

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6821598号
(P6821598)

(45) 発行日 令和3年1月27日(2021.1.27)

(24) 登録日 令和3年1月8日(2021.1.8)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 N	15/77	(2006.01)	C 1 2 N 15/77 Z N A Z
C 1 2 N	15/67	(2006.01)	C 1 2 N 15/67 Z
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N	15/52	(2006.01)	C 1 2 N 15/52 Z
C 1 2 P	13/08	(2006.01)	C 1 2 P 13/08 A

請求項の数 16 (全 68 頁)

(21) 出願番号	特願2017-555711 (P2017-555711)	(73) 特許権者	517366688
(86) (22) 出願日	平成28年12月7日 (2016.12.7)		ザイマージェン インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2018-530991 (P2018-530991A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 946
(43) 公表日	平成30年10月25日 (2018.10.25)		08, エメリービル, ホートン スト
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/065464		リート 5980, スイート 105
(87) 国際公開番号	W02017/100376	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開日	平成29年6月15日 (2017.6.15)		弁理士 山本 秀策
審査請求日	平成30年4月23日 (2018.4.23)	(74) 代理人	100113413
(31) 優先権主張番号	62/264, 232		弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成27年12月7日 (2015.12.7)	(74) 代理人	100181674
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 飯田 貴敏
(31) 優先権主張番号	62/431, 409	(74) 代理人	100181641
(32) 優先日	平成28年12月7日 (2016.12.7)		弁理士 石川 大輔
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	230113332
			弁護士 山本 健策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 *Corynebacterium glutamicum*由来のプロモーター

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1～8からなる群から選択されるプロモーターポリヌクレオチド配列を少なくとも3つ含む、プロモーターのラダーであって、

前記プロモーターのラダーが、徐々に増加するレベルのプロモーター活性を有する複数のプロモーターを含む、前記プロモーターのラダー。

【請求項2】

前記プロモーターポリヌクレオチド配列の少なくとも1つが、配列番号1、5、及び7からなる群から選択される、請求項1に記載のプロモーターのラダー。

【請求項3】

前記プロモーターポリヌクレオチド配列の少なくとも1つが、配列番号1～2からなる群から選択される、請求項1に記載のプロモーターのラダー。

【請求項4】

前記プロモーターポリヌクレオチド配列の少なくとも1つが、配列番号3、4、及び5からなる群から選択される、請求項1に記載のプロモーターのラダー。

【請求項5】

前記プロモーターポリヌクレオチド配列の少なくとも1つが、配列番号6～8からなる群から選択される、請求項1に記載のプロモーターのラダー。

【請求項6】

前記プロモーターのラダーの各プロモーターが、少なくとも1つの異種標的遺伝子に機

能的に連結している、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のプロモーターのラダー。

【請求項 7】

前記少なくとも 1 つの異種標的遺伝子が、アミノ酸、有機酸、タンパク質、及びポリマーからなる群から選択される生体分子を生成する生合成経路の成分である遺伝子である、請求項 6 に記載のプロモーターのラダー。

【請求項 8】

前記少なくとも 1 つの異種標的遺伝子が、
京都遺伝子ゲノム百科事典 (K E G G) のエントリー M 0 0 0 1 6 の遺伝子を含むリジン生合成経路；

K E G G エントリー M 0 0 5 2 5 の遺伝子を含むリジン生合成経路；

K E G G エントリー M 0 0 5 2 6 の遺伝子を含むリジン生合成経路；

K E G G エントリー M 0 0 5 2 7 の遺伝子を含むリジン生合成経路；

K E G G エントリー M 0 0 3 0 の遺伝子を含むリジン生合成経路；

K E G G エントリー M 0 0 4 3 3 の遺伝子を含むリジン生合成経路；及び

K E G G エントリー M 0 0 3 1 の遺伝子を含むリジン生合成経路

からなる群から選択されるアミノ酸生合成経路の成分である遺伝子である、請求項 6 または請求項 7 に記載のプロモーターのラダー。

【請求項 9】

請求項 1 に記載のプロモーターのラダーを含む複数の組換えポリヌクレオチドであって、各組換えポリヌクレオチドが、異種標的遺伝子に機能的に連結している前記プロモーターのラダーからの 1 つのプロモーターを含む、前記複数の組換えポリヌクレオチド。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のプロモーターのラダー、または、請求項 9 に記載の複数の組換えポリヌクレオチドを含む、複数の組換えベクターであって、各ベクターが、前記プロモーターのラダーまたは少なくとも 1 つの組換えポリヌクレオチドからの少なくとも 1 つのプロモーターを含む、前記複数の組換えベクター。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のプロモーターのラダー、請求項 9 に記載の複数の組換えポリヌクレオチド、または請求項 10 に記載の複数の組換えベクターを含む、複数の宿主細胞であって、各宿主細胞が、前記プロモーターのラダー、少なくとも 1 つの組換えポリヌクレオチドまたは少なくとも 1 つのベクターからの少なくとも 1 つのプロモーターを含む、前記複数の宿主細胞。

【請求項 12】

コリネバクテリウム属に属する、請求項 11 に記載の複数の宿主細胞。

【請求項 13】

各々が少なくとも 1 つの異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 1 ~ 8 からなる群から選択されるプロモーターポリヌクレオチド配列少なくとも 3 つの組み合わせを含む、形質転換された宿主細胞であって、

前記プロモーターポリヌクレオチドの組み合わせが、徐々に増加するレベルのプロモーター活性を有する複数のプロモーターを含む、前記形質転換された宿主細胞。

【請求項 14】

前記標的遺伝子が、アミノ酸、有機酸、香味料、及び香料、バイオ燃料、タンパク質、及び酵素、ポリマー/モノマー、及び他の生体材料、脂質、核酸、小分子治療薬、タンパク質治療薬、ファインケミカル、及び栄養補助食品から選択される生体分子を生成する生合成経路と関連する、請求項 13 に記載の形質転換された宿主細胞。

【請求項 15】

前記標的遺伝子が、抗生物質、アルカロイド、テルペノイド、及びポリケチドから選択される二次代謝産物を生成する生合成経路と関連する、請求項 14 に記載の形質転換された宿主細胞。

【請求項 16】

10

20

30

40

50

各プロモーターポリヌクレオチドが、異なる異種標的遺伝子に機能的に連結している、請求項 1 3 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載の形質転換された宿主細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2015年12月7日に提出された米国特許仮出願番号第62/264,232号、及び2016年12月7日に提出された米国特許仮出願番号第62/431,409号の利益を主張し、それぞれの出願は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0002】

テキストファイルとして提供された配列表の参照による組み込み

配列表は、2016年11月30日に作成され、4,575バイトのサイズを有する、テキストファイル「ZMG-001-PC_TSL.txt」として本明細書に提供される。テキストファイルの内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0003】

本発明は、*Corynebacterium glutamicum* から単離されたポリヌクレオチドを含む天然プロモーター及びそれ由来する変異プロモーター、宿主細胞、及びプロモーターを含む組換えベクター、及び宿主細胞を培養することを含む、標的遺伝子の発現を改変し、生体分子を生成する方法に関する。

20

【背景技術】

【0004】

コリネ型細菌、特に、*Corynebacterium glutamicum* の株は、アミノ酸、有機酸、ビタミン、ヌクレオシド、及びヌクレオチドなどの生体分子の生成において重要な役割を果たし、生成処理を改善するために継続的な努力がなされている。前記処理は、例えば攪拌及び酸素供給などの発酵関連措置、または例えば発酵中の糖濃度などの栄養培地の組成、または例えばイオン交換クロマトグラフィーによって製品形態にワークアップ、または微生物自体の本来の性能特性に対して改良されてもよい。

【0005】

性能特性には、例えば、収率、力価、生産性、副生成物の除去、処理逸脱への耐性、最適成長温度、及び成長速度を含み得る。微生物株の性能を改善する1つの方法は、代謝産物の生成を制御する遺伝子の発現を増加することである。遺伝子の発現を増加することは、その遺伝子によってコードされる酵素の活性を増加し得る。酵素活性を増加することは、酵素が属する経路によってなされる代謝産物の合成速度を増加し得る。場合によっては、代謝産物の生成速度を増加することは、他の細胞処理を不均衡にし、微生物培養の成長を阻害し得る。場合によっては、下方調節活性は、株の性能を改善するために重要である。例えば、副生成物から離れて流束を再指向することは、収率を改善し得る。従って、代謝経路内で種々の成分の発現レベルを同時に微調整することが、しばしば必要である。

30

【0006】

プロモーターは、遺伝子が転写される速度を調節し、種々の方法で転写に影響を及ぼし得る。構成的プロモーターは、例えば、内部または外部の細胞条件に関わらず、それらの関連遺伝子の転写を一定速度で指向する一方で、調節可能なプロモーターは、内部及び/または外部細胞条件、例えば、成長速度、温度、特定の環境化学に対する応答などに応じて、遺伝子が転写される速度を増加または減少させる。プロモーターは、正常な細胞状況から単離され、事実上任意の遺伝子の発現を調節するように操作することができ、対象の細胞成長、生成物収率、及び/または他の表現型を効果的に改変することができる。

40

【0007】

これまで説明してきたよりも十分に定められた *Corynebacterium* 属プロモーターのより広範な仕分けを明確にする必要がある。そのようなプロモーターは、コリネフォルム細胞中の遺伝子の協調発現に有用であろう。例えば、*C. glutamicu*

50

mプロモーターの集合体は、所望の生体分子に対する生合成経路の成分をコードする遺伝子の発現を増強することによって、*C. glutamicum*細胞中の生体分子の工業規模生成を容易にする。本明細書に記載のプロモーターは、これら及び他の必要性を満たすのを助ける。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

簡単に言えば、本開示は、*Corynebacterium glutamicum*から単離されたポリヌクレオチドを含む天然プロモーター及びそれに由来する変異プロモーターに関し、各々は、短いDNA配列、理想的には、100未満の塩基対によってコード
10
することができ、徐々に増加する発現レベルを有する構成的プロモーターのラダー（はしご）を一緒になって表す。種々の遺伝子が前記プロモーターの制御下で有利に発現されることが可能である。

【0009】

本発明の一実施形態は、配列番号1、配列番号5、または配列番号7から選択される配列を含む第1のプロモーターポリヌクレオチドに関する。いくつかの実施形態では、第1
20
のプロモーターポリヌクレオチドは、配列番号1、配列番号5、または配列番号7から選択される配列からなる。本発明の一実施形態は、本明細書に記載の少なくとも2つの第1のプロモーターポリヌクレオチドを含むプロモーターポリヌクレオチドの組み合わせに関する。本発明の一実施形態は、本明細書に記載の少なくとも1つの第1のプロモーターポリヌクレオチド、及び配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号6、及び配列番号8からなる群から選択される配列を含む少なくとも1つの第2のプロモーターポリヌクレオチドを含むプロモーターポリヌクレオチドの組み合わせに関する。本発明の一実施形態は、本明細書に記載の少なくとも1つの第1のプロモーターポリヌクレオチド、及び配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号6、及び配列番号8からなる群から選択される配列からなる少なくとも1つの第2のプロモーターポリヌクレオチドを含むプロモーターポリヌクレオチドの組み合わせに関する。

【0010】

本発明の一実施形態は、本明細書に記載の第1のプロモーターポリヌクレオチドを含む
30
宿主細胞に関する。本発明の一実施形態は、本明細書に記載の第1のプロモーターポリヌクレオチドを含む組換えベクターに関する。いくつかの実施形態では、第1のプロモーターポリヌクレオチドは、第1の標的遺伝子に機能的に連結している。本発明の一実施形態は、本明細書に記載のプロモーターポリヌクレオチドの組み合わせを含む宿主細胞に関する。本発明の一実施形態は、本明細書に記載のプロモーターポリヌクレオチドの組み合わせを含む組換えベクターに関する。いくつかの実施形態では、各プロモーターポリヌクレオチドは、異なる標的遺伝子に機能的に連結している。いくつかの実施形態では、標的遺伝子は、同じ代謝経路の一部である。いくつかの実施形態では、標的遺伝子は、同じ代謝経路の一部ではない。本発明の一実施形態は、本明細書に記載の組換えベクターで形質転換された宿主細胞に関する。

【0011】

本発明の一実施形態は、標的遺伝子に機能的に連結した少なくとも1つのプロモーター
40
ポリヌクレオチドを含み；プロモーターポリヌクレオチドは、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、及び配列番号8から選択される配列を含み；プロモーターポリヌクレオチドが、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号6、または配列番号8から選択される配列を含む場合、標的遺伝子は、プロモーターポリヌクレオチドの内因性遺伝子以外である、宿主細胞に関する。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、少なくとも2つのプロモーターポリヌクレオチドを含み、各プロモーターポリヌクレオチドは、異なる標的遺伝子に機能的に連結している。本発明の一実施形態は、標的遺伝子に機能的に連結した少なくとも1つのプロモーターポリヌクレオチドを含み；プロモーターポリヌクレオチドは、配列番号1、配列番号2、配列番号
50

3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、及び配列番号8から選択される配列を含み；プロモーターポリヌクレオチドが、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号6、または配列番号8から選択される配列を含む場合、標的遺伝子は、プロモーターポリヌクレオチドの内因性遺伝子以外である、組換えベクターに関する。いくつかの実施形態では、組換えベクターは、少なくとも2つのプロモーターポリヌクレオチドを含み、各プロモーターポリヌクレオチドは、異なる標的遺伝子に機能的に連結している。いくつかの実施形態では、標的遺伝子は、同じ代謝経路の一部である。いくつかの実施形態では、標的遺伝子は、同じ代謝経路の一部ではない。本発明の一実施形態は、本明細書に記載の組換えベクターで形質転換された宿主細胞に関する。

【0012】

本発明の一実施形態は、本明細書に記載の宿主細胞を培養することを含み、各標的遺伝子の改変は、上方調節、及び下方調節から独立して選択される、1つ以上の標的遺伝子の発現を改変する方法に関する。標的遺伝子は、例えば、アミノ酸、有機酸、核酸、タンパク質、及びポリマーを含む、生体分子の生合成経路の1つ以上のポリペプチドまたはタンパク質をコードするのが好ましい。

【0013】

本発明の別の実施形態は、生体分子を生成するのに適した条件下で、本明細書に記載の宿主細胞を培養することを含む、生体分子を生成する方法に関する。いくつかの実施形態では、標的遺伝子は、アミノ酸、有機酸、香味料、及び香料、バイオ燃料、タンパク質、及び酵素、ポリマー/モノマー、及び他の生体材料、脂質、核酸、小分子治療薬、タンパク質またはペプチド治療薬、ファインケミカル、及び栄養補助食品から選択される生体分子を生成する生合成経路と関連する。好ましい実施形態では、生体分子は、L-アミノ酸である。具体的実施形態では、L-アミノ酸は、リジンである。

【0014】

いくつかの実施形態では、宿主細胞は、*Corynebacterium*属に属する。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、*Corynebacterium glutamicum*である。

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

少なくとも1つの異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号1～8からなる群から選択されるプロモーターポリヌクレオチド配列を含む、組換え核酸分子。

(項目2)

前記プロモーターポリヌクレオチド配列が、配列番号1、5、及び7からなる群から選択される、項目1に記載の組換え核酸分子。

(項目3)

リンカーオリゴヌクレオチドまたはリンカーポリヌクレオチドをさらに含む、項目1または2に記載の組換え核酸分子。

(項目4)

前記少なくとも1つの異種標的遺伝子が、アミノ酸、有機酸、タンパク質、及びポリマーからなる群から選択される生体分子を生成する生合成経路の成分である遺伝子である、項目1に記載の組換え核酸分子。

(項目5)

前記少なくとも1つの異種標的遺伝子が、京都遺伝子ゲノム百科事典及びゲノム(KEGG)のエントリーM00016の遺伝子を含むリジン生合成経路；

KEGGエントリーM00525の遺伝子を含むリジン生合成経路；

KEGGエントリーM00526の遺伝子を含むリジン生合成経路；

KEGGエントリーM00527の遺伝子を含むリジン生合成経路；

KEGGエントリーM0030の遺伝子を含むリジン生合成経路；

KEGGエントリーM00433の遺伝子を含むリジン生合成経路；及び

10

20

30

40

50

K E G G エントリー M 0 0 3 1 の遺伝子を含むリジン生合成経路からなる群から選択される生合成経路のアミノ酸の成分である遺伝子である、項目 4 に記載の組換え核酸分子。

(項目 6)

配列番号 1 ~ 8 からなる群から選択される 1 つ以上の追加のプロモーターポリヌクレオチド配列をさらに含み、各プロモーターが、少なくとも 1 つの追加の異種遺伝子に機能的に連結している、項目 1 に記載の組換え核酸分子。

(項目 7)

前記組換え核酸分子が単離されている、項目 1 に記載の組換え核酸分子。

(項目 8)

少なくとも 1 つの異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 1 ~ 8 からなる群から選択されるプロモーターポリヌクレオチド配列を含む、組換えベクター。

(項目 9)

前記プロモーターポリヌクレオチド配列が、配列番号 1、5、及び 7 からなる群から選択される、項目 8 に記載の組換えベクター。

(項目 10)

前記標的遺伝子が、同じ代謝経路の一部である、項目 8 または 9 に記載の組換えベクター。

(項目 11)

前記標的遺伝子が、同じ代謝経路の一部ではない、項目 8 または 9 に記載の組換えベクター。

(項目 12)

項目 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の組換え核酸分子、または項目 8 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の組換えベクターで形質転換された組換え核酸分子を含む、宿主細胞。

(項目 13)

項目 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の 1 つ以上の追加の組換え核酸分子、または項目 8 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の 1 つ以上の追加の組換えベクターで形質転換された 1 つ以上の追加の組換え核酸分子をさらに含む、項目 12 に記載の宿主細胞。

(項目 14)

項目 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の 1 つ以上の追加の組換え核酸分子、または項目 8 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の 1 つ以上の追加の組換えベクターが、異なる異種標的遺伝子に機能的に連結している、項目 13 に記載の宿主細胞。

(項目 15)

プロモーターポリヌクレオチド配列の組み合わせを含み、前記プロモーターポリヌクレオチド配列の各々が、異なる異種標的遺伝子に機能的に連結している、項目 12 に記載の宿主細胞。

(項目 16)

前記異なる異種標的遺伝子の各々が、同じ代謝経路の一部である、項目 15 に記載の宿主細胞。

(項目 17)

前記異なる異種標的遺伝子の各々が、同じ代謝経路の一部ではない、項目 15 に記載の宿主細胞。

(項目 18)

Corynebacterium 属に属する、項目 12 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の宿主細胞。

(項目 19)

Corynebacterium glutamicum である、項目 18 に記載の宿主細胞。

【図面の簡単な説明】

【0015】

10

20

30

40

50

【図1】*C. glutamicum* ATCC 13032ゲノム中の遺伝子ごとの5'UTR長(x軸)対2つの成長条件(y軸)にわたる発現比のグラフを示す。0.33~3の間の2つの成長条件にわたる発現比と、26~40塩基対の間の5'UTR長の両方を有する遺伝子は、黒丸によって表される。両方の基準に一致しなかった遺伝子は、灰色丸によって表される。

【図2】黄色の蛍光タンパク質ベースアッセイにおける8つの候補プロモーター(y軸)の正規化活性(x軸)のグラフを示す。各候補プロモーターの各生物学的複製は、黒丸によって表される。親プラスミドpK18repは、陰性対照として作用した。

【図3】アミノ酸L-リジンの生合成のための遺伝子及び生化学経路の図を提示する。生合成経路中で中間体を迂回する遺伝子(例えば、pck、odx、icd、及びhom)は、下線で示す。

10

【図4】*C. glutamicum*から、異種標的遺伝子fbp、dapB、ptsG、lysA、pgi、及びppcに機能的に連結した配列番号1~8からなる群から選択されるプロモーターポリヌクレオチド配列を有する組換え核酸分子で形質転換された*C. glutamicum*の宿主細胞中のL-リジン生成の変化の本明細書による例示の実施形態の結果のグラフを提示する。

【図5】*C. glutamicum*から、異種標的遺伝子dapS、cg0931、DapB、及びlysAに機能的に連結した配列番号1~8からなる群から選択されるプロモーターポリヌクレオチド配列を有する組換え核酸分子で形質転換された*C. glutamicum*の宿主細胞中のL-リジン生成の変化の本明細書による例示の実施形態の結果のグラフを提示する。

20

【発明を実施するための形態】

【0016】

以下の説明では、ある具体的な詳細が、本開示の種々の実施形態の完全な理解を提供するために記載される。しかしながら、当業者は、本開示が、これらの詳細によらずに実践されてもよいことを理解するであろう。

【0017】

文脈によって別様に要求されない限り、以下の明細書及び請求項を通して、単語「を含む(comprise)」並びに「を含む(comprises)」及び「を含む(comprising)」などのその変形例は、「含むが、限定されない」という意味で、開かれた包括的な意味で解釈されるべきである。

30

【0018】

本明細書で使用される場合、「組換え核酸分子」という用語は、組換えDNA分子または組換えRNA分子を指す。組換え核酸分子は、異なる元の供給源から結合した核酸分子を含有し、天然には一緒に結合しない任意の核酸分子である。組換えRNA分子は、組換えDNA分子から転写されたRNA分子を含む。特に、組換え核酸分子は、異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号1~8のプロモーターを含む核酸分子を含む。

【0019】

本明細書で使用される場合、「異種標的遺伝子」という用語は、特定のゲノム中で作動的に連結するプロモーターによってその自然状態(例えば、遺伝子組換えではない細胞内)で制御されない任意の遺伝子またはコード配列を指す。本明細書中で提供される場合、自然には存在しないプロモーターに機能的に連結した全ての標的遺伝子は、「異種標的遺伝子」と考えられる。より詳細には、配列番号1、5、及び7のプロモーターポリヌクレオチド配列は自然には存在しないため、全ての機能的に連結した標的遺伝子配列は、「異種標的遺伝子」配列である。本明細書で使用される場合、異種標的遺伝子は、オペロンの一部である1つ以上の標的遺伝子を含み得る。すなわち、オペロンの内因性プロモーターは、配列番号1~8の核酸配列を有するプロモーターポリヌクレオチド配列に置換される。本明細書で使用される場合、「プロモーターポリヌクレオチド配列」という用語は、関連配列番号に記載される配列を有する核酸を指す。

40

【0020】

50

本明細書の全体を通して「一実施形態」または「ある実施形態」という言及は、実施形態に関連して記載された特定の特徴、構造、または特性は、本開示の少なくとも1つの実施形態に含まれることを意味する。それゆえ、本明細書の全体を通じた種々の場所における「一実施形態では」または「ある実施形態では」という用語の出現は、必ずしも同じ実施形態に言及するものではない。本発明のある特定の特徴は、明確にするため、別々の実施形態に関連して説明されているが、これを単一の実施態様に組み合わせても提供できることが理解される。逆に、本発明の種々の特徴は、簡潔にするために、単一の実施形態に関連して説明されているが、別々に提供されても、または任意の適切なサブコンビネーション中で提供されてもよい。

【0021】

プロモーター活性を有するポリヌクレオチド

天然の *C. glutamicum* プロモーターは、以下の基準：1) 構成的プロモーターのラダー、すなわち、徐々に増加するレベルのプロモーター活性を有する複数のプロモーターを表すこと；及び2) 短いDNA配列、理想的には、100未満の塩基対によってコードされることの両方を満たすと同定された。*C. glutamicum* ATCC 13032においてグローバル遺伝子発現レベルを記述している公開されたデータセット (Lee et al., *Biotechnol Lett* (2013) 35: 709-717) は、異なる成長条件にわたって恒常的に発現される遺伝子を同定するために検査した。発現レベルが、2つの成長条件にわたって一定 (0.33~3の間の発現比として定義される) のままであった、すなわち、過酸化水素の添加の有り無し両方の最少培地におけるケモスタット成長であった遺伝子は、第1の基準を満たした。*C. glutamicum* ATCC 13032トランスクリプトームを記述している公開されたデータセット (Pfeifer-Sancar et al., *BMC Genomics* 2013, 14: 888) は、コンパクトプロモーターを有する遺伝子、すなわち、60塩基対コアプロモーター領域と、26~40の長さの塩基対の間の5'非翻訳領域とからなる遺伝子を見つけるために検査した。2つのデータセットを相互参照して、両方の基準を満たしたプロモーターを同定した。図1を参照されたい。以下の5つの野生型プロモーターが同定された (表1)。

【0022】

【表1】

表1：異なる成長条件下で発現レベルが増加し、恒常発現する *C. glutamicum* のプロモーター

株	配列番号	平均活性
Pcg1860-eyfp	2	89243
Pcg0007-eyfp	3	44527
Pcg0755-eyfp	4	43592
Pcg3381-eyfp	6	4723
Pcg3121-eyfp	8	98

【0023】

野生型プロモーター *cg1860* 及び *cg3121* は、文献には記載されていない。野生型プロモーター *cg0007-gyrB* もまた、文献には記載されていない、しかしながら、Neumann及びQuinones (*J Basic Microbiol*. 1997; 37(1): 53-69) は、*E. coli* における *gyrB* 遺伝子発現の調節について記載している。野生型プロモーター *cg0755* は、メチオニン生合成経路の既知の一部である (Suda et al., *Appl Microbiol Biotechnol* (2008) 81: 505-513; 及び Rey et al., *Journal of Biotechnology* 103 (2003) 51-65)。野生型

プロモーター *c g 3 3 8 1* は、*t a t A* ホモログである。 *C o r y n e b a c t e r i u m* における *t a t A* 経路は、Kikuchi et al., Applied and Environmental Microbiology, Nov. 2006, p. 7183-7192 によって記載されている。強力な構成的プロモーター *P c g 0 0 0 7* は、突然変異誘発のために選択された。予測された *P c g 0 0 0 7* の - 10 要素 (*T A A G A T*) における 6 つの位置のうちの 4 つを無作為化し、より強力なプロモーター変異体と、減衰したプロモーター変異体 (配列番号 1、5、及び 7) の両方を生成した。

【 0 0 2 4 】

したがって、本発明の一実施形態は、徐々に増加するレベルのプロモーター活性を有する構成的プロモーターのラダーを一緒に表す、*C . g l u t a m i c u m* から単離されたポリヌクレオチドを含む天然プロモーター、及びそれに由来する変異プロモーターに関する。いくつかの実施形態では、*C . g l u t a m i c u m* プロモーターは、短い DNA 配列によってコードされ得る。いくつかの実施形態では、*C . g l u t a m i c u m* プロモーターは、100 未満の塩基対の DNA 配列によってコードされ得る。

【 0 0 2 5 】

本発明の一実施形態は、配列番号 1 (*P c g 0 0 0 7 _ l i b _ 3 9*)、配列番号 2 (*P c g 1 8 6 0*)、配列番号 3 (*P c g 0 0 0 7*)、配列番号 4 (*P c g 0 7 5 5*)、配列番号 5 (*P c g 0 0 0 7 _ l i b _ 2 6 5*)、配列番号 6 (*P c g 3 3 8 1*)、配列番号 7 (*P c g 0 0 0 7 _ l i b _ 1 1 9*)、または配列番号 8 (*P c g 3 1 2 1*) から選択される配列を含むプロモーターポリヌクレオチドに関する。別の実施形態では、本明細書は、少なくとも 1 つの異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 1 からなるプロモーターポリヌクレオチドを提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、少なくとも 1 つの異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 2 のプロモーターポリヌクレオチドを提供し、それを含む。別の実施形態では、本明細書は、少なくとも 1 つの異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 3 のプロモーターポリヌクレオチドを提供し、それを含む。別の実施形態では、本明細書は、少なくとも 1 つの異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 4 のプロモーターポリヌクレオチドを提供し、それを含む。別の実施形態では、本明細書は、少なくとも 1 つの異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 5 のプロモーターポリヌクレオチドを提供し、それを含む。別の実施形態では、本明細書は、少なくとも 1 つの異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 5 からなるプロモーターポリヌクレオチドを提供し、それを含む。別の実施形態では、本明細書は、少なくとも 1 つの異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 7 のプロモーターポリヌクレオチドを提供し、それを含む。別の実施形態では、本明細書は、少なくとも 1 つの異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 8 のプロモーターポリヌクレオチドを提供し、それを含む。

【 0 0 2 6 】

本明細書で使用される場合、「プロモーターカセット」は、少なくとも 1 つの異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 1 ~ 8 のプロモーターポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド配列を指す。本開示のある特定の実施形態では、「プロモーターカセット」は、リンカーポリヌクレオチド、異種遺伝子に続く転写終結因子、異種遺伝子の開始コドンの上流のリボソーム結合部位、及び各々の組み合わせの 1 つ以上をさらに含み得る。本発明の一実施形態は、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、または配列番号 8 からなる配列から選択されるプロモーターポリヌクレオチドに関する。ある実施形態では、本明細書は、配列番号 1 のプロモーターポリヌクレオチド配列を提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、配列番号 5 のプロモーターポリヌクレオチド配列を提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、配列番号 7 のプロモーターポリヌクレオチド配列を提供し、それを含む。本明細書で使用される場合、プロモーターカセットは、それに機能的に連結している異種標的遺伝子の名前に続く参照プロモーター名によって記載されてもよい。例えば、グルコース - 6 - リン酸 1 - デヒドロゲナーゼ遺伝子をコードする遺伝子 *z w f* に機能的に連結した、*P c g 1 8 6 0* と題された配列番号 1 のプロモーターは、*P c g 1 8 6 0 - z w f* として参照

10

20

30

40

50

される。同様に、P c g 0 0 0 7 _ 3 9 - l y s A は、ポリペプチドジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼをコードする標的遺伝子 l y s A に機能的に連結した配列番号 1 の 0 0 0 7 _ 3 9 プロモーターである。

【 0 0 2 7 】

本発明の一実施形態は、本明細書に記載のプロモーターポリヌクレオチドの組み合わせに関する。この文脈では、「プロモーターポリヌクレオチドの組み合わせ」という用語は、別々の単離配列として、別々のポリヌクレオチド分子の成分として、または同じポリヌクレオチド分子の成分として存在してもよい 2 つ以上のポリヌクレオチド、及びそれらの組み合わせを指す。ポリヌクレオチド分子の例としては、染色体、及びプラスミドが挙げられる。

10

【 0 0 2 8 】

本発明は、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、または配列番号 8 に示すヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドから本質的になる単離プロモーターポリヌクレオチドにも関する。ある実施形態では、本明細書は、配列番号 1 の単離プロモーターポリヌクレオチドを提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、配列番号 5 の単離プロモーターポリヌクレオチドを提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、配列番号 7 の単離プロモーターポリヌクレオチドを提供し、それを含む。

【 0 0 2 9 】

「本質的に」という用語は、この文脈において、1, 0 0 0 未満、8 0 0 未満、7 0 0 未満、6 0 0 未満、5 0 0 未満または 4 0 0 未満のヌクレオチド長のポリヌクレオチド；及び 1 5, 0 0 0 未満、1 0, 0 0 0 未満、7, 5 0 0 未満、5, 0 0 0 未満、2, 5 0 0 未満、1, 0 0 0 未満、8 0 0 未満、7 0 0 未満、6 0 0 未満、5 0 0 未満、または 4 0 0 未満のヌクレオチド長のポリヌクレオチドが、それぞれ、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、または配列番号 8 のポリヌクレオチドの 5' 末端及び 3' 末端に添加されていることを意味する。

20

【 0 0 3 0 】

配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、または配列番号 8 のポリヌクレオチドのそれぞれの 5' 末端及び 3' 末端に添加されたポリヌクレオチドの前述の 2 つのリストからの特徴の任意の有用な組み合わせは、本発明に従う。「有用な組み合わせ」は、例えば、実施されている効率的な組換えをもたらす特徴の組み合わせを意味する。置換される DNA 領域に隣接する同じ長さの追加の使用は、実験手順における相同組換えによる領域の移動を容易にする。比較的長い隣接相同領域は、環状 DNA 分子間の効率的な組換えに有利であるが、置換ベクターのクローニングは、フランクの長さが増すとより困難になる (Wang et al., Molecular Biotechnology, 432: 43-53 (2006))。本明細書は、標的遺伝子配列の相同組換え及び置換を指向するために、少なくとも 1 つの異種標的遺伝子 (例えば、「プロモーターカセット」) に機能的に連結した配列番号 1 ~ 8 のプロモーターポリヌクレオチド配列に隣接する相同領域を提供し、それを含む。ある実施形態では、相同領域は、直接繰り返し領域である。ある実施形態では、相同領域は、プロモーターカセットに隣接する標的遺伝子配列の各々の 5 0 0 塩基対 (bp) ~ 5 0 0 0 bp を含む。ある実施形態では、相同領域は、プロモーターカセットに隣接する標的遺伝子配列の各々の少なくとも 5 0 0 bp を含む。ある実施形態では、相同領域は、プロモーターカセットに隣接する標的遺伝子配列の各々の少なくとも 1 0 0 0 bp (1 Kb) を含む。ある実施形態では、相同領域は、プロモーターカセットに隣接する標的遺伝子配列の各々の少なくとも 2 Kb を含む。ある実施形態では、相同領域は、プロモーターカセットに隣接する標的遺伝子配列の各々の少なくとも 5 Kb を含む。

30

40

【 0 0 3 1 】

さらに、本発明は、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、または配列番号 8 に示すヌクレオチド配列からなる単離プロモ

50

ーターポリヌクレオチドに関する。ある実施形態では、単離プロモーターポリヌクレオチドは、配列番号1のポリヌクレオチド配列からなる。ある実施形態では、単離プロモーターポリヌクレオチドは、配列番号5のポリヌクレオチド配列からなる。ある実施形態では、単離プロモーターポリヌクレオチドは、配列番号7のポリヌクレオチド配列からなる。

【0032】

微生物などの生物中に存在するポリヌクレオチドの生化学及び化学構造に関する詳細は、例えば、Berg et al.によるテキストブック“Biochemie” [Biochemistry] に特に見つけることができる (Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin, Germany, 2003; ISBN 3-8274-1303-6)。

10

【0033】

核酸塩基または塩基アデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、及びチミン(T)を含有するデオキシリボヌクレオチドモノマーからなるポリヌクレオチドは、デオキシリボ-ポリヌクレオチドまたはデオキシリボ核酸(DNA)と呼ばれる。核酸塩基または塩基アデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、及びウラシル(U)を含有するリボヌクレオチドモノマーからなるポリヌクレオチドは、リボポリヌクレオチドまたはリボ核酸(RNA)と呼ばれる。前記ポリヌクレオチド中のモノマーは、3', 5'-ホスホジエステル結合によって互いに共有結合している。

【0034】

「プロモーターポリヌクレオチド」または「プロモーター」または「プロモーター活性を有するポリヌクレオチド」は、転写されるポリヌクレオチドに機能的に連結した場合、コードポリヌクレオチドの転写の開始点及び開始頻度を決定することで、制御されたポリヌクレオチドの発現の強度に影響を及ぼすことができるポリヌクレオチド、好ましくは、デオキシリボポリヌクレオチド、または核酸、好ましくは、デオキシリボ核酸(DNA)を意味する。「プロモーターラダー」という用語は、本明細書で使用される場合、徐々に増加するレベルのプロモーター活性を有する複数のプロモーターを指す。「プロモーター活性」という用語は、本明細書で使用される場合、プロモーターが、mRNAにポリヌクレオチド配列の転写を開始する能力を指す。プロモーター活性を評価する方法は、当該技術分野に周知であり、例えば、以下の実施例2に記載の方法が挙げられる。「構成的プロモーター」という用語は、本明細書で使用される場合、内部または外部細胞条件に関わらず一定速度で*tits* 関連遺伝子の転写を指向するプロモーターを指す。

20

30

【0035】

DNAの二本鎖構造のため、配列表の配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、または配列番号8中の鎖と相補的な鎖もまた同様に、本発明の主題である。

【0036】

キット

本発明の一実施形態は、配列番号1、配列番号5、及び配列番号7から選択される配列を含む第1のプロモーターポリヌクレオチド、及びポリヌクレオチドの適当な保管手段を含むキットに関する。いくつかの実施形態では、第1のプロモーターポリヌクレオチドは、配列番号1、配列番号5、及び配列番号7から選択される配列からなる。いくつかの実施形態では、キットは、少なくとも2つの本明細書に記載の第1のプロモーターポリヌクレオチドを含むプロモーターポリヌクレオチドの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、キットは、本明細書に記載の少なくとも1つの第1のプロモーターポリヌクレオチド、及び配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号6、及び配列番号8から選択される配列を含む少なくとも1つの第2のプロモーターポリヌクレオチドを含むプロモーターポリヌクレオチドの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、キットは、本明細書に記載の少なくとも1つの第1のプロモーターポリヌクレオチド、及び配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号6、及び配列番号8から選択される配列からなる少なくとも1つの第2のプロモーターポリヌクレオチドを含むプロモーターポリヌクレオチドの組

40

50

み合わせを含む。

【 0 0 3 7 】

標的遺伝子

本発明の一実施形態は、本明細書に記載のプロモーターポリヌクレオチドを含む組換えベクターで形質転換された宿主細胞を培養することを含む、標的遺伝子を発現する方法に関する。標的遺伝子は、本明細書に記載のプロモーターによって発現が制御されるポリヌクレオチドである。標的遺伝子は、1つ以上のポリペプチド（複数可）をコードするコードポリヌクレオチド、または非コードRNAなどの非コードポリヌクレオチドであり得る。タンパク質/ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、A T G、G T G、及びT T G、好ましくは、A T GまたはG T G、特に好ましくは、A T Gからなる群から選択される開始コドン、タンパク質コード配列、並びにT A A、T A G、及びT G Aからなる群から選択される1つ以上の停止コドン（複数可）から本質的になる。

10

【 0 0 3 8 】

「転写」は、相補的RNA分子が、DNAテンプレートから開始して生成される処理を意味する。この処理には、RNAポリメラーゼ、「シグマ因子」、及び転写調節タンパク質などのタンパク質を伴う。標的遺伝子がコードポリヌクレオチドである場合、合成RNA（メッセンジャーRNA、mRNA）は、ポリペプチドまたはタンパク質を続いて生じる翻訳の処理中にテンプレートとして機能する。

【 0 0 3 9 】

「機能的に連結した」は、この文脈において、センスRNA転写産物を生成するために前記さらなるポリヌクレオチドの転写をもたらす、さらなるオリゴ-またはポリヌクレオチドと共に本発明によるプロモーターポリヌクレオチドの連続的配置を意味する。

20

【 0 0 4 0 】

さらなるポリヌクレオチドが、ポリペプチド/タンパク質をコードし、開始コドンから開始され、停止コドン、必要に応じて、転写終結配列を含むポリペプチドのコード領域からなる標的遺伝子である場合、「機能的に連結した」は、前記標的遺伝子の転写、及び合成RNAの翻訳をもたらす、標的遺伝子と共に本発明によるプロモーターポリヌクレオチドの連続的配置を意味する。

【 0 0 4 1 】

標的遺伝子が複数のタンパク質/ポリペプチドをコードする場合、各遺伝子は、リボソーム結合部位によって先行されてもよい。必要に応じて、終結配列は、最後の遺伝子の下流に位置する。

30

【 0 0 4 2 】

標的遺伝子は、好ましくは、タンパク質を構成するアミノ酸、タンパク質を構成しないアミノ酸、ビタミン、ヌクレオシド、ヌクレオチド、及び有機酸からなる群から選択される生体分子の生合成経路の1つ以上のポリペプチドまたはタンパク質をコードするのが好ましい。標的遺伝子は、参照により本明細書に組み込まれるE P 1 1 0 8 7 9 0 A 2の表1に記載される1つ以上のポリヌクレオチドからなるのが好ましい。

【 0 0 4 3 】

本明細書は、代謝及び生合成経路に関与する遺伝子として京都遺伝子ゲノム百科事典（KEGG）で同定可能な異種標的遺伝子のいずれか1つに機能的に連結した配列番号1～8からなる群から選択されるプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換え核酸分子を提供し、それを含む。KEGGデータベースは、genome.jp/keggにてインターネット上で入手可能である。ある実施形態では、配列番号1～8のプロモーターポリヌクレオチド配列は、KEGGマップ番号00300に示されているように、リジン生合成経路の1つ以上の標的遺伝子に機能的に連結している。ある実施形態では、1つ以上の標的遺伝子は、リジンスクシニル-DAP生合成経路、M00016から選択される。ある実施形態では、1つ以上の標的遺伝子は、リジンアセチル-DAP生合成経路、M00525から選択される。ある実施形態では、1つ以上の標的遺伝子は、リジンDAPデヒドロゲナーゼ生合成経路、M00526から選択される。ある実施形態では、1つ以上の

40

50

標的遺伝子は、リジンDAPアミノトランスフェラーゼ生合成経路、M00527から選択される。ある実施形態では、1つ以上の標的遺伝子は、AAA経路生合成経路、M00030から選択される。ある実施形態では、1つ以上の標的遺伝子は、LysW、M00031によって仲介される2-オキソグルタル酸、M00433、またはリジン生合成経路からのリジン生合成経路から選択される。

【0044】

本開示は、エントリーM00020の遺伝子を含むセリン生合成経路の1つ以上の標的遺伝子に機能的に連結した配列番号1~8のプロモーターポリヌクレオチド配列を提供し、それを含む。ある実施形態では、配列番号1~8のプロモーターポリヌクレオチド配列は、KEGGエントリーM00018の遺伝子を含むスレオニン生合成経路の1つ以上の標的遺伝子に機能的に連結している。ある実施形態では、配列番号1~8のプロモーターポリヌクレオチド配列は、KEGGエントリーM00021の遺伝子を含むシステイン生合成経路の1つ以上の標的遺伝子に機能的に連結している。ある実施形態では、配列番号1~8のプロモーターポリヌクレオチド配列は、KEGGエントリーM00338の遺伝子を含むシステイン生合成経路の1つ以上の標的遺伝子に機能的に連結している。ある実施形態では、配列番号1~8のプロモーターポリヌクレオチド配列は、KEGGエントリーM00609の遺伝子を含むシステイン生合成経路の1つ以上の標的遺伝子に機能的に連結している。ある実施形態では、配列番号1~8のプロモーターポリヌクレオチド配列は、KEGGエントリーM00017の遺伝子を含むメチオニン生合成経路の1つ以上の標的遺伝子に機能的に連結している。ある実施形態では、配列番号1~8のプロモーターポリヌクレオチド配列は、KEGGエントリーM00019の遺伝子を含むバリン/イソロイシン生合成経路の1つ以上の標的遺伝子に機能的に連結している。ある実施形態では、配列番号1~8のプロモーターポリヌクレオチド配列は、KEGGエントリーM00535の遺伝子を含むイソロイシン生合成経路の1つ以上の標的遺伝子に機能的に連結している。ある実施形態では、配列番号1~8のプロモーターポリヌクレオチド配列は、KEGGエントリーM00570の遺伝子を含むイソロイシン生合成経路の1つ以上の標的遺伝子に機能的に連結している。ある実施形態では、配列番号1~8のプロモーターポリヌクレオチド配列は、KEGGエントリーM00432の遺伝子を含むロイシン生合成経路の1つ以上の標的遺伝子に機能的に連結している。ある実施形態では、配列番号1~8のプロモーターポリヌクレオチド配列は、KEGGエントリーM00015の遺伝子を含むプロリン生合成経路の1つ以上の標的遺伝子に機能的に連結している。ある実施形態では、配列番号1~8のプロモーターポリヌクレオチド配列は、KEGGエントリーM00028の遺伝子を含むオルニチン生合成経路の1つ以上の標的遺伝子に機能的に連結している。ある実施形態では、配列番号1~8のプロモーターポリヌクレオチド配列は、KEGGエントリーM00763の遺伝子を含むオルニチン生合成経路の1つ以上の標的遺伝子に機能的に連結している。ある実施形態では、配列番号1~8のプロモーターポリヌクレオチド配列は、KEGGエントリーM00026の遺伝子を含むヒスチジン生合成経路の1つ以上の標的遺伝子に機能的に連結している。ある実施形態では、配列番号1~8のプロモーターポリヌクレオチド配列は、KEGGエントリーM00022の遺伝子を含むシキミ酸生合成経路の1つ以上の標的遺伝子に機能的に連結している。ある実施形態では、配列番号1~8のプロモーターポリヌクレオチド配列は、エントリーM00023の遺伝子を含むトリプトファン生合成経路の1つ以上の標的遺伝子に機能的に連結している。ある実施形態では、配列番号1~8のプロモーターポリヌクレオチド配列は、KEGGエントリーM00024の遺伝子を含むフェニルアラニン生合成経路の1つ以上の標的遺伝子に機能的に連結している。ある実施形態では、配列番号1~8のプロモーターポリヌクレオチド配列は、KEGGエントリーM00025の遺伝子を含むチロシン生合成経路の1つ以上の標的遺伝子に機能的に連結している。ある実施形態では、配列番号1~8のプロモーターポリヌクレオチド配列は、KEGGエントリーM00040の遺伝子を含むチロシン生合成経路の1つ以上の標的遺伝子に機能的に連結している。

【0045】

10

20

30

40

50

本開示は、エントリーM00020の遺伝子を含むセリン生合成経路の1つ以上の標的遺伝子に機能的に連結した配列番号1、5または7のプロモーターポリヌクレオチド配列を提供し、それを含む。ある実施形態では、配列番号1、5または7のプロモーターポリヌクレオチド配列は、KEGGエントリーM00018の遺伝子を含むスレオニン生合成経路の1つ以上の標的遺伝子に機能的に連結している。ある実施形態では、配列番号1、5または7のプロモーターポリヌクレオチド配列は、KEGGエントリーM00021の遺伝子を含むシステイン生合成経路の1つ以上の標的遺伝子に機能的に連結している。ある実施形態では、配列番号1、5または7のプロモーターポリヌクレオチド配列は、KEGGエントリーM00338の遺伝子を含むシステイン生合成経路の1つ以上の標的遺伝子に機能的に連結している。ある実施形態では、配列番号1、5または7のプロモーターポリヌクレオチド配列は、KEGGエントリーM00609の遺伝子を含むシステイン生合成経路の1つ以上の標的遺伝子に機能的に連結している。ある実施形態では、配列番号1、5または7のプロモーターポリヌクレオチド配列は、KEGGエントリーM00017の遺伝子を含むメチオニン生合成経路の1つ以上の標的遺伝子に機能的に連結している。ある実施形態では、配列番号1、5または7のプロモーターポリヌクレオチド配列は、KEGGエントリーM00019の遺伝子を含むバリン/イソロイシン生合成経路の1つ以上の標的遺伝子に機能的に連結している。ある実施形態では、配列番号1、5または7のプロモーターポリヌクレオチド配列は、KEGGエントリーM00535の遺伝子を含むイソロイシン生合成経路の1つ以上の標的遺伝子に機能的に連結している。ある実施形態では、配列番号1、5または7のプロモーターポリヌクレオチド配列は、KEGGエントリーM00570の遺伝子を含むイソロイシン生合成経路の1つ以上の標的遺伝子に機能的に連結している。ある実施形態では、配列番号1、5または7のプロモーターポリヌクレオチド配列は、KEGGエントリーM00432の遺伝子を含むロイシン生合成経路の1つ以上の標的遺伝子に機能的に連結している。ある実施形態では、配列番号1、5または7のプロモーターポリヌクレオチド配列は、KEGGエントリーM00015の遺伝子を含むプロリン生合成経路の1つ以上の標的遺伝子に機能的に連結している。ある実施形態では、配列番号1、5または7のプロモーターポリヌクレオチド配列は、KEGGエントリーM00028の遺伝子を含むオルニチン生合成経路の1つ以上の標的遺伝子に機能的に連結している。ある実施形態では、配列番号1、5または7のプロモーターポリヌクレオチド配列は、KEGGエントリーM00763の遺伝子を含むオルニチン生合成経路の1つ以上の標的遺伝子に機能的に連結している。ある実施形態では、配列番号1、5または7のプロモーターポリヌクレオチド配列は、KEGGエントリーM00026の遺伝子を含むヒスチジン生合成経路の1つ以上の標的遺伝子に機能的に連結している。ある実施形態では、配列番号1、5または7のプロモーターポリヌクレオチド配列は、KEGGエントリーM00022の遺伝子を含むシキミ酸生合成経路の1つ以上の標的遺伝子に機能的に連結している。ある実施形態では、配列番号1、5または7のプロモーターポリヌクレオチド配列は、エントリーM00023の遺伝子を含むトリプトファン生合成経路の1つ以上の標的遺伝子に機能的に連結している。ある実施形態では、配列番号1、5または7のプロモーターポリヌクレオチド配列は、KEGGエントリーM00024の遺伝子を含むフェニルアラニン生合成経路の1つ以上の標的遺伝子に機能的に連結している。ある実施形態では、配列番号1、5または7のプロモーターポリヌクレオチド配列は、KEGGエントリーM00025の遺伝子を含むチロシン生合成経路の1つ以上の標的遺伝子に機能的に連結している。ある実施形態では、配列番号1、5または7のプロモーターポリヌクレオチド配列は、KEGGエントリーM00040の遺伝子を含むチロシン生合成経路の1つ以上の標的遺伝子に機能的に連結している。

【0046】

本明細書は、表2に提供される *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032からの異種標的遺伝子のいずれか1つ、またはそれらの任意の *Corynebacterium glutamicum* 等価物に機能的に連結した配列番号1~8からなる群から選択されるプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換え核酸

10

20

30

40

50

分子を提供し、それを含む。配列開始及び末端位置は、ゲノムヌクレオチド受託NC__003450.3に相当する。当業者には、相当する遺伝子が、*C. glutamicum*の他の株に存在し、表2から容易に同定され得ることが理解されるであろう。実施形態では、本明細書は、表2に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号1のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換え核酸分子を提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表2に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号2のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換え核酸分子を提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表2に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号3のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換え核酸分子を提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表2に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号4のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換え核酸分子を提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表2に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号5のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換え核酸分子を提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表2に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号6のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換え核酸分子を提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表2に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号7のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換え核酸分子を提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表2に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号8のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換え核酸分子を提供し、それを含む。

【0047】

10

20

【表 2 - 1】

表 2 : 本明細書による *Corynebacterium glutamicum* から
の標的遺伝子

遺伝子 ID	シンボル	エイリアス	記述	開始	末端	配向
1021315	NCg10248	NCg10248, Cg10252	アスパラギン酸-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ	270660	271694	+
1021300	NCg10223	NCg10223, Cg10226	プレフェン酸デヒドロゲナーゼ	241880	242902	-
1021294	NCg10247	NCg10247, Cg10251	アスパラギン酸キナーゼ	269371	270636	+
1021282	NCg10215	NCg10215, Cg10218	アミノトランスフェラーゼ	232257	233282	-
1021250	NCg10181	NCg10181, Cg10184	グルタミン 2-オキシグルタル酸アミノトランスフェラーゼ大サブユニット	195240	199772	+
1021247	gltD	NCg10182, Cg10185	グルタミン酸シンターゼ	199772	201292	+
1021203	aroE	NCg10409, Cg10424	キナ酸/シキミ酸デヒドロゲナーゼ	446538	447389	+
1021149	NCg10245	NCg10245, Cg10248	2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ	266151	267896	-
1021136	gpmA	NCg10390, Cg10402	2, 3-ビスホスホグリセリン酸依存性ホスホグリセリン酸ムターゼ	425177	425923	+
1021131	NCg10408	NCg10408, Cg10423	3-デヒドロキナ酸デヒドラターゼ	446087	446524	+
1021078	NCg10398	NCg10398, Cg10410	ピロリン-5-カルボン酸レダクターゼ	434877	435698	+
1020978	trpA	NCg12932, Cg13035	トリプトファンシンターゼサブユニットアルファ	3239333	3240175	+
1020976	NCg12931	NCg12931, Cg13034	トリプトファンシンターゼサブユニットベータ	3238083	3239336	+
1020975	NCg12930	NCg12930, trpC, trpF	二官能性インドール-3-グリセロールリン酸シンターゼ/ホスホリボシルアントラニル酸イソメラーゼ	3236642	3238066	+

10

20

30

40

【表 2 - 2】

102097 4	trpD	NCg12929, Cg13032	アントラニル酸ホスホ リボシルトランスフェ ラーゼ	323560 3	323664 9	+
102097 3	NCg12 928	NCg12928, Cg13031	アントラニル酸シント ラーゼ II	323495 7	323558 3	+
102097 2	NCg12 927	NCg12927, Cg13029	アントラニル酸シント ラーゼ I	323340 4	323496 0	+
102085 2	NCg12 809	NCg12809, Cg12910	ビルビン酸キナーゼ	311046 2	311232 1	-
102084 2	NCg12 799	NCg12799, Cg12899	プレフェン酸デヒドラ ターゼ	309857 6	309952 3	-
102084 1	NCg12 798	NCg12798, Cg12898	ホスホグリセリン酸ム ターゼ	309790 2	309857 3	-
102078 8	NCg12 747	NCg12747, Cg12844	アミノトランスフェラ ラーゼ	303067 0	303198 3	+
102074 5	NCg12 704	NCg12704, Cg12802	ヌクレオシダーゼ	298821 2	298877 2	-
102072 9	NCg12 688	NCg12688, Cg12786	シスタチオニンガンマ -シントラーゼ	297205 8	297320 6	-
102071 4	NCg12 673	NCg12673, Cg12770	フルクトース-ビスホ スフェートアルドラー ゼ	295423 9	295527 3	-
102059 4	NCg12 557	NCg12557, Cg12646	ジヒドロジピコリン酸 シントラーゼ	281545 9	281639 7	+
102056 4	NCg12 528	NCg12528, Cg12617	D-2-ヒドロキシイソカ ブロン酸デヒドロゲナ ラーゼ	278675 4	278771 6	-
102050 9	NCg12 474	NCg12474, Cg12563	セリンアセチルトラン スフェラーゼ	272306 5	272361 3	+
102050 8	NCg12 473	NCg12473, Cg12562	システインシントラー ゼ	272190 5	272286 1	+
102047 1	NCg12 436	NCg12436, Cg12522	ホスホセリンホスファ ターゼ	266955 5	267085 6	-
102039 3	NCg12 360	NCg12360, Cg12446	シスタチオニンガンマ -シントラーゼ	259031 0	259147 0	-
102037 0	NCg12 337	NCg12337, Cg12423	リボース-5-リン酸イ ソメラーゼ B	256393 0	256440 3	-
102030 7	NCg12 274	NCg12274, Cg12356	ガンマ-グルタミルキ ナーゼ	249666 8	249777 7	-
102030 5	proA	NCg12272, Cg12354	ガンマ-グルタミルリ ン酸レダクターゼ	249433 7	249563 5	-

10

20

30

40

【表 2 - 3】

102030 1	NCg12 268	NCg12268, Cg12350	フルクトース-2,6-ピ スホスファターゼ	249114 9	249185 9	—
102026 0	NCg12 227	NCg12227, Cg12309	PLP 依存性アミノトラ ンスフェラーゼ	244460 7	244571 3	+
102018 8	NCg12 155	NCg12155, Cg12236	二官能性 RNase H/酸 ホスファターゼ	237141 0	237255 8	—
102018 1	NCg12 148	NCg12148, Cg12229	グルタミンシンターゼ	236281 6	236415 6	—
102017 2	NCg12 139	NCg12139, Cg12220	スレオニンシンターゼ	235359 8	235504 3	—
102016 6	NCg12 133	NCg12133, Cg12214	グルタミンシンターゼ	234883 0	235026 3	+
102015 5	NCg12 123	NCg12123, Cg12204	分枝鎖アミノ酸アミノ トランスフェラーゼ	233591 3	233701 6	—
102013 0	NCg12 098	NCg12098, Cg12178	3-デオキシ-7-ホスホ ヘプトロン酸シンター ゼ	230769 5	230909 5	—
102008 7	NCg12 055	NCg12055, Cg12136	システインシンターゼ	225836 0	225931 3	—
102008 6	NCg12 054	NCg12054, Cg12135	ジアミノピメリン酸デ カルボキシラーゼ	225573 6	225702 5	—
102008 0	NCg12 048	NCg12048, Cg12129	メチオニンシンターゼ II	224700 4	224820 9	—
102007 8	NCg12 046	NCg12046, Cg12127	スレオニン デヒドラ ターゼ	224486 2	224617 2	—
102005 3	hisD	NCg12021, Cg12102	ヒスチジノールデヒド ロゲナーゼ	221759 7	221892 5	—
102005 2	NCg12 020	NCg12020, Cg12101	ヒスチジノール-リン 酸アミノトランスフェ ラーゼ	221649 1	221759 1	—
102005 1	hisB	NCg12019, Cg12100	イミダゾールグリセロ ール-リン酸デヒドラ ターゼ	221586 6	221647 4	—
102004 8	hisH	NCg12016, Cg12097	イミダゾールグリセロ ールリン酸シンターゼ サブユニット HisH	221263 8	221327 3	—
102004 7	NCg12 015	NCg12015, Cg12096	ホスホリボシルイソメ ラーゼ A	221187 9	221261 9	—
102004 5	hisF	NCg12013, Cg12094	イミダゾールグリセロ ールリン酸シンターゼ サブユニット HisF	221027 0	221104 6	—

10

20

30

40

【表 2 - 4】

102004 4	hisI	NCgl2012, Cgl2093	ホスホリボシル-AMP シ クロヒドロラーゼ	220991 7	221027 3	—
102004 2	NCgl12 010	NCgl12010, Cgl12091	インドール-3-グリセ ロールリン酸シンター ゼ	220836 4	220914 9	—
102004 0	NCgl12 008	NCgl12008, Cgl12089	ピルビン酸キナーゼ	220566 5	220709 2	—
101993 0	NCgl11 898	NCgl11898, Cgl11973	4-ヒドロキシ-テトラ ヒドロジピコリン酸レ ダクターゼ	208118 8	208193 4	—
101992 8	dapA	NCgl11896, Cgl11971	4-ヒドロキシ-テトラ ヒドロジピコリン酸シ ンターゼ	207927 8	208018 3	—
101990 0	dapF	NCgl11868, Cgl11943	ジアミノピメリン酸エ ピメラーゼ	205184 2	205267 5	—
101961 4	NCgl11 583	NCgl11583, Cgl11645	L-セリンデアミナーゼ	174488 4	174623 3	+
101959 8	aroE	NCgl11567, Cgl11629	シキミ酸 5-デヒドロゲ ナーゼ	172460 9	172543 9	—
101959 2	NCgl11 561	NCgl11561, Cgl11623	コリスミ酸シンターゼ	171966 6	172089 8	—
101959 1	aroK	NCgl11560, Cgl11622	シキミ酸キナーゼ	171910 4	171967 6	—
101959 0	aroB	NCgl11559, Cgl11621	3-デヒドロキナ酸シン ターゼ	171793 5	171903 2	—
101957 1	NCgl11 541	NCgl11541, Cgl11603	メチオニンアデノシル トランスフェラーゼ	169917 4	170039 7	—
101956 6	NCgl11 536	NCgl11536, Cgl11598	リブローズ-リン酸 3- エピメラーゼ	169325 9	169391 8	—
101955 6	NCgl11 526	NCgl11526, Cgl11588	グリセルアルデヒド -3-リン酸デヒドロゲ ナーゼ	168262 1	168362 5	—
101955 5	pgk	NCgl11525, Cgl11587	ホスホグリセリン酸キ ナーゼ	168118 7	168240 4	—
101955 4	tpiA	NCgl11524, Cgl11586	トリオースリン酸イソ メラーゼ	168032 9	168110 8	—
101955 0	NCgl11 520	NCgl11520, Cgl11582	オルニチンシクロデア ミナーゼ	167412 0	167526 8	—
101954 3	NCgl11 513	NCgl11513, Cgl11575	トランスアルドラーゼ	166667 3	166775 5	+
101954 2	NCgl11 512	NCgl11512, Cgl11574	トランスケトラーゼ	166440 3	166650 5	+

10

20

30

40

【表 2 - 5】

101951 2	NCg11 482	NCg11482, Cg11540	アコニット酸ヒドラターゼ	162627 9	162911 0	+
101948 0	NCg11 450	NCg11450, Cg11507	メチオニンシンターゼ I コバラミン結合サブ ユニット	158757 0	159123 5	-
101947 8	hisE	NCg11448, Cg11505	ホスホリボシル-ATP ピ ロホスファターゼ	158646 2	158672 5	-
101947 7	hisG	NCg11447, Cg11504	ATP ホスホリボシルト ランスフェラーゼ	158560 0	158644 5	-
101937 7	NCg11 347	NCg11347, Cg11401	アルギニノコハク酸リ アーゼ	147147 7	147291 0	+
101937 6	NCg11 346	NCg11346, Cg11400	アルギニノコハク酸シ ンターゼ	147021 1	147141 6	+
101937 4	NCg11 344	NCg11344, Cg11398	オルニチンカルバモイ ルトランスフェラーゼ	146856 5	146952 4	+
101937 3	argD	NCg11343, Cg11397	アセチルオルニチンア ミノトランスフェラー ゼ	146737 6	146855 1	+
101937 2	NCg11 342	NCg11342, Cg11396	アセチルグルタミン酸 キナーゼ	146642 2	146737 5	+
101937 1	argJ	NCg11341, Cg11395	二官能性オルニチンア セチルトランスフェラ ーゼ/N-アセチルグル タミン酸シンターゼ	146521 0	146637 6	+
101937 0	argC	NCg11340, Cg11394	N-アセチル-ガンマ-グ ルタミル-リン酸レダ クターゼ	146405 3	146512 6	+
101929 3	leuD	NCg11263, Cg11316	3-イソプロピルリンゴ 酸 デヒドラターゼ小 サブユニット	138190 2	138249 5	+
101929 2	NCg11 262	NCg11262, Cg11315	3-イソプロピルリンゴ 酸 デヒドラターゼ大 サブユニット	138044 0	138188 5	+
101926 7	NCg11 237	NCg11237, Cg11286	3-イソプロピルリンゴ 酸 デヒドロゲナーゼ	135348 9	135451 1	+
101926 5	NCg11 235	NCg11235, Cg11284	D-3-ホスホグリセリン 酸 デヒドロゲナーゼ	135085 5	135244 7	+
101925 4	NCg11 224	NCg11224, Cg11273	ケトール-酸レダクト イソメラーゼ	134072 4	134174 0	+
101925 3	ilvH	NCg11223, Cg11272	アセト乳酸シンターゼ 小サブユニット	134002 5	134054 3	+

10

20

30

40

【表 2 - 6】

101925 2	NCg11 222	NCg11222, Cg11271	アセト乳酸シンターゼ 大サブユニット	133813 1	134001 1	+
101924 9	NCg11 219	NCg11219, Cg11268	ジヒドロキシ-酸デヒ ドラターゼ	133343 9	133528 0	-
101923 2	NCg11 202	NCg11202, Cg11250	6-ホスホフルクトキナ ーゼ	131504 6	131608 6	+
101916 7	NCg11 137	NCg11137, Cg11184	ホモセリンキナーゼ	124385 5	124478 4	+
101916 6	NCg11 136	NCg11136, Cg11183	ホモセリンデヒドロゲ ナーゼ	124250 7	124384 4	+
101916 3	NCg11 133	NCg11133, Cg11180	ジアミノピメリン酸デ カルボキシラーゼ	123992 9	124126 6	+
101912 4	NCg11 094	NCg11094, Cg11139	5-メチルテトラヒドロ プテロイルトリグルタ ミン酸-ホモシステイ ンS-メチルトランスフ ェラーゼ	118838 5	119062 2	-
101911 7	aroE	NCg11087, Cg11132	シキミ酸5-デヒドロゲ ナーゼ	118086 9	118167 5	-
101909 4	NCg11 064	NCg11064, Cg11109	スクシニル-ジアミノ ピメリン酸デサクシニ ラーゼ	115573 1	115684 0	+
101909 3	NCg11 063	NCg11063, Cg11108	テトラヒドロジピコリ ン酸N-スクシニルトラ ンスフェラーゼ	115472 6	115567 6	-
101909 1	NCg11 061	NCg11061, Cg11106	2,3,4,5-テトラヒドロ ピリジン-2,6-ジカル ボン酸N-スクシニルト ランスフェラーゼ	115237 0	115326 3	-
101904 2	NCg11 013	NCg11013, Cg11058	ホスホグリセリン酸ム ターゼ	110750 3	110820 4	+
101898 3	glyA	NCg10954, Cg10996	セリンヒドロキシメチ ルトランスフェラーゼ	105062 4	105192 8	+
101897 9	NCg10 950	NCg10950, Cg10990	ホスホ-2-デヒドロ-3- デオキシヘプトン酸ア ルドラーゼ	104661 0	104771 0	+
101896 8	NCg10 939	NCg10939, Cg10978	スレオニン デヒドラ ターゼ	103871 8	103965 0	-
101896 4	eno	NCg10935, Cg10974	ホスホビルビン酸ヒド ラターゼ	103494 9	103622 6	+
101893 4	NCg10 905	NCg10905, Cg10942	リボース-リン酸ピロ ホスホキナーゼ	997463	998440	-

10

20

30

40

【表 2 - 7】

101892 9	NCg10 900	NCg10900, Cg10937	グリセルアルデヒド -3-リン酸デヒドロゲ ナーゼ	993174	994616	+
101884 8	NCg10 819	NCg10819, Cg10853	仮説タンパク質	910852	911157	-
101882 4	gltA	NCg10795, Cg10829	II 型クエン酸シター ゼ	877838	879151	+
101882 3	NCg10 794	NCg10794, Cg10828	ホスホセリンアミノト ランスフェラーゼ	875982	877112	-
101880 9	NCg10 780	NCg10780, Cg10814	アミノトランスフェラ ーゼ	861592	862755	+
101879 4	NCg10 765	NCg10765, Cg10799	フルクトース-1,6-ビ スホスファターゼ	841514	842296	-
101875 9	NCg10 730	NCg10730, Cg10764	3-ホスホシキミ酸 1-カ ルボキシビニルトラン スフェラーゼ	801187	802479	-
101868 8	NCg10 659	NCg10659, Cg10689	ピルビン酸カルボキシ ラーゼ	705211	708633	+
101866 3	NCg10 634	NCg10634, Cg10664	単量体イソクエン酸デ ヒドロゲナーゼ (NADP+)	677828	680044	-

10

20

【 0 0 4 8 】

ある実施形態では、本明細書は、表 2 に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 1 のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターを提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表 2 に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 2 のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターを提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表 2 に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 3 のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターを提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表 2 に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 4 のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターを提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表 2 に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 5 のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターを提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表 2 に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 6 のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターを提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表 2 に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 7 のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターを提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表 2 に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 8 のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターを提供し、それを含む。

30

40

【 0 0 4 9 】

ある実施形態では、本明細書は、表 2 に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 1 のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターで形質転換された宿主細胞を提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表 2 に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 2 のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベク

50

ターで形質転換された宿主細胞を提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表2に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号3のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターで形質転換された宿主細胞を提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表2に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号4のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターで形質転換された宿主細胞を提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表2に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号5のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターで形質転換された宿主細胞を提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表2に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号6のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターで形質転換された宿主細胞を提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表2に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号7のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターで形質転換された宿主細胞を提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表2に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号8のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターで形質転換された宿主細胞を提供し、それを含む。本明細書で使用される場合、宿主細胞は、1つ以上のプロモーターカセットで形質転換されている「発現」と題されたセクションで後述される有機体を指す。当業者には明らかとなるように、宿主細胞は、本明細書に記載の1つ以上のプロモーターカセットを含み得る。

10

【0050】

ある実施形態では、本明細書は、表3に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号1のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターで形質転換された宿主細胞を提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表3に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号2のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターで形質転換された宿主細胞を提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表3に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号3のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターで形質転換された宿主細胞を提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表3に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号4のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターで形質転換された宿主細胞を提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表3に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号5のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターで形質転換された宿主細胞を提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表3に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号6のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターで形質転換された宿主細胞を提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表3に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号7のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターで形質転換された宿主細胞を提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表3に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号8のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターで形質転換された宿主細胞を提供し、それを含む。本明細書で使用される場合、宿主細胞は、1つ以上のプロモーターカセットで形質転換されている「発現」と題されたセクションで後述される有機体を指す。当業者には明らかとなるように、宿主細胞は、本明細書に記載の1つ以上のプロモーターカセットを含み得る。

20

30

40

【0051】

【表 3 - 1】

表 3 : *C. glutamicum* L-リジン生合成経路

シンボル	遺伝子名 (EC #)	<i>C. glutamicum</i> 遺伝子	位置	発現
asd	アスパラギン酸-セミアル デヒドデヒドロゲナーゼ (EC:1.2.1.11)	asd	270660..2 71694	+
dapA	4-ヒドロキシ-テトラヒド ロジピコリン酸シンターゼ (EC:4.3.3.7)	dapA	補 体 (2079278. .2080183)	+
dapB	ジヒドロジピコリン酸 レ ダクターゼ (EC:1.17.1.8)	Cgl1973	補 体 (2081188. .2081934)	+
dapD	2,3,4,5-テトラヒドロピリ ジン-2-カルボン酸 N-スク シニルトランスフェラーゼ (EC:2.3.1.117)	dapD	補 体 (1153838. .1154731)	+
dapD	2,3,4,5-テトラヒドロピリ ジン-2-カルボン酸 N-スク シニルトランスフェラーゼ (EC:2.3.1.117)	dapD2	補 体 (1156194. .1157144)	+
cg0931	N-スクシニルジアミノピメ リン酸アミノトランスフェ ラーゼ (EC:2.6.1.17)	cg0931	863063..8 64226	+
dapE	スクシニル-ジアミノピメ リン酸デサクシニラーゼ (EC:3.5.1.18)	dapE	1157199.. 1158308	+
dapF	ジアミノピメリン酸エピメ ラーゼ (EC:5.1.1.7)	dapF	補 体 (2021891. .2022724)	+
lysA	ジアミノピメリン酸デカル ボキシラーゼ (EC:4.1.1.20)	lysA	1241397.. 1242734	+
ddh	ジアミノピメリン酸デヒド ロゲナーゼ (EC:1.4.1.16)	ddh	補 体 (2760062. .2761024)	+
ask (lysC)	アスパラギン酸キナーゼ Lysc アルファ及びベータサ ブユニット (EC:2.7.2.4)	lysC	269371..2 70636	+

10

20

30

40

【表 3 - 2】

aspB	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (EC:2.6.1.1)	aspB	256618..257898	+	
PTS	ホスホトランスフェラーゼシステム (PTS);PTS のグルコース特異的酵素 II BC 成分 (EC:2.7.1.69)	ptsG	1424684..1426735	+	
zwf	グルコース-6-リン酸 1-デヒドロゲナーゼ (EC:1.1.1.49 1.1.1.363)	zwf	1669327..1670871	+	10
pgi	グルコース-6-リン酸イソメラーゼ (EC:5.3.1.9)	pgi	補体 (909227..910849)	+	
tkt	トランスケトラーゼ (EC:2.2.1.1)	tkt	1665870..1667972	+	
fbp	6-ホスホフルクトキナーゼ 1 (EC:2.7.1.11)	Cgl1250	1315046..1316086	+	20
ppc	ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (EC:4.1.1.31)	ppc	補体 (1678851..1681610)	+	
pyc	ピルビン酸カルボキシラーゼ (EC:6.4.1.1)	pyc	706684..710106	+	
icd	イソクエン酸デヒドロゲナーゼ (EC:1.1.1.42)	icd	補体 (679301..681517)	-	30
pck	ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (GTP) (EC:4.1.1.32)	pck	補体 (3025365..3027197)	-	
odx	オキサロ酢酸デカルボキシラーゼ (EC 4.1.1.3)	odx	AP017369.1:1508967..1509782 (from C. glutamicumN24)	-	40
hom	ホモセリンキナーゼ (EC:2.7.1.39)	Cgl1184	1243855..1244784	-	
	ホモセリンデヒドロゲナーゼ (EC:1.1.1.3);	Cgl1183	1242507..1243844	-	

【表 3 - 3】

	スレオニンシンターゼ (EC:4.2.3.1)	Cg12220	補 体 (2353598. .2355043)	-
--	----------------------------	---------	-------------------------------	---

【 0 0 5 2 】

ある実施形態では、本明細書は、表 3 に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 1 のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターを提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表 3 に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 2 のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターを提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表 3 に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 3 のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターを提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表 3 に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 4 のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターを提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表 3 に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 5 のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターを提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表 3 に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 6 のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターを提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表 3 に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 7 のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターを提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表 3 に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 8 のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターを提供し、それを含む。

【 0 0 5 3 】

ある実施形態では、本明細書は、表 3 に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 1 のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターで形質転換された宿主細胞を提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表 3 に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 2 のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターで形質転換された宿主細胞を提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表 3 に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 3 のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターで形質転換された宿主細胞を提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表 3 に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 4 のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターで形質転換された宿主細胞を提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表 3 に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 5 のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターで形質転換された宿主細胞を提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表 3 に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 6 のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターで形質転換された宿主細胞を提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表 3 に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 7 のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターで形質転換された宿主細胞を提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表 3 に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 8 のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターで形質転換された宿主細胞を提供し、それを含む。本明細書で使用される場合、宿主細胞は、1 つ以上のプロモーターカセットで形質転換されている「発現」と題されたセクションで後述される有機体を指す。当業者には明らかとなるように、宿主細胞は、本明細書に記載の 1 つ以上のプロモーターカセットを含み得る。

【 0 0 5 4 】

本明細書は、表 4 に提供される *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 からの異種標的遺伝子のいずれか 1 つ、またはそれらの任意の C

o r y n e b a c t e r i u m g l u t a m i c u m等価物に機能的に連結した配列番号1～8からなる群から選択されるプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターで形質転換された宿主細胞を提供する。配列開始及び末端位置は、ゲノムヌクレオチド受託NC__003450.3に相当する。当業者には、相当する遺伝子が、C.glu t a m i c u mの他の株に存在し、表4から容易に同定され得ることが理解されるであろう。実施形態では、本明細書は、表4に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号1のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターで形質転換された宿主細胞を提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表4に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号2のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターで形質転換された宿主細胞を提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表4に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号3のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターで形質転換された宿主細胞を提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表4に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号4のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターで形質転換された宿主細胞を提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表4に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号5のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターで形質転換された宿主細胞を提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表4に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号6のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターで形質転換された宿主細胞を提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表4に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号7のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターで形質転換された宿主細胞を提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表4に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号8のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターで形質転換された宿主細胞を提供し、それを含む。本明細書で使用される場合、宿主細胞は、1つ以上のプロモーターカセットで形質転換されている「発現」と題されたセクションで後述される有機体を指す。当業者には明らかとなるように、宿主細胞は、本明細書に記載の1つ以上のプロモーターカセットを含み得る。

【 0 0 5 5 】

10

20

【表 4】

表 4 : C. glutamicum L-メチオニン生合成経路

シンボル	遺伝子名 (EC #)	C. glutamicum 遺伝子	位置
lysC	アスパラギン酸キナーゼ [EC:2.7.2.4]	Cgl0251	269371..270636
	アスパラギン酸-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ [EC:1.2.1.11]	Cgl0252	270660..271694
dapA	4-ヒドロキシ-テトラヒドロジピコリン酸シンターゼ [EC:4.3.3.7]	dapA	補体 (2079278..2080183)
dapA	4-ヒドロキシ-テトラヒドロジピコリン酸シンターゼ [EC:4.3.3.7]	Cgl2646	2815459..2816397
dapB	4-ヒドロキシ-テトラヒドロジピコリン酸レダクターゼ [EC:1.17.1.8]	Cgl1973	補体 (2081188..2081934)
dapD	2,3,4,5-テトラヒドロピリジン-2-カルボン酸 N-スクシニルトランスフェラーゼ [EC:2.3.1.117]	Cgl1106	補体 (1152370..1153263)
dapC	N-スクシニルジアミノピメリン酸アミノトランスフェラーゼ [EC:2.6.1.17]	Cgl0814	861592..862755
dapE	スクシニル-ジアミノピメリン酸デサクシニラーゼ [EC:3.5.1.18]	Cgl1109	1155731..1156840
dapF	ジアミノピメリン酸エピメラーゼ [EC:5.1.1.7]	dapF	補体 (2051842..2052675)
lysA	ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ [EC:4.1.1.20]	Cgl1180	1239929..1241266

10

20

30

40

【 0 0 5 6 】

ある実施形態では、本明細書は、表 4 に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 3 のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターを提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表 4 に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 4 のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターを提供し、それを含む

50

。ある実施形態では、本明細書は、表 4 に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 5 のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターを提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表 4 に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 6 のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターを提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表 4 に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 7 のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターを提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表 4 に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 8 のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターを提供し、それを含む。

【 0 0 5 7 】

ある実施形態では、本明細書は、表 4 に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 1 のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターで形質転換された宿主細胞を提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表 4 に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 2 のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターで形質転換された宿主細胞を提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表 4 に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 3 のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターで形質転換された宿主細胞を提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表 4 に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 4 のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターで形質転換された宿主細胞を提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表 4 に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 5 のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターで形質転換された宿主細胞を提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表 4 に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 6 のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターで形質転換された宿主細胞を提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表 4 に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 7 のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターで形質転換された宿主細胞を提供し、それを含む。ある実施形態では、本明細書は、表 4 に記載の異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 8 のプロモーターポリヌクレオチド配列を含む組換えベクターで形質転換された宿主細胞を提供し、それを含む。

【 0 0 5 8 】

いくつかの実施形態では、標的遺伝子は、アミノ酸、有機酸、香味料、及び香料、バイオ燃料、タンパク質、及び酵素、ポリマー/モノマー、及び他の生体材料、脂質、核酸、小分子治療薬、タンパク質治療薬、ファインケミカル、及び栄養補助食品から選択される生体分子を生成する生合成経路と関連する。

【 0 0 5 9 】

いくつかの実施形態では、標的遺伝子は、抗生物質、アルカロイド、テルペノイド、及びポリケチドから選択される二次代謝産物を生成する生合成経路と関連する。いくつかの実施形態では、標的遺伝子は、アルコール、アミノ酸、ヌクレオチド、抗酸化物質、有機酸、ポリオール、ビタミン、及び脂質/脂肪酸から選択される一次代謝産物を生成する代謝経路と関連する。いくつかの実施形態では、標的遺伝子は、タンパク質、核酸、及びポリマーから選択されるマクロ分子を生成する生合成経路と関連する。

【 0 0 6 0 】

加えて、L - アミノ酸の生成は、それぞれの生合成経路、解糖、アナプレロシス、クエン酸回路、ペントースリン酸回路、アミノ酸輸送、及び必要に応じて調節タンパク質の 1 つ以上の酵素を増強、特に、過剰発現するのに有利であり得る。

【 0 0 6 1 】

それゆえ、例えば、L - アミノ酸の生成のために、以下の群から選択される 1 つ以上の遺伝子が増強、特に、過剰発現されるのが有利であり得る：ジヒドロジピコリン酸シンターゼをコードする遺伝子 *dapA* (EP - B 0 1 9 7 3 3 5) ; エノラーゼをコードする遺伝子 *eno* (DE : 1 9 9 4 7 7 9 1 . 4) ; グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒド

10

20

30

40

50

ロゲナーゼをコードする遺伝子 gap (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086); トリオースリン酸イソメラーゼをコードする遺伝子 tpi (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086); 3-ホスホグリセリン酸キナーゼをコードする遺伝子 pgk (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086); グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子 zwf (JP-A-09224661); ピルビン酸カルボキシラーゼをコードする遺伝子 pyc (DE-A-19831609; Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086); リンゴ塩-キノン-オキソレダクターゼをコードする遺伝子 mqo (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395-403 (1998)); フィードバック耐性アスパラギン酸キナーゼをコードする遺伝子 lysC (受託番号 P26512); リジン輸送をコードする遺伝子 lysE (DE-A-19548222); ホモセリンデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子 hom (EP-A 0131171); スレオニンデヒドラターゼをコードする遺伝子 ilvA (Mockel et al., Journal of Bacteriology (1992) 8065-8072) またはフィードバック耐性スレオニンデヒドラターゼをコードする対立遺伝子 ilvA (Fbr) (Mockel et al., (1994) Molecular Microbiology 13:833-842); アセトヒドロキシ酸シンターゼをコードする遺伝子 ilvBN (EP-B 0356739); ジヒドロキシ酸デヒドラターゼをコードする遺伝子 ilvD (Sahm and Eggeling (1999) Applied and Environmental Microbiology 65:1973-1979); 及び Zwa1 タンパク質をコードする遺伝子 zwa1 (DE:19959328.0, DSM 13115)。

10

20

【0062】

さらに、L-アミノ酸の生成は、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼをコードする遺伝子 pck (DE 19950409.1; DSM 13047); グルコース-6-リン酸イソメラーゼをコードする遺伝子 pgi (米国特許第6,586,214号; DSM 12969); ピルビン酸オキシダーゼをコードする遺伝子 poxB (DE:19951975.7; DSM 13114); 及び Zwa2 タンパク質をコードする遺伝子 zwa2 (DE:19959327.2、DSM 13113) からなる群から選択される1つ以上の遺伝子の発現を減衰、特に、減少することも有利であり得る。

30

【0063】

加えて、アミノ酸、特に、L-リジンの生成は、望ましくない副反応を排除することがさらに有利であり得る (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982)。

40

【0064】

したがって、本発明によるプロモーターは、C. glutamicum 中で標的遺伝子を過剰発現または過小発現するいずれの場合において使用することができる。

【0065】

リンカー

両方のポリヌクレオチドが、直接、またはリンカーオリゴヌクレオチドまたはリンカーポリヌクレオチドによつてのいずれかで互いに機能的に連結されるように、標的遺伝子は、本発明によるプロモーターポリヌクレオチドの下流、すなわち、3'末端に位置する。リンカーオリゴヌクレオチドまたはリンカーポリヌクレオチドによつて互いに機能的に連結したプロモーター及び標的遺伝子が好ましい。前記リンカーオリゴヌクレオチドまたは

50

リンカーポリヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチドからなる。

【0066】

この文脈では、「直接互いに機能的に連結した」という表現は、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、または配列番号8の3'末端でのヌクレオチドが、標的遺伝子の開始コドンの第1のヌクレオチドに直接連結していることを意味する。これは、5'-末端AUG開始コドンで直ちに開始する「リーダーレス」mRNAをもたらすため、任意の他の翻訳開始シグナルを有さない。

【0067】

この文脈では、「リンカーオリゴヌクレオチドによって互いに機能的に連結した」という表現は、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、または配列番号8の3'末端でのヌクレオチドが、1、2、3、4または5のヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドによって標的遺伝子の開始コドンの第1のヌクレオチドに連結されることを意味する。

10

【0068】

この文脈では、「リンカーポリヌクレオチドによって互いに機能的に連結した」という表現は、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、または配列番号8の3'末端でのヌクレオチドが、6~600未満のヌクレオチド長のポリヌクレオチドによって標的遺伝子の開始コドンの第1のヌクレオチドに連結されることを意味する。

【0069】

この文脈では、「互いに機能的に連結した」という表現は、標的遺伝子は、標的遺伝子の転写、及び合成RNAの翻訳が保証されるように、本発明によるプロモーターポリヌクレオチドに結合することを意味する。

20

【0070】

技術的な要件に応じて、リンカーポリヌクレオチドは、

6 - 600、6 - 500、6 - 400、6 - 300、6 - 200、6 - 180、6 - 160、6 - 140、6 - 120、6 - 100、6 - 80、6 - 60、6 - 50、6 - 40、6 - 30、6 - 28、6 - 27、6 - 26、6 - 25；または

8 - 600、8 - 500、8 - 400、8 - 300、8 - 200、8 - 180、8 - 160、8 - 140、8 - 120、8 - 100、8 - 80、8 - 60、8 - 50、8 - 40、8 - 30、8 - 28、8 - 27、8 - 26、8 - 25；または

10 - 600、10 - 500、10 - 400、10 - 300、10 - 200、10 - 180、10 - 160、10 - 140、10 - 120、10 - 100、10 - 80、10 - 60、10 - 50、10 - 40、10 - 30、10 - 28、10 - 27、10 - 26、10 - 25；または

12 - 600、12 - 500、12 - 400、12 - 300、12 - 200、12 - 180、12 - 160、12 - 140、12 - 120、12 - 100、12 - 80、12 - 60、12 - 50、12 - 40、12 - 30、12 - 28、12 - 27、12 - 26、12 - 25；または

14 - 600、14 - 500、14 - 400、14 - 300、14 - 200、14 - 180、14 - 160、14 - 140、14 - 120、14 - 100、14 - 80、14 - 60、14 - 50、14 - 40、14 - 30、14 - 28、14 - 27、14 - 26、14 - 20；または

16 - 600、16 - 500、16 - 400、16 - 300、16 - 200、16 - 180、16 - 160、16 - 140、16 - 120、16 - 100、16 - 80、16 - 60、16 - 50、16 - 40、16 - 30、16 - 28、16 - 27、16 - 26、16 - 25；または

18 - 600、18 - 500、18 - 400、18 - 300、18 - 200、18 - 180、18 - 160、18 - 140、18 - 120、18 - 100、18 - 80、18 - 60、18 - 50、18 - 40、18 - 30、18 - 28、18 - 27、18 - 26、1

30

40

50

8 - 25 ; または

20 - 600、20 - 500、20 - 400、20 - 300、20 - 200、20 - 180、20 - 160、20 - 140、20 - 120、20 - 100、20 - 80、20 - 60、20 - 50、20 - 40、20 - 30、20 - 28、20 - 27、20 - 26、20 - 25 のヌクレオチド長である。

【0071】

特に好ましい実施形態では、リンカーポリヌクレオチドは、これは、機能的構築物を生成するのが好ましいため、20、21、22、23、24、または25のヌクレオチド長である。

【0072】

本発明はさらに、その3'末端でのヌクレオチドを介して、5'末端にATGまたはGTG開始コドンを含む、1つ以上のポリペプチド(複数可)をコードする標的遺伝子に、直接、またはRNAの翻訳を確実にするリンカーポリヌクレオチドによって機能的に連結する配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、または配列番号8のポリヌクレオチドから本質的になる単離プロモーターポリヌクレオチドに関する。リンカーポリヌクレオチドによって互いに機能的に連結したプロモーター及び標的遺伝子が好ましい。

【0073】

本発明はさらに、その3'末端でのヌクレオチドを介して、リンカーオリゴヌクレオチドに機能的に連結している配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、または配列番号8のポリヌクレオチドから本質的になる単離ポリヌクレオチドに関する。

【0074】

加えて、本発明はさらに、その3'末端でのヌクレオチドを介して、RNAの翻訳を確実にするリンカーポリヌクレオチドに機能的に連結している配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、または配列番号8のポリヌクレオチドから本質的になる単離ポリヌクレオチドに関する。

【0075】

この文脈では、「本質的に」という用語は、1,000未満、800未満、700未満、600未満、500未満、または400未満のヌクレオチド長のポリヌクレオチドが、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、または配列番号8のポリヌクレオチドの5'末端に添加されている、1,000未満、800未満、700未満、600未満、500未満、または400未満のヌクレオチド長のポリヌクレオチドが、標的遺伝子の3'末端に添加されている、または15,000未満、10,000未満、7,500未満、5,000未満、2,500未満、1,000未満、800未満、700未満、600未満、500未満、または400未満のヌクレオチド長のポリヌクレオチドが、リンカーオリゴ-またはポリヌクレオチドの3'末端に添加されていることを意味する。

【0076】

ポリヌクレオチドの前述の3つのリストからの特徴の任意の有用な組み合わせは、本発明に従う。「有用な組み合わせ」は、例えば、実施されている効率的な組換えをもたらす特徴の組み合わせを意味する。置換されるDNA領域に隣接する同じ長さの追加の使用は、実験手順における相同組換えによる領域の移動を容易にする。比較的長い隣接相同領域は、環状DNA分子間の効率的な組換えに有利であるが、置換ベクターのクローニングは、フランクの長さが増すとより困難になる(Wang et al., Molecular Biotechnology, 432:43-53(2006))。

【0077】

加えて、3'末端が、その5'末端にATGまたはGTG開始コドンを含む、1つ以上のポリペプチド(複数可)をコードする標的遺伝子に機能的に連結している場合、リンカーオリゴ-またはポリヌクレオチドの3'末端でのフランクは、15,000未満の長

10

20

30

40

50

さのヌクレオチドに増加する。

【0078】

これらの特に好ましい実施形態のリンカーポリヌクレオチドは、有利な方法でRNAの翻訳を確実にする。

【0079】

配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、または配列番号8のヌクレオチド配列を有する本発明によるポリヌクレオチド、RNAの翻訳を確実にするリンカーポリヌクレオチド、及びその5'末端にATGