【表 2 6】

|           |   |    |                  |
|-----------|---|----|------------------|
|           | CCCGCTGGCGCGGGGAACTCG<br>AGGTGGTACCAGATCT   |    |                  |
| gltA2     | <i>TCGAGTTC</i> CCCGCGCCAGCGGG<br><i>GATAAACCGTATTGACCAATTC</i><br><i>ATTCGGGACAGTTATTAGTTCG</i><br><i>AGTTC</i> CCCGCGCCAGCGGGGAT<br><i>AAACCG</i> | 78 |                  |
| gltA2-FOR | GGGACAGTTATTAGTTCGAGTT<br>CCCGCGCCAGCGGGGATAAAC<br>CGAAAAAAAAAATCCC   | 79 | pCASCADE control |
| gltA2-REV | GAATGAATTGGTCAATACGGT<br>TTATCCCGCTGGCGCGGGGA<br>ACTCGAGGTGGTACCAGATCT  | 80 |                  |
| proD      | <i>TCGAGTTC</i> CCCGCGCCAGCGGG<br><i>GATAAACCGAGTGGTTGCTGGA</i><br><i>TAACTTTACGGGCATGCTCGAG</i><br><i>TTCCCGCGCCAGCGGGGATAA</i><br><i>ACCG</i>     | 81 |                  |
| proD-FOR  | AACTTTACGGGCATGCTCGAGT<br>TCCCGCGCCAGCGGGGATAAA<br>CCGAAAAAAAAAATCCC  | 82 | pCASCADE control |
| proD-REV  | ATCCAGCAACCACTCGGTTTAT<br>CCCGCTGGCGCGGGGAACTC<br>GAGGTGGTACCAGATCT   | 83 |                  |
| udhA      | <i>TCGAGTTC</i> CCCGCGCCAGCGGG<br><i>GATAAACCGTFACCATTCTGTT</i><br><i>GCTTTTATGTATAAGAATCGAG</i><br><i>TTCCCGCGCCAGCGGGGATAA</i><br><i>ACCG</i>     | 84 |                  |
| udhA-FOR  | TTTTATGTATAAGAATCGAGTT<br>CCCGCGCCAGCGGGGATAAAC<br>CGAAAAAAAAAATCCC   | 85 | pCASCADE control |
| udhA-REV  | GCAACAGAATGGTAACGGTTT<br>ATCCCGCTGGCGCGGGGAAC<br>TCGAGGTGGTACCAGATC   | 86 |                  |
| zwf       | <i>TCGAGTTC</i> CCCGCGCCAGCGGG<br><i>GATAAACCGCTCGTAAAAGCAG</i>   | 87 |                  |

10

20

30

【表 2 7】

|              |   |    |                  |
|--------------|---|----|------------------|
|              | TACAGTGCACCGTAAGATCGA<br>GTTCCCGCGCCAGCGGGGATA<br>AACCG   |    |                  |
| zwf-FOR      | CAGTGCACCGTAAGATCGAGTT<br>CCCCGCGCCAGCGGGGATAAAC<br>CGAAAAAAAAAACCCC  | 88 | pCASCADE control |
| zwf-REV      | TACTGCTTTTACGAGCGGTTTA<br>TCCCCGCTGGCGGGGAACT<br>CGAGGTGGTACCAGATC  | 89 |                  |
| FG1          | TCGAGTTCCTCCGCGCCAGCGGG<br>GATAAACCGTTGATTATAATAA<br>CCGTTTATCTGTTTCGTA7CGAG<br>TTCCCGCGCCAGCGGGGATAA<br>ACCGAAAAGCATATAATGCGT<br>AAAAGTTATGAAGTTCGAGTTC<br>CCCGCGCCAGCGGGGATAAAC<br>G  | 90 |                  |
| gltA1-FOR    | GCGCCAGCGGGGATAAACCGA<br>AAAGCATATAATGCG  | 91 | pCASCADE-gltA1   |
| pCASCADE-REV | CTTGCCCGCCTGATGAATGCTC<br>ATCCGG  | 92 |                  |
| pCASCADE-FOR | CCGGATGAGCATTATCAGGC<br>GGGCAAG   | 93 | pCASCADE-fabI    |
| fabI-REV     | CGGTTTATCCCCGCTGGCGCG<br>GGGAACCTGATACGAACAGAT<br>AAACGGTTATTATAATC   | 94 |                  |
| FG2          | TCGAGTTCCTCCGCGCCAGCGGG<br>GATAAACCGTTGATTATAATAA<br>CCGTTTATCTGTTTCGTA7CGAG<br>TTCCCGCGCCAGCGGGGATAA<br>ACCGTATTGACCAATTCATTCG<br>GGACAGTTATTAGTTCGAGTTC<br>CCCGCGCCAGCGGGGATAAAC<br>G | 95 |                  |
| gltA2-FOR    | GCGCCAGCGGGGATAAACCGT<br>ATTGACCAATTCATTC   | 96 | pCASCADE-gltA2   |
| pCASCADE-REV | CTTGCCCGCCTGATGAATGCTC  | 97 |                  |

10

20

30

【表 2 8】

|              |  |     |               |
|--------------|--|-----|---------------|
|              | ATCCGG   |     |               |
| pCASCADE-FOR | CCGGATGAGCATTTCATCAGGC<br>GGGCAAG  | 98  | pCASCADE-fabI |
| fabI-REV     | CGGTTTATCCCCGCTGGCGCG<br>GGGAACTCGATACGAACAGAT<br>AAACGGTTATTATAATC  | 99  |               |
| FU           | <i>TCGAGTTCCCCGCGCCAGCGGG<br/>GATAAACCGTTGATTATAATAA<br/>CCGTTTATCTGTTTCGTA/TCGAG<br/>TTCCCCGCGCCAGCGGGGATAA<br/>ACCGTTACCATTCTGTTGCTTT<br/>TATGTATAAGAA/TCGAGTTCCC<br/>CGCGCCAGCGGGGATAAACCG</i>  | 100 |               |
| udhA-FOR     | GCGCCAGCGGGGATAAACCGT<br>TACCATTCTGTTG   | 101 | pCASCADE-udhA |
| pCASCADE-REV | CTTGCCCGCCTGATGAATGCTC<br>ATCCGG   | 102 |               |
| pCASCADE-FOR | CCGGATGAGCATTTCATCAGGC<br>GGGCAAG  | 103 | pCASCADE-fabI |
| fabI-REV     | CGGTTTATCCCCGCTGGCGCG<br>GGGAACTCGATACGAACAGAT<br>AAACGGTTATTATAATC  | 104 |               |
| FZ           | <i>TCGAGTTCCCCGCGCCAGCGGG<br/>GATAAACCGTTGATTATAATAA<br/>CCGTTTATCTGTTTCGTA/TCGAG<br/>TTCCCCGCGCCAGCGGGGATAA<br/>ACCGCTCGTAAAAGCAGTACA<br/>GTGCACCGTAAGAT/TCGAGTTCC<br/>CCGCGCCAGCGGGGATAAACCG</i> | 105 |               |
| zwf-FOR      | GCGCCAGCGGGGATAAACCGC<br>TCGTAAAAG   | 106 | pCASCADE-zwf  |
| pCASCADE-REV | CTTGCCCGCCTGATGAATGCTC<br>ATCCGG   | 107 |               |
| pCASCADE-FOR | CCGGATGAGCATTTCATCAGGC<br>GGGCAAG  | 108 | pCASCADE-fabI |
| fabI-REV     | CGGTTTATCCCCGCTGGCGCG<br>GGGAACTCGATACGAACAGAT   | 109 |               |

10

20

30

【表 2 9】

|              |   |     |                |
|--------------|---|-----|----------------|
|              | AAACGGTTATTATAATC   |     |                |
| G1G2         | <i>TCGAGTTCCTCCCGCCAGCGGG<br/>GATAAACCGAAAAGCATATAAT<br/>GCGTAAAAGTTATGAAGTTCG<br/>AGTTCCTCCCGCCAGCGGGGAT<br/>AAACCGTATTGACCAATTCATT<br/>CGGGACAGTTATTAGTTCGAGT<br/>TCTCCCGCCAGCGGGGATAAA<br/>CCG</i> | 110 |                |
| gltA2-FOR    | <i>GCGCCAGCGGGGATAAACCGT<br/>ATTGACCAATTCATT</i>  | 111 | pCASCADE-gltA2 |
| pCASCADE-REV | <i>CTTGCCCGCCTGATGAATGCTC<br/>ATCCGG</i>  | 112 |                |
| pCASCADE-FOR | <i>CCGGATGAGCATTTCATCAGGC<br/>GGGCAAG</i>   | 113 | pCASCADE-gltA1 |
| gltA1-REV    | <i>CGGTTTATCTCCCGCTGGCGCG<br/>GGGAACTCGAACTTCATAACT<br/>TTTAC</i>   | 114 |                |
| G1U          | <i>TCGAGTTCCTCCCGCCAGCGGG<br/>GATAAACCGAAAAGCATATAATG<br/>CGTAAAAGTTATGAAGTTCGA<br/>GTTCCTCCCGCCAGCGGGGATA<br/>AACCCTTACCATTCTGTTGCTT<br/>TTATGTATAAGAATCGAGTTC<br/>CCGCGCCAGCGGGGATAAACCG</i>        | 115 |                |
| udhA-FOR     | <i>GCGCCAGCGGGGATAAACCGT<br/>TACCATTCTGTTG</i>  | 116 | pCASCADE-udhA  |
| pCASCADE-REV | <i>CTTGCCCGCCTGATGAATGCTC<br/>ATCCGG</i>  | 117 |                |
| pCASCADE-FOR | <i>CCGGATGAGCATTTCATCAGGC<br/>GGGCAAG</i>   | 118 | pCASCADE-gltA1 |
| gltA1-REV    | <i>CGGTTTATCTCCCGCTGGCGCG<br/>GGGAACTCGAACTTCATAACT<br/>TTTAC</i>   | 119 |                |
| G1Z          | <i>TCGAGTTCCTCCCGCCAGCGGG<br/>GATAAACCGAAAAGCATATAAT<br/>GCGTAAAAGTTATGAAGTTCG</i>  | 120 |                |

10

20

30

【表 3 0】

|              |   |     |                |
|--------------|---|-----|----------------|
|              | <i>AGTTCCCGCGCCAGCGGGGAT<br/>AAACCGCTCGTAAAAGCAGTA<br/>CAGTGCACCGTAAGATCGAGTT<br/>CCCCGCGCCAGCGGGGATAAAC<br/>CG</i>   |     |                |
| zwf-FOR      | GCGCCAGCGGGGATAAACCGC<br>TCGTA AAAAG  | 121 | pCASCADE-zwf   |
| pCASCADE-REV | CTTGCCCGCCTGATGAATGCTC<br>ATCCGG  | 122 |                |
| pCASCADE-FOR | CCGGATGAGCATTTCATCAGGC<br>GGGCAAG   | 123 | pCASCADE-gltA1 |
| gltA1-REV    | CGGTTTATCCCCGCTGGCGCG<br>GGGAACTCGAACTTCATAACT<br>TTTAC   | 124 |                |
| G2U          | <i>TCGAGTTCCCGCGCCAGCGGG<br/>GATAAACCGTATTGACCAATCA<br/>TTCGGGACAGTTATTAGTTCGA<br/>GTTCCCGCGCCAGCGGGGATA<br/>AACCGTFACCATTCTGTGCTT<br/>TTATGTATAAGAAATCGAGTCC<br/>CCGCGCCAGCGGGGATAAACCG</i>  | 125 |                |
| udhA-FOR     | GCGCCAGCGGGGATAAACCGT<br>TACCATTCTGTTG  | 126 | pCASCADE-udhA  |
| pCASCADE-REV | CTTGCCCGCCTGATGAATGCTC<br>ATCCGG  | 127 |                |
| pCASCADE-FOR | CCGGATGAGCATTTCATCAGGC<br>GGGCAAG   | 128 | pCASCADE-gltA2 |
| gltA2-REV    | CGGTTTATCCCCGCTGGCGCG<br>GGGAACTCGAACTAATAACTG<br>TC  | 129 |                |
| G2Z          | <i>TCGAGTTCCCGCGCCAGCGGG<br/>GATAAACCGTATTGACCAATCA<br/>TTCGGGACAGTTATTAGTTCGA<br/>GTTCCCGCGCCAGCGGGGATA<br/>AACCGCTCGTAAAAGCAGTAC<br/>AGTGCACCGTAAGATCGAGTTC<br/>CCCGCGCCAGCGGGGATAAACCG</i> | 130 |                |

10

20

30

【表 3 1】

|              | <i>G</i>   |     |                |
|--------------|--|-----|----------------|
| zwf-FOR      | GCGCCAGCGGGGATAAACCGC<br>TCGTAAAAG   | 131 | pCASCADE-zwf   |
| pCASCADE-REV | CTTGCCCGCCTGATGAATGCTC<br>ATCCGG   | 132 |                |
| pCASCADE-FOR | CCGGATGAGCATTTCATCAGGC<br>GGGCAAG  | 133 | pCASCADE-gltA2 |
| gltA2-REV    | CGGTTTATCCCCGCTGGCGCG<br>GGGAACTCGAACTAATAACTG<br>TC   | 134 |                |
| UZ           | <i>TCGAGTTCCCCGCGCCAGCGGG<br/>GATAAACCGTTACCATTCTGTT<br/>GCTTTTATGTATAAGAAATCGAG<br/>TTCCCCGCGCCAGCGGGGATAA<br/>ACCGCTCGTAAAAGCAGTACA<br/>GTGCACCGTAAGATCGAGTTC<br/>CCGCGCCAGCGGGGATAAACCG</i>   | 135 |                |
| zwf-FOR      | GCGCCAGCGGGGATAAACCGC<br>TCGTAAAAG   | 136 | pCASCADE-zwf   |
| pCASCADE-REV | CTTGCCCGCCTGATGAATGCTC<br>ATCCGG   | 137 |                |
| pCASCADE-FOR | CCGGATGAGCATTTCATCAGGC<br>GGGCAAG  | 138 | pCASCADE-udhA  |
| udhA-REV     | CGGTTTATCCCCGCTGGCGCG<br>GGGAACTCGATTCTTATACAT<br>AAAAGC   | 139 |                |
| FG1G2        | <i>TCGAGTTCCCCGCGCCAGCGGG<br/>GATAAACCGTTGATTATAATAA<br/>CCGTTTATCTGTTCGTAATCGAG<br/>TTCCCCGCGCCAGCGGGGATAA<br/>ACCGAAAAGCATATAATGCGT<br/>AAAAGTTATGAAGTTCGAGTTC<br/>CCGCGCCAGCGGGGATAAACCG<br/>GTATTGACCAATTCATTCGGG<br/>ACAGTTATTAGTTCGAGTTC<br/>CGCGCCAGCGGGGATAAACCG</i> | 140 |                |
| gltA2-FOR    | GCGCCAGCGGGGATAAACCGT  | 141 | pCASCADE-gltA2 |

10

20

30

【表 3 2】

|              |  |     |                 |
|--------------|--|-----|-----------------|
|              | <i>ATTGACCAATTCATTC</i>  |     |                 |
| pCASCADE-REV | CTTGCCCGCCTGATGAATGCTC<br>ATCCGG   | 142 |                 |
| pCASCADE-FOR | CCGGATGAGCATTTCATCAGGC<br>GGGCAAG  | 143 | pCASCADE-FG1    |
| gltA1-REV    | CGGTTTATCCCCGCTGGCGCG<br>GGGAACTCGAACTTCATAACT<br>TTTAC  | 144 |                 |
| G1G2A        | <i>TCGAGTTCCCCGCGCCAGCGGG<br/>GATAAACCGAAAAGCATATAAT<br/>GCGTAAAAGTTATGAAGTTCG<br/>AGTTCCCCGCGCCAGCGGGGAT<br/>AAACCGTATTGACCAATTCATT<br/>CGGGACAGTTATTAGTTCGAGT<br/>TCCCGCGCCAGCGGGGATAAA<br/>CCGGTTTTTGTAATTT TACAGG<br/>CAACCTTTTATTCGAGTTC<br/>GCGCCAGCGGGGATAAACCG</i> | 145 |                 |
| gapAPI-FOR   | GCGCCAGCGGGGATAAACCGG<br>TTTTTGTAATTT TACAGGC  | 146 | pCASCADE-gapAPI |
| pCASCADE-REV | CTTGCCCGCCTGATGAATGCTC<br>ATCCGG   | 147 |                 |
| pCASCADE-FOR | CCGGATGAGCATTTCATCAGGC<br>GGGCAAG  | 148 | pCASCADE-G1G2   |
| gltA2-REV    | CGGTTTATCCCCGCTGGCGCG<br>GGGAACTCGAACTAATAACTG<br>TC   | 149 |                 |
| G1G2U        | <i>TCGAGTTCCCCGCGCCAGCGGG<br/>GATAAACCGAAAAGCATATAAT<br/>GCGTAAAAGTTATGAAGTTCG<br/>AGTTCCCCGCGCCAGCGGGGAT<br/>AAACCGTATTGACCAATTCATT<br/>CGGGACAGTTATTAGTTCGAGT<br/>TCCCGCGCCAGCGGGGATAAA<br/>CCGTTACCAATCTGTTGCTTT<br/>ATGTATAAGAATCGAGTTC<br/>GCGCCAGCGGGGATAAACCG</i>   | 150 |                 |

10

20

30



【表 3 3】

|              |   |     |               |
|--------------|---|-----|---------------|
| udhA-FOR     | GCGCCAGCGGGGATAAACCGT<br>TACCATTCTGTTG  | 151 | pCASCADE-udhA |
| pCASCADE-REV | CTTGCCCGCCTGATGAATGCTC<br>ATCCGG  | 152 |               |
| pCASCADE-FOR | CCGGATGAGCATTTCATCAGGC<br>GGGCAAG   | 153 | pCASCADE-G1G2 |
| gltA2-REV    | CGGTTTATCCCCGCTGGCGCG<br>GGGAACTCGAACTAATAACTG<br>TC  | 154 |               |
| G1G2Z        | <i>TCGAGTTCCCCGCGCCAGCGGG<br/>GATAAACCGAAAAGCATATAAT<br/>GCGTAAAAGTTATGAAGTTCG<br/>AGTTCCCCGCGCCAGCGGGGAT<br/>AAACCGTATTGACCAATTCATT<br/>CGGGACAGTTATTAGTTCGAGT<br/>TCCCCGCGCCAGCGGGGATAAA<br/>CCGCTCGTAAAAGCAGTACAG<br/>TGCACCGTAAGATCGAGTTCCC<br/>CGCGCCAGCGGGGATAAACCG</i> | 155 |               |
| zwf-FOR      | GCGCCAGCGGGGATAAACCGC<br>TCGTAAAAG  | 156 | pCASCADE-zwf  |
| pCASCADE-REV | CTTGCCCGCCTGATGAATGCTC<br>ATCCGG  | 157 |               |
| pCASCADE-FOR | CCGGATGAGCATTTCATCAGGC<br>GGGCAAG   | 158 | pCASCADE-G1G2 |
| gltA2-REV    | CGGTTTATCCCCGCTGGCGCG<br>GGGAACTCGAACTAATAACTG<br>TC  | 159 |               |
| FG1G2A       | <i>TCGAGTTCCCCGCGCCAGCGGG<br/>GATAAACCGTTGATTATAATAA<br/>CCGTTTATCTGTTCGTA7CGAG<br/>TCCCCGCGCCAGCGGGGATAA<br/>ACCGAAAAGCATATAATGCGT<br/>AAAAGTTATGAAGTTCGAGTTC<br/>CCCGCGCCAGCGGGGATAAAC<br/>GTATTGACCAATTCATTCGGG<br/>ACAGTTATTAGTTCGAGTTCCC</i>                             | 160 |               |

10

20

30

【表 3 4】

|              |  |     |                 |
|--------------|--|-----|-----------------|
|              | <i>CGCGCCAGCGGGGATAAACCGG<br/>TTTTTGTAATTT TACAGGCAAC<br/>CTTTTATTCGAGTTCCTCCGCGC<br/>CAGCGGGGATAAACCG</i>   |     |                 |
| gapAPI-FOR   | <i>GCGCCAGCGGGGATAAACCGG<br/>TTTTTGTAATTT TACAGGC</i>  | 161 | pCASCADE-gapAPI |
| pCASCADE-REV | <i>CTTGCCCGCCTGATGAATGCTC<br/>ATCCGG</i>   | 162 |                 |
| pCASCADE-FOR | <i>CCGGATGAGCATTTCATCAGGC<br/>GGGCAAG</i>  | 163 | pCASCADE-FG1G2  |
| gltA2-REV    | <i>CGGTTTATCCCCGCTGGCGCG<br/>GGGAACTCGAACTAATAACTG<br/>TC</i>  | 164 |                 |
| FG1G2U       | <i>TCGAGTTCCTCCGCGCCAGCGGG<br/>GATAAACCGTTGATTATAATAA<br/>CCGTTTATCTGTTTCGTA/TCGAG<br/>TTCCTCCGCGCCAGCGGGGATAA<br/>ACCGAAAAGCATATAATGCGT<br/>AAAAGTTATGAAGTTCGAGTTC<br/>CCCGCGCCAGCGGGGATAAACCG<br/>GTATTGACCAATTCATTCGGG<br/>ACAGTTATTAGTTCGAGTTCCTC<br/>CGCGCCAGCGGGGATAAACCGT<br/>TACCATTCTGTTGCTTTTATGT<br/>ATAAGAATCGAGTTCCTCCGCGC<br/>CAGCGGGGATAAACCG</i> | 165 |                 |
| gltA2-FOR    | <i>GCGCCAGCGGGGATAAACCGT<br/>ATTGACCAATTCATTC</i>  | 166 | pCASCADE-udhA   |
| pCASCADE-REV | <i>CTTGCCCGCCTGATGAATGCTC<br/>ATCCGG</i>   | 167 |                 |
| pCASCADE-FOR | <i>CCGGATGAGCATTTCATCAGGC<br/>GGGCAAG</i>  | 168 | pCASCADE-FG1G2  |
| gltA1-REV    | <i>CGGTTTATCCCCGCTGGCGCG<br/>GGGAACTCGAACTTCATAACT<br/>TTTAC</i>   | 169 |                 |
| FG1G2Z       | <i>TCGAGTTCCTCCGCGCCAGCGGG<br/>GATAAACCGTTGATTATAATAA</i>  | 170 |                 |

10

20

30

【表 3 5】

|              |   |     |                 |    |
|--------------|---|-----|-----------------|----|
|              | CCGTTTATCTGTTTCGTAATCGAG<br>TTCCCGCGCCAGCGGGGATAA<br>ACCGAAAAGCATATAATGCGT<br>AAAAGTTATGAAGTTCGAGTTC<br>CCCGCGCCAGCGGGGATAAACC<br>GTATTGACCAATTCATTCGGG<br>ACAGTTATTAGTTCGAGTTC<br>CGCGCCAGCGGGGATAAACC<br>TCGTAAAAGCAGTACAGTGCA<br>CCGTAAGATCGAGTTC<br>CCAGCGGGGATAAACC                |     |                 |    |
| gltA2-FOR    | GCGCCAGCGGGGATAAACCGT<br>ATTGACCAATTCATTC   | 171 | pCASCADE-zwf    | 10 |
| pCASCADE-REV | CTTGCCCGCCTGATGAATGCTC<br>ATCCGG  | 172 |                 |    |
| pCASCADE-FOR | CCGGATGAGCATTTCATCAGGC<br>GGGCAAG   | 173 | pCASCADE-FG1G2  | 20 |
| gltA1-REV    | CGGTTTATCCCGCTGGCGCG<br>GGGAACTCGAACTTCATAACT<br>TTTAC  | 174 |                 |    |
| G1G2UA       | TCGAGTTC<br>GATAAACCGAAAAGCATATAAT<br>GCGTAAAAGTTATGAAGTTCG<br>AGTTC<br>AAACCGTATTGACCAATTCATT<br>CGGGACAGTTATTAGTTCGAGT<br>TCCCGCGCCAGCGGGGATAAA<br>CCGTTACCATCTGTGCTTTT<br>ATGTATAAGAATCGAGTTC<br>GCGCCAGCGGGGATAAACC<br>TTTTGTAATTT TACAGGCAAC<br>CTTTTATTCGAGTTC<br>CAGCGGGGATAAACC | 175 |                 | 30 |
| gapAPI-FOR   | GCGCCAGCGGGGATAAACC<br>TTTTTGTAATTT TACAGGC   | 176 | pCASCADE-gapAPI |    |
| pCASCADE-REV | CTTGCCCGCCTGATGAATGCTC<br>ATCCGG  | 177 |                 |    |

【表 3 6】

|              |  |     |                |
|--------------|--|-----|----------------|
| pCASCADE-FOR | CCGGATGAGCATTTCATCAGGC<br>GGGCAAG  | 178 | pCASCADE-G1G2U |
| udhA-REV     | CGGTTTATCCCCGCTGGCGCG<br>GGGAACTCGATTCTTATACAT<br>AAAAGC   | 179 |                |
| G1G2UZ       | <i>TCGAGTTCCCCGCGCCAGCGGG<br/>GATAAACCGAAAAGCATATAAT<br/>GCGTAAAAGTTATGAAGTTCG<br/>AGTTCCCCGCGCCAGCGGGGAT<br/>AAACCGTATTGACCAATTCATT<br/>CGGGACAGTTATTAGTTCGAGT<br/>TCCCCGCGCCAGCGGGGATAAA<br/>CCGTTACCATTCTGTGCTTTT<br/>ATGTATAAGAAATCGAGTTC<br/>GCGCCAGCGGGGATAAACCGCT<br/>CGTAAAAGCAGTACAGTGCAC<br/>CGTAAGATCGAGTTCCCCGCGC<br/>CAGCGGGGATAAACCG</i> | 180 |                |
| zwf-FOR      | GCGCCAGCGGGGATAAACCGC<br>TCGTAAAAG   | 181 | pCASCADE-zwf   |
| pCASCADE-REV | CTTGCCCGCCTGATGAATGCTC<br>ATCCGG   | 182 |                |
| pCASCADE-FOR | CCGGATGAGCATTTCATCAGGC<br>GGGCAAG  | 183 | pCASCADE-G1G2U |
| udhA-REV     | CGGTTTATCCCCGCTGGCGCG<br>GGGAACTCGATTCTTATACAT<br>AAAAGC   | 184 |                |
| FG1G2UA      | <i>TCGAGTTCCCCGCGCCAGCGGG<br/>GATAAACCGTTGATTATAATAA<br/>CCGTTTATCTGTTCGATTCGAG<br/>TTCCCCGCGCCAGCGGGGATAA<br/>ACCGAAAAGCATATAATGCGT<br/>AAAAGTTATGAAGTTCGAGTTC<br/>CCCGCGCCAGCGGGGATAAACCG<br/>GTATTGACCAATTCATTCCGGG<br/>ACAGTTATTAGTTCGAGTTC<br/>CGCGCCAGCGGGGATAAACCGT</i>   | 185 |                |

10

20

30

【表 3 7】

|              |   |     |                     |
|--------------|---|-----|---------------------|
|              | TACCATTCTGTTGCTTTTATGT<br>ATAAGAATCGAGTTC <del>CCCCGCGC</del><br>CAGCGGGGATAAACCGGTTTT<br>GTAATTT TACAGGCAACCTTT<br>TATTCGAGTTC <del>CCCCGCGCCAGC</del><br>GGGGATAAACCG   |     |                     |
| gapAPI-FOR   | GCGCCAGCGGGGATAAACCGG<br>TTTTTGTAATTT TACAGGC   | 186 | pCASCADE-gapAPI     |
| pCASCADE-REV | CTTGCCCGCTGATGAATGCTC<br>ATCCGG   | 187 |                     |
| pCASCADE-FOR | CCGGATGAGCATTTCATCAGGC<br>GGGCAAG   | 188 | pCASCADE-<br>FG1G2U |
| udhA-REV     | CGGTTTATCCCCGCTGGCGCG<br>GGGA <del>ACTCGATTCTTATA</del> CAT<br>AAAAGC   | 189 |                     |
| FG1G2UZ      | T <del>CGAGTTC<del>CCCCGCGCCAGCGGG</del></del><br>GATAAACCGTTGATTATAATAA<br>CCGTTTATCTGTTTCGTA <del>TCGAG</del><br>T <del>CCCCGCGCCAGCGGGGATAA</del><br>ACCGAAAAGCATATAATGCGT<br>AAAAGTTATGAAGTTCGAGTTC<br>CCCCGCGCCAGCGGGGATAAACCG<br>GTATTGACCAATTCATTCGGG<br>ACAGTTATTAGTTCGAGTTC <del>CC</del><br>CGCGCCAGCGGGGATAAACCGT<br>TACCATTCTGTTGCTTTTATGT<br>ATAAGAATCGAGTTC <del>CCCCGCGC</del><br>CAGCGGGGATAAACCGCTCGTA<br>AAAGCAGTACAGTGCACCGTA<br>AGATCGAGTTC <del>CCCCGCGCCAGC</del><br>GGGGATAAACCG | 190 |                     |
| zwf-FOR      | GCGCCAGCGGGGATAAACCGC<br>TCGTA <del>AAAAG</del>   | 191 | pCASCADE-zwf        |
| pCASCADE-REV | CTTGCCCGCTGATGAATGCTC<br>ATCCGG   | 192 |                     |
| pCASCADE-FOR | CCGGATGAGCATTTCATCAGGC<br>GGGCAAG   | 193 | pCASCADE-<br>FG1G2U |

10

20

30

【表 3 8】

|              |  |     |                      |
|--------------|--|-----|----------------------|
| udhA-REV     | CGGTTTATCCCCGCTGGCGCG<br>GGGAACTCGATTCTTATACAT<br>AAAAGC   | 194 |                      |
| FG1G2UZA     | <i>TCGAGTTCCCCGCGCCAGCGGG<br/>GATAAACCGTTGATTATAATAA<br/>CCGTTTATCTGTTGTA7CGAG<br/>TTCCCCGCGCCAGCGGGGATAA<br/>ACCGAAAAGCATATAATGCGT<br/>AAAAGTTATGAAGTTCGAGTTC<br/>CCCCGCGCCAGCGGGGATAAAC<br/>GTATTGACCAATTCATTCGGG<br/>ACAGTTATTAGTTCGAGTTCCC<br/>CGCGCCAGCGGGGATAAACCGT<br/>TACCATTCTGTTGCTTTTATGT<br/>ATAAGAATCGAGTTCCCCGCGC<br/>CAGCGGGGATAAACCGCTCGTA<br/>AAAGCAGTACAGTGCACCGTA<br/>AGATCGAGTTCCCCGCGCCAGC<br/>GGGGATAAACCGGTTTTTGTA<br/>TTT TACAGGCAACCTTTTATTC<br/>GAGTTCCCCGCGCCAGCGGGGA<br/>TAAACCG</i> | 195 |                      |
| gapAPI-FOR   | GCGCCAGCGGGGATAAACCGG<br>TTTTTGTAATTT TACAGGC  | 196 | pCASCADE-gapAPI      |
| pCASCADE-REV | CTTGCCCGCCTGATGAATGCTC<br>ATCCGG   | 197 |                      |
| pCASCADE-FOR | CCGGATGAGCATTTCATCAGGC<br>GGGCAAG  | 198 | pCASCADE-<br>FG1G2UZ |
| zwf-REV      | CGGTTTATCCCCGCTGGCGCG<br>GGGAACTCGATCTTACGGTGC<br>ACTGTAC  | 199 |                      |
| UZ           | <i>TCGAGTTCCCCGCGCCAGCGGG<br/>GATAAACCGTTACCATTCTGTT<br/>GCTTTTATGTATAAGAA7CGAG<br/>TTCCCCGCGCCAGCGGGGATAA<br/>ACCGCTCGTAAAAGCAGTACA<br/>GTGCACCGTAAGATCGAGTTC</i>   | 200 |                      |

10

20

30

【表 3 9】

|              | CCGCGCCAGCGGGGATAAAACCG                                   |     |               |
|--------------|---|-----|---------------|
| zwf-FOR      | GCGCCAGCGGGGATAAAACCGC<br>TCGTAAAAG                       | 201 | pCASCADE-zwf  |
| pCASCADE-REV | CTTGCCCGCCTGATGAATGCTC<br>ATCCGG                          | 202 |               |
| pCASCADE-FOR | CCGGATGAGCATTTCATCAGGC<br>GGGCAAG                         | 203 | pCASCADE-udhA |
| udhA-REV     | CGGTTTATCCCCGCTGGCGCG<br>GGGAAGCTCGATTCTTATACAT<br>AAAAGC | 204 |               |

10

【 0 1 6 2】

【表 4 0】

表 1 0 : 本研究に用いたプラスミドのリスト。

| 本研究に利用したプラスミド    |   |                                |
|------------------|---|--------------------------------|
| プラスミド            | 目的  | ソース                            |
| pSIM5            | 組み換え工学及び株構築                                 | コート (Court) ラボ <sup>54</sup>   |
| pCP20            | FRTカナマイシンカセットキュアリング                         | コート (Court) ラボ <sup>54</sup>   |
| pSMART-HC-Kan    | バックボーンベクター                                  | ルシジェン・コーポレーション                 |
| pcrRNA.Tet       | pCASCADE-controlバックボーン                      | バイゼル (Beisel) ラボ <sup>54</sup> |
| 本研究に於いて構築したプラスミド |   |                                |
| プラスミド            | プラスミド名称                                     | アドジーン (Addgene) ID             |
| pSMART-Ala2      | pSMART-HCKan-IN:yibDp-ald*                  | 71326                          |
| pSMART-Ala3      | pSMART-HCKan-IN:phoBp-ald*                  | 71327                          |
| pSMART-Ala4      | pSMART-HCKan-IN:phoHp-ald*                  | 71328                          |
| pSMART-Ala5      | pSMART-HCKan-IN:mipAp-ald*                  | 71329                          |
| pSMART-Ala11     | pSMART-HCKan-proA-ald*                      | 87172                          |
| pSMART-Ala12     | pSMART-HCKan-proC-ald*                      | 87173                          |
| pSMART-Ala13     | pSMART-HCKan-proD-ald*                      | 87174                          |
| pSMART-Ala14     | pSMART-HCKan-proB-ald*                      | 101079                         |
| pSMART-Ala15     | pSMART-HCKan-HCEp-ald*                      | 101080                         |
| pSMART-Mev2      | pSMART-IN:yibDp1-mvaE-IN:phoBp2-mvaS(A110G) | 66642                          |
| pSMART-Mev3      | pSMART-IN:yibDp1-mvaE-IN:mipAp2-mvaS(A110G) | 102761                         |
| pSMART-Mev4      | pSMART-IN:yibDp1-mvaE-IN:phoHp2-mvaS(A110G) | 102762                         |
| pSMART-Mev5      | pSMART-IN:mipAp1-mvaE-IN:yibD2-mvaS(A110G)  | 102763                         |
| pSMART-3HP       | pSMART-3HP-NADPH-rhtA                       | 87143                          |
| pCDF-mcherry1    | pCDF-proD-mcherry                           | 87144                          |

20

30

40

【表 4 1】

|                   |   |       |    |
|-------------------|---|-------|----|
| pCDF-mcherry2     | pCDF-proD-mcherry-DAS4                  | 87145 |    |
| pSMART-GFPuv      | pSMART-IN:yibDp-GFPuv                   | 65822 |    |
| pSMART-GFPuv2     | pSMART-IN:phoBp-GFPuv                   | 71517 |    |
| pSMART-GFPuv3     | pSMART-IN:phoUp-GFPuv                   | 71518 |    |
| pSMART-GFPuv4     | pSMART-IN:phoHp-GFPuv                   | 71519 |    |
| pSMART-GFPuv5     | pSMART-IN:mipAp-GFPuv                   | 71520 |    |
| pCASCADE-control  | pCASCADE                                | 65821 | 10 |
| pCASCADE-proD     | pCASCADE-proD                           | 65820 |    |
| pCASCADE-gapAP1   | pCASCADE-gapAP1                         | 87146 |    |
| pCASCADE-fabI     | pCASCADE-fabI                           | 66635 |    |
| pCASCADE-FG1      | pCASCADE-fabI-gltA1                     | 71340 |    |
| pCASCADE-FG1G2    | pCASCADE-fabI-gltA1-gltA2               | 71342 |    |
| pCASCADE-FG1G2A   | pCASCADE-fabI-gltA1-gltA2-gapA          | 87147 |    |
| pCASCADE-FG1G2U   | pCASCADE-fabI-gltA1-gltA2-udhA          | 66637 |    |
| pCASCADE-FG1G2UA  | pCASCADE-fabI-gltA1-gltA2-udhA-gapA     | 87154 | 20 |
| pCASCADE-FG1G2UZ  | pCASCADE-fabI-gltA1-gltA2-udhA-zwf      | 87148 |    |
| pCASCADE-FG1G2UZA | pCASCADE-fabI-gltA1-gltA2-udhA-zwf-gapA | 87149 |    |
| pCASCADE-FG1G2Z   | pCASCADE-fabI-gltA1-gltA2-zwf           | 66638 |    |
| pCASCADE-FG2      | pCASCADE-fabI-gltA2                     | 71341 |    |
| pCASCADE-FU       | pCASCADE-fabI-udhA                      | 66636 |    |
| pCASCADE-FZ       | pCASCADE-fabI-zwf                       | 71335 |    |
| pCASCADE-G1G2     | pCASCADE-gltA1-gltA2                    | 71348 | 30 |
| pCASCADE-G1G2A    | pCASCADE-gltA1-gltA2-gapA               | 87150 |    |
| pCASCADE-G1G2U    | pCASCADE-gltA1-gltA2-udhA               | 71343 |    |
| pCASCADE-G1G2UA   | pCASCADE-gltA1-gltA2-udhA-gapA          | 87151 |    |
| pCASCADE-G1G2UZ   | pCASCADE-gltA1-gltA2-udhA-zwf           | 87152 |    |
| pCASCADE-G1G2Z    | pCASCADE-gltA1-gltA2-zwf                | 71347 |    |
| pCASCADE-G1U      | pCASCADE-gltA1-udhA                     | 71339 |    |
| pCASCADE-G1Z      | pCASCADE-gltA1-zwf                      | 71337 | 40 |
| pCASCADE-G2U      | pCASCADE-gltA2-udhA                     | 65819 |    |
| pCASCADE-G2Z      | pCASCADE-gltA2-zwf                      | 71338 |    |
| pCASCADE-gltA1    | pCASCADE-gltA1                          | 71334 |    |
| pCASCADE-gltA2    | pCASCADE-gltA2                          | 65817 |    |
| pCASCADE-udhA     | pCASCADE-udhA                           | 65818 |    |
| pCASCADE-UZ       | pCASCADE-udhA-zwf                       | 87153 |    |



【表 4 2】

|              |              |       |
|--------------|--------------|-------|
| pCASCADE-zwf | pCASCADE-zwf | 65825 |
|--------------|--------------|-------|

## 【 0 1 6 3 】

## 第 7 節： 2 段階マイクロ発酵

## E . c o l i 培地ストック溶液

・ 10 × 濃縮アンモニウム - クエン酸 30 塩 ( 1 L )、 30 g の  $(NH_4)_2SO_4$  及び 1.5 g のクエン酸を掻き混ぜ乍ら水中で混合し、 10 M の NaOH に依って pH を 7.5 に合わせる。オートクレーブし、室温 ( RT ) で保存する。

10

・ 10 × 濃縮アンモニウム - クエン酸 90 塩 ( 1 L )、 90 g の  $(NH_4)_2SO_4$  及び 2.5 g のクエン酸を掻き混ぜ乍ら水中で混合し、 10 M の NaOH に依って pH を 7.5 に合わせる。オートクレーブし、 RT で保存する。

・ 1 M の 3 - ( N - モルホリノ ) プロパンスルホン酸カリウム ( MOPS )、 50 % KOH に依って pH 7.4 に合わせる。濾過滅菌し ( 0.2 μm )、 RT で保存する。

・ 0.5 M 燐酸カリウム緩衝液、 pH 6.8.248.5 mL の 1.0 M の  $K_2HPO_4$  及び 251.5 mL の 1.0 M の  $KH_2PO_4$  を混合し、超純水に依って 1000 mL の終体積に合わせる。濾過滅菌し ( 0.2 μm )、 RT で保存する。

・ 2 M の  $MgSO_4$  及び 10 mM の  $CaSO_4$  溶液、濾過滅菌し ( 0.2 μm )、 RT で保存する。

20

・ チアミン HCl の 50 g / L 溶液、濾過滅菌し ( 0.2 μm )、 4 で保存する。

・ グルコースの 500 g / L 溶液、熱し乍ら掻き混ぜて溶解する。冷却し、濾過滅菌し ( 0.2 μm )、 RT で保存する。

・ 100 g / L 酵母エキス、オートクレーブし、 RT で保存する。

・ 100 g / L カザミノ酸、オートクレーブし、 RT で保存する。

・ 500 × 微量金属ストック： 10 mL の濃縮  $H_2SO_4$ 、 0.6 g の  $CoSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 5.0 g の  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 、 0.6 g の  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 0.2 g の  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 、 0.1 g の  $H_3BO_3$ 、 及び 0.3 g の  $MnSO_4 \cdot H_2O$  を含有する 1000 mL の水中のミクロ栄養素の溶液を調製する。濾過滅菌し ( 0.2 μm )、 RT で暗所に保存する。

30

・ 培地を調製する前に毎回、水中の 40 mM 硫酸第二鉄七水和物の新しい溶液を調製し、濾過滅菌する ( 0.2 μm )。

## 【 0 1 6 4 】

## 培地構成成分

沈殿を最小化する為に書かれている順番で次表に基づくストック溶液を無菌的に混合する事に依って、最終的な使用培地を調製し、其れから濾過滅菌する ( 0.2 μm フィルターに依る )。

## 【 0 1 6 5 】

## 【表 4 3】

表 1 1 : シード培地, pH6.8 :

| 成分  | 単位  | SM10   | SM10++ |
|---|-----|--------|--------|
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>     | g/L | 9      | 9      |
| クエン酸  | g/L | 0.25   | 0.25   |
| 燐酸カリウム  | mM  | 5      | 5      |
| CoSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O                | g/L | 0.0048 | 0.0048 |
| CuSO <sub>4</sub> ・5H <sub>2</sub> O                | g/L | 0.04   | 0.04   |
| ZnSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O                | g/L | 0.0048 | 0.0048 |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ・2H <sub>2</sub> O | g/L | 0.0016 | 0.0016 |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      | g/L | 0.0008 | 0.0008 |
| MnSO <sub>4</sub> ・H <sub>2</sub> O                 | g/L | 0.0024 | 0.0024 |
| FeSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O                | g/L | 0.044  | 0.044  |
| MgSO <sub>4</sub>                                   | mM  | 2.5    | 2.5    |
| CaSO <sub>4</sub>                                   | mM  | 0.06   | 0.06   |
| グルコース   | g/L | 45     | 45     |
| MOPS  | mM  | 200    | 200    |
| チアミン HCl  | g/L | 0.01   | 0.01   |
| 酵母エキス   | g/L | 1      | 2.5    |
| カザミノ酸   | g/L | 0      | 2.5    |

10

20

## 【 0 1 6 6 】

## 【表 4 4】

表 1 2 : 生産/洗浄培地, pH6.8 :

| 成分  | 単位  | FGM3   | FGM3<br>燐酸無し | FGM3 洗浄 | FGM3+40mM<br>燐酸 | FGM10  |
|---|-----|--------|--------------|---------|-----------------|--------|
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>     | g/L | 3      | 3            | 3       | 3               | 9      |
| クエン酸  | g/L | 0.15   | 0.15         | 0.15    | 0.15            | 0.25   |
| 燐酸カリウム  | mM  | 1.8    | 0            | 0       | 40              | 5      |
| CoSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O                | g/L | 0.0024 | 0.0024       | 0       | 0.0024          | 0.0048 |
| CuSO <sub>4</sub> ・5H <sub>2</sub> O                | g/L | 0.02   | 0.02         | 0.00    | 0.02            | 0.04   |
| ZnSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O                | g/L | 0.0024 | 0.0024       | 0       | 0.0024          | 0.0048 |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ・2H <sub>2</sub> O | g/L | 0.0008 | 0.0008       | 0       | 0.0008          | 0.0016 |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      | g/L | 0.0004 | 0.0004       | 0       | 0.0004          | 0.0008 |
| MnSO <sub>4</sub> ・H <sub>2</sub> O                 | g/L | 0.0012 | 0.0012       | 0       | 0.0012          | 0.0024 |
| FeSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O                | g/L | 0.022  | 0.022        | 0       | 0.022           | 0.044  |
| MgSO <sub>4</sub>                                   | mM  | 2      | 2            | 0       | 2               | 2.5    |
| CaSO <sub>4</sub>                                   | mM  | 0.05   | 0.05         | 0       | 0.05            | 0.06   |
| グルコース   | g/L | 45     | 25           | 0       | 45              | 25     |
| MOPS  | mM  | 200    | 200          | 0       | 200             | 0      |
| チアミン HCl  | g/L | 0.01   | 0.01         | 0       | 0.01            | 0.01   |

30

40

## 【 0 1 6 7 】

## マイクロ発酵

マイクロ発酵プロトコールの概観が図 1 6 A ~ C に例示されている。株は 9 6 ウェルプレートマイクロ発酵に於ける生産について評価し、24 時間の生産段階の為に、細胞を対数期中期迄初期増殖させ、収穫し、洗浄し、再懸濁し、燐酸不含生産培地に依って OD 600 = 1 に正規化した。マイクロ発酵の成功は：(1) 指数期に全ての株を収穫する事に依って株を同調させる事と；(2) 回分の糖を低く保ち得乍ら有意な予想される産物蓄積を可能にする様な、低いバイオマスレベルの使用と；(3) 十分な混合及び通気を供給し乍ら蒸発損失を最小化する為の方法とを要求した。最後の要件に対処する為に、E n z y

50

Screen (商標) からの商業的に利用可能なマイクロプレートサンドイッチカバー及びクランプを用いた。此れ等は、蒸発損失を大いに縮減し乍ら、400rpmで動作する標準的な25mmオービタルシェーカーに於いて高いレベルの混合及び通気を可能にする<sup>92-93</sup>。異なるインスレーター付き磷酸プロモーターに依るアラニン生産のマイクロ発酵結果が図17に示されている。gapA及びgapN遺伝子変改を有する評価した株のマイクロ発酵結果が図18に依って与えられている。

【0168】

第8節：マイクロ発酵のロバスト性評価

マイクロ発酵の酸素ロバスト性研究の間に、生産培養体積を変えて、以前に報告された通り且つ下で表14に挙げられている通り、所望の酸素移動速度(OTR)値を達成した( [http://www.enzyscreen.com/oxygen\\_transfer\\_rates.htm](http://www.enzyscreen.com/oxygen_transfer_rates.htm) )<sup>92-93</sup>。生産段階の間の回分グルコースレベルを変改して、グルコースに対するロバスト性を評価した。マイクロ発酵スケールのロバスト性実験に利用した株は表15に挙げられている。マイクロ発酵のロバスト性研究からの結果は、図19A~D、図20A~D、図21A~D、図22A~D、図23A~D、図24A~D、図25A~D、図26A~D、図27A~D、図28A~D、図29A~D、図30A~D、図31A~D、及び図32に与えられている。

10

【0169】

【表45】

表14：異なるOTR値の培養条件。

| 25mm オービタルシェーカー       |                 |              |
|-----------------------|-----------------|--------------|
| 最大 OTR<br>(mmol/L-hr) | 振盪スピード<br>(rpm) | 充填体積<br>(μL) |
| 25                    | 400             | 100          |
| 20                    | 400             | 150          |
| 15                    | 400             | 200          |

20

【0170】

## 【表 4 6】

表 1 5 : マイクロ発酵ロバスト性評価に用いた株及び其れ等の RS スコアのリスト。

| 株# | サイレンシング | 蛋白質分解 | プラスミド       | RS   |
|----|---------|-------|-------------|------|
| 1  | gltA1   | FU    | pSMART-Ala2 | 89.6 |
| 2  | gltA1   | F     | pSMART-Ala2 | 89.5 |
| 3  | gltA1   | GU    | pSMART-Ala2 | 89.4 |
| 4  | FG1G2   | 無し    | pSMART-Ala2 | 89.3 |
| 5  | G1G2    | GU    | pSMART-Ala2 | 88.8 |
| 6  | FG1G2   | G     | pSMART-Ala2 | 88.2 |
| 7  | G1G2    | F     | pSMART-Ala2 | 83.4 |
| 8  | gltA2   | FGU   | pSMART-Ala2 | 83.4 |
| 9  | gltA1   | FGU   | pSMART-Ala2 | 83.1 |
| 10 | G1G2    | FGU   | pSMART-Ala2 | 82.3 |
| 11 | gltA2   | U     | pSMART-Ala2 | 82.2 |
| 12 | gltA2   | F     | pSMART-Ala2 | 80.6 |
| 13 | FG1G2   | FG    | pSMART-Ala2 | 80.5 |
| 14 | 無し      | G     | pSMART-Ala2 | 79.9 |
| 15 | gltA2   | GU    | pSMART-Ala2 | 77.9 |
| 16 | fabI    | FGU   | pSMART-Ala2 | 75.7 |
| 17 | 無し      | FG    | pSMART-Ala2 | 75.4 |
| 18 | G1G2    | FU    | pSMART-Ala2 | 75.3 |
| 19 | 無し      | FGU   | pSMART-Ala2 | 73.4 |
| 20 | 無し      | FU    | pSMART-Ala2 | 73.3 |
| 21 | gltA1   | U     | pSMART-Ala2 | 72.9 |
| 22 | fabI    | FG    | pSMART-Ala2 | 69.1 |
| 23 | FG1G2   | FU    | pSMART-Ala2 | 67.6 |
| 24 | gltA2   | FU    | pSMART-Ala2 | 67.5 |

10

20

【表 4 7】

|    |       |     |              |        |
|----|-------|-----|--------------|--------|
| 25 | 無し    | F   | pSMART-Ala2  | 65.6   |
| 26 | gltA2 | FG  | pSMART-Ala2  | 62.1   |
| 27 | FG1G2 | F   | pSMART-Ala2  | 61.1   |
| 28 | fabI  | GU  | pSMART-Ala2  | 59.9   |
| 29 | fabI  | F   | pSMART-Ala2  | 59.6   |
| 30 | gltA1 | FG  | pSMART-Ala2  | 58.1   |
| 31 | gltA1 | 無し  | pSMART-Ala2  | 57.1   |
| 32 | 無し    | 無し  | pSMART-Ala2  | 55.5   |
| 33 | G1G2  | 無し  | pSMART-Ala2  | 54.1   |
| 34 | fabI  | U   | pSMART-Ala2  | 53.9   |
| 35 | gltA2 | G   | pSMART-Ala2  | 52.8   |
| 36 | fabI  | 無し  | pSMART-Ala2  | 50.3   |
| 37 | fabI  | FU  | pSMART-Ala2  | 48.4   |
| 38 | gltA2 | 無し  | pSMART-Ala2  | 47.8   |
| 39 | FG1G2 | FGU | pSMART-Ala2  | 44.6   |
| 40 | 無し    | GU  | pSMART-Ala2  | 42.9   |
| 41 | 無し    | U   | pSMART-Ala2  | 39.3   |
| 42 | fabI  | G   | pSMART-Ala2  | 39.2   |
| 43 | gltA1 | G   | pSMART-Ala2  | 34.7   |
| 44 | G1G2  | FG  | pSMART-Ala2  | 32.8   |
| 45 | FG1G2 | U   | pSMART-Ala2  | 29.4   |
| 46 | FG1G2 | GU  | pSMART-Ala2  | 24.3   |
| 47 | G1G2  | G   | pSMART-Ala2  | 24.1   |
| 48 | G1G2  | U   | pSMART-Ala2  | -25.3  |
| 49 | 無し    | 無し  | pSMART-Ala13 | 55.7   |
| 50 | 無し    | 無し  | pSMART-Ala12 | -31.5  |
| 51 | 無し    | 無し  | pSMART-Ala15 | -103.2 |
| 52 | 無し    | 無し  | pSMART-Ala11 | -114.1 |
| 53 | 無し    | 無し  | pSMART-Ala14 | -441.5 |

10

20

## 【 0 1 7 1 】

## 第 9 節：標準化された 2 段階発酵

燐酸を制限した標準化された 2 段階発酵プロトコールを、全ての調節弁株の評価に利用した。此のプロトコールは高度に再現可能な増殖段階結果を生み、異なる産物を作る株同士でさえも、最小限の株から株への変動性を有する。異なる株に依る異なるフィード速度及び塩基利用の結果として、生産段階の間には、より有意な変動性が観察された。図 3 3 A は、本研究に於いて実施した 1 L 発酵の 10 g · c d w / L バイオマスレベルに依る全ての調節弁株の増殖曲線を与えている。此の一貫性は、図 3 3 B に依って与えられている増殖連動型生産株のより変動的な増殖とは対照的である。

30

## 【 0 1 7 2 】

## 【表 4 8】

表 1 6：メバロン酸スケータブル性に用いた株。

| 株# | サイレンシング | 蛋白質分解 | プラスミド       |
|----|---------|-------|-------------|
| 1  | FG1G2   | FU    | pSMART-Mev2 |
| 2  | G2Z     | FGUA  | pSMART-Mev2 |
| 3  | FG1G2A  | FUN   | pSMART-Mev2 |
| 4  | UZ      | FGUA  | pSMART-Mev2 |

40

## 【 0 1 7 3 】

## 第 1 0 節：分析法

50

## 【表 4 9】

表 1 7 : UPLC-MS/MS パラメータ

| 分析成分     | 保持時間<br>(min) | ESI<br>モード | MRM トランジション<br>(単数又は複数) | コーン電圧 | 衝突<br>エネルギー |
|----------|---------------|------------|-------------------------|-------|-------------|
| アラニン     | 0.5           | +          | 89.95→44.08             | 15    | 9           |
| C13 アラニン | 0.5           | +          | 91.95→46.08             | 15    | 9           |

## 【 0 1 7 4 】

## 図面の詳細な説明

図 1 A : 2 段階発酵に於ける動的な代謝コントロールの概観。代謝工学は、所望の産物への代謝経路をホストの既存の代謝ネットワークに対して最適化する事を使用し、フィードストックを所望の産物に変換する。塗り潰された丸は代謝物質を指示し、線は酵素反応を指示する。多くの場合に、代謝工学に於ける従来の最適化は、3つの鍵と成るステップ ( a ) 望まれない副産物に至る物を包含する競合する非必須の代謝経路の欠失、及びフィードストック分子を産物に変換する経路の酵素の過剰発現 ( より太い線に依って指示されている ) と、予想上は ( b ) 生産を更に増大させる為に必須の代謝の酵素を減弱させる事 ( 橙色の線に依って指示されている ) とを使用する。此のプロセスを繰り返して、収量を所望の産物に最適化する ( 円グラフ )。対照的に、動的な代謝ネットワーク最小化を用いて、普通に用いられる 2 段階発酵プロセスのポテンシャルを完全に解放し得る ( c ~ d )。此れ等のプロセスの第 1 の段階に於いては ( c ) バイオマス増殖及び収量を最適化し乍ら、第 2 の段階に於いては ( d ) 産物形成を最適化する。これは、バイオマスレベルが蓄積し、制限栄養素 ( 此のケースでは無機燐酸 ) を消費し、此れが欠乏した時に生産的な静止期への進入をトリガーする 2 段階プロセス ( e ) に良く適している。CRISPRi に基づく遺伝子サイレンシング及び / 又はコントロールされた蛋白質分解を利用する合成的な代謝調節弁を用いて ( f 及び g ) 生産段階への遷移に依って該当する代謝ネットワークを大いに縮減し得、 ( f ) サイレンシングガイドの阵列が誘導され、CASCAD E 複合体に依って個々のガイドへとプロセッシングされ、関心の複数の遺伝子 ( GOI ) をサイレンシング標的化する為に用いられ得る。 ( g ) C 末端 DAD + 4 タグが染色体改変に依って関心の酵素 ( EOI ) に追加される場合には、其れ等は誘導性の sspB シャペロンの存在下に於いて clpXP プロテアーゼに依って誘導的に分解され得る。 ( h ) 誘導性の蛋白質分解及び CRISPRi サイレンシングに依る 2 段階の動的コントロールを用いる E. coli の蛋白質レベルの動的コントロール。細胞が増殖すると、燐酸が欠乏し、細胞は mCherry を「オフにし」、GFPuv を「オンにする」。網掛けエリアは平均からの 1 標準偏差を表す。n = 3。 ( i ) mCherry 分解への単独及び組み合わせの蛋白質分解及び遺伝子サイレンシングの相対的なインパクトと、 ( j ) 減衰速度。

## 【 0 1 7 5 】

図 1 B : 株及びバイオプロセス最適化。 ( a ) 多くの場合に、代謝工学に於ける株及びプロセス最適化の為に従来のアプローチは、競合する非必須の代謝経路の欠失と経路酵素の過剰発現とを使用する ( 塗り潰された丸 : 代謝物質 ; 線 : 酵素反応。緑は生産経路を指示した )。 ( a - i ) 株パラバントはスクリーニングスケールで評価され ( マイクロタイタープレート、振盪フラスコ等 )、 ( a - ii ) 最も良好な株を、より大スケールの計装化バイリアクターに依って評価する。多数の設計 - 組立 - 試験サイクル ( a - vi ~ vii ) を用いて、生産株及びプロセス両方を繰り返し最適化する。多くの場合に決定的な環境 ( プロセス ) 変数の最適化を包含する ( a - viii )。 ( a - iii ) 最も良好な実施株及び関連する最適化されたプロセス条件を、産業的に然るべきレベルへとスケールアップする。 ( b ) 2 段階の動的な代謝コントロールを用いる迅速な株及びバイオプロセス最適化。細胞の代謝ネットワークは産物形成に必須のステップのみへと動的に最小化される。これは標準化された 2 段階バイオプロセス ( c ) に依って成し遂げられ、此処では、バイオマスを蓄積する増殖段階の次に、最小限の代謝ネットワークのみに依る生産段階がある。マクロ栄養素の限定は、細胞性の代謝を増殖から生産に「切り換える」為に用いられ

10

20

30

40

50

得る。アプローチは、スクリーニングの為の予想される株バリエーションのより小さい部分集合を齎す (b - i)。代謝ネットワーク最小化は、然るべき代謝物質レベル (d) 及び其れ故に生産レベルを増大させる事を助け、其れは、プロセスロバスト性 (e) 並びに結果としてプロセス及び株スケラブル性 (f) をも又強化する。スクリーニングから同定された最も良好な生産者を、(b - i i) より大きい計装化バイオリクター及び (b - i i i) 爾後に産業的に然るべきレベルへと予測可能且つ迅速にスケラブル化する。必要とされる場合には、改善をガイドする為に、限定された設計 - 組立 - 試験サイクル (b - i v) を組み込む。株評価の為に、全てのスケールに於いて、産物非依存的な標準化されたプロトコールが踏襲され、集約的なプロセス最適化の必要を除去する。

#### 【0176】

図2A~D: *E. coli* に於ける2段階の合成的な代謝調節弁 (SMV) の実装。図2Aは、CRISPRiに基づく遺伝子サイレンシング及び/又はコントロールされた蛋白質分解を利用するSMVが構築されたと言う事を図示している。(上)サイレンシング: 誘導性のサイレンシングガイドRNAのアレイ (i) を用いて、関心の複数の遺伝子 (GOI) の発現をサイレンシングし得る。此の時には天然の *E. coli* のCRISPR/Cascade機構が発現され、此れがガイドアレイを個々のガイド (i i) へとプロセシングし得る。(下)蛋白質分解: C末端DAS+4タグが関心の酵素 (EOI) に追加される時に (染色体改変に依る)、sspBシャペロンのコントロールされた誘導 (i i i) に依って、其れ等はclpXPプロテアーゼに依って分解され得る (i v)。図2Bは、誘導性の蛋白質分解及びCRISPRiサイレンシングを用いる *E. coli* の蛋白質レベルの動的コントロールを図示している。細胞が増殖すると、燐酸が欠乏し、細胞はmCherryを「オフにし」、GFPuvを「オンにする」。網掛けエリアは平均からの1標準偏差を表す。r.f.u., 相対蛍光単位。図2Cは、mCherry分解への単独及び組み合わせの蛋白質分解及び遺伝子サイレンシングの相対的なインパクトを図示している。n.f.u., 正規化された蛍光単位 (最大蛍光に対して正規化)。図2Dは、観察されたmCherry蛍光減衰速度 (時間当り) への単独及び組み合わせの蛋白質分解及び遺伝子サイレンシングの相対的なインパクトを図示している。

#### 【0177】

図3A~K: 2段階の動的コントロールを利用する *E. coli* に依るアラニン生産。図3Aは株バリエーション設計を図示している。中央代謝の主要な経路が示されており: 解糖系、ペントース燐酸経路、クエン酸サイクル (TCA)、脂肪酸生合成、及び可溶性トランスヒドロゲナーゼを包含する。中央代謝のフラックスを縮減する為に「オフにされる」鍵と成る調節弁候補酵素/遺伝子は: グルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ (zwf - 「Z」)、リポアミドデヒドロゲナーゼ (lpd - 「L」)、クエン酸シンターゼ (glutA - 「G」)、エノイルACPレダクターゼ (fabI - 「F」)、及び可溶性トランスヒドロゲナーゼ (udhA - 「U」) を包含し得る。重要な事に、fabIの動的な除去は細胞内マロニルCoAプール及びマロニルCoAフラックスを増大させる事が以前に実証されている<sup>55</sup>。動的に「オンにされる」酵素は、関心の産物、此のケースではアラニンを生産する為の代謝経路を包含し得る。具体的な経路酵素はNADPH依存性アラニンデヒドロゲナーゼ (ald\*) 及びアラニン排出輸送体 (alaE) を包含する。加えて、アラニン生産経路はNADPHを補因子として利用するので、S. ミュータンスのgapN遺伝子<sup>56</sup> に依ってコードされるNADPH依存性グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼを、単独で、及び天然のgapA - 「A」遺伝子 (NADH依存性グリセルアルデヒドデヒドロゲナーゼ) をオフにする事との組み合わせでオンにした。略語: PTS - グルコースホスホトランスフェラーゼ輸送システム、P - 燐酸、BP - ビス燐酸、OAA - オキサロ酢酸、DHAP - ジヒドロキシアセトン燐酸、GA3P - グリセルアルデヒド3リン酸、1,3-BPG - 1,3ビスホスホグリセリン酸、3-PG - 3 - ホスホグリセリン酸、2-PG - 2 - ホスホグリセリン酸、PEP - ホスホエノールピルビン酸、MSA - マロン酸セミアルデヒド、ACP - アシルキャリア蛋白質、Ru - リブローズ、Xu - キシルロース、E - エリトロース、Ri - リボース、S - セドヘブツロース。遺

10

20

30

40

50

伝子サイレンシング単独、蛋白質分解単独、又は両方の組み合わせの何方かに依って、調節弁遺伝子/酵素の全ての組み合わせの動的コントロールの為のSMVに依って株を操作した。此れ等の株を標準化されたマイクロ発酵に於けるアラニン生産について評価した。図3Bは、2段階マイクロ発酵に於いて調べた全ての調節弁株について平均アラニン力価(黒)の順位プロットを図示しており、灰色エリアは標準偏差を表す。コントロール株のアラニン生産は赤で色付けした。図3Cは、0g/L(紫)から5g/L(赤)迄の、異なる蛋白質分解及びサイレンシングの組み合わせに应答した2段階生産の平均アラニン力価を図示している。図3Dは、単一の「調節弁」アラニン株(gltA1のサイレンシング(「G1」)、fabI及びudhAの蛋白質分解(「FU」))について、評価された異なる酸素移動速度(OTR)及びグルコース濃度に対して应答した平均アラニン力価を図示している。此の表面の結果を用いて株特異的なロバスト性スコア(RS)を計算した(本文を参照)。此の株は最も高いRSスコアを有する。図3Eは、複数のプロセス条件に於いて評価された48個の「調節弁」株の部分集合について、ロバスト性スコアのヒートマップを図示している。図3Fは、マイクロ発酵(fabI-gltA1-gltA2のサイレンシング(「FG1G2」)、fabI、gltA、及びudhAの蛋白質分解(「FGU」))から1Lバイオリクターへの最も良好な生産株の1つのスケールアップが、48hrsの生産後に0.8g/gの収量で80g/Lの力価を齎す事を図示している。図3Gは、此の株に於けるalaEアラニン排出輸送体の過剰発現(パネルf)が有意に改善された生産を齎し、27hrsの生産に依って~1g/gの収量で147g/Lに達する事を図示している(追加の詳細は補足資料第3節を参照)。図3Hはマイクロ発酵に於けるロバスト性評価の為に選択された株を図示している。図3Iは最もロバストな「調節弁」アラニン株のロバスト性及び力価を図示している(サイレンシング\_gltA1、蛋白質分解\_FU)。下面は、評価した全てのプロセス条件のメディアンに対して正規化されたアラニン力価のヒートマップを示しており、上面は、全てのプロセス条件に於けるアラニン力価を示している。同じカラースケール(g/Lに依るアラニン力価)を両方のパネルに用いた。図3Jは選択された株のRS3スコアを図示している。図3Kは、評価した全ての条件についてプロセス再現性ヒートマップを図示している。同じグレースケールを図3J及び図3Kに用いた。

10

20

#### 【0178】

図4A~F: 2段階及び増殖連動型アプローチの間のロバスト性比較。図4Aは、評価した全てのアラニン株についてRS3スコアの順位を図示しており、赤いバーは調節弁アラニン株を指示しており、青いバーは増殖連動型(GA)アラニン株を指示している。図4Bは、蛋白質分解「F」調節弁を有する「調節弁」アラニン株及び増殖連動型アラニン株について平均RS3スコアを図示している。図4Cは、評価した全ての条件のマイクロ発酵に於ける代表的な「調節弁」アラニン(蛋白質分解\_FGU、サイレンシング\_gltA1)及び増殖連動型アラニン株について最大力価プロットを図示している。図4Dは、評価した全ての条件に於ける増殖連動型アラニン株のプロセス再現性を図示している。図4Eは、代表的なロバストな「調節弁」アラニンについてロバスト性及び力価を図示している(蛋白質分解\_FGU、サイレンシング\_gltA1)。図4FはGA2株についてロバスト性及び力価を図示している。下面、評価した全てのプロセス条件のメディアンに対して正規化されたアラニン力価のヒートマップ、上面、全てのプロセス条件に於けるアラニン力価。同じカラースケール(g/Lに依るアラニン力価)を両方のパネルに用いた。

30

40

#### 【0179】

図5A~J: マイクロ発酵(図5A~D)及び1L発酵(図5E~J)に於ける「調節弁」及び増殖連動型アラニン生産の比較。ロバスト性分析に用いた全ての株の平均アラニン力価(図5A)及びロバスト性スコア(図5B)。選択された「調節弁」(図5C)及び増殖連動型(図5D)アラニン株の異なるOTR及びグルコース濃度に対して应答した平均アラニン力価。(図5B)に置いてアスタリスクに依って標識されている株を此の分析に用いた。此れ等の2つの株を1L性能比較の為に選択した。図5E及び図5Fは評価

50



した 1 L 性能指標を図示しており、平均比生産性 (SP, g / g d c w - h)、平均グルコース取り込み速度 (GUR, g / g c d w - h)、最大力価 (g / L)、及び最大収量 (g / g) を包含する。図 5 G 及び図 5 H は  $\mu$  L から 1 L へのスケラブル性を図示している。1 L データを 50 時間の生産の間の最大力価に対して標準化した。グルコース欠乏を回避する為に十分なフィードを増殖連動型株に用いた。図 5 I 及び図 5 J は、夫々スケラブル性プロット図 5 G 及び図 5 H に用いた全ての株について 1 L 生産プロファイルを図示しており、より暗色の記号は増殖曲線を表し、より明色の記号は生産曲線を表し、図 5 G 又は図 5 H に於いて記号の形は同じ株をコードする。

#### 【 0 1 8 0 】

図 6 A ~ E : 2 段階の動的コントロールを利用する *E. coli* のメバロン酸生産。図 6 A はメバロン酸生産の為に代謝経路及び SMV を図示している。図 6 B は、コントロール株に於いて、変えられたプロモーターの組み合わせを有する幾つかの生産経路プラスミドバリエーションを用いるメバロン酸生産を図示している。図 6 C は、メバロン酸を生産する「調節弁」株の部分集合のマイクロ発酵結果を図示しており、蛋白質分解型及びサイレンシング SMV の組み合わせと併せて図 6 B からの最も良好な生産経路を用いている。図 6 D は、1 L スケールで評価したメバロン酸株の部分集合について、 $\mu$  L から 1 L へのスケラブル性を図示している。 $\mu$  L データは  $n = 3$ 、1 L データは  $n = 1$ 。50 時間の生産時間の間の最大力価を相関に用いた。図 6 E は、1 L バイオリクターに於ける図 6 D からの最も良好なメバロン酸株の生産を図示している (fabI - gltA1 - gltA2 のサイレンシング (「FG1G2」)、fabI 及び udhA の蛋白質分解 (「FU」))。78 hrs の生産に依って 97 g / L の力価が観察された。生産段階の間の収量は 0.46 g / g に達した (理論収量の 84%) (追加の詳細は補足資料第 9 節を参照)。図 6 F は、3 - HP を生産する株の部分集合のマイクロ発酵結果を図示している。図 6 G は、1 L スケールに於いて評価した 3 - HP 株の部分集合について  $\mu$  L から 1 L へのスケラブル性を図示している (補足資料表 S 2 1 及び S 2 2)。図 6 H は、1 L システムに於ける最も良好な 3 - HP 株の生産性能を図示している。四角, 3 - HP / メバロン酸力価 ; 丸, OD 6 0 0。最も高い生産者に於いて、生産段階の間の収量は、メバロン酸では 0.46 g / g、3 - HP では 0.63 g / g に達した。

#### 【 0 1 8 1 】

図 7 : 燐酸欠乏プロモーターキャラクタリゼーション。一連の GFP レポーターベクターを構築して、12 個の以前に同定された燐酸制御型プロモーターの発現レベルを評価した。燐酸を制限した最少培地を用いる標準化されたプロトコルを用いて、Biolector (商標) に依って、GFP 発現について株を連続的に評価した。バイオマスレベルがピークに達した後に (明瞭性の為、示していない)、GFP 発現が始まる。重要な事に、現行の一連のプロモーターは広範囲の発現レベルを可能にする。

#### 【 0 1 8 2 】

図 8 : インスレーター付き燐酸欠乏プロモーターキャラクタリゼーション。一連の GFP レポーターベクターを構築して、FGM 3 培地に於ける 5 つのインスレーター付き燐酸制御型プロモーターの発現レベルを評価した。燐酸を制限した最少培地を用いる標準化されたプロトコルを用いて、Biolector (商標) に依って、GFP 発現について株を連続的に評価した。バイオマスレベルがピークに達した後に (明瞭性の為、示していない)、GFP 発現が始まる。重要な事に、現行の一連のプロモーターは広範囲の発現レベルを可能にする。

#### 【 0 1 8 3 】

図 9 : インスレーター付き恒常的プロモーターキャラクタリゼーション。一連の GFP レポーターベクターを構築して、40 mM 燐酸培地に依って、FGM 3 に於ける 5 つのインスレーター付き恒常的プロモーターの発現レベルを評価した。網掛けエリアは標準偏差を表す。 $n = 3$ 。株を Biolector (商標) に依って GFP 発現について連続的に評価した。GFP 発現はプロモーター pro A、pro B、及び pro D でのみ観察された。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 8 4 】

図 1 0 : 2 段階発酵に於ける最適な 3 - H P フラックスの代謝モデル化結果。左 : バイオマス生産を目的関数として用いた、増殖段階の間の最適化されたフラックス。右 : 3 - H P 生産を目的関数として用いた、3 - H P 生産段階の間の最適化されたフラックス ( バイオマス生産は 0 に設定した ) 。フラックスは、利用されるグルコースの 1 0 0 モル当りの所与の反応のフラックスの相対的な比又はモルとして挙げられている。

## 【 0 1 8 5 】

図 1 1 : 染色体改変。

## 【 0 1 8 6 】

図 1 2 : 1 L の F G M 1 0 最少培地発酵に於ける出発ホスト株の平均最大増殖速度。  $n = 2$ 。 10

## 【 0 1 8 7 】

図 1 3 A ~ E : 1 L の標準的な最少培地発酵に於いて出発ホスト株の増殖期の間利用されるグルコースの分配。指数期中期 ~ 後期に於いて「生産」が始まるので、D L F \_ 0 0 2 5 については指数増殖期中期及び増殖期終期の結果が与えられている。結果はデュブリケートの発酵の平均である。図 1 3 A , B W 2 5 1 1 3 ; 図 1 3 B , B W a p l d f ; 図 1 3 C , D L F \_ 0 0 0 1 ; 図 1 3 D , 指数中期の D L F \_ 0 0 2 5 ; 図 1 3 E , 増殖期の終わりの D L F \_ 0 0 2 5 。単位はグラムグルコースであった。

## 【 0 1 8 8 】

図 1 4 : p C A S C A D E - c o n t r o l プラスミド構築スキーム。 20

## 【 0 1 8 9 】

図 1 5 A ~ B : p C A S C A D E 構築スキーム。図 1 5 A , 単一の s g R N A クローニング ; 図 1 5 B , 2 個の s g R N A 。

## 【 0 1 9 0 】

図 1 6 A ~ C : マイクロ発酵プロセス概観。( A ) 高スループットなマイクロ発酵プロトコールの概観。フリーザーストック ( 代替的には、コロニーが用いられ得る ) を用いて、96 ウェルプレートの S M 1 0 + + に接種する。培養を 1 6 時間に渡って一晩増殖させ、遠心に依って収穫し、燐酸無し培地に依って洗浄し、燐酸無し培地に標的バイオマスレベルで再懸濁する ( O D 6 0 0 n m = 1 . 0 ) 。 E n z y S c r e e n ( 商標 ) カバー及びクランプを用いて蒸発を縮減し、高い酸素移動速度を可能にする。プロトコールはテカングループ・リミテッド ( Tecan Group Ltd. ) E v o リキッドハンドラーに依って実装されている。( B ) 96 ウェルプレート培養に依る代表的な一晩増殖。一晩培養の O D 6 0 0 の分布をプロットした。( C ) テカングループ・リミテッド ( Tecan Group Ltd. ) E v o リキッドハンドラーを用いる正規化後の代表的な O D 6 0 0 分布。 30

## 【 0 1 9 1 】

図 1 7 : 異なるインスレーター付き燐酸プロモーターを D L F \_ 0 0 2 5 株に用いる L - アラニン生産の為のマイクロ発酵。

## 【 0 1 9 2 】

図 1 8 : g a p N / g a p A 株に依る L - アラニン生産のヒートマップ。 40

## 【 0 1 9 3 】

図 1 9 A ~ D : ロバスト性について評価された 4 つの株の、マイクロ発酵に於ける異なる O T R 及びグルコース濃度に対して応答したアラニン生産。

## 【 0 1 9 4 】

図 2 0 A ~ D : ロバスト性について評価された 4 つの株の、マイクロ発酵に於ける異なる O T R 及びグルコース濃度に対して応答したアラニン生産。

## 【 0 1 9 5 】

図 2 1 A ~ D : ロバスト性について評価された 4 つの株の、マイクロ発酵に於ける異なる O T R 及びグルコース濃度に対して応答したアラニン生産。

## 【 0 1 9 6 】

図 2 2 A ~ D : ロバスト性について評価された 4 つの株の、マイクロ発酵に於ける異な 50

る O T R 及びグルコース濃度に対して応答したアラニン生産。

【 0 1 9 7 】

図 2 3 A ~ D : ロバスト性について評価された 4 つの株の、マイクロ発酵に於ける異なる O T R 及びグルコース濃度に対して応答したアラニン生産。

【 0 1 9 8 】

図 2 4 A ~ D : ロバスト性について評価された 4 つの株の、マイクロ発酵に於ける異なる O T R 及びグルコース濃度に対して応答したアラニン生産。

【 0 1 9 9 】

図 2 5 A ~ D : ロバスト性について評価された 4 つの株の、マイクロ発酵に於ける異なる O T R 及びグルコース濃度に対して応答したアラニン生産。

【 0 2 0 0 】

図 2 6 A ~ D : ロバスト性について評価された 4 つの株の、マイクロ発酵に於ける異なる O T R 及びグルコース濃度に対して応答したアラニン生産。

【 0 2 0 1 】

図 2 7 A ~ D : ロバスト性について評価された 4 つの株の、マイクロ発酵に於ける異なる O T R 及びグルコース濃度に対して応答したアラニン生産。

【 0 2 0 2 】

図 2 8 A ~ D : ロバスト性について評価された 4 つの株の、マイクロ発酵に於ける異なる O T R 及びグルコース濃度に対して応答したアラニン生産。

【 0 2 0 3 】

図 2 9 A ~ D : ロバスト性について評価された 4 つの株の、マイクロ発酵に於ける異なる O T R 及びグルコース濃度に対して応答したアラニン生産。

【 0 2 0 4 】

図 3 0 A ~ D : ロバスト性について評価された 4 つの株の、マイクロ発酵に於ける異なる O T R 及びグルコース濃度に対して応答したアラニン生産。

【 0 2 0 5 】

図 3 1 A ~ D : ロバスト性について評価された 4 つの株の、マイクロ発酵に於ける異なる O T R 及びグルコース濃度に対して応答したアラニン生産。

【 0 2 0 6 】

図 3 2 : ロバスト性について評価された 1 つの株の、マイクロ発酵に於ける異なる O T R 及びグルコース濃度に対して応答したアラニン生産。

【 0 2 0 7 】

図 3 3 A ~ B : 本文書に於いて評価した 1 L スケールの全ての ( 図 3 3 A ) 調節弁及び ( 図 3 3 B ) 増殖連動型株の増殖プロファイル。ラグタイムの何れかの変動を考慮して、増殖曲線を同調させた。調節弁株の増殖曲線は同じ指数中期時点に同調させた。増殖連動型株の増殖曲線は同じテイクオフポイントに同調させた。

【 0 2 0 8 】

図 3 4 : 文献からの最も高いメバロン酸力価を有する株及び此の仕事に於いて評価したメバロン酸株 1 の比生産性 ( S P ) 比較。

【 0 2 0 9 】

図 3 5 : M S 測定からのアラニン標準曲線。トリプレートの標準的な測定からの質量分析応答の平均及び標準偏差をプロットした。

【 0 2 1 0 】

図 3 6 A ~ B : R I 測定からのグルコース ( 図 3 6 A ) 及びエタノール ( 図 3 6 B ) 標準曲線。トリプレートの標準的な測定からのピーク面積の平均及び標準偏差をプロットした。

【 0 2 1 1 】

図 3 7 : T U V 測定からの 3 - ヒドロキシプロピオン酸標準曲線。デュプレートの標準的な測定からのピーク面積の平均及び標準偏差をプロットした。

【 0 2 1 2 】

10

20

30

40

50

図38A~D: (図38A) L-アラニン、(図38B) D-アラニン、(図38C) メバロン酸、及び(図38D) メバロノラク톤のTUV標準曲線。トリプリケートの標準的な測定からのピーク面積の平均及び標準偏差をプロットした。

【0213】

参照

1. キャメロン (Cameron), D. E.; バシヨア (Bashor), C. J.; コリンズ (Collins), J. J. 著, 「合成生物学の手短な歴史 (A brief history of synthetic biology)」ネイチャー・レビューズ・マイクロバイオロジー (Nature Reviews Microbiology) 2014年, 12(5), 381-90.
2. チェオン (Cheong), S.; クロムバーグ (Clomburg), J. M.; ゴンザレス (Gonzalez), R. 著, 「非脱炭酸的クライゼン縮合反応を用いる細菌に依る機能性低分子のエネルギー及び炭素効率的合成 (Energy- and carbon-efficient synthesis of functionalized small molecules in bacteria using non-decarboxylative Claisen condensation reactions)」ネイチャー・バイオテクノロジー (Nature biotechnology) 2016年, 34(5), 556-61. 10
3. チョイ (Choi), S. Y.; パク (Park), S. J.; キム (Kim), W. J.; ヤン (Yang), J. E.; リー (Lee), H.; シン (Shin), J.; リー (Lee), S. Y. 著, 「大腸菌に於ける炭水化物からのポリ(乳酸-co-グリコール酸)の1ステップ発酵型生産 (One-step fermentative production of poly(lactate-co-glycolate) from carbohydrates in Escherichia coli)」ネイチャー・バイオテクノロジー (Nature biotechnology) 2016年, 34(4), 435-40. 20
4. ジャルボー (Jarboe), L. R.; ツァン (Zhang), X.; ワン (Wang), X.; ムーア (Moore), J. C.; シャンムガム (Shanmugam), K. T.; イングラム (Ingram), L. O. 著, 「バイオ再生可能な燃料及びケミカルの生産の為の代謝工学: 合成生物学の寄与 (Metabolic engineering for production of biorenewable fuels and chemicals: contributions of synthetic biology)」ジャーナル・オブ・バイオメディシン&バイオテクノロジー (Journal of biomedicine & biotechnology) 2010年, 761042.
5. リー (Lee), J. W.; ナ (Na), D.; パク (Park), J. M.; リー (Lee), J.; チョイ (Choi), S.; リー (Lee), S. Y. 著, 「天然及び非天然ケミカルの為の微生物のシステム代謝工学 (Systems metabolic engineering of microorganisms for natural and non-natural chemicals)」ネイチャー・ケミカル・バイオロジー (Nature Chemical Biology) 2012年, 8(6), 536-46. 30
6. デロモナコ (Dellomonaco), C.; クロムバーグ (Clomburg), J. M.; ミラー (Miller), E. N.; ゴンザレス (Gonzalez), R. 著, 「燃料及びケミカルの合成の為のベータ酸化サイクルの操作された反転 (Engineered reversal of the beta-oxidation cycle for the synthesis of fuels and chemicals)」ネイチャー (Nature) 2011年, 476(7360), 355-9.
7. キム (Kim), S.; クロムバーグ (Clomburg), J. M.; ゴンザレス (Gonzalez), R. 著, 「大腸菌のベータ酸化反転に依る中鎖長 (C6-C10) 燃料及びケミカルの合成 (Synthesis of medium-chain length (C6-C10) fuels and chemicals via beta-oxidation reversal in Escherichia coli)」ジャーナル・オブ・インダストリアル・マイクロバイオロジー&バイオテクノロジー (Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology) 2015年, 42(3), 465-75. 40
8. メドウズ (Meadows), A. L.; ホーキンス (Hawkins), K. M.; ツェガエ (Tsegaye), Y.; アンティポフ (Antipov), E.; キム (Kim), Y.; レーツ (Rae tz), L.; ダール (Dahl), R. H.; タイ (Tai), A.; マハトデジクル・メドウズ (Mahatdejkul-Meadows), T.; シュー (Xu), L.; チョウ (Zhao), L.; ダシカ (Dasika), M. S.; ムラルカ (Murarka), A.; レニハン (Lenihan), J.; エン (Eng), D.; レン (Leng), J. S.; リウ (Liu), C. L.; ウェンガー (Wen 50

ger), J. W.; ジャン (Jiang), H.; チャオ (Chao), L.; ウエストフォール (Westfall), P.; ライ (Lai), J.; ガネサン (Ganesan), S.; ジャクソン (Jackson), P.; マンス (Mans), R.; プラット (Platt), D.; リーブス (Reeves), C. D.; サイジャ (Saija), P. R.; ウィツヒマン (Wichmann), G.; ホームズ (Holmes), V. F.; ベンジャミン (Benjamin), K.; ヒル (Hill), P. W.; ガードナー (Gardner), T. S.; ツォン (Tsong), A. E. 著, 「産業イソプレノイド生産の為に酵母中央炭素代謝を書き換える (Rewriting yeast central carbon metabolism for industrial isoprenoid production)」ネイチャー (Nature) 2016年, 537 (7622), 694 - 697.

9. ヤーダブ (Yadav), V. G.; デ・メイ (De Mey), M.; リム (Lim), C. G.; アジクマール (Ajikumar), P. K.; ステファノプロス (Stephanopoulos), G. 著, 「代謝工学及び合成生物学の将来: 系統的な実現に向けて (The future of metabolic engineering and synthetic biology: towards a systematic practice)」メタボリック・エンジニアリング (Metabolic Engineering) 2012年, 14 (3), 233 - 41.

10

10. ブロフィー (Brophy), J. A.; フォークト (Voigt), C. A. 著, 「遺伝子回路設計の原理 (Principles of genetic circuit design)」ネイチャー・メソッズ (Nature Methods) 2014年, 11 (5), 508 - 20.

11. クティナス (Koutinas), M.; キバリッシデス (Kiparissides), A.; ピスティコプーロス (Pistikopoulos), E. N.; マンタラリス (Mantalaris), A. 著, 「バイオプロセスシステム工学: 従来のプロセス工学原理を産業バイオテクノロジーに移入する (Bioprocess systems engineering: transferring traditional process engineering principles to industrial biotechnology)」コンピューショナル・アンド・ストラクチャル・バイオテクノロジー・ジャーナル (Computational and Structural Biotechnology Journal) 2012年, 3, e201210022.

20

12. ロドリゴ (Rodrigo), G.; ハラミーヨ (Jaramillo), A. 著, 「AutoBioCAD: 遺伝子回路の完全なバイオデザイン自動化 (AutoBioCAD: full biodesign automation of genetic circuits)」ACSシンセティック・バイオロジー (ACS Synthetic Biology) 2013年, 2 (5), 230 - 6.

13. ガルスト (Garst), A. D.; バッサロ (Bassalo), M. C.; パインズ (Pines), G.; リンチ (Lynch), S. A.; ハルウェグ・エドワーズ (Halweg-Edwards), A. L.; リウ (Liu), R.; リャン (Liang), L.; ワン (Wang), Z.; ズイトウン (Zeitoun), R.; アレクサンダー (Alexander), W. G.; ギル (Gill), R. T. 著, 「蛋白質、代謝、及びゲノム工学の為にヌクレオチド解像度に依る変異のゲノムワイドマッピング (Genome-wide mapping of mutations at single-nucleotide resolution for protein, metabolic and genome engineering)」ネイチャー・バイオテクノロジー (Nature Biotechnology) 2017年, 35 (1), 48 - 55.

30

14. チャーチ (Church), G. M.; エロヴィッツ (Elowitz), M. B.; スモルケ (Smolke), C. D.; フォークト (Voigt), C. A.; ワイス (Weiss), R. 著, 「合成生物学のポテンシャルを引き出す (Realizing the potential of synthetic biology)」ネイチャー・レビューズ・モレキュラー・セル・バイオロジー (Nature Reviews Molecular Cell Biology) 2014年, 15 (4), 289 - 94.

40

15. トマス (Thomas), S.; メイナード (Maynard), N. D.; ギル (Gill), J. 著, 「ギブソンアセンブリ (登録商標) を用いるDNAライブラリー構築 (DNA library construction using Gibson Assembly[reg])」ネイチャー・メソッズ (Nature Methods) 2015年, 12 (11).

16. グッドウィン (Goodwin), S.; マクファーソン (McPherson), J. D.; マッコンビー (McCombie), W. R. 著, 「時代の到来: 次世代シーケンシングテクノロジーの10年 (Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies)」ネイチャー・レビューズ・ジェネティクス (Nature Reviews Genetics) 2016年

50

, 17(6), 333-51.

17. リンチ (Lynch), M. D.; ヴァルネッケ (Warnecke), T.; ギル (Gill), R. T. 著, 「SCALES: ライブラリー濃縮のマルチスケール分析 (SCALES: multiscale analysis of library enrichment)」ネイチャー・メソッズ (Nature Methods) 2007年, 4(1), 87-93.

18. ゼイトゥーン (Zeitoun), R. I.; ガルスト (Garst), A. D.; デゲン (Degen), G. D.; パインズ (Pines), G.; マンセル (Mansell), T. J.; グリーブス (Glebes), T. Y.; ボイル (Boyle), N. R.; ギル (Gill), R. T. 著, 「操作された細胞集団に於ける組み合わせのゲノム変異の多重トラッキング (Multiplexed tracking of combinatorial genomic mutations in engineered cell populations)」ネイチャー・バイオテクノロジー (Nature Biotechnology) 2015年, 33(6), 631-7.

19. クルーク (Crook), N.; アバテマルコ (Abatemarco), J.; サン (Sun), J.; ワグナー (Wagner), J. M.; シュミッツ (Schmitz), A.; アルパー (Alper), H. S. 著, 「酵母の遺伝子及び経路のインビボ連続進化 (In vivo continuous evolution of genes and pathways in yeast)」ネイチャー・コミュニケーションズ (Nature Communications) 2016年, 7, 13051.

20. バーク (Burg), J. M.; リード (Reed), B. J.; イェー (Ye), Z.; クーパー (Cooper), C. B.; モレブ (Moreb), E. A.; 及びリンチ (Lynch), M. D. 著, 「大規模バイオプロセスの競争力: 2段階発酵に於ける動的な代謝コントロールのポテンシャル (Large-Scale Bioprocess Competitiveness: The Potential of Dynamic Metabolic Control in Two-Stage Fermentations)」カレント・オピニオンズ・イン・ケミカルエンジニアリング (Current Opinions in Chemical Engineering) 2016年, (査読中).

21. ツァン (Zhang), Y. H. 著, 「合成的なインビトロバイオシステムに依るバイオ燃料及びバイオケミカルの生産: 機会及び課題 (Production of biofuels and biochemicals by in vitro synthetic biosystems: Opportunities and challenges)」バイオテクノロジー・アドバンシズ (Biotechnology Advances) 2015年, 33(7), 1467-83.

22. ディートリヒ (Dietrich), J. A.; マッキー (McKee), A. E.; キースリング (Keasling), J. D. 著, 「高スループット代謝工学: 低分子スクリーニング及びセレクションの進展 (High-throughput metabolic engineering: advances in small-molecule screening and selection)」アニュアル・レビュー・オブ・バイオケミストリー (Annual Review of Biochemistry) 2010年, 79, 563-90.

23. フォルメンティ (Formenti), L. R.; ノルガード (Norregaard), A.; ボリック (Bolic), A.; ヘルナンデス (Hernandez), D. Q.; ハーゲマン (Hagemann), T.; ヘインズ (Heins), A. L.; ラーション (Larsson), H.; ミアーズ (Mears), L.; マウリシオ・イグレスias (Mauricio-Iglesias), M.; クルーネ (Kruhne), U.; ゲルネイ (Germaey), K. V. 著, 「産業発酵テクノロジー研究の課題 (Challenges in industrial fermentation technology research)」バイオテクノロジー・ジャーナル (Biotechnology Journal) 2014年, 9(6), 727-38.

24. レバノン (Levanon), S. S.; サン (San), K. Y.; ベネット (Bennett), G. N. 著, 「大腸菌 ArcA 及び FNR 制御システム及び代謝応答への酸素の効果 (Effect of oxygen on the Escherichia coli ArcA and FNR regulation systems and metabolic responses)」バイオテクノロジー・アンド・バイオエンジニアリング (Biotechnology and Bioengineering) 2005年, 89(5), 556-64.

25. ローク (Logue), J. B.; ファインドレー (Findlay), S. E.; コンテ (Comte), J. 著, 「エディトリアル: 環境変化に対する微生物応答 (Editorial: Microbial Responses to Environmental Changes)」フロンティアズ・イン・マイクロバイオロジー (Frontiers in Microbiology) 2015年, 6, 1364.

10

20

30

40

50

26. ガルシア・オチョア (Garcia-Ochoa), F.; ゴメス (Gomez), E. 著, 「微生物プロセスに於けるバイオリアクタースケールアップ及び酸素移動速度: 概観 (Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview)」バイオテクノロジー・アドバンシズ (Biotechnology Advances) 2009年, 27(2), 153-76.

27. ウェーゲマン (Waegeman), H.; ボープレ (Beauprez), J.; モエンス (Moens), H.; メルテンス (Maertens), J.; デ・メイ (De Mey), M.; フルキエ・モレノ (Foulquie-Moreno), M. R.; ヘイネン (Heijnen), J. J.; シャルリエ (Charlier), D.; ソーテールト (Soetaert), W. 著, 「大腸菌 K12 のバイオマス形成及び代謝フラックスへの *iclR* 及び *arcA* ノックアウトの効果、並びに大腸菌 BL21 (DE3) の代謝を理解する上での其の意味合い (Effect of *iclR* and *arcA* knockouts on biomass formation and metabolic fluxes in *Escherichia coli* K12 and its implications on understanding the metabolism of *Escherichia coli* BL21 (DE3))」BMC マイクロバイオロジー (BMC Microbiology) 2011年, 11, 70.

28. ウェーゲマン (Waegeman), H.; メルテンス (Maertens), J.; ボープレ (Beauprez), J.; デ・メイ (De Mey), M.; ソーテールト (Soetaert), W. 著, 「大腸菌 BL21 (DE3) の生理学及び代謝フラックスへの *iclR* 及び *arcA* 欠失の効果 (Effect of *iclR* and *arcA* deletions on physiology and metabolic fluxes in *Escherichia coli* BL21 (DE3))」バイオテクノロジー・レターズ (Biotechnology Letters) 2012年, 34(2), 329-37.

29. ヘメリッヒ (Hemmerich), J.; アデランタード (Adelantado), N.; バリゴン (Barrigon), J. M.; ポンテ (Ponte), X.; ホルマン (Hormann), A.; フェレル (Ferrer), P.; ケンジー (Kensy), F.; ヴァレーロ (Valero), F. 著, 「マイクロバイオリアクター及びラボスケール攪拌槽バイオリアクターシステムに於ける流加戦略の網羅的なクローンスクリーニング及び評価: リゾプス・オリゼリパーゼを生産する *Pichia pastoris* への応用 (Comprehensive clone screening and evaluation of fed-batch strategies in a microbioreactor and lab scale stirred tank bioreactor system: application on *Pichia pastoris* producing *Rhizopus oryzae* lipase)」マイクロバイアル・セル・ファクトリーズ (Microbial Cell Factories) 2014年, 13(1), 36.

30. ラミレス・バルガス (Ramirez-Vargas), R.; ヴィタル・ジャコメ (Vital-Jacome), M.; カマーチョ・ペレス (Camacho-Perez), E.; ハバード (Hubbard), L.; タラソ (Thalasso), F. 著, 「24 ウェルマイクロバイオリアクターシステムに於ける酸素移動のキャラクター化及び予想される呼吸計測応用 (Characterization of oxygen transfer in a 24-well microbioreactor system and potential respirometric applications)」ジャーナル・オブ・バイオテクノロジー (Journal of Biotechnology) 2014年, 186, 58-65.

31. フーバー (Huber), R.; ロス (Roth), S.; ラーメン (Rahmen), N.; ブフス (Buchs), J. 著, 「高スループットな実験法を利用して、磷酸制限に依る *E. coli* の T7 発現システムの比生産性を強化する (Utilizing high-throughput experimentation to enhance specific productivity of an *E. coli* T7 expression system by phosphate limitation)」BMC バイオテクノロジー (BMC biotechnology) 2011年, 11, 22.

32. リンチ (Lynch), M. D. 著, 「新たなテリトリーへ: 必須の代謝ネットワークの操作に依る改善された微生物合成 (Into new territory: improved microbial synthesis through engineering of the essential metabolic network)」カレント・オピニオン・イン・バイオテクノロジー (Current Opinion in Biotechnology) 2016年, 38, 106-11.

33. マッギネス (McGinness), K. E.; ベイカー (Baker), T. A.; ザウアー (Sauer), R. T. 著, 「コントロール可能な蛋白質の分解を操作する (Engineering

10

20

30

40

50

controllable protein degradation)」モレキュラー・セル (Molecular Cell) 2006年, 22(5), 701-7.

34. リュオ (Luo), M. L.; ムリス (Mullis), A. S.; リーネイ (Leenay), R. T.; バイゼル (Beisel), C. L. 著, 「プログラム可能な遺伝子抑制の為に内在性I型CRISPR-Casシステムを用途変更する (Repurposing endogenous type I CRISPR-Cas systems for programmable gene repression)」ニユクレック・アシツズ・リサーチ (Nucleic acids research) 2015年, 43(1), 674-81.

35. チー (Qi), L. S.; ラーソン (Larson), M. H.; ギルバート (Gilbert), L. A.; ダウドナ (Doudna), J. A.; ワイスマン (Weissman), J. S.; アーキン (Arkin), A. P.; リム (Lim), W. A. 著, 「遺伝子発現の配列特異的コントロールの為にRNAに依ってガイドされるプラットフォームとしてCRISPRを用途変更する (Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression)」セル (Cell) 2013年, 152(5), 1173-83.

10

36. チュブコフ (Chubukov), V.; ザウアー (Sauer), U. 著, 「バシラス・サチリス及び大腸菌の静止期代謝の環境依存性 (Environmental dependence of stationary-phase metabolism in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*)」アプライド・アンド・エンバイロメンタル・マイクロバイオロジー (Applied and environmental microbiology) 2014年, 80(9), 2901-9.

37. サントス・ベネイト (Santos-Beneit), F. 著, 「Phoレギュロン: 細菌の巨大な制御ネットワーク (The Pho regulon: a huge regulatory network in bacteria)」フロンティアズ・イン・マイクロバイオロジー (Frontiers in Microbiology) 2015年, 6, 402.

20

38. ブラウンズ (Brouns), S. J.; ジョア (Jore), M. M.; ラングレン (Lundgren), M.; ウェストラ (Westra), E. R.; スライクハイス (Slijkhuis), R. J.; スナイデルス (Snijders), A. P.; ディックマン (Dickman), M. J.; マカロワ (Makarova), K. S.; クーニン (Koonin), E. V.; ファンデルウースト (van der Oost), J. 著, 「短鎖CRISPR-RNAは原核生物の抗ウイルス防御をガイドする (Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes)」サイエンス (Science) 2008年, 321(5891), 960-4.

30

39. ジャン (Jian), J.; ツァン (Zhang), S. Q.; シー (Shi), Z. Y.; ワン (Wang), W.; チェン (Chen), G. Q.; ウー (Wu), Q. 著, 「欠損した混合酸発酵経路を有する大腸菌変異体に依るポリヒドロキシアルカン酸の生産 (Production of polyhydroxyalkanoates by *Escherichia coli* mutants with defected mixed acid fermentation pathways)」アプライド・マイクロバイオロジー・アンド・バイオテクノロジー (Applied Microbiology and Biotechnology) 2010年, 87(6), 2247-56.

40. グリュネンフェルダ (Grunenfelder), B.; ルンメル (Rummel), G.; ボラドスキー (Vohradsky), J.; ローダー (Roder), D.; ランゲン (Langen), H.; ジェナル (Jenal), U. 著, 「細菌細胞周期のプロテオーム分析 (Proteomic analysis of the bacterial cell cycle)」米国科学アカデミー紀要 (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America) 2001年, 98(8), 4681-6.

40

41. ヒンツェ (Hintsche), M.; クランプ (Klump), S. 著, 「増殖速度依存的な遺伝子発現の希釈及び理論的記述 (Dilution and the theoretical description of growth-rate dependent gene expression)」ジャーナル・オブ・バイオロジカル・エンジニアリング (Journal of Biological Engineering) 2013年, 7(1), 22.

42. レルヒナー (Lerchner), A.; ヤラシュ (Jarasch), A.; スケラ (Skerra), A. 著, 「新規の補因子特異性の為にバシラス・サチリスのアラニンデヒドロゲナーゼの操作 (Engineering of alanine dehydrogenase from *Bacillus subtilis* for nove

50



l cofactor specificity)」バイオテクノロジー・アンド・アプライド・バイオケミストリー (Biotechnology and Applied Biochemistry) 2016年, 63(5), 616-624.

43. ホリ (Hori), H.; ヨネヤマ (Yoneyama), H.; トベ (Tobe), R.; アンダー (Ando), T.; イソガイ (Isogai), E.; カツマタ (Katsumata), R. 著, 「大腸菌の新規遺伝子 ygaW (alaE) に依ってコードされる誘導性 L-アラニン排出輸送体 (Inducible L-alanine exporter encoded by the novel gene ygaW (alaE) in *Escherichia coli*)」アプライド・アンド・エンバイロメンタル・マイクロバイオロジー (Applied and environmental microbiology) 2011年, 77(12), 4027-34.

10

44. デイビス (Davis), J. H.; ルビン (Rubin), A. J.; ザウアー (Sauer), R. T. 著, 「一連のインスレーター付き細菌プロモーターの設計、構築、及びキャラクタリゼーション (Design, construction and characterization of a set of insulated bacterial promoters)」ニュクレック・アシッズ・リサーチ (Nucleic acids research) 2011年, 39(3), 1131-41.

45. ヘドウル (Hedl), M.; サザーリン (Sutherlin), A.; ワイルディング (Wilding), E. I.; マツツラ (Mazzulla), M.; マクデヴィット (McDevitt), D.; レーン (Lane), P.; ベルクナー (Burgner), J. W.; レーンボイター (Lehnbeuter), K. R.; シュタウファッシャー (Stauffacher), C. V.; グウィン (Gwynn), M. N.; ロドウェル (Rodwell), V. W. 著, 「イソペンテニル二リン酸生合成の二重機能蛋白質エンテロコッカス・フェカリスアセトアセチル補酵素 A チオラーゼ/3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル補酵素 A レダクターゼ (Enterococcus faecalis acetoacetyl-coenzyme A thiolase/3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, a dual-function protein of isopentenyl diphosphate biosynthesis)」ジャーナル・オブ・バクテリオロジー (Journal of Bacteriology) 2002年, 184(8), 2116-22.

20

46. ストゥシー (Steussy), C. N.; ロビソン (Robison), A. D.; テトリック (Tetrick), A. M.; ナイト (Knight), J. T.; ロドウェル (Rodwell), V. W.; シュタウファッシャー (Stauffacher), C. V.; サザーリン (Sutherlin), A. L. 著, 「酵素活性の構造的制限: HMG-CoA シンターゼのケース (A structural limitation on enzyme activity: the case of HMG-CoA synthase)」バイオケミストリー (Biochemistry) 2006年, 45(48), 14407-14.

30

47. シャオン (Xiong), M.; シュナイダーマン (Schneiderman), D. K.; ベイツ (Bates), F. S.; ヒルマイヤー (Hillmyer), M. A.; ツァン (Zhang), K. 著, 「糖からの機械的にチューニング可能なブロックポリマーのスケラブルな生産 (Scalable production of mechanically tunable block polymers from sugar)」米国科学アカデミー紀要 (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America) 2014年, 111(23), 8357-62.

48. オッターシュテット (Otterstedt), K.; ラーション (Larsson), C.; ビル (Bill), R. M.; シュタルベルク (Stahlberg), A.; ボレス (Boles), E.; ホーマン (Hohmann), S.; グスタフソン (Gustafsson), L. 著, 「酵母サッカロマイセス・セレビシエの代謝モードを切り換える (Switching the mode of metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*)」EMBO リポーツ (EMBO Reports) 2004年, 5(5), 532-7.

40

49. フブマン (Hubmann), G.; ギルーエ (Guillouet), S.; ネフォクト (Nevoigt), E. 著, 「サッカロマイセス・セレビシエに依るグリセロール形成の持続可能な縮減の為に Gpd1 及び Gpd2 のファインチューニング (Gpd1 and Gpd2 fine-tuning for sustainable reduction of glycerol formation in *Saccharomyces cerevisiae*)」アプライド・アンド・エンバイロメンタル・マイクロバイオロジー (Applied and environmental microbiology) 2011年, 77(17), 5857-67.

50

50. ラスカリス (Lascares), R.; ブッセマーカ (Bussemaker), H. J.; ブールスマ (Boorsma), A.; パイパー (Piper), M.; ファンデルスペック (van der Spek), H.; グリベル (Grivell), L.; ブロム (Blom), J. 著, 「グルコースに依って増殖したサッカロマイセス・セレピシエに於ける Hap4p 過剰発現は、細胞が新規の代謝状態に進入する事を誘導する (Hap4p overexpression in glucose-grown *Saccharomyces cerevisiae* induces cells to enter a novel metabolic state)」ゲノム・バイオロジー (Genome Biology) 2003年, 4(1), R3.

51. ミッタ (Mittal), N.; バブ (Babu), M. M.; ロイ (Roy), N. 著, 「ミトコンドリア電子伝達系の効率は長寿命の mrg19 サッカロマイセス・セレピシエに於いて増大している (The efficiency of mitochondrial electron transport chain is increased in the long-lived mrg19 *Saccharomyces cerevisiae*)」エイジング・セル (Aging Cell) 2009年, 8(6), 643-53.

52. トマス (Thomas), M. R.; オシア (O'Shea), E. K. 著, 「細胞内の磷酸緩衝液は細胞外磷酸レベルの一過的揺らぎを遮る (An intracellular phosphate buffer filters transient fluctuations in extracellular phosphate levels)」米国科学アカデミー紀要 (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America) 2005年, 102(27), 9565-70.

53. グレイ (Gray), J. V.; ペツコ (Petsko), G. A.; ジョンストン (Johnston), G. C.; リンゲ (Ringe), D.; シンガー (Singer), R. A.; ヴェルナー・ウォッシュバーン (Werner-Washburne), M. 著, 「眠れる森の美女: サッカロマイセス・セレピシエの休眠 ("Sleeping beauty": quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*)」マイクロバイオロジー・アンド・モレキュラーバイオロジー・レビューズ (Microbiology and Molecular Biology Reviews) 2004, 68(2), 187-206.

54. グリリー (Grilly), C.; ストリッカー (Stricker), J.; パン (Pang), W. L.; ベネット (Bennett), M. R.; ヘイスティ (Hasty), J. 著, 「サッカロマイセス・セレピシエの蛋白質の分解をチューニングする為の合成的な遺伝子ネットワーク (A synthetic gene network for tuning protein degradation in *Saccharomyces cerevisiae*)」モレキュラー・システムズ・バイオロジー (Molecular Systems Biology) 2007年, 3, 127.

55. オース (Orth), J. D.; ティエール (Thiele), I.; パルソン (Palsson), B. O. 著, 「フラックスバランス分析とは何か? (What is flux balance analysis?)」ネイチャー・バイオテクノロジー (Nature Biotechnology) 2010年, 28(3), 245-8.

56. イム (Yim), H.; ハセルベック (Haselbeck), R.; ニウ (Niu), W.; プホル・バックスレー (Pujol-Baxley), C.; バーガード (Burgard), A.; ボルト (Boldt), J.; カンドゥリナ (Khandurina), J.; トラウィック (Trawick), J. D.; オスターハウト (Osterhout), R. E.; シュテファン (Stephen), R.; エスタディリヤ (Estadilla), J.; テイサン (Teisan), S.; シュレイヤー (Schreyer), H. B.; アンドレ (Andrae), S.; ヤン (Yang), T. H.; リー (Lee), S. Y.; バーク (Burk), M. J.; バンディエン (Van Dien), S. 著, 「1,4-ブタンジオールの直接的生産の為の大腸菌の代謝工学 (Metabolic engineering of *Escherichia coli* for direct production of 1,4-butanediol)」ネイチャー・ケミカル・バイオロジー (Nature Chemical Biology) 2011年, 7(7), 445-52.

57. グプタ (Gupta), A.; ライツマン (Reizman), I. M.; ライシュ (Reisch), C. R.; プラザー (Prather), K. L. 著, 「経路非依存的なクオラムセンシング回路を用いた操作された細菌の代謝フラックスの動的制御 (Dynamic regulation of metabolic flux in engineered bacteria using a pathway-independent quorum-sensing circuit)」ネイチャー・バイオテクノロジー (Nature biotechnology) 2017年, 35(3), 273-279.

58. ワン (Wang), J.; ユー (Yu), H. Q. 著, 「回分培養に於けるラルスト

10

20

30

40

50

ニア・ユートロファ ATCC 17699 に依るポリヒドロキシ酪酸 (PHB) 及び細胞外ポリマー性物質 (EPS) の生合成 (Biosynthesis of polyhydroxybutyrate (PHB) and extracellular polymeric substances (EPS) by *Ralstonia eutropha* ATCC 17699 in batch cultures)」アプライド・マイクロバイオロジー・アンド・バイオテクノロジー (Applied Microbiology and Biotechnology) 2007年, 75(4), 871-8.

59. シュー (Xu), P.; チャオ (Qiao), K.; アーン (Ahn), W. S.; ステファノプロス (Stephanopoulos), G. 著, 「ドロップイン輸送用燃料及びオレオケミカルの合成のためのプラットフォームとしてヤロウィア・リポリティカを操作する (Engineering *Yarrowia lipolytica* as a platform for synthesis of drop-in transportation fuels and oleochemicals)」米国科学アカデミー紀要 (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America) 2016年, 113(39), 10848-53.

10

60. リンチ (Lynch), M. D.; ヴァルネッケ (Warnecke), T.; ギル (Gill), R. T. 著 「3-ヒドロキシプロピオン酸及び他の産物を生産する為の方法 (Method for Producing 3-Hydroxypropionic Acid and Other Products)」2011年9月8日.

61. チャオ (Qiao), K.; ワシレンコ (Wasylenko), T. M.; ジョウ (Zhou), K.; シュー (Xu), P.; ステファノプロス (Stephanopoulos), G. 著, 「ヤロウィア・リポリティカの脂質生産は、サイトゾルレドックス代謝を操作する事に依って最大化される (Lipid production in *Yarrowia lipolytica* is maximized by engineering cytosolic redox metabolism)」ネイチャー・バイオテクノロジー (Nature Biotechnology) 2017年.

20

62. ジャン (Jian), J.; ツァン (Zhang), S. Q.; シー (Shi), Z. Y.; ワン (Wang), W.; チェン (Chen), G. Q.; ウー (Wu), Q. 著, 「欠損した混合酸発酵経路を有する大腸菌変異体に依るポリヒドロキシアルカン酸の生産 (Production of polyhydroxyalkanoates by *Escherichia coli* mutants with defected mixed acid fermentation pathways)」アプライド・マイクロバイオロジー・アンド・バイオテクノロジー (Applied Microbiology and Biotechnology) 2010年, 87(6), 2247-56.

63. シャラン (Sharan), S. K.; トマソン (Thomason), L. C.; クズネツォフ (Kuznetsov), S. G.; コート (Court), D. L. 著, 「組み換え工学: 遺伝子工学の相同組み換えに基づく方法 (Recombineering: a homologous recombination-based method of genetic engineering)」ネイチャー・プロトコールズ (Nature Protocols) 2009年, 4(2), 206-23.

30

64. リ (Li), X. T.; トマソン (Thomason), L. C.; サヴィツケ (Sawitzke), J. A.; コスタンティーノ (Costantino), N.; コート (Court), D. L. 著, 「tetA-sacBカセットを用いるポジティブ及びネガティブセレクション: 大腸菌の組み換え工学及びP1トランスダクション (Positive and negative selection using the tetA-sacB cassette: recombineering and P1 transduction in *Escherichia coli*)」ニユクレイック・アシッズ・リサーチ (Nucleic acids research) 2013年, 41(22), e204.

40

65. ババ (Baba), T.; アラ (Ara), T.; ハセガワ (Hasegawa), M.; タカイ (Takai), Y.; オクムラ (Okumura), Y.; ババ (Baba), M.; ダツェンコ (Datsenko), K. A.; トミタ (Tomita), M.; ワナー (Wanner), B. L.; モリ (Mori), H. 著, 「大腸菌 K-12 のインフレームの単一遺伝子ノックアウト変異体の構築: Keioコレクション (Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection)」モレキュラー・システムズ・バイオロジー (Molecular systems biology) 2006年, 2, 20060008.

66. ファンダイケン (van Dijken), J. P.; バウアー (Bauer), J.; ブランビラ (Brambilla), L.; ドゥボック (Duboc), P.; フランソワ (Francois), J.

50

- . M . ; ガンセド (Gancedo) , C . ; ジュゼッピン (Giuseppin) , M . L . F . ; ヘイネン (Heijnen) , J . J . ; ホーア (Hoare) , M . ; ランゲ (Lange) , H . C . ; マッデン (Madden) , E . A . ; ニーダーベルガー (Niederberger) , P . ; ニールセン (Nielsen) , J . ; パルー (Parrou) , J . L . ; ペティット (Petit) , T . ; ポロ (Porro) , D . ; ロイス (Reuss) , M . ; ヴァンリエル (van Riel) , N . ; リッツィ (Rizzi) , M . ; スティンスマ (Steensma) , H . Y . ; ヴェリップス (Verrips) , C . T . ; ヴィンデロウ (Vindeloev) , J . ; プロンク (Pronk) , J . T . 著 , 「 4 つのサッカロマイセス・セレビスエ株の生理学的及び遺伝学的特性の施設間比較 (An interlaboratory comparison of physiological and genetic properties of four *Saccharomyces cerevisiae* strains) 」 エンザイム・アンド・マイクロバイアル・テクノロジー (Enzyme and Microbial Technology) 2000 , 26 (9 - 10) , 706 - 714 . 10
- 67 . オッターシュテット (Otterstedt) , K . ; ラーション (Larsson) , C . ; ビル (Bill) , R . M . ; シュターベルク (Stahlberg) , A . ; ボレス (Boles) , E . ; ホーマン (Hohmann) , S . ; グスタフソン (Gustafsson) , L . 著 , 「 酵母サッカロマイセス・セレビスエの代謝モードを切り換える (Switching the mode of metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*) 」 E M B O リポーツ (EMBO Reports) 2004年 , 5 (5) , 532 - 7 .
- 68 . ヴィツオルケ (Wieczorke) , R . ; クランペ (Krampe) , S . ; ワイエルシュタール (Weierstall) , T . ; フライデル (Freidel) , K . ; ホレンベルク (Hollenberg) , C . P . ; ボレス (Boles) , E . 著 , 「 サッカロマイセス・セレビスエのヘキソースの取り込みをブロックする為には少なくとも20個の輸送体遺伝子の同時ノックアウトが要求される (Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*) 」 F E B S レターズ (FEBS Letters) 1999年 , 464 (3) , 123 - 128 . 20
- 69 . ギーツ (Gietz) , R . D . ; シストル (Schiestl) , R . H . 著 , 「 LiAc / SS キャリア DNA / PEG 法を用いる高効率の酵母形質転換 (High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method) 」 ネイチャー・プロトコールズ (Nature Protocols) 2007年 , 2 (1) , 31 - 4 .
- 70 . ストヴィセク (Stovicek) , V . ; ボロディナ (Borodina) , I . ; フォースター (Forster) , J . 著 , 「 CRISPR - Cas システムはサッカロマイセス・セレビスエ産業株の高速で単純なゲノム編集を可能にする (CRISPR-Cas system enables fast and simple genome editing of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains) 」 メタボリック・エンジニアリング・コミュニケーションズ (Metabolic Engineering Communications) 2015年 , 2 , 13 - 22 . 30
- 71 . ラブun (Labun) , K . ; モンタギュー (Montague) , T . G . ; ギャニオン (Gagnon) , J . A . ; タイム (Thyme) , S . B . ; バレン (Valen) , E . 著 , 「 CHOPCHOP v2 : 次世代の CRISPR ゲノム工学の為のウェブツール (CHOPCHOP v2: a web tool for the next generation of CRISPR genome engineering) 」 ニュクレイック・アシッズ・リサーチ (Nucleic acids research) 2016年 , 44 (W1) , W272 - 6 . 40
- 72 . ホフマン (Hoffman) , C . S . ; ウィンストン (Winston) , F . 著 , 「 酵母からの10分間 DNA 調製は大腸菌の形質転換の為の自律型プラスミドを効率的に遊離させる (A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*) 」 ジーン (Gene) 1987年 , 57 (2 - 3) , 267 - 272 .
- 73 . リュオ (Luo) , M . L . ; ムリス (Mullis) , A . S . ; リーネイ (Leenay) , R . T . ; パイゼル (Beisel) , C . L . 著 , 「 プログラム可能な遺伝子抑制の為に内在性 I 型 CRISPR - Cas システムを用途変更する (Repurposing endogenous type I CRISPR-Cas systems for programmable gene repression) 」 ニュクレイック・アシッズ・リサーチ (Nucleic acids research) 2015年 , 43 (1) , 674 - 81 . 50

74. デイビス (Davis), J. H.; ルビン (Rubin), A. J.; ザウアー (Sauer), R. T. 著, 「一連のインスレーター付き細菌プロモーターの設計、構築、及びキャラクター化 (Design, construction and characterization of a set of insulated bacterial promoters)」*ニユクレック・アシツズ・リサーチ (Nucleic acids research)* 2011年, 39(3), 1131-41.

75. スミス (Smith), J. D.; スレシュ (Suresh), S.; シュレヒト (Schlecht), U.; ウー (Wu), M.; ワギー (Wagih), O.; ペルツ (Peltz), G.; デイビス (Davis), R. W.; シュタインメツ (Steinmetz), L. M.; パーツ (Parts), L.; サントンジュ (St Onge), R. P. 著, 「酵母に於ける定量的CRISPR干渉スクリーニングは、ケミカル-遺伝子相互作用とガイドRNA設計の為の新たな規則とを同定する (Quantitative CRISPR interference screens in yeast identify chemical-genetic interactions and new rules for guide RNA design)」*ゲノムバイオロジー (Genome Biology)* 2016年, 17, 45.

76. ギルバート (Gilbert), L. A.; ラーソン (Larson), M. H.; モルスツト (Morsut), L.; リウ (Liu), Z.; ブラー (Brar), G. A.; トーレス (Torres), S. E.; スターン・ギノサル (Stern-Ginossar), N.; ブランドマン (Brandman), O.; ホワイトヘッド (Whitehead), E. H.; ダウドナ (Doudna), J. A.; リム (Lim), W. A.; ワイスマン (Weissman), J. S.; チー (Qi), L. S. 著, 「CRISPRに依って媒介される真核生物の転写のモジュール型RNAに依ってガイドされる制御 (CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes)」*セル (Cell)* 2013年, 154(2), 442-51.

77. シコースキー (Sikorski), R. S.; ヒーター (Hieter), P. 著, 「サッカロマイセス・セレビシエのDNAの効率的な操作の為に設計されたシャトルベクター及び酵母宿主株のシステム (A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*)」*ジェネティクス (Genetics)* 1989年, 122(1), 19-27.

78. ドウーツ (Duetz), W. A.; リュエディ (Ruedi), L.; ヘルマン (Hermann), R.; オコーナー (O'Connor), K.; ブフス (Buchs), J.; ヴィトホルト (Witholt), B. 著, 「マイクロタイタープレートに依る細菌株の強通気、増殖、保存、及び複製の為の方法 (Methods for intense aeration, growth, storage, and replication of bacterial strains in microtiter plates)」*アプライド・アンド・エンバイロメンタル・マイクロバイオロジー (Applied and environmental microbiology)* 2000年, 66(6), 2641-6.

79. ドウーツ (Duetz), W. A.; ヴィトホルト (Witholt), B. 著, 「スクエアディープウェルマイクロタイタープレートに依る懸濁細菌培養の通気のためのオービタル振盪の有効性 (Effectiveness of orbital shaking for the aeration of suspended bacterial cultures in square-deepwell microtiter plates)」*バイオケミカル・エンジニアリング・ジャーナル (Biochemical Engineering Journal)* 2001年, 7(2), 113-115.

80. リンデマン (Lindemann), C. J.; シン (Singh), M. M.; ラムジット (Ramjit), H. G.; ベル (Bell), C.; イップ (Ip), D. P. 著, 「キャピラリーガス液体クロマトグラフィーに依るカプセルのメバロノラクトンの決定 (Determination of mevalonolactone in capsules by capillary gas-liquid chromatography)」*ジャーナル・オブ・ファーマシューティカル・アンド・バイオメディカル・アナリシス (Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis)* 1991年, 9(4), 311-6.

81. ケセレー (Keseler), I. M.; マッキー (Mackie), A.; ペラルタ・ヒル (Peralta-Gil), M.; サントス・サバレタ (Santos-Zavaleta), A.; ガマ・カストロ (Gama-Castro), S.; ボナビデス・マルティネス (Bonavides-Martinez), C.; ファルチャー (Fulcher), C.; フエルタ (Huerta), A. M.; コターリ (Kothari)

10

20

30

40

50

), A.; クルメナッカ (Krummenacker), M.; ラタンドレス (Latendresse), M.; ムニス・ラスカド (Muniz-Rascado), L.; オン (Ong), Q.; パレイ (Paley), S.; シュローダー (Schroder), I.; シアラー (Shearer), A. G.; サブラベティ (Subhraveti), P.; トラバース (Travers), M.; ウィーラシング (Weerasinghe), D.; ウイス (Weiss), V.; コラド・ビデス (Collado-Vides), J.; ガンサラス (Gunsalus), R. P.; ポールセン (Paulsen), I.; カーブ (Karp), P. D. 著, 「EcoCyc: モデル生物データベースをシステム生物学と融合させる (EcoCyc: fusing model organism databases with systems biology)」ニユクレイック・アシッツ・リサーチ (Nucleic acids research) 2013年, 41 (データベース号), D605-12.

10

82. デイビス (Davis), J. H.; ルビン (Rubin), A. J.; ザウアー (Sauer), R. T. 著, 「一連のインスレーター付き細菌プロモーターの設計、構築、及びキャラクター化 (Design, construction and characterization of a set of insulated bacterial promoters)」ニユクレイック・アシッツ・リサーチ (Nucleic acids research) 2011年, 39 (3), 1131-41.

83. プー (Poo), H.; ソン (Song), J. J.; ホン (Hong), S. - P.; チョイ (Choi), Y. - H.; ユン (Yun), S. W.; キム (Kim), J. - H.; リー (Lee), S. C.; リー (Lee), S. - G.; サン (Sung), M. H. 著, 「ヒト腫瘍壊死因子 - の便利でコスト有効な可溶性の生産の為の新規の高レベル恒常的発現システム pHCE ベクター (Novel high-level constitutive expression system, pHCE vector, for a convenient and cost-effective soluble production of human tumor necrosis factor- )」バイオテクノロジー・レターズ (Biotechnology Letters) 2002年, 24 (14), 1185-1189.

20

84. ババ (Baba), T.; アラ (Ara), T.; ハセガワ (Hasegawa), M.; タカイ (Takai), Y.; オクムラ (Okumura), Y.; ババ (Baba), M.; ダツェンコ (Datsenko), K. A.; トミタ (Tomita), M.; ワナー (Wanner), B. L.; モリ (Mori), H. 著, 「大腸菌 K-12 のインフレーム単一遺伝子ノックアウト変異体の構築: Keio コレクション (Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection)」モレキュラー・システムズ・バイオロジー (Molecular Systems Biology) 2006年, 2, 20060008.

30

85. ジャン (Jian), J.; ツァン (Zhang), S. Q.; シー (Shi), Z. Y.; ワン (Wang), W.; チェン (Chen), G. Q.; ウー (Wu), Q. 著, 「欠損した混合酸発酵経路を有する大腸菌変異体に依るポリヒドロキシアルカン酸の生産 (Production of polyhydroxyalkanoates by Escherichia coli mutants with defected mixed acid fermentation pathways)」アプライド・マイクロバイオロジー・アンド・バイオテクノロジー (Applied Microbiology and Biotechnology) 2010年, 87 (6), 2247-56.

86. ファンダイケン (van Dijken), J. P.; バウアー (Bauer), J.; ブランビラ (Brambilla), L.; ドゥボック (Duboc), P.; フランソワ (Francois), J. M.; ガンセド (Gancedo), C.; ジュゼッピン (Giuseppin), M. L. F.; ヘイネン (Heijnen), J. J.; ホーア (Hoare), M.; ランゲ (Lange), H. C.; マッデン (Madden), E. A.; ニーダーベルガー (Niederberger), P.; ニールセン (Nielsen), J.; パルー (Parrou), J. L.; ペティット (Petit), T.; ポロ (Porro), D.; ロイス (Reuss), M.; ヴァンリエル (van Riel), N.; リッツィ (Rizzi), M.; スティンスマ (Steensma), H. Y.; ヴェリップス (Verrips), C. T.; ヴィンデルロウ (Vindeloev), J.; プロンク (Pronk), J. T. 著, 「4つのサッカロマイセス・セレビシエ株の生理学的及び遺伝学的特性の施設間比較 (An interlaboratory comparison of physiological and genetic properties of four Saccharomyces cerevisiae strains)」エンザイム・アンド・マイクロバイアル・テクノロジー (Enzyme and Microbial Technology) 2000年, 26 (9-10), 706-714.

40

50

87. オッターシュテット (Otterstedt), K.; ラーション (Larsson), C.; ビル (Bill), R. M.; シュタルベルク (Stahlberg), A.; ボレス (Boles), E.; ホーマン (Hohmann), S.; グスタフソン (Gustafsson), L. 著, 「酵母サツカロマイセス・セレビシエの代謝モードを切り換える (Switching the mode of metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*)」EMBOリポーツ (EMBO Reports) 2004年, 5(5), 532-7.

88. リュオ (Luo), M. L.; ムリス (Mullis), A. S.; リーネイ (Leenay), R. T.; バイゼル (Beisel), C. L. 著, 「プログラム可能な遺伝子抑制の為に内在性I型CRISPR-Casシステムを用途変更する (Repurposing endogenous type I CRISPR-Cas systems for programmable gene repression)」ニクレイック・アシ  
10 ヅ・リサーチ (Nucleic acids research) 2015年, 43(1), 674-81.

89. ワイルド (Wilde), R. J.; ゲスト (Guest), J. R. 著, 「大腸菌K12のクエン酸シンターゼ及び琥珀酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の転写物分析 (Transcript analysis of the citrate synthase and succinate dehydrogenase genes of *Escherichia coli* K12)」ジャーナル・オブ・ジェネラル・マイクロバイオロジー (Journal of General Microbiology) 1986年, 132(12), 3239-51.

90. シャルパンティエ (Charpentier), B.; ブランラン (Branlant), C. 著, 「大腸菌 *gapA* 遺伝子は栄養増殖期RNAポリメラーゼホロ酵素Eシグマ70及び熱  
20 ショックRNAポリメラーゼEシグマ32に依って転写される (The *Escherichia coli gapA* gene is transcribed by the vegetative RNA polymerase holoenzyme E sigma 70 and by the heat shock RNA polymerase E sigma 32)」ジャーナル・オブ・バクテリオロジー (Journal of Bacteriology) 1994年, 176(3), 830-839.

91. リ (Li), X. T.; トマソン (Thomason), L. C.; サヴィツケ (Sawitzke), J. A.; コスタンティーノ (Costantino), N.; コート (Court), D. L. 著, 「tetA-sacBカセットを用いるポジティブ及びネガティブセレクション: 大腸菌の組み換え工学及びP1トランスダクション (Positive and negative selection using the tetA-sacB cassette: recombineering and P1 transduction in *Escherichia coli*)」ニクレイック・アシ  
30 ヅ・リサーチ (Nucleic acids research) 2013年, 41(22), e204.

92. ドウーツ (Duetz), W. A.; リュエディ (Ruedi), L.; ヘルマン (Hermann), R.; オコーナー (O'Connor), K.; ブフス (Buchs), J.; ヴィトホルト (Witholt), B. 著, 「マイクロタイタープレートに依る細菌株の強通気、増殖、保存、及び複製の為の方法 (Methods for intense aeration, growth, storage, and replication of bacterial strains in microtiter plates)」アプライド・アンド・エンバイロメンタル・マイクロバイオロジー (Applied and environmental microbiology) 2000年, 66(6), 2641-6.

93. ドウーツ (Duetz), W. A.; ヴィトホルト (Witholt), B. 著, 「スクエアディープウェルマイクロタイタープレートに依る懸濁細菌培養の通気の為のオービタル振盪の有効性 (Effectiveness of orbital shaking for the aeration of suspended bacterial cultures in square-deepwell microtiter plates)」バイオケミカル・エンジニア  
40 リング・ジャーナル (Biochemical Engineering Journal) 2001年, 7(2), 113-115.

#### 【0214】

本発明の好ましい実施形態を本願に於いて示し記載したが、斯かる実施形態が例としてのみ提供されていると言う事は当業者には明白であろう。本発明から外れる事無しに、当業者には多数の変形、変化、及び置換がすぐに想到されるであろう。本発明を実現する上で、本願に記載されている本発明の実施形態の種々の代替が採用され得ると言う事は理解されるべきである。次の請求項が本発明の範囲を定めると言う事と、此れ等の請求項の範囲内の方法及び構造並びに其れ等の均等物が其れに依ってカバーされると言う事とが意図されている。

## 〔付記 1〕

産物を生成する為の細胞であって、  
前記細胞が：

代謝経路の酵素の発現のコントロールされた縮減の為の異種的なポリヌクレオチド（前記酵素の発現の前記コントロールされた縮減は、前記細胞の静止期を誘導する）と；

前記産物の生成の為の生産酵素の発現のコントロールされた増大を媒介する為の異種的な生産ポリヌクレオチドと；

を含み、

前記酵素を欠く細胞と比較して、前記静止期の間の前記産物の生産の速度が、環境条件の変化に応答してより縮減されない、

産物を生成する為の細胞。

10

## 〔付記 2〕

前記異種的なポリヌクレオチドが前記代謝経路のフラックスを縮減する、付記 1 に記載の細胞。

## 〔付記 3〕

前記酵素がエノイル A C P / C o A レダクターゼ、グルコース 6 リン酸デヒドロゲナーゼ、リポアミドデヒドロゲナーゼ、クエン酸シクターゼ、可溶性トランスヒドロゲナーゼ、及び N A D H 依存性グリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼから成る群から選択される、付記 1 又は 2 に記載の細胞。

## 〔付記 4〕

前記生産酵素が N A D P H 依存性アラニンデヒドロゲナーゼ、アラニン排出輸送体、及び N A D P H 依存性グリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼから成る群から選択される、付記 1 ~ 3 の何れか 1 項に記載の細胞。

20

## 〔付記 5〕

環境条件の前記変化が、前記細胞に接触する培養培地の糖の濃度を増大又は減少させる事を含む、付記 1 ~ 4 の何れか 1 項に記載の細胞。

## 〔付記 6〕

前記糖がグルコースである、付記 5 に記載の細胞。

## 〔付記 7〕

環境条件の前記変化が、前記細胞に接触する培養培地の酸素供給を増大又は減少させる事を含む、付記 1 ~ 6 の何れか 1 項に記載の細胞。

30

## 〔付記 8〕

前記産物が 3 - ヒドロキシプロピオン酸を含む、付記 1 ~ 7 の何れか 1 項に記載の細胞。

## 〔付記 9〕

前記産物がアミノ酸を含む、付記 1 ~ 7 の何れか 1 項に記載の細胞。

## 〔付記 10〕

前記アミノ酸がアラニンを含む、付記 9 に記載の細胞。

## 〔付記 11〕

前記細胞が培養に依って増殖させられ、前記培養に依る前記アラニンの生産の速度が少なくとも  $0.5 \text{ g/L/時間}$  である、付記 10 に記載の細胞。

40

## 〔付記 12〕

前記アラニンの生産の前記速度が少なくとも  $1.0 \text{ g/L/時間}$  である、付記 11 に記載の細胞。

## 〔付記 13〕

前記アラニンの生産の前記速度が少なくとも  $1.5 \text{ g/L/時間}$  である、付記 11 に記載の細胞。

## 〔付記 14〕

前記アラニンの生産の前記速度が少なくとも  $1.6 \text{ g/L/時間}$  である、付記 11 に記載の細胞。

50



## 〔付記 15〕

前記細胞が培養に依って増殖させられ、前記培養が少なくとも 80 g / L の前記アラニンを生産する、付記 10 に記載の細胞。

## 〔付記 16〕

前記培養が少なくとも 100 g / L の前記アラニンを生産する、付記 15 に記載の細胞。

## 〔付記 17〕

前記培養が少なくとも 120 g / L の前記アラニンを生産する、付記 15 に記載の細胞。

## 〔付記 18〕

前記培養が少なくとも 140 g / L の前記アラニンを生産する、付記 15 に記載の細胞。

10

## 〔付記 19〕

前記生産ポリヌクレオチドがアラニン排出輸送体をコードする、付記 9 ~ 18 の何れか 1 項に記載の細胞。

## 〔付記 20〕

前記アラニン排出輸送体が alaE である、付記 19 に記載の細胞。

## 〔付記 21〕

前記産物がメバロン酸を含む、付記 1 ~ 7 の何れか 1 項に記載の細胞。

## 〔付記 22〕

前記細胞が培養に依って増殖させられ、前記培養に依る前記メバロン酸の生産の速度が少なくとも 0.5 g / L / 時間である、付記 21 に記載の細胞。

20

## 〔付記 23〕

前記メバロン酸の生産の前記速度が少なくとも 1.0 g / L / 時間である、付記 22 に記載の細胞。

## 〔付記 24〕

前記メバロン酸の生産の前記速度が少なくとも 1.2 g / L / 時間である、付記 22 に記載の細胞。

## 〔付記 25〕

前記メバロン酸の生産の前記速度が少なくとも 1.25 g / L / 時間である、付記 22 に記載の細胞。

30

## 〔付記 26〕

前記細胞が培養に依って増殖させられ、前記培養が少なくとも 50 g / L の前記メバロン酸を生産する、付記 21 に記載の細胞。

## 〔付記 27〕

前記培養が少なくとも 70 g / L の前記メバロン酸を生産する、付記 26 に記載の細胞。

## 〔付記 28〕

前記培養が少なくとも 90 g / L の前記メバロン酸を生産する、付記 26 に記載の細胞。

40

## 〔付記 29〕

前記培養が少なくとも 95 g / L の前記メバロン酸を生産する、付記 26 に記載の細胞。

## 〔付記 30〕

前記異種的なポリヌクレオチドが：前記酵素をコードする遺伝子の転写を抑制する為のサイレンシングポリヌクレオチド；及び前記酵素の細胞性の分解を媒介する為の分解ポリヌクレオチドから成る群から選択される、付記 1 ~ 29 の何れか 1 項に記載の細胞。

## 〔付記 31〕

前記異種的なポリヌクレオチドがサイレンシングポリヌクレオチドを含み、前記サイレンシングポリヌクレオチドが、前記酵素をコードする遺伝子のプロモーターを認識する g

50

R N A 配列を含むガイド R N A ( g R N A ) を含む、付記 3 0 に記載の細胞。

〔付記 3 2〕

前記異種的なポリヌクレオチドが C R I S P R 酵素をコードし、前記 C R I S P R 酵素が前記 g R N A に結合した時に前記プロモーター配列に特異的に結合する、付記 3 1 に記載の細胞。

〔付記 3 3〕

前記 C R I S P R 酵素が触媒的に不活性である、付記 3 2 に記載の細胞。

〔付記 3 4〕

前記異種的なポリヌクレオチドが分解ポリヌクレオチドを含み、前記分解ポリヌクレオチドが分解タグをコードする配列を含み、前記分解タグが前記酵素の分解を媒介する、付記 3 0 に記載の細胞。

〔付記 3 5〕

前記異種的なポリヌクレオチドの発現が前記細胞中の利用可能な燐酸量に依って制御される、付記 1 ~ 3 4 の何れか 1 項に記載の細胞。

〔付記 3 6〕

前記生産ポリヌクレオチドの発現が前記細胞中の利用可能な燐酸量に依って制御される、付記 1 ~ 3 4 の何れか 1 項に記載の細胞。

〔付記 3 7〕

前記細胞が E . c o l i 細胞である、付記 1 ~ 3 6 の何れか 1 項に記載の細胞。

〔付記 3 8〕

細胞の複数の株を独立して培養する事（各株は、( i ) 代謝経路の酵素の発現のコントロールされた縮減を媒介する為の異種的なポリヌクレオチド（前記酵素の発現の前記コントロールされた縮減は、前記細胞の静止期を誘導する）と；( i i ) 前記産物の生成の為の生産酵素の発現のコントロールされた増大を媒介する為の異種的な生産ポリヌクレオチドと；を含み、前記複数の株の各株は、前記異種的なポリヌクレオチド又は前記異種的な生産ポリヌクレオチドの少なくとも 1 つの配列が別の株とは異なる）と；

前記複数の株を静止期迄増殖させる事と；

前記複数の株から或る株を選択する事（前記静止期の間前記選択された株に依って生産される前記産物のレベルに基づく）と、

を含む方法。

〔付記 3 9〕

前記産物の前記レベルを決定する事を更に含む、付記 3 8 に記載の方法。

〔付記 4 0〕

前記選択された株を増殖させる事を更に含む、付記 3 8 に記載の方法。

〔付記 4 1〕

前記選択された株がバイオリクターに依って増殖させられる、付記 4 0 に記載の方法

〔付記 4 2〕

前記選択された株を含む培養培地が少なくとも 5 0 0 m l の体積を有する、付記 4 1 に記載の方法。

〔付記 4 3〕

前記培養培地が少なくとも 1 L の体積を有する、付記 4 2 に記載の方法。

〔付記 4 4〕

前記異種的なポリヌクレオチドが：前記酵素をコードする遺伝子の転写を抑制する為のサイレンシングポリヌクレオチド；及び前記酵素の細胞性の分解を媒介する為の分解ポリヌクレオチドから成る群から選択される、付記 3 8 ~ 4 3 の何れか 1 項に記載の方法。

〔付記 4 5〕

前記複数の株の第 1 及び第 2 の株がサイレンシングポリヌクレオチドを含む、付記 4 4 に記載の方法。

〔付記 4 6〕

10

20

30

40

50

前記サイレンシングポリヌクレオチドが、前記酵素をコードする遺伝子のプロモーター配列を認識する gRNA 配列を含むガイド RNA (gRNA) を含む、付記 45 に記載の方法。

〔付記 47〕

前記 gRNA 配列が前記第 1 及び第 2 の株間で異なる、付記 46 に記載の方法。

〔付記 48〕

前記複数の株の第 1 及び第 2 の株が分解ポリヌクレオチドを含む、付記 44 に記載の方法。

〔付記 49〕

前記分解ポリヌクレオチドの配列が前記第 1 及び第 2 の株間で異なる、付記 48 に記載の方法。

10

〔付記 50〕

前記酵素がエノイル ACP / CoA レダクターゼ、グルコース 6 リン酸デヒドロゲナーゼ、リポアミドデヒドロゲナーゼ、クエン酸シンターゼ、可溶性トランスヒドロゲナーゼ、及び NADH 依存性グリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼから成る群から選択される、付記 38 ~ 49 の何れか 1 項に記載の方法。

〔付記 51〕

前記生産酵素が NADPH 依存性アラニンデヒドロゲナーゼ、アラニン排出輸送体、及び NADPH 依存性グリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼから成る群から選択される、付記 38 ~ 50 の何れか 1 項に記載の方法。

20

〔付記 52〕

前記産物がメバロン酸、3-ヒドロキシプロピオン酸、及びアミノ酸から成る群から選択される、付記 38 ~ 51 の何れか 1 項に記載の方法。

〔付記 53〕

前記産物がアミノ酸であり、前記アミノ酸がアラニンである、付記 52 に記載の方法。

〔付記 54〕

前記異種的なポリヌクレオチドを欠く細胞と比較して、前記選択された株の細胞に於いては、前記静止期の間の前記産物の生産の速度が環境条件の変化にตอบสนองしてより縮減されない、付記 38 ~ 53 の何れか 1 項に記載の方法。

〔付記 55〕

環境条件の前記変化が、前記細胞に接触する培養培地の糖の濃度の変化を含む、付記 54 に記載の方法。

30

〔付記 56〕

環境条件の前記変化が、前記細胞に接触する培養培地の酸素供給の変化を含む、付記 54 に記載の方法。

〔付記 57〕

細胞性の産物を生成する方法であって：

培養培地に依って異種的な細胞を培養する事を含み、前記異種的な細胞が：(i) 代謝経路の酵素の発現のコントロールされた縮減を媒介する為の異種的なポリヌクレオチド（前記酵素の発現の前記コントロールされた縮減は、前記細胞の静止期を誘導する）と；(ii) 前記産物の生成の為の生産酵素の発現のコントロールされた増大を媒介する為の異種的な生産ポリヌクレオチドと；を含み、

40

前記酵素を欠く細胞と比較して、前記静止期の間の前記産物の生産の速度が環境条件の変化にตอบสนองしてより縮減されない、

細胞性の産物を生成する方法。

〔付記 58〕

前記環境条件を変化させる事を更に含む、付記 57 に記載の方法。

〔付記 59〕

前記環境条件が前記培養培地の糖の濃度を含み、前記環境条件を変化させる事が前記濃度を増大又は減少させる事を含む、付記 58 に記載の方法。

50

〔付記 6 0〕前記糖がグルコースである、付記 5 9 に記載の方法。〔付記 6 1〕前記環境条件が前記培養培地の酸素濃度を含み、前記環境条件を変化させる事が前記酸素濃度を増大又は減少させる事を含む、付記 5 8 に記載の方法。〔付記 6 2〕前記培養する事が、バイオリクターに依って実施される、付記 5 7 に記載の方法。〔付記 6 3〕前記培養培地が少なくとも 5 0 0 m l の体積を有する、付記 6 2 に記載の方法。〔付記 6 4〕前記培養培地が少なくとも 1 L の体積を有する、付記 5 2 に記載の方法。〔付記 6 5〕前記産物が 3 - ヒドロキシプロピオン酸を含む、付記 5 7 ~ 6 4 の何れか 1 項に記載の方法。〔付記 6 6〕前記産物がアミノ酸を含む、付記 5 7 ~ 6 4 の何れか 1 項に記載の方法。〔付記 6 7〕前記アミノ酸がアラニンを含む、付記 6 6 に記載の方法。〔付記 6 8〕前記アラニンの生産の前記速度が少なくとも 0 . 5 g / L / 時間である、付記 6 7 に記載の方法。〔付記 6 9〕前記アラニンの生産の前記速度が少なくとも 1 . 0 g / L / 時間である、付記 6 7 に記載の方法。〔付記 7 0〕前記アラニンの生産の前記速度が少なくとも 1 . 5 g / L / 時間である、付記 6 7 に記載の方法。〔付記 7 1〕前記アラニンの生産の前記速度が少なくとも 1 . 6 g / L / 時間である、付記 6 7 に記載の方法。〔付記 7 2〕前記生産ポリヌクレオチドがアラニン排出輸送体をコードする、付記 6 7 ~ 7 1 の何れか 1 項に記載の方法。〔付記 7 3〕前記アラニン排出輸送体が a 1 a E である、付記 7 2 に記載の方法。〔付記 7 4〕前記産物がメバロン酸を含む、付記 5 7 ~ 6 4 の何れか 1 項に記載の方法。〔付記 7 5〕前記メバロン酸の生産の前記速度が少なくとも 0 . 5 g / L / 時間である、付記 7 4 に記載の方法。〔付記 7 6〕前記メバロン酸の生産の前記速度が少なくとも 1 . 0 g / L / 時間である、付記 7 4 に記載の方法。〔付記 7 7〕前記メバロン酸の生産の前記速度が少なくとも 1 . 2 g / L / 時間である、付記 7 4 に記載の方法。〔付記 7 8〕前記メバロン酸の生産の前記速度が少なくとも 1 . 2 5 g / L / 時間である、付記 7 4 に記載の方法。〔付記 7 9〕

10

20

30

40

50

前記異種的なポリヌクレオチドが：前記酵素をコードする遺伝子の転写を抑制する為のサイレンシングポリヌクレオチド；及び前記酵素の細胞性の分解を媒介する為の分解ポリヌクレオチドから成る群から選択される、付記 57 ~ 78 の何れか 1 項に記載の方法。

〔付記 80〕

前記異種的なポリヌクレオチドがサイレンシングポリヌクレオチドを含み、前記サイレンシングポリヌクレオチドが、前記酵素をコードする遺伝子のプロモーター配列を認識する gRNA 配列を含むガイドRNA (gRNA) を含む、付記 79 に記載の方法。

〔付記 81〕

前記異種的なポリヌクレオチドがCRISPR酵素をコードし、前記CRISPR酵素が前記gRNAに結合した時に前記プロモーター配列に特異的に結合する、付記 80 に記載の方法。

〔付記 82〕

前記CRISPR酵素が触媒的に不活性である、付記 81 に記載の方法。

〔付記 83〕

前記異種的なポリヌクレオチドが分解ポリヌクレオチドを含み、前記分解ポリヌクレオチドが分解タグをコードする配列を含み、前記分解タグが前記酵素の分解を媒介する、付記 79 に記載の方法。

〔付記 84〕

前記異種的なポリヌクレオチドの発現が前記細胞中の利用可能な磷酸量に依って制御される、付記 57 ~ 83 の何れか 1 項に記載の方法。

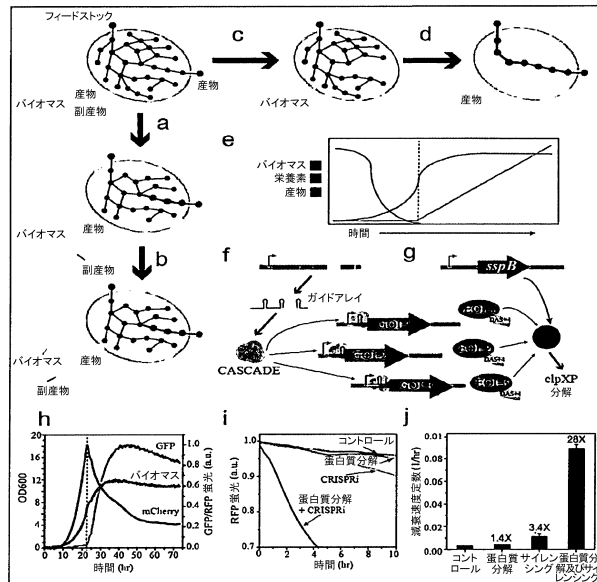
〔付記 85〕

前記生産ポリヌクレオチドの発現が前記細胞中の利用可能な磷酸量に依って制御される、付記 57 ~ 83 の何れか 1 項に記載の方法。

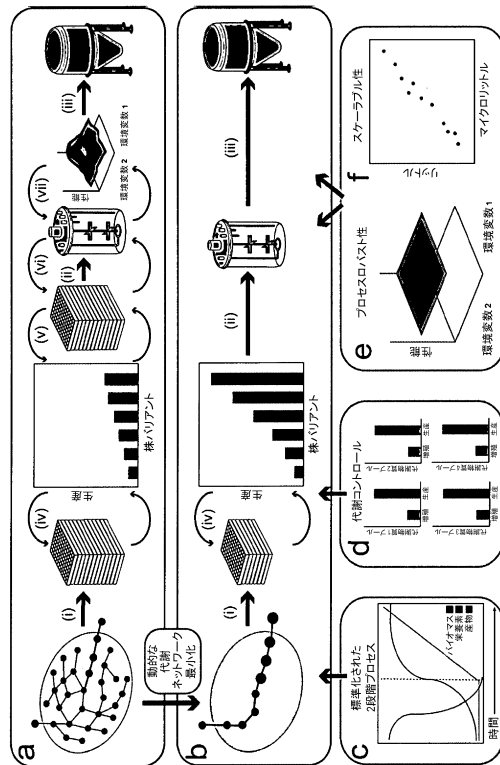
〔付記 86〕

前記細胞がE. coli細胞である、付記 57 ~ 85 の何れか 1 項に記載の方法。

【図 1 A】



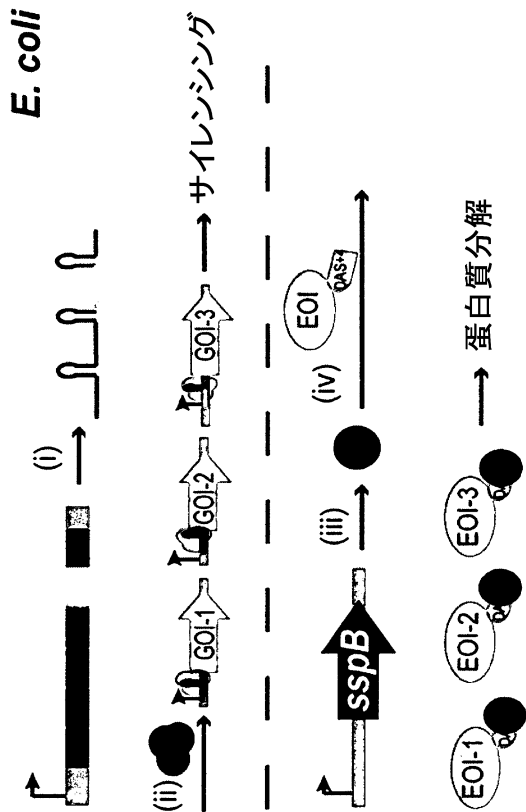
【図 1 B】



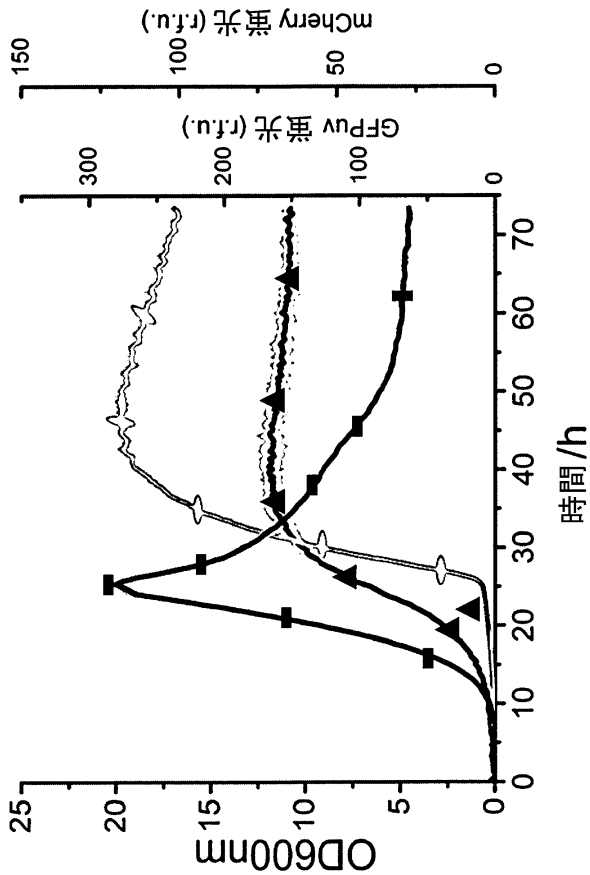
10

20

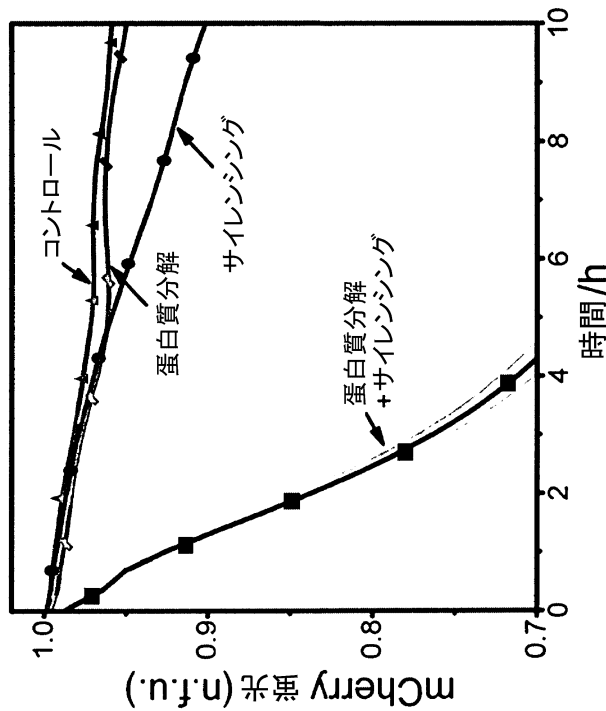
【 図 2 A 】



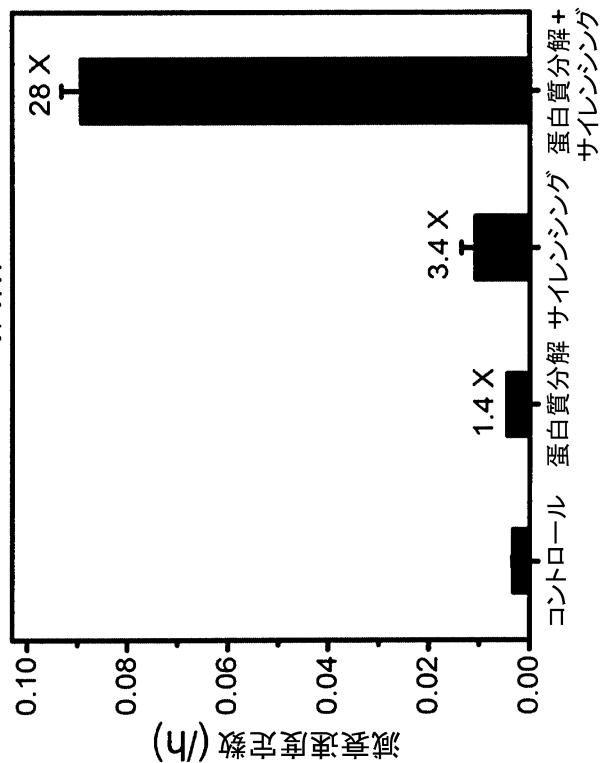
【 図 2 B 】



【 図 2 C 】

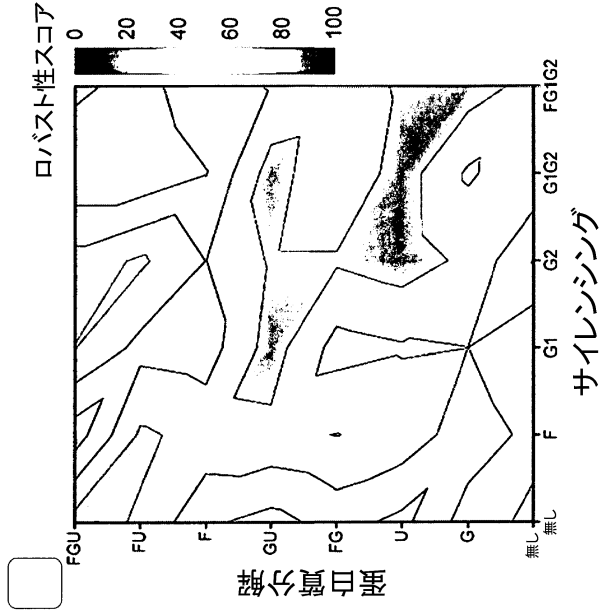


【 図 2 D 】

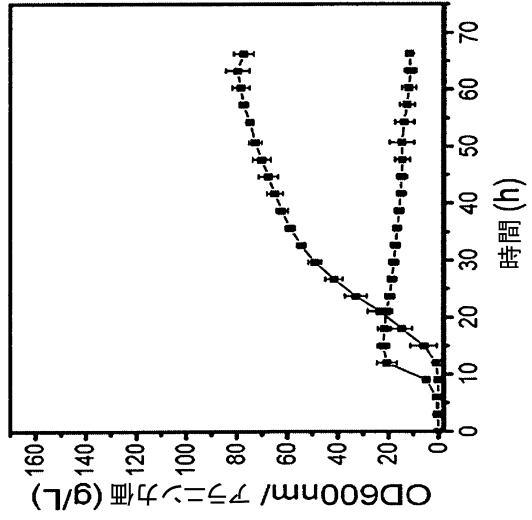




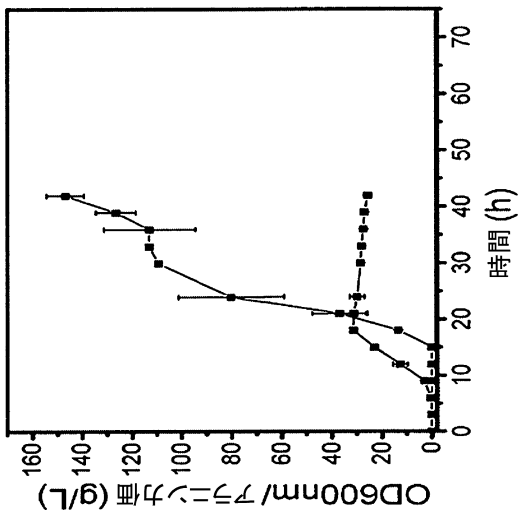
【図 3 E】



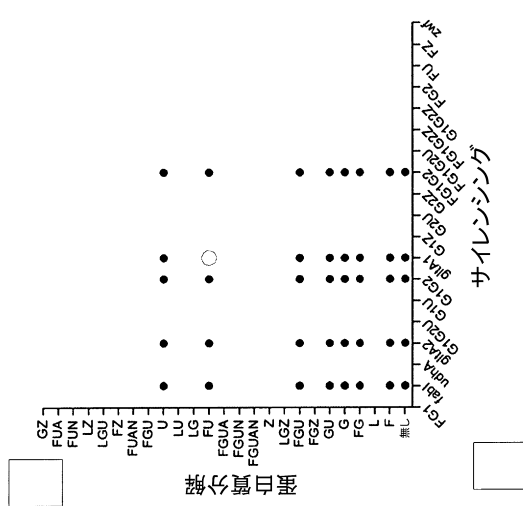
【図 3 F】



【図 3 G】

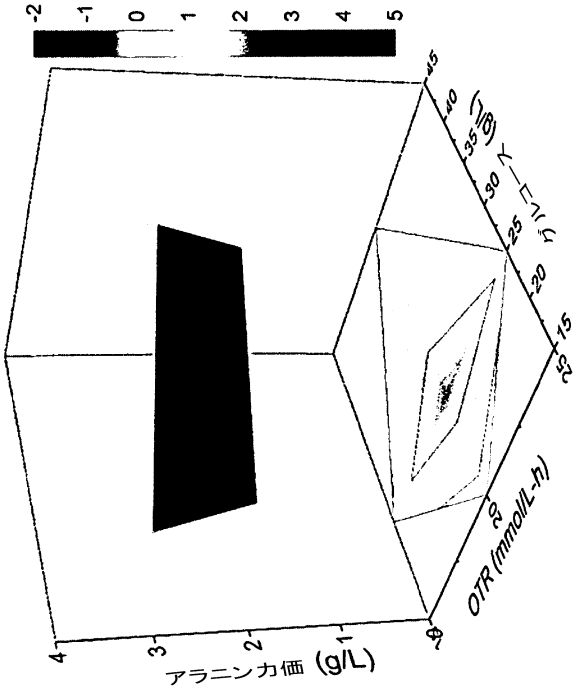


【図 3 H】

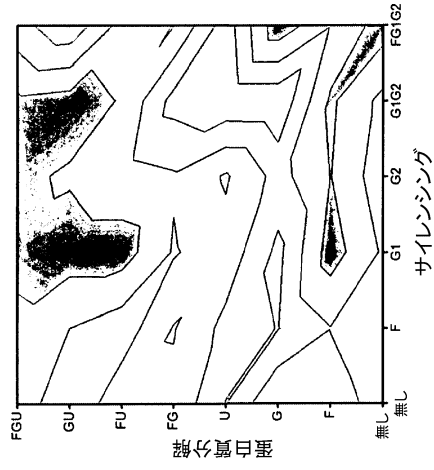




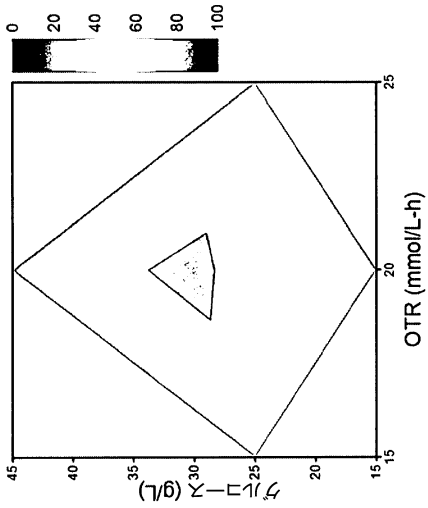
【図 3 I】



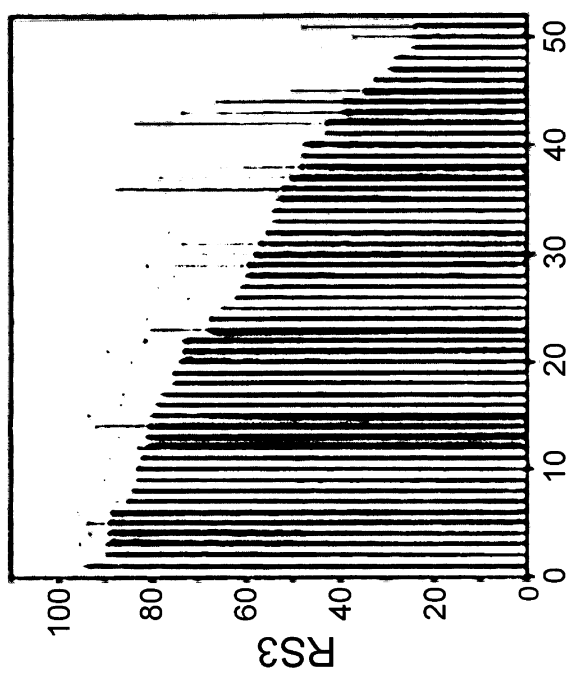
【図 3 J】



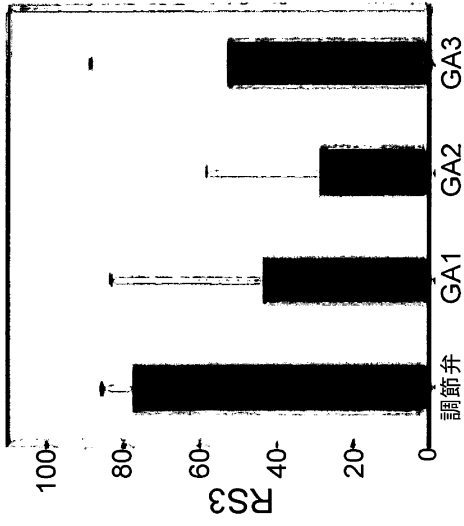
【図 3 K】



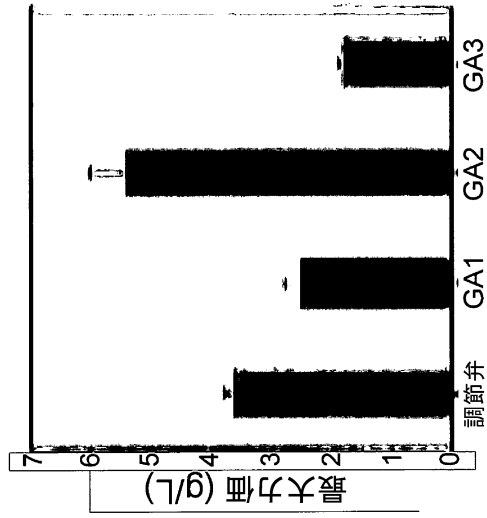
【図 4 A】



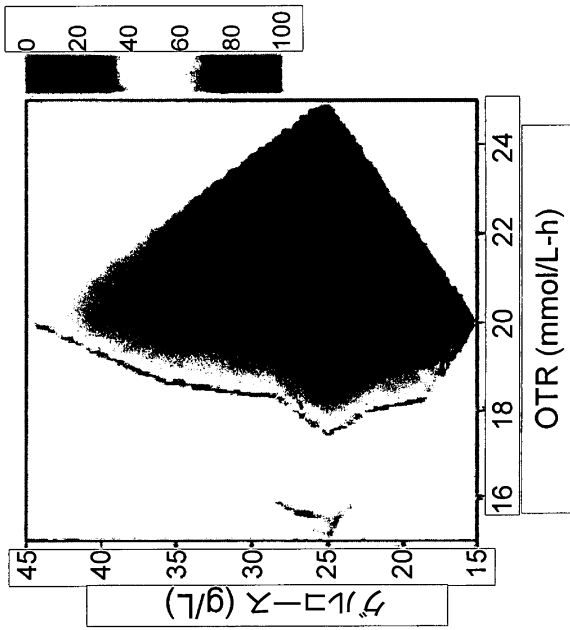
【図 4 B】



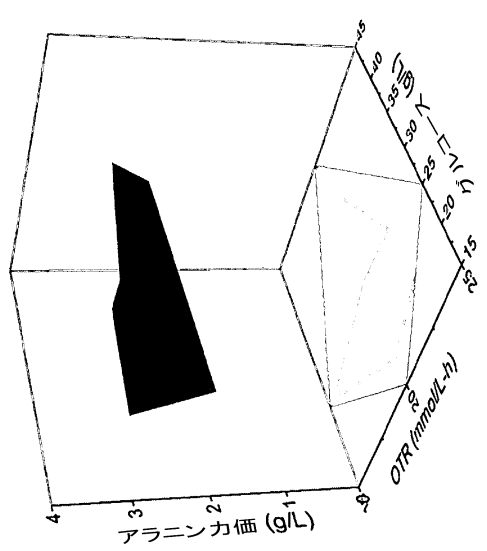
【図 4 C】



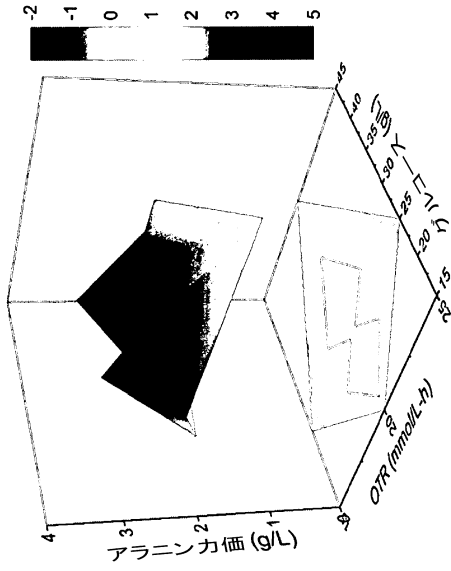
【図 4 D】



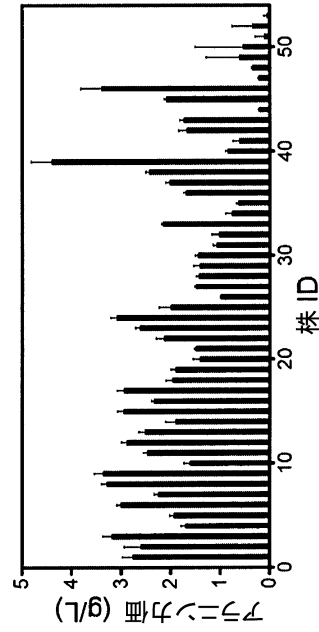
【図 4 E】



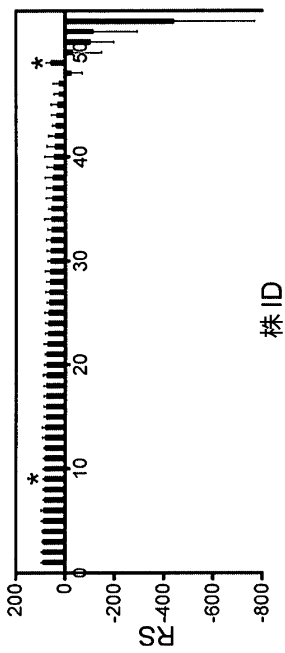
【図 4 F】



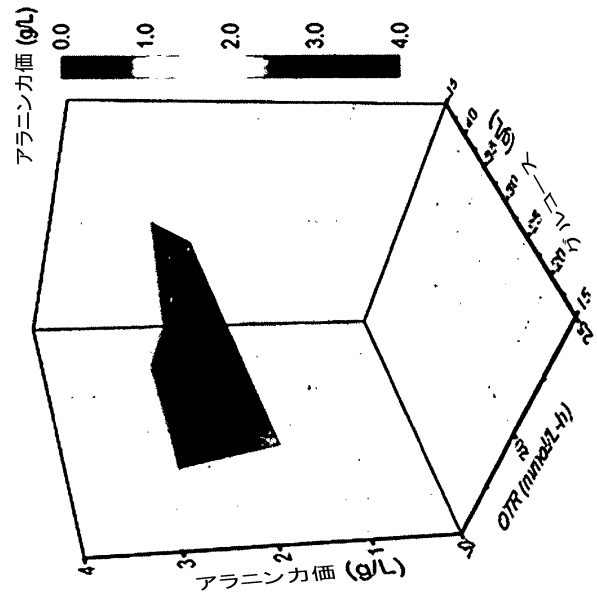
【図 5 A】



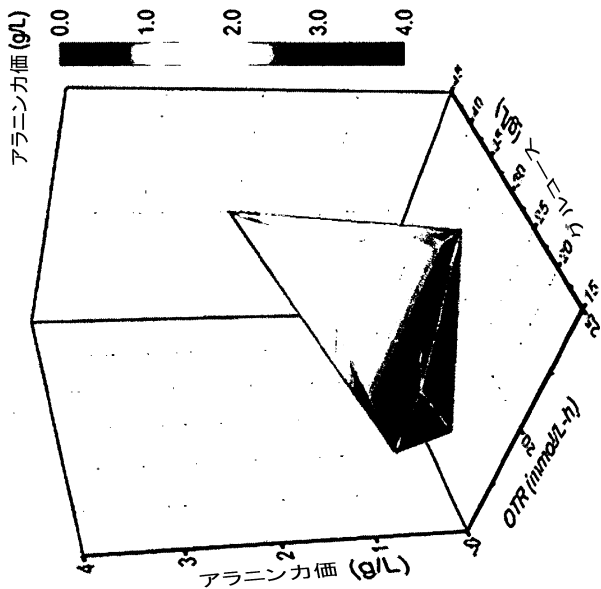
【図 5 B】



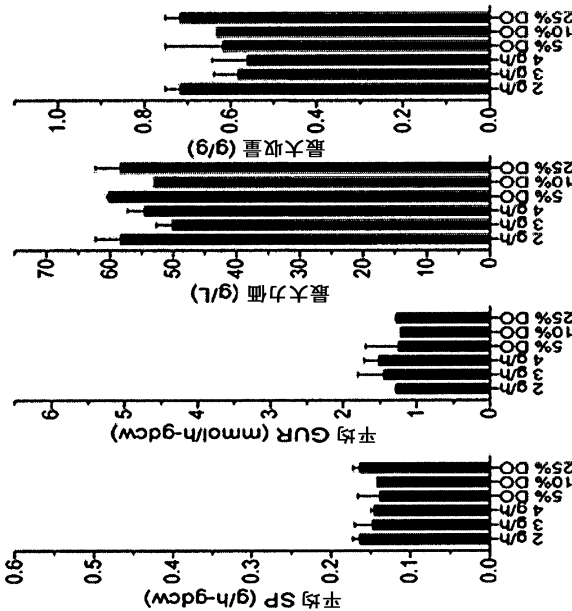
【図 5 C】



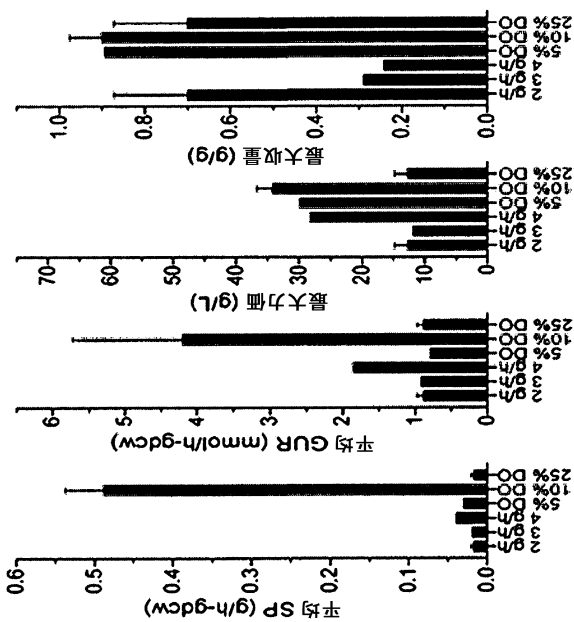
【図 5 D】



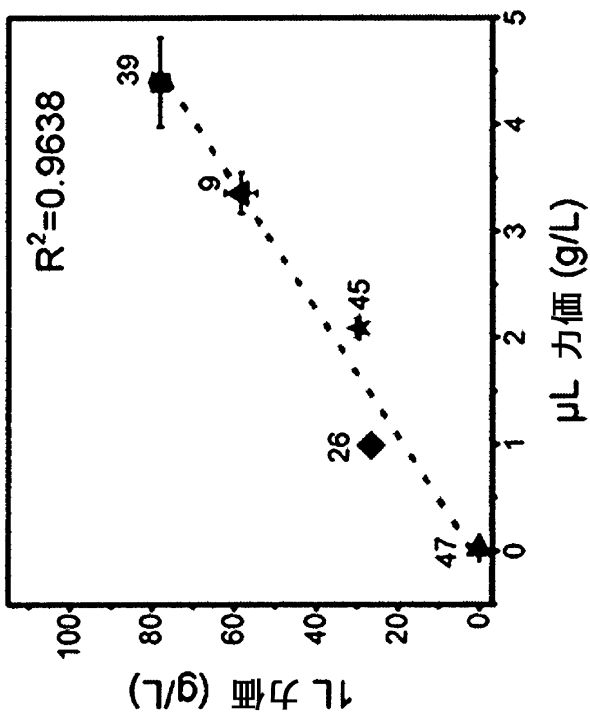
【図 5 E】



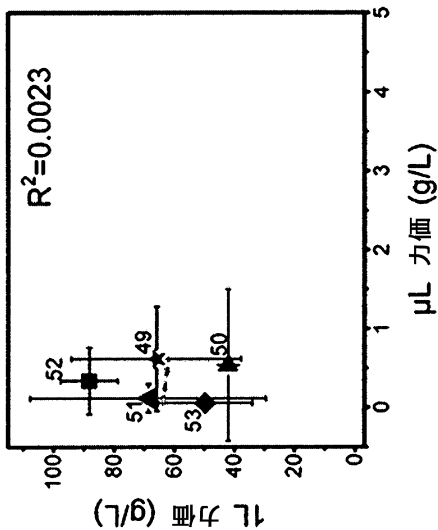
【図 5 F】



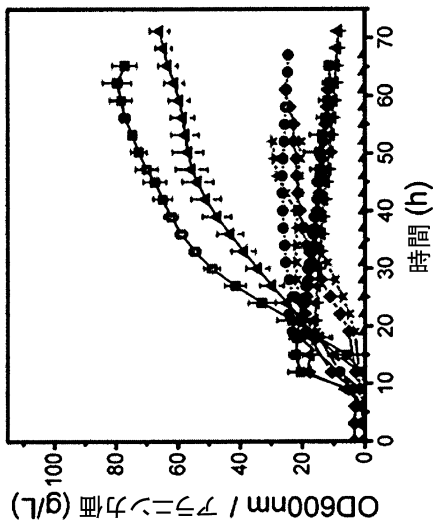
【図 5 G】



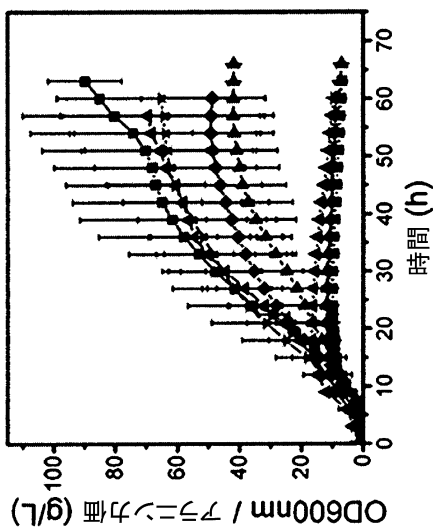
【 図 5 H 】



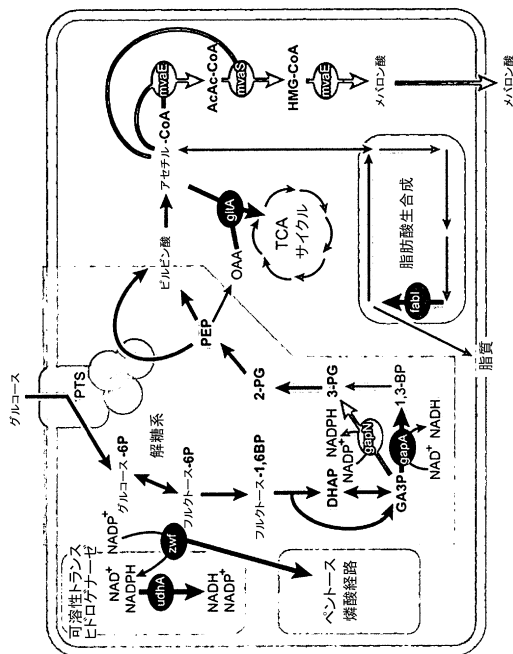
【 図 5 I 】



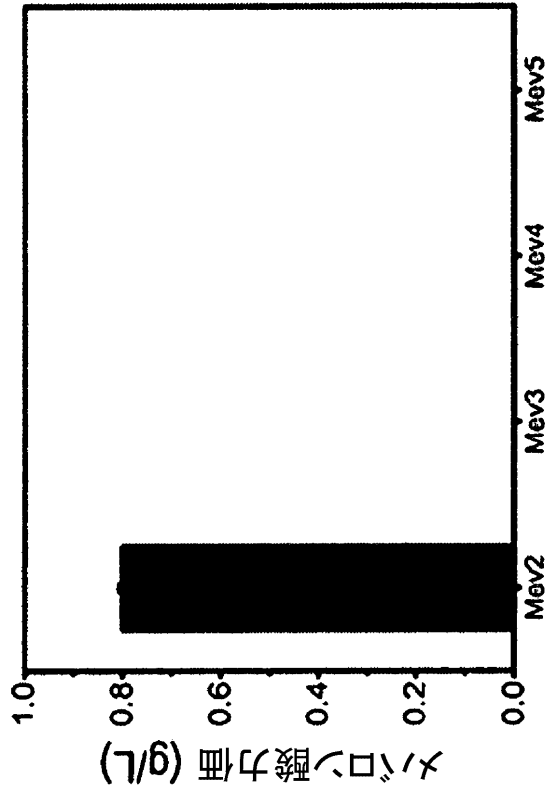
【 図 5 J 】



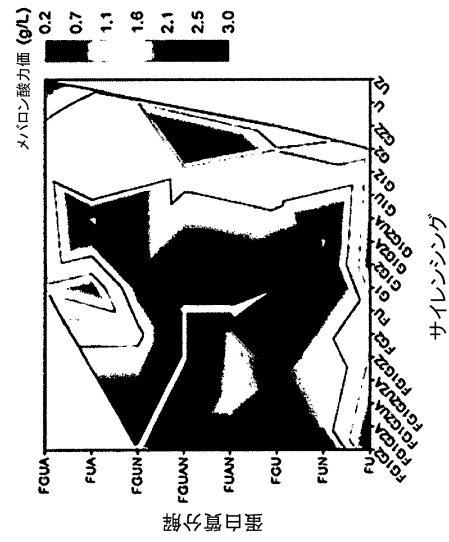
【 図 6 A 】



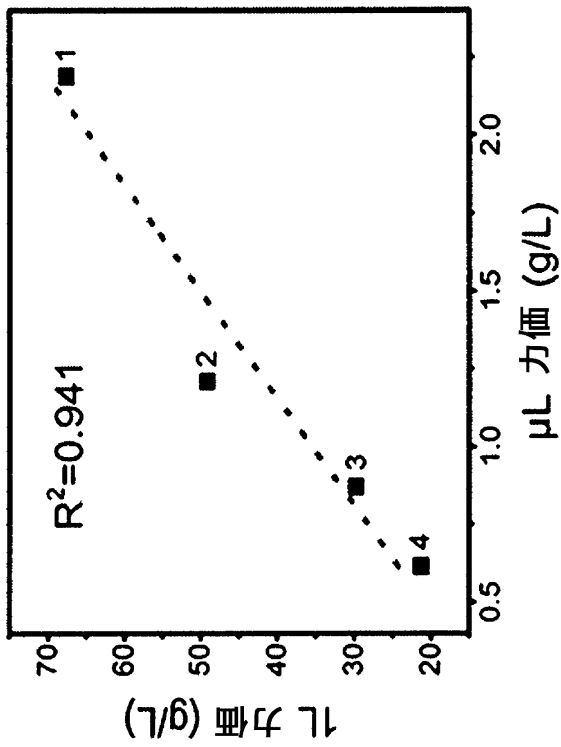
【 図 6 B 】



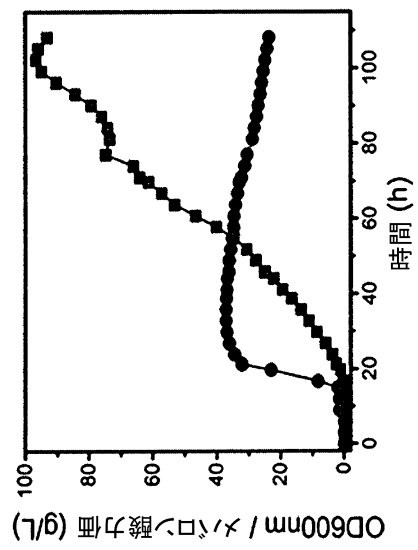
【 図 6 C 】



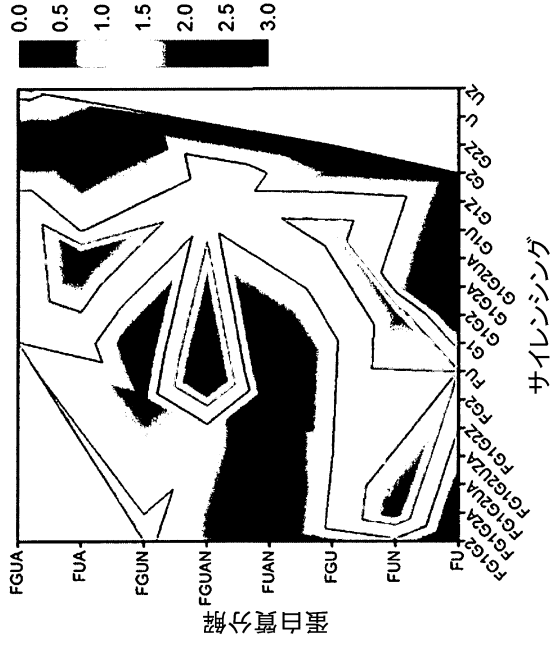
【 図 6 D 】



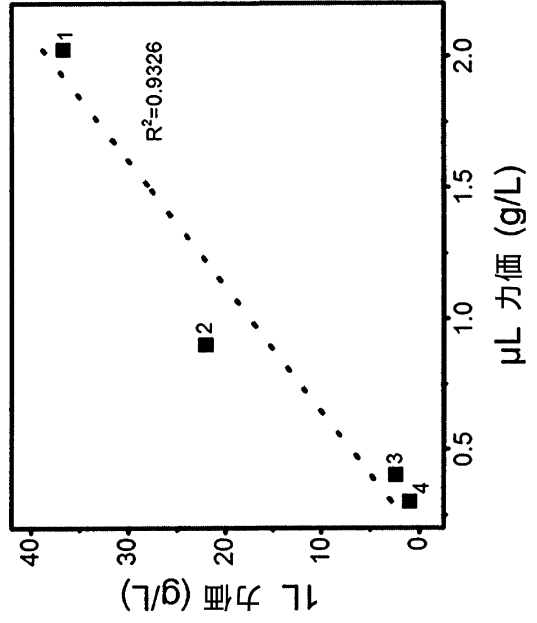
【 図 6 E 】



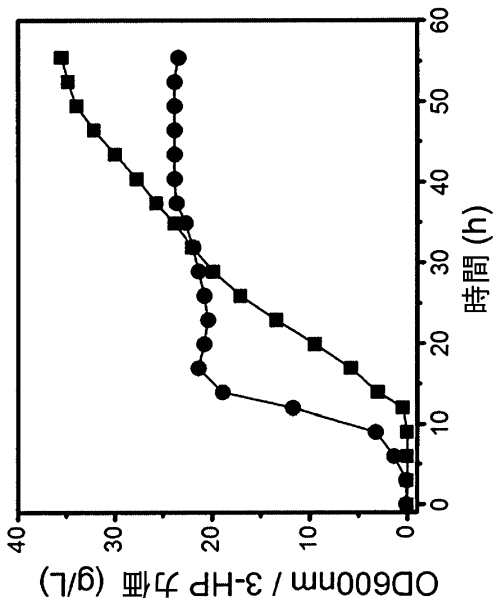
【 図 6 F 】



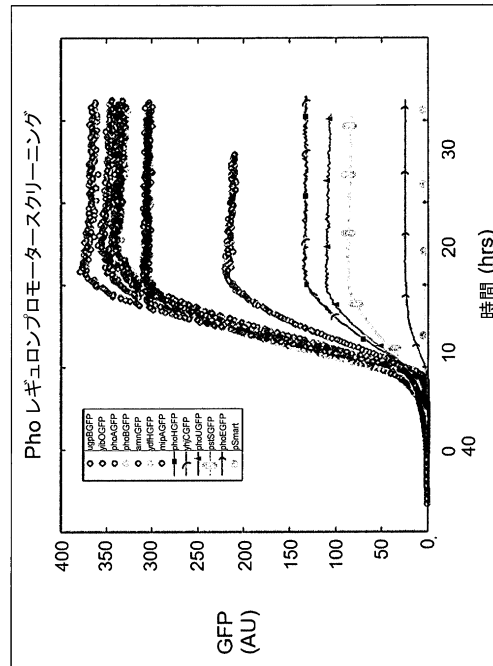
【 図 6 G 】



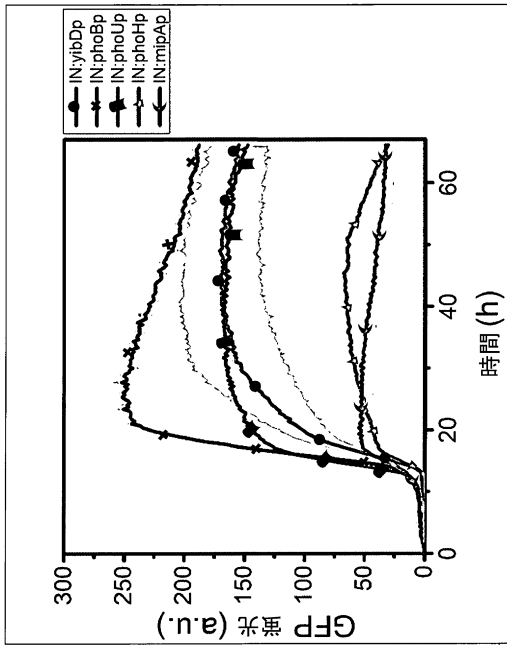
【 図 6 H 】



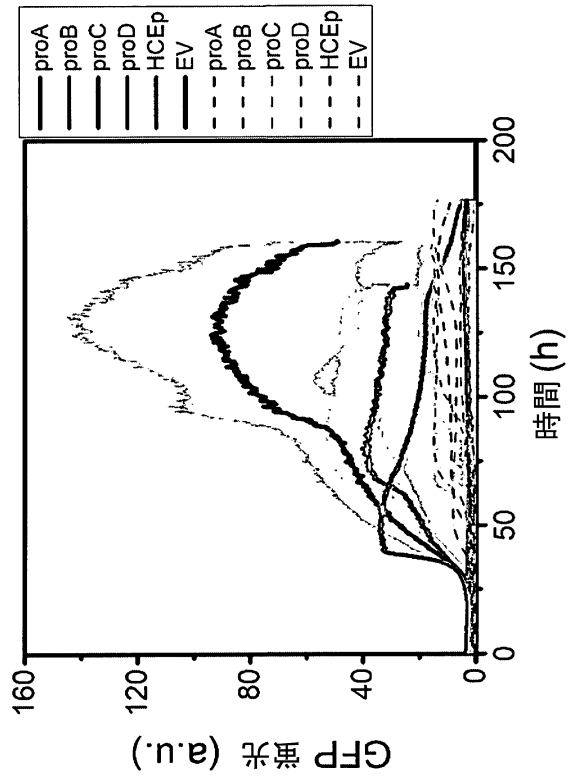
【 図 7 】



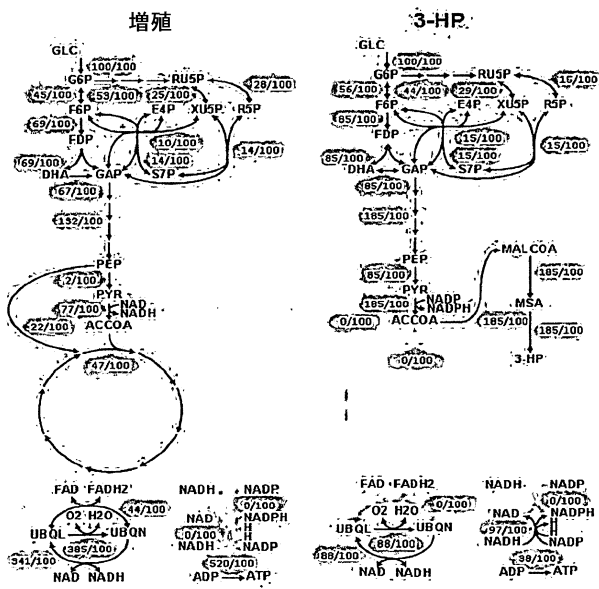
【 図 8 】



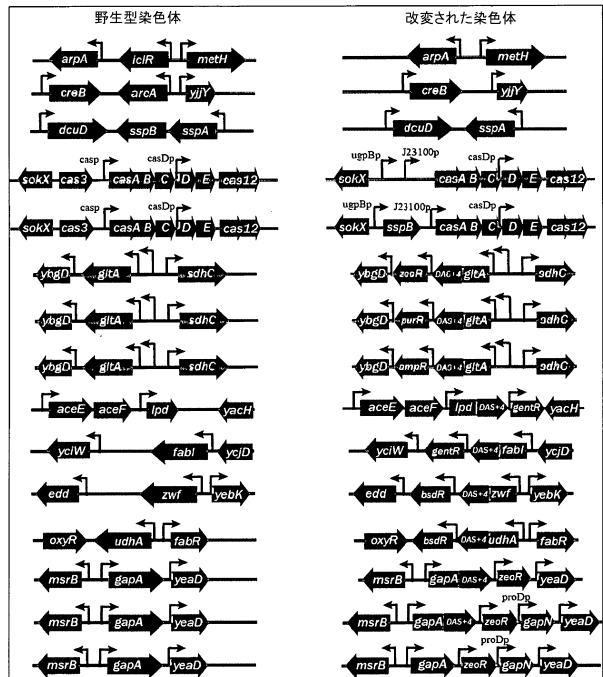
【 図 9 】



【 図 10 】

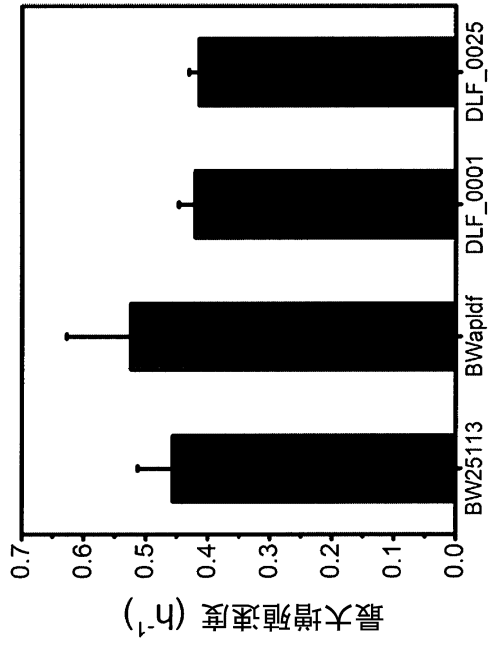


【 図 11 】

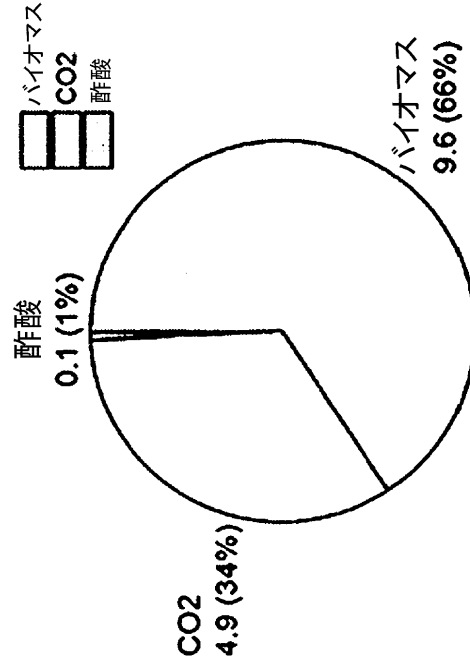




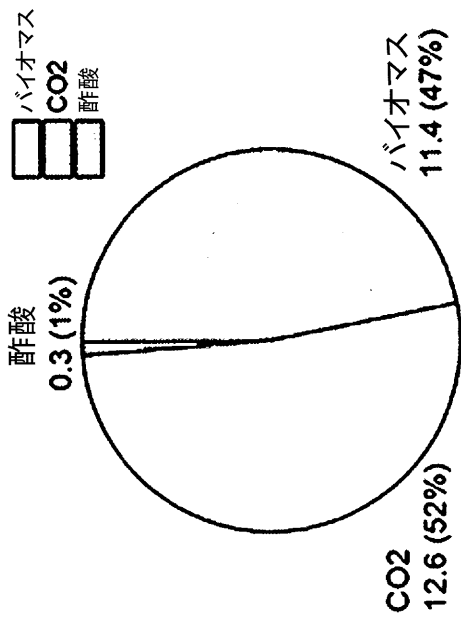
【図 1 2】



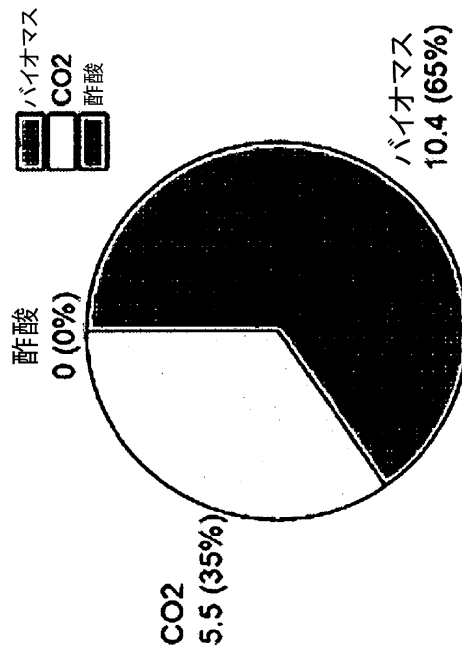
【図 1 3 A】



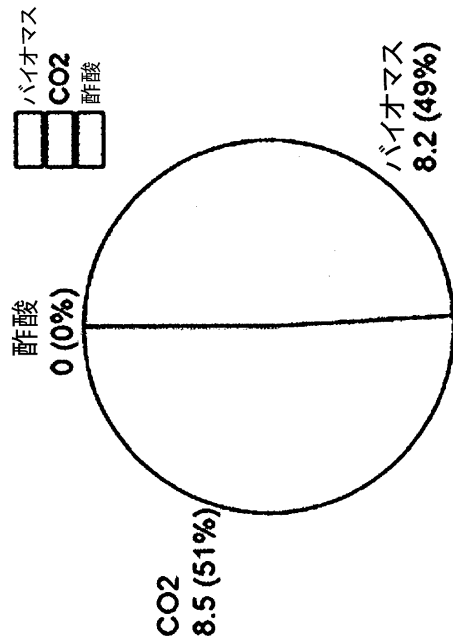
【図 1 3 B】



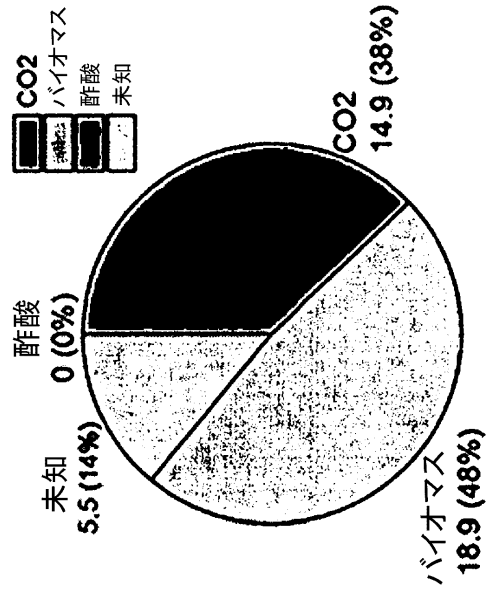
【図 1 3 C】



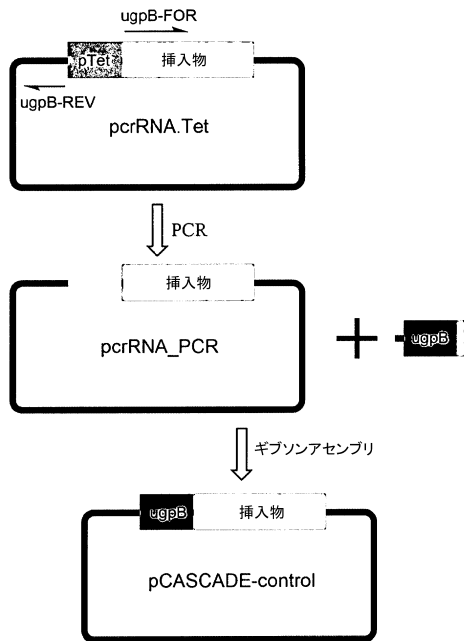
【 図 1 3 D 】



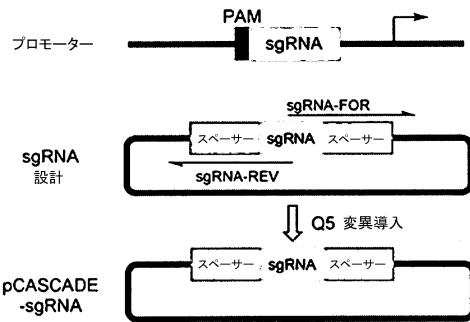
【 図 1 3 E 】



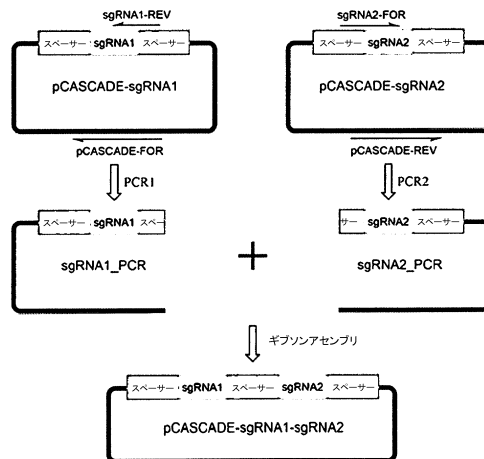
【 図 1 4 】



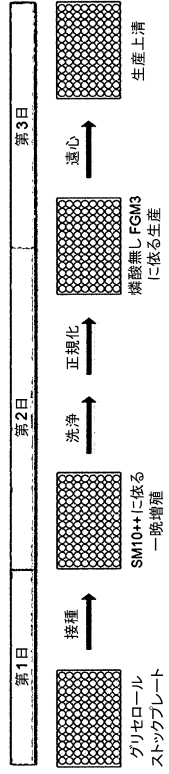
【 図 1 5 A 】



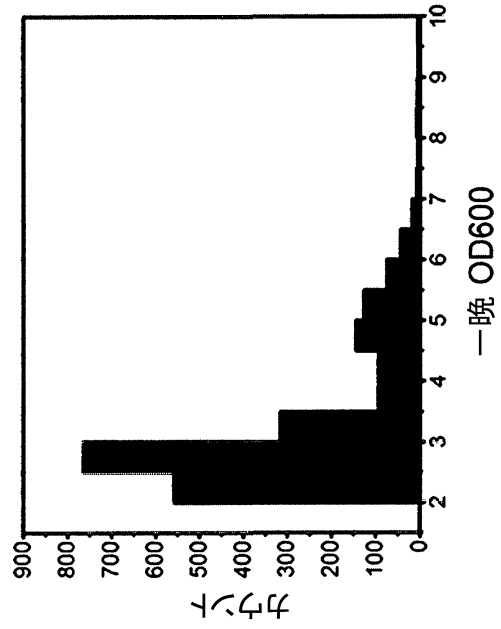
【 図 1 5 B 】



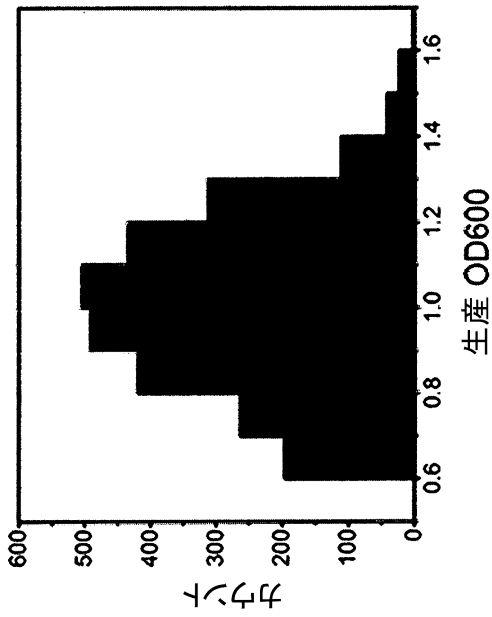
【図 16 A】



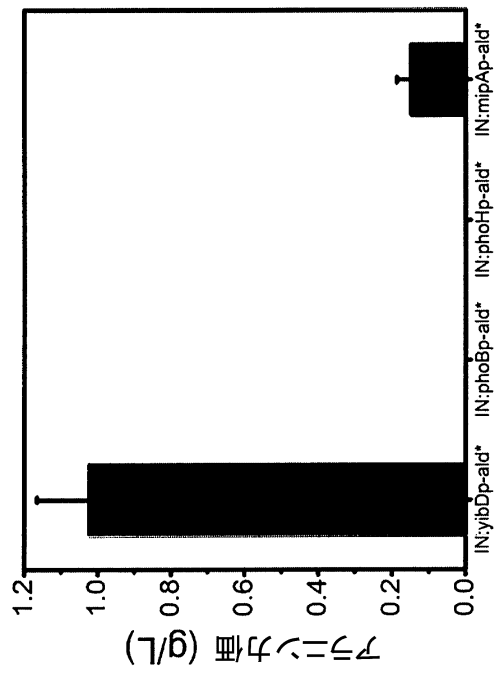
【図 16 B】



【図 16 C】

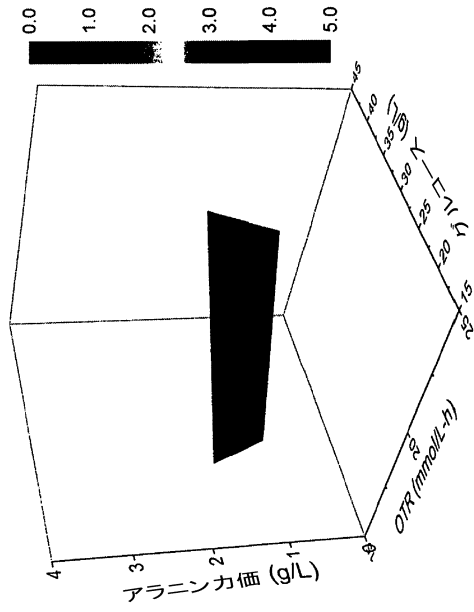


【図 17】

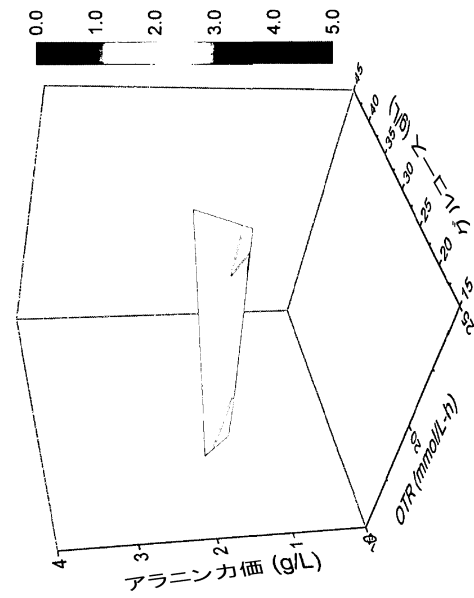




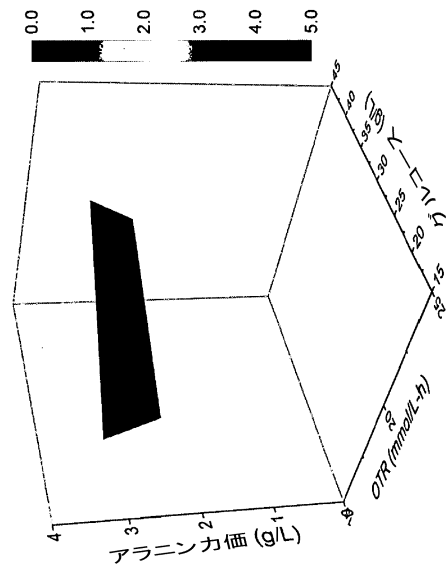
【図19D】



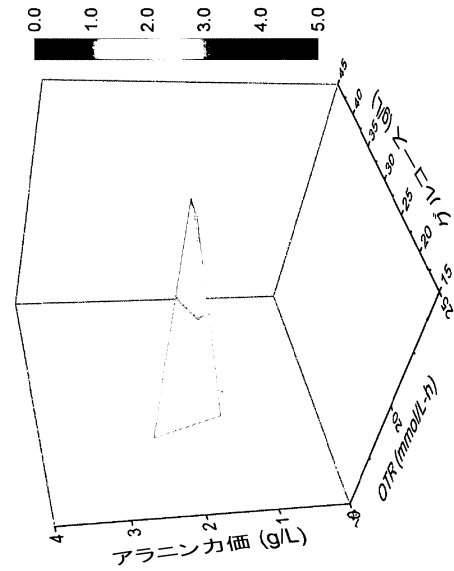
【図20A】



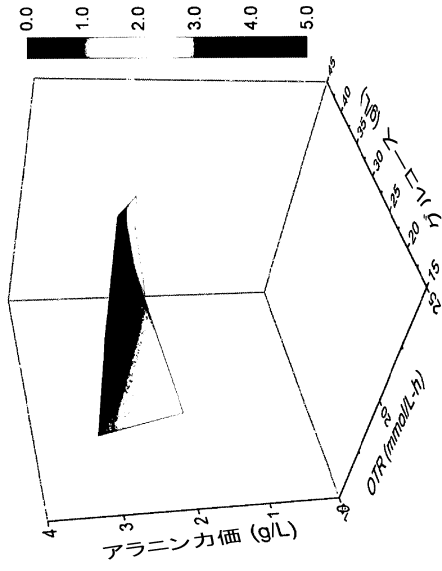
【図20B】



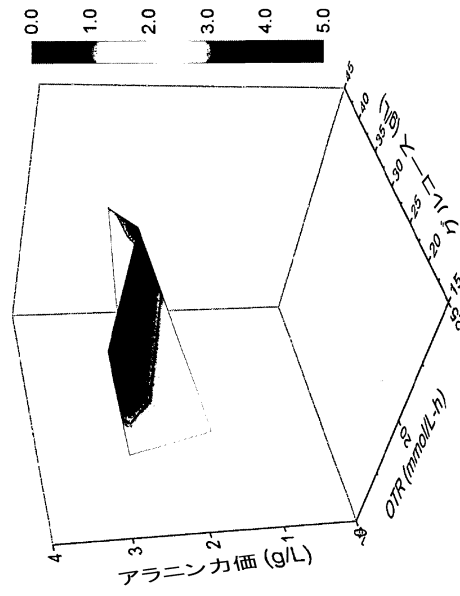
【図20C】



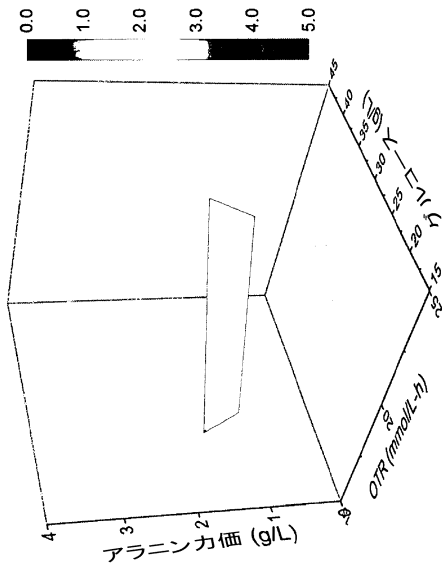
【図20D】



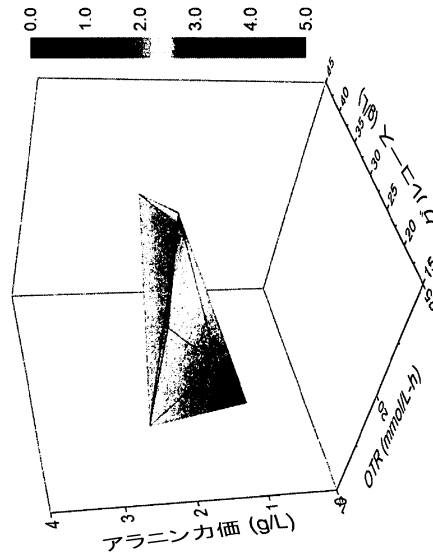
【図21A】



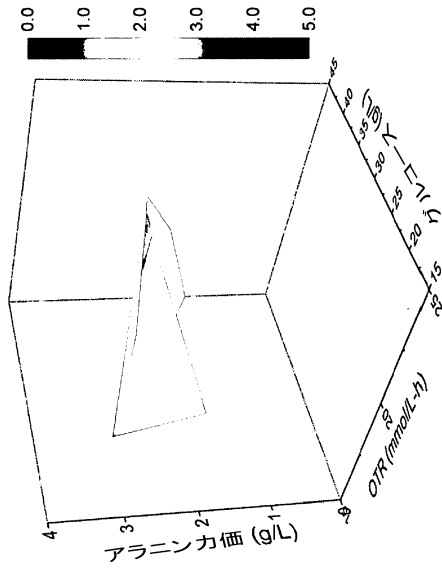
【図21B】



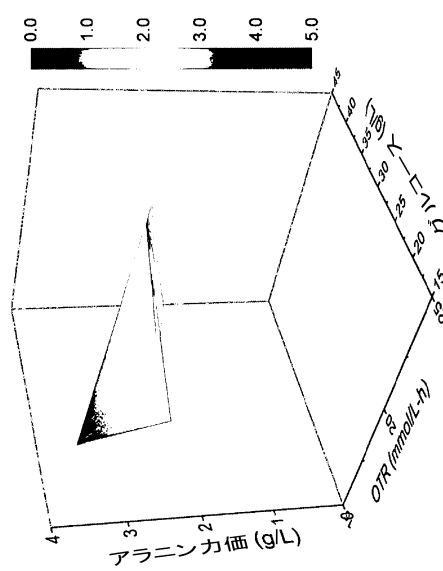
【図21C】



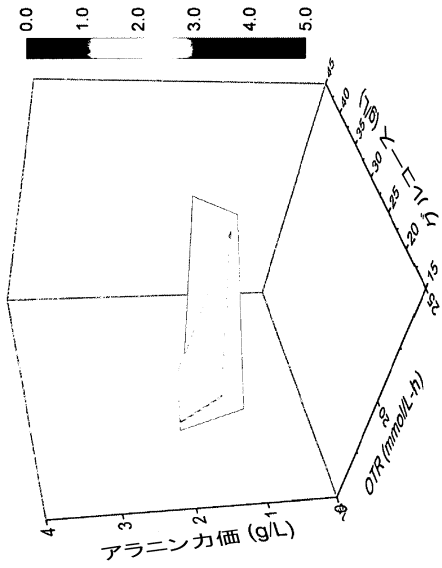
【 2 1 D】



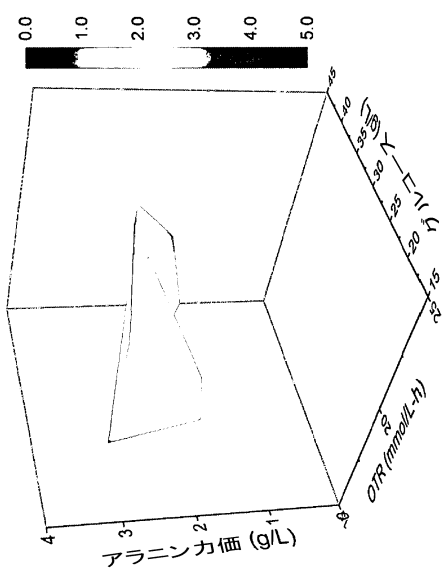
【 2 2 A】



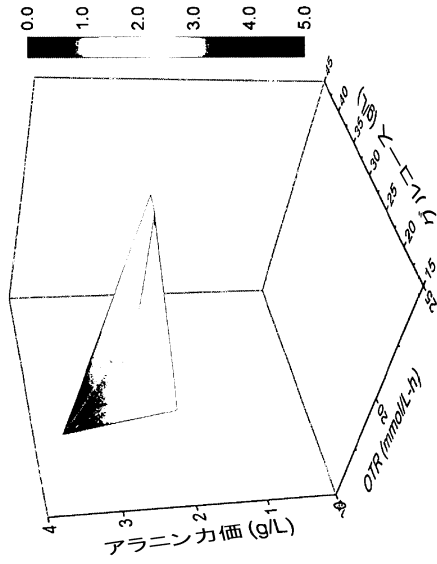
【 2 2 B】



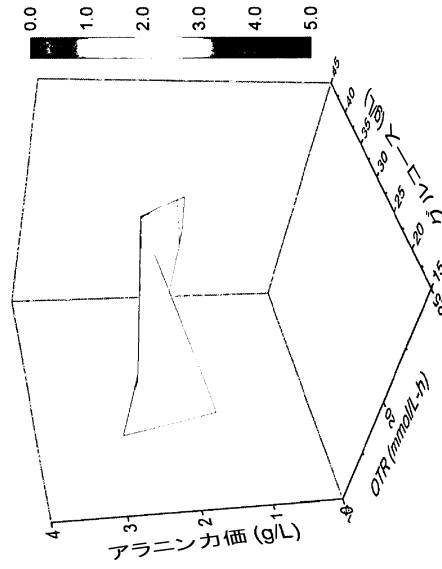
【 2 2 C】



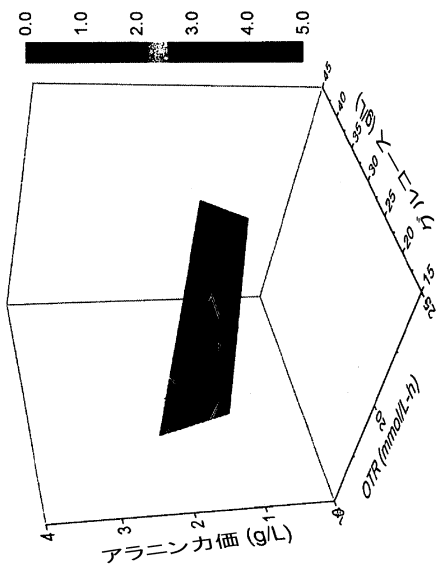
【 2 2 D】



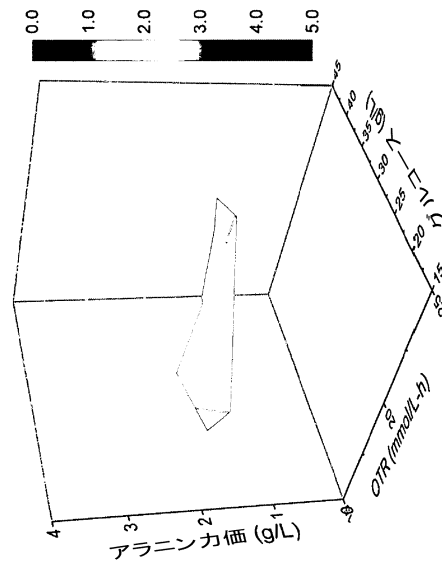
【 2 3 A】



【 2 3 B】

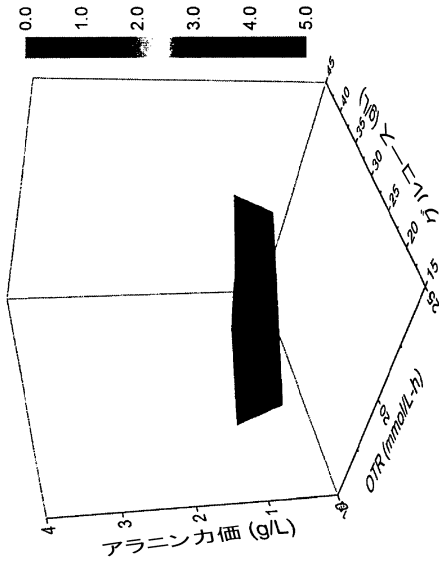


【 2 3 C】

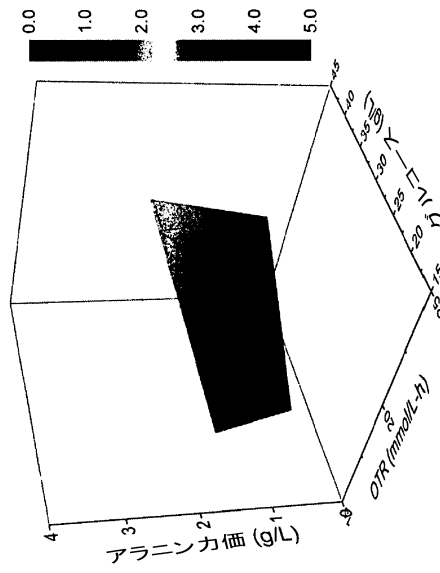




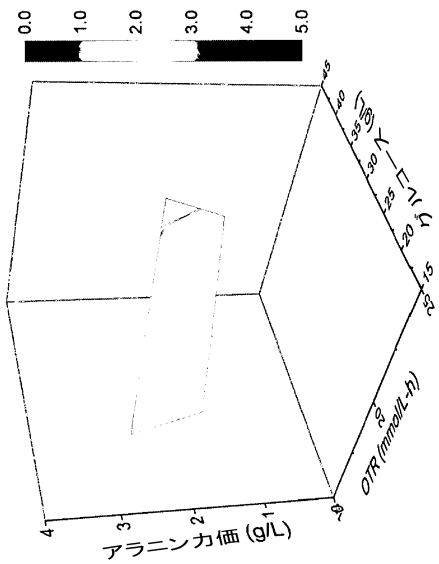
【図 23 D】



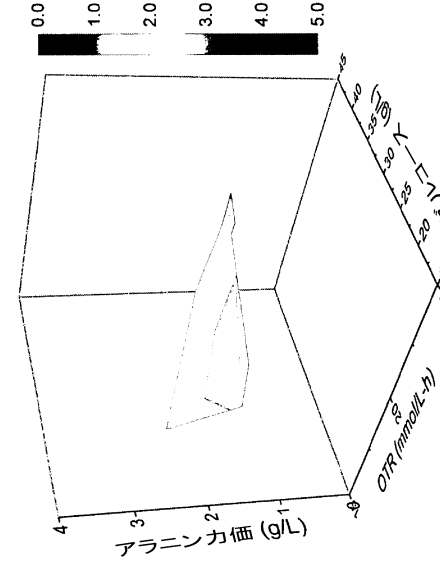
【図 24 A】



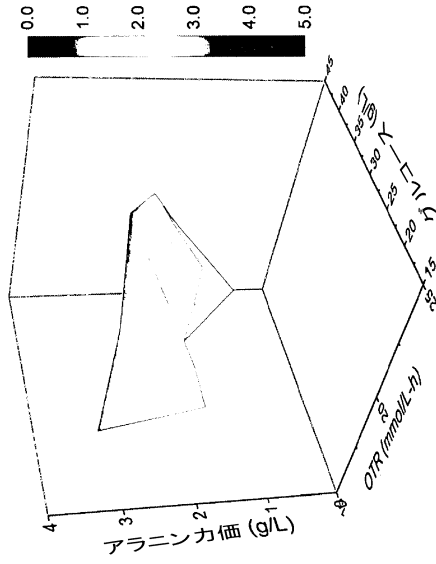
【図 24 B】



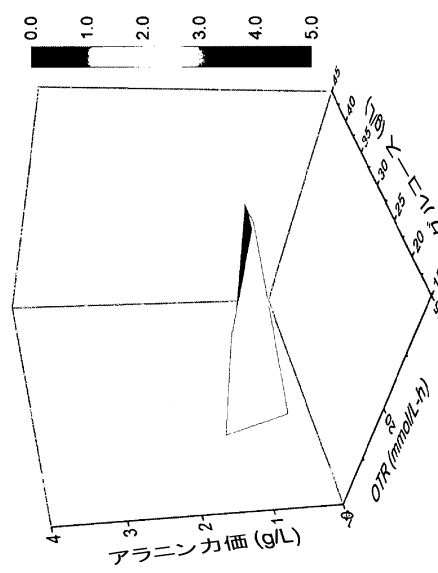
【図 24 C】



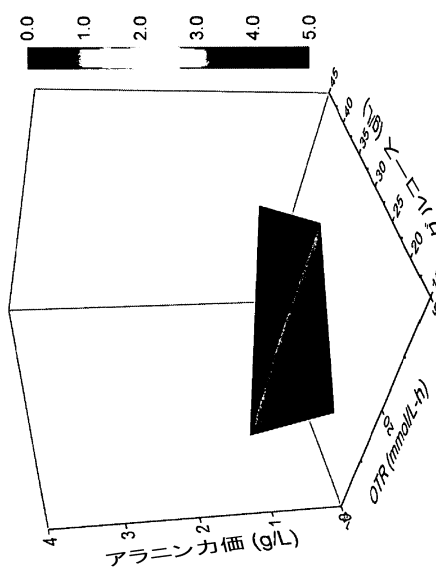
【 24 D】



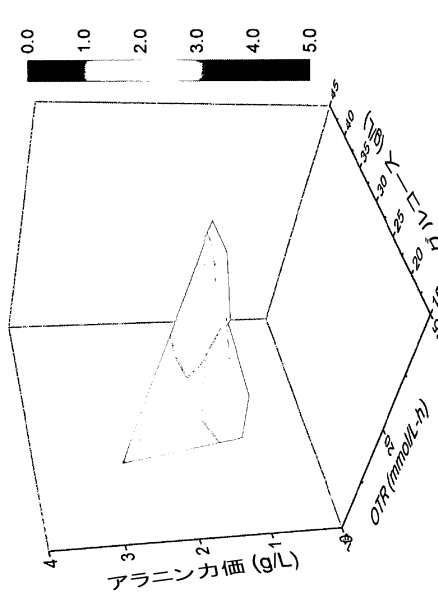
【 25 A】



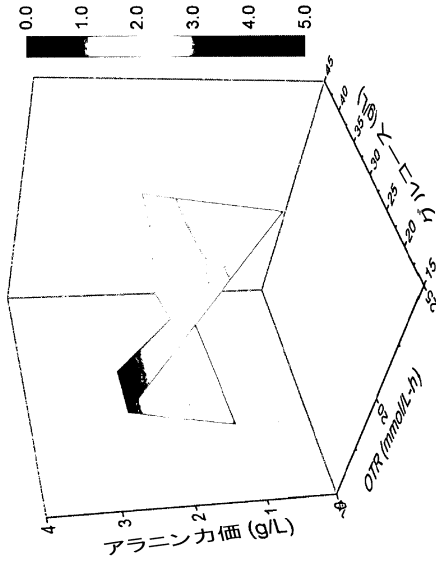
【 25 B】



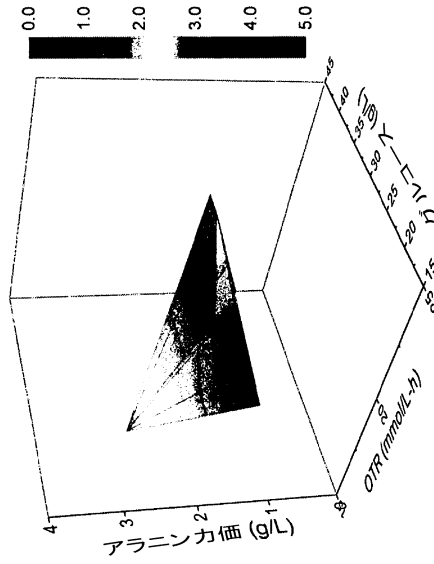
【 25 C】



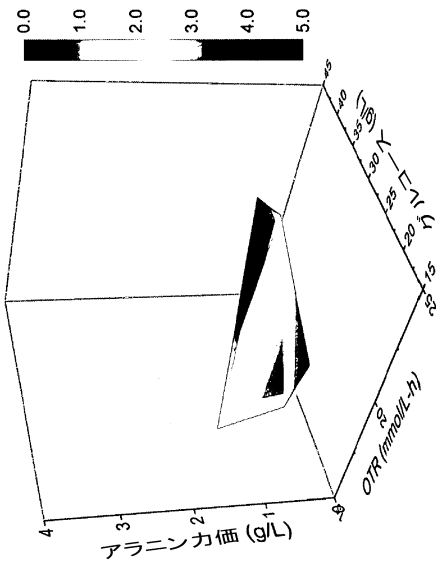
【図 25 D】



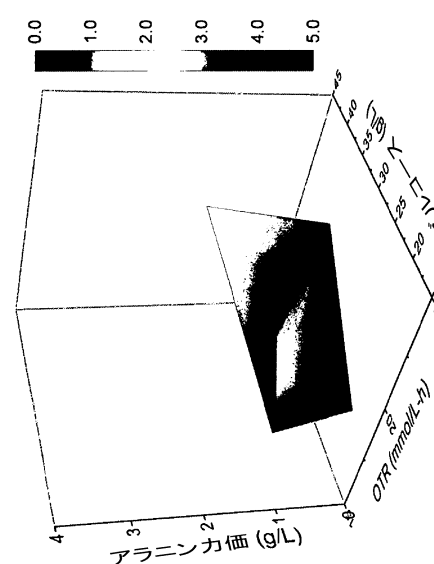
【図 26 A】



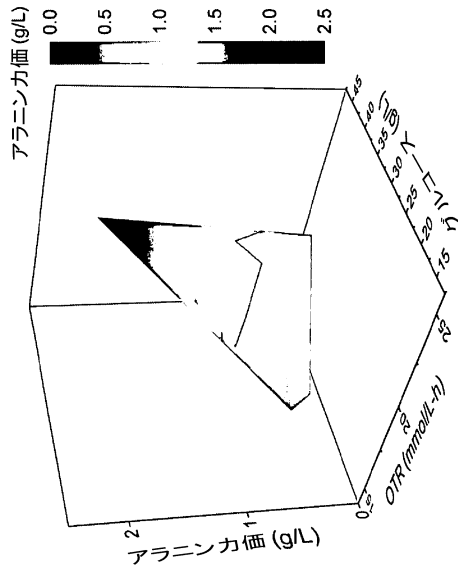
【図 26 B】



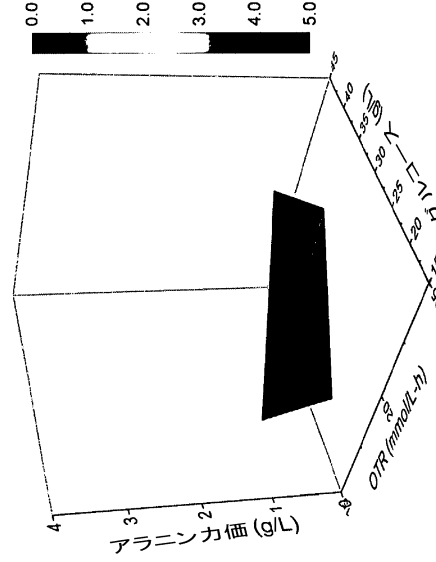
【図 26 C】



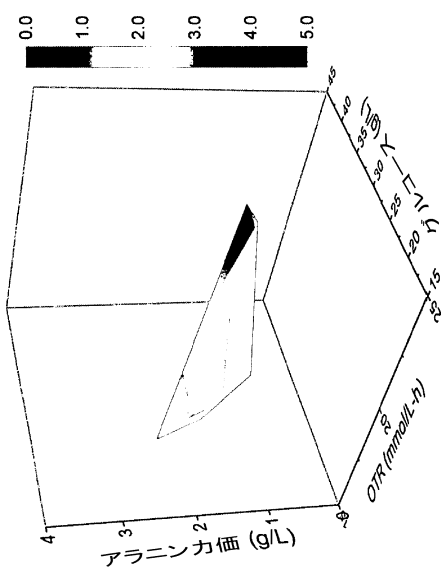
【図 26 D】



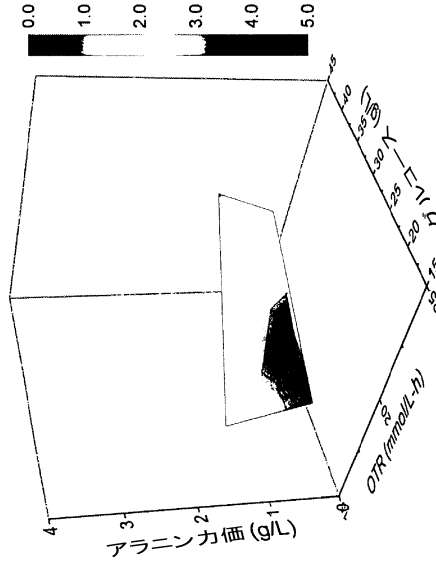
【図 27 A】



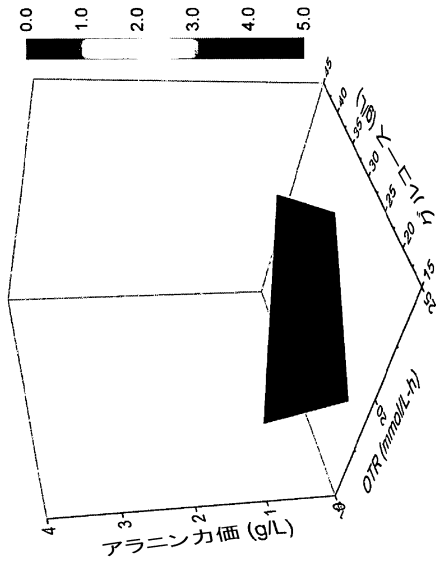
【図 27 B】



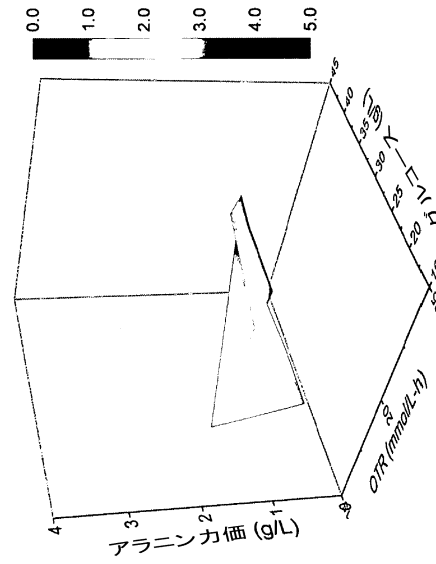
【図 27 C】



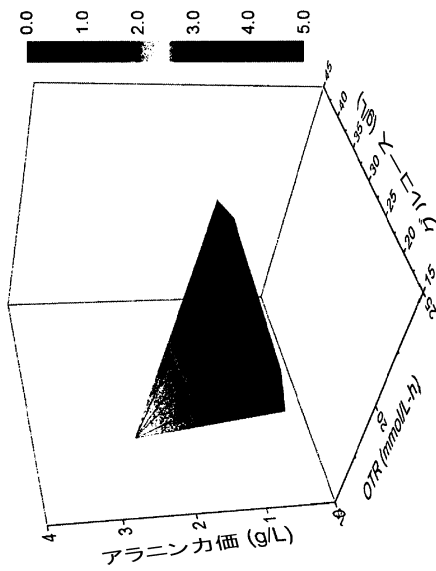
【図 27 D】



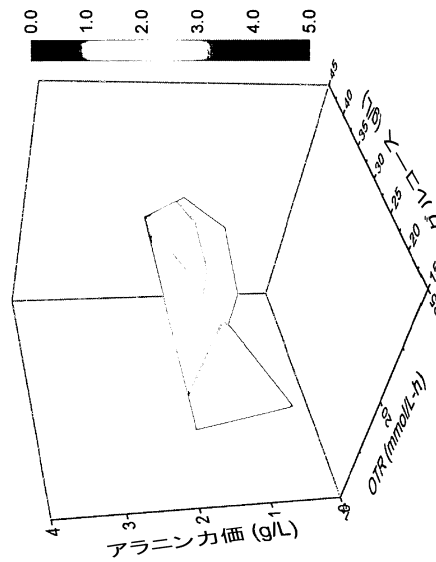
【図 28 A】



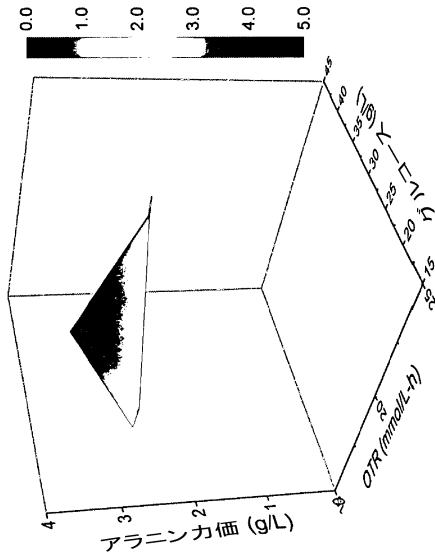
【図 28 B】



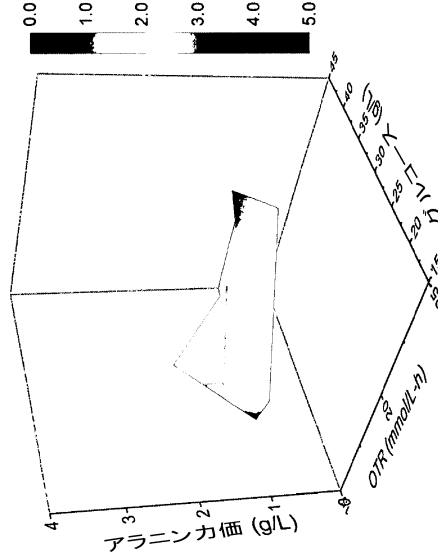
【図 28 C】



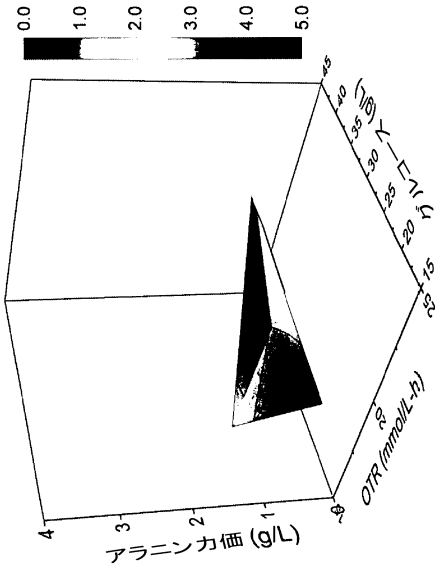
【図 28 D】



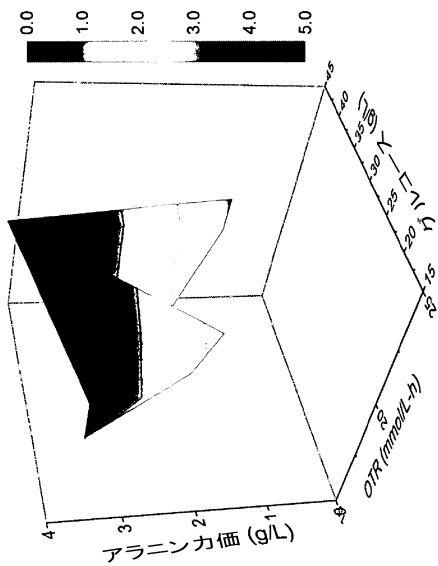
【図 29 A】



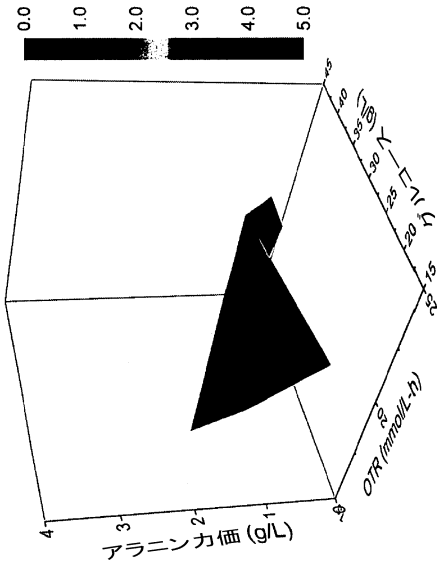
【図 29 B】



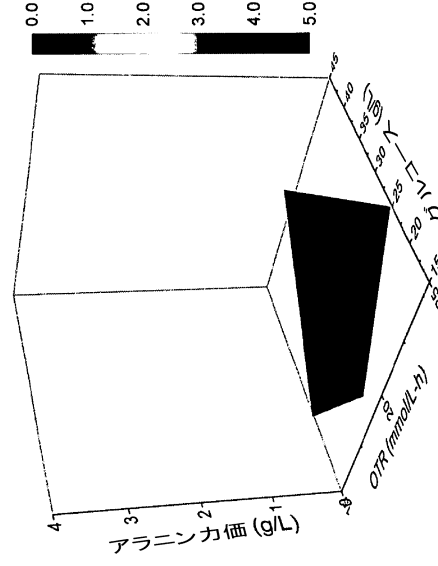
【図 29 C】



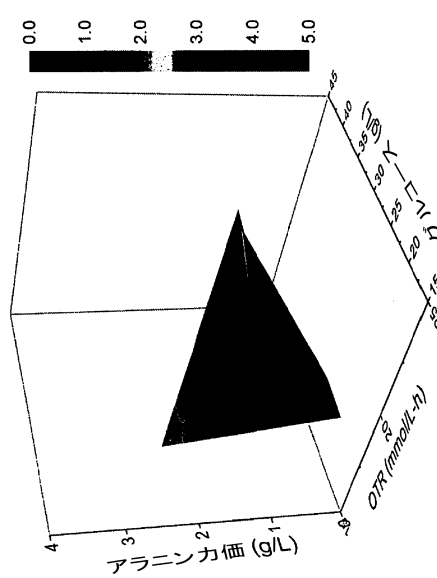
【 29 D】



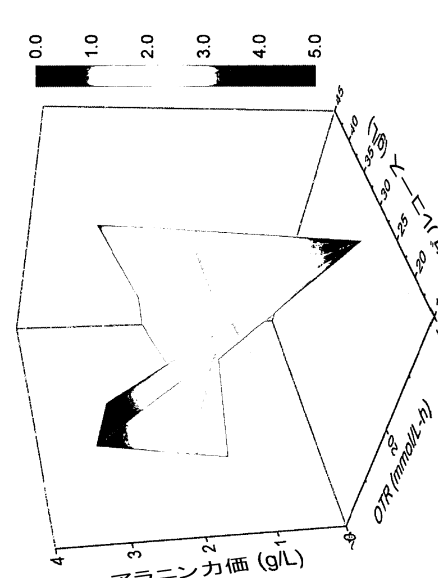
【 30 A】



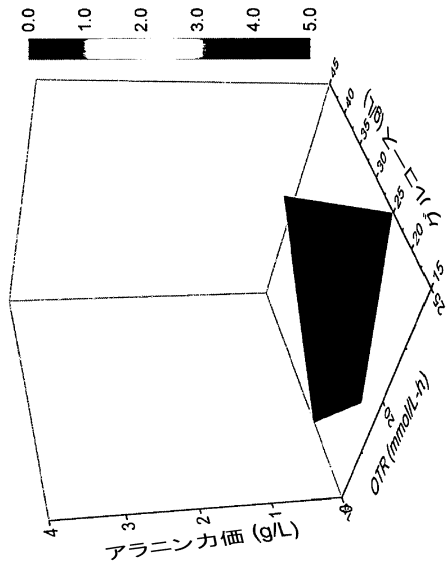
【 30 B】



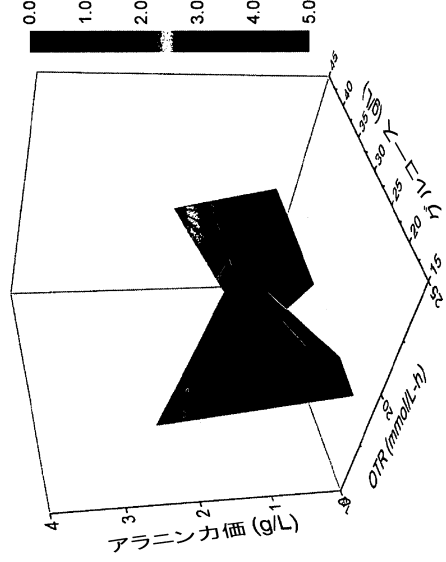
【 30 C】



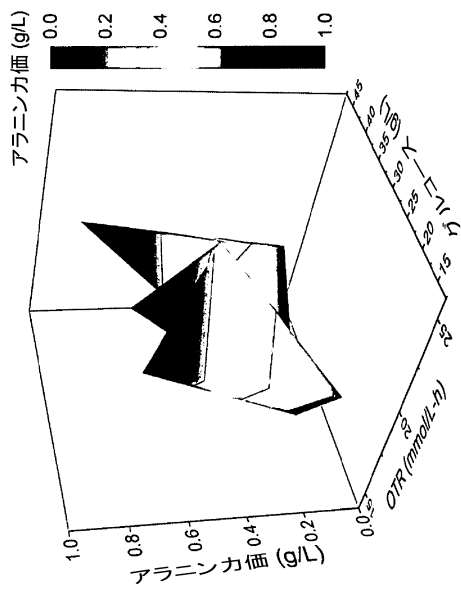
【図 30 D】



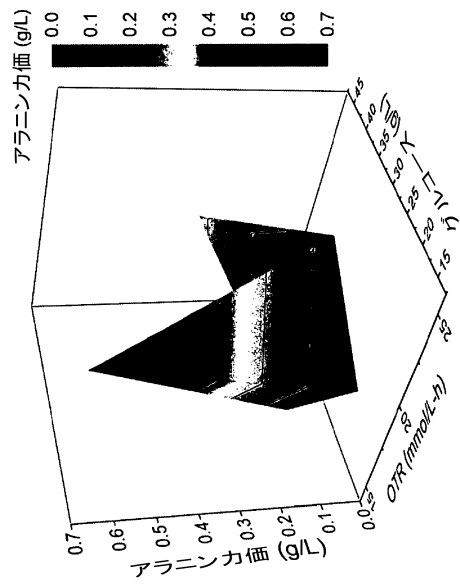
【図 31 A】



【図 31 B】

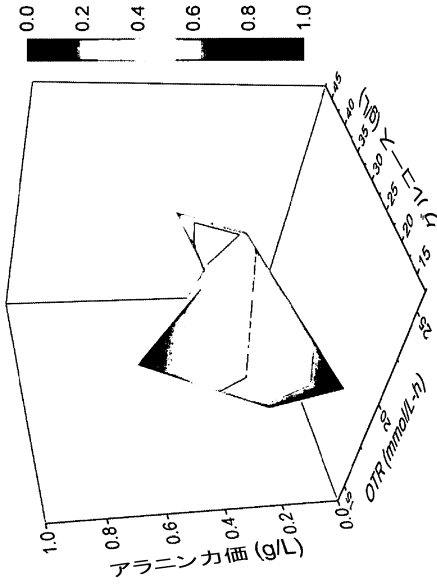


【図 31 C】

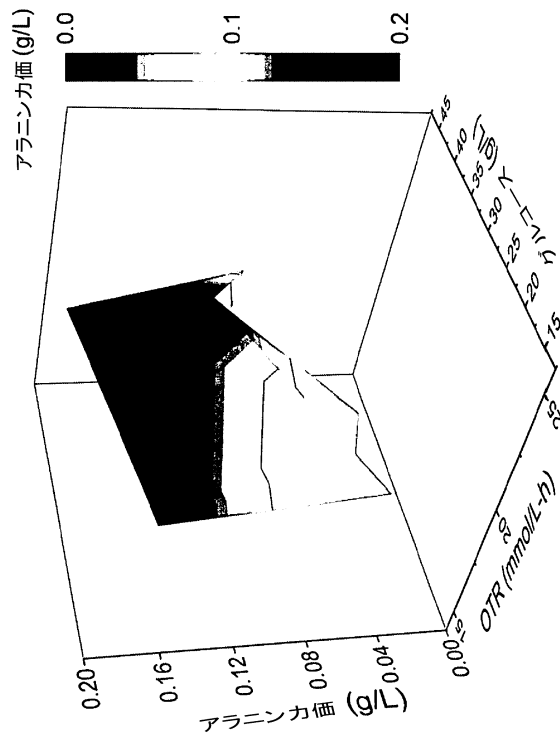




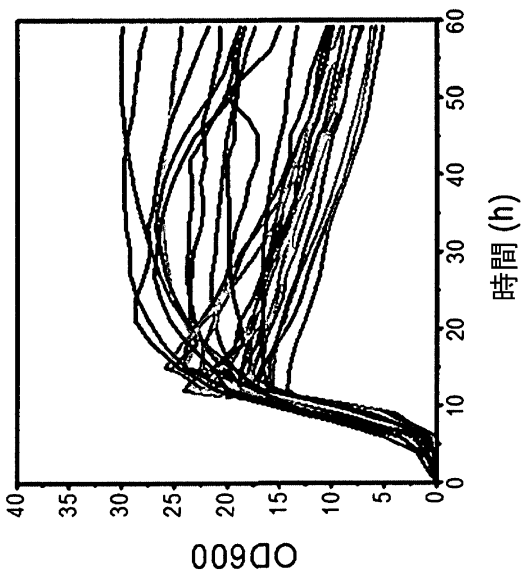
【図 3 1 D】



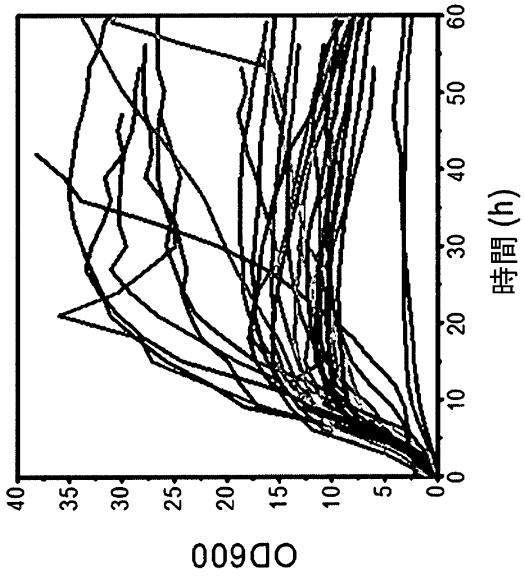
【図 3 2】



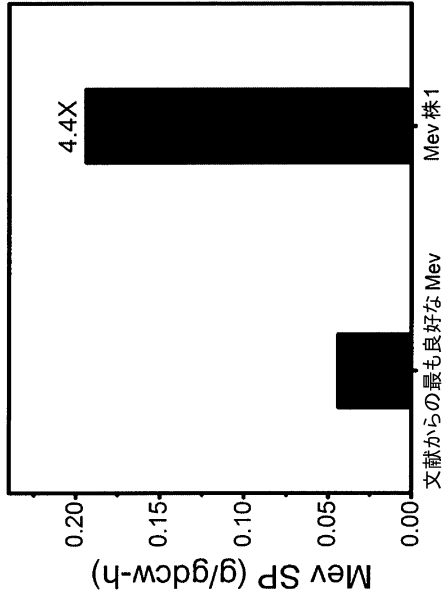
【図 3 3 A】



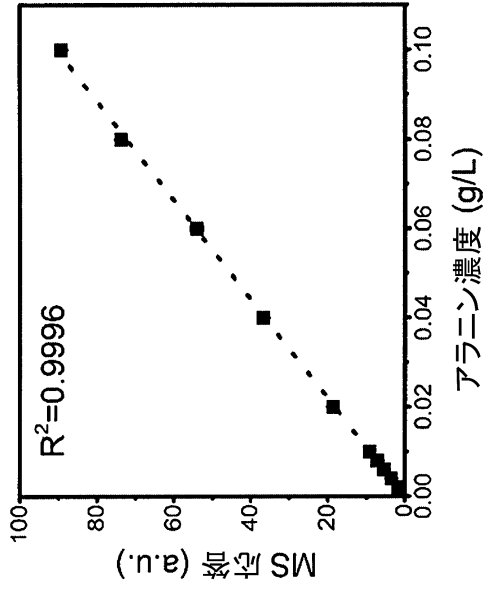
【図 3 3 B】



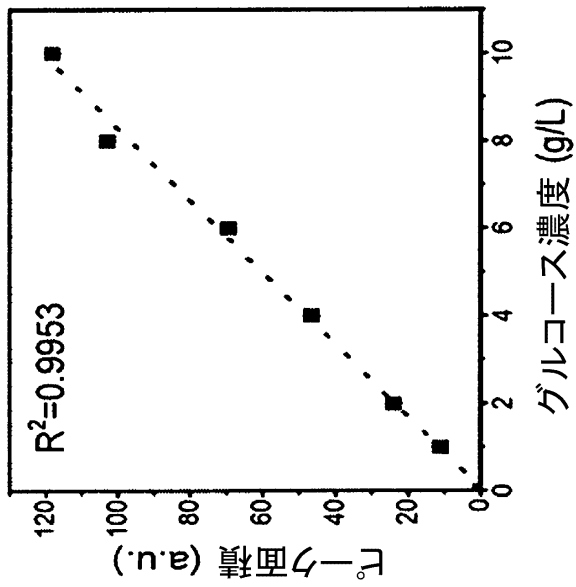
【 図 3 4 】



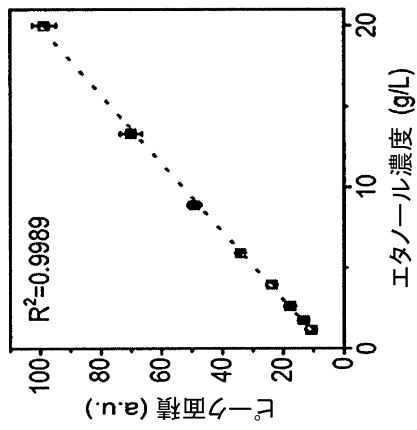
【 図 3 5 】



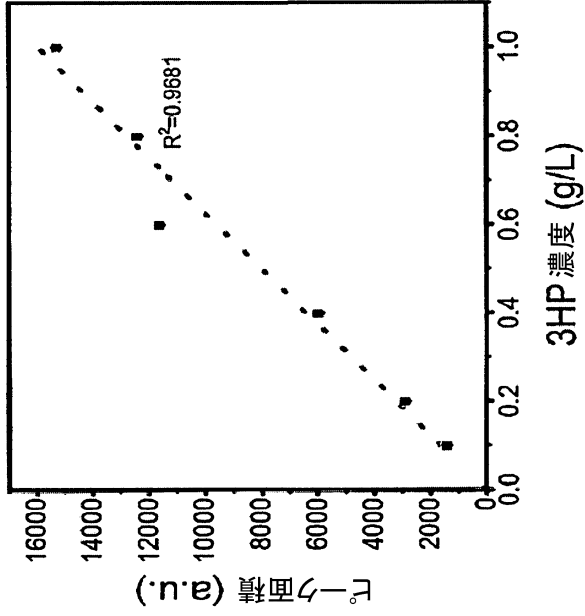
【 図 3 6 A 】



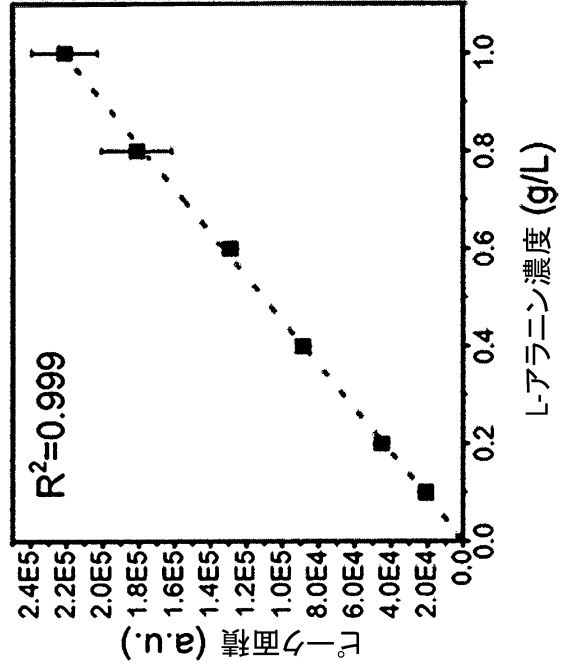
【 図 3 6 B 】



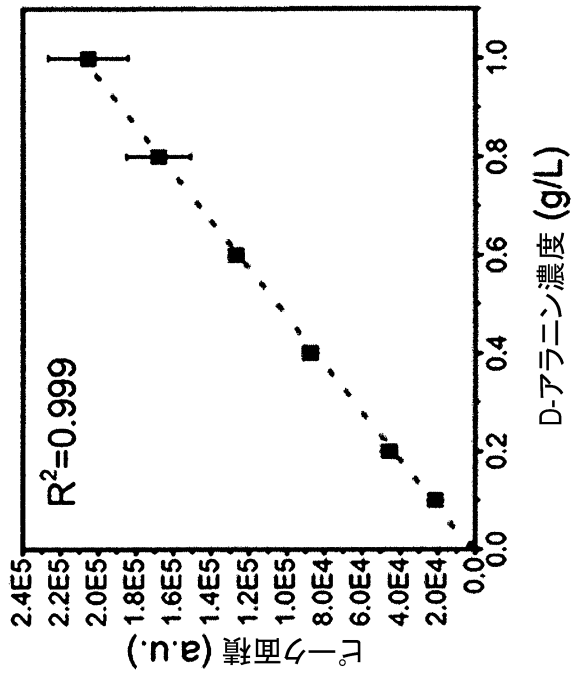
【 図 3 7 】



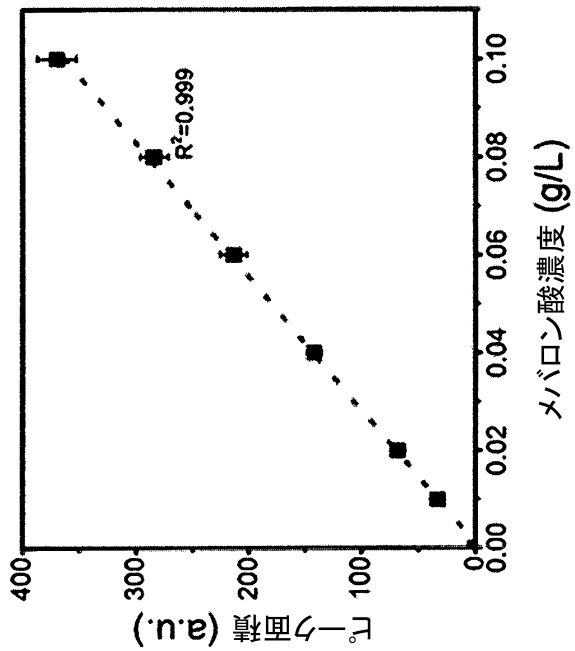
【 図 3 8 A 】



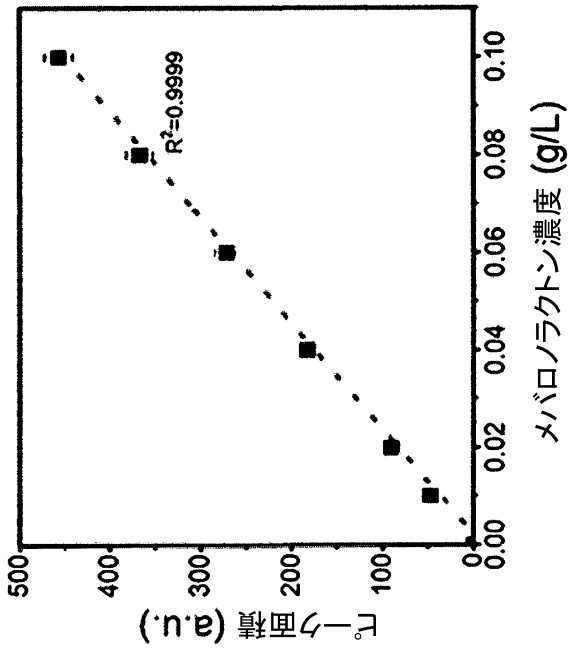
【 図 3 8 B 】



【 図 3 8 C 】



【図 38D】



【配列表】

0006878607000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/10  
C 1 2 N 15/113 (2010.01) C 1 2 N 15/113 Z

(72)発明者 イエ, ジーシャ  
アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 27606 ローリー, アイビー コモンズ ドライブ  
3515 アpartment 301

審査官 福澤 洋光

(56)参考文献 米国特許出願公開第2015/0072399(US, A1)  
米国特許出願公開第2011/0244575(US, A1)  
特表2013-535962(JP, A)  
Genome Biology, 2002年, Vol.4, Issue 1, Article R3, pp.1-10

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C 1 2 N 1 / 0 0 - 1 5 / 9 0  
C 1 2 P 1 / 0 0 - 4 1 / 0 0  
CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
PubMed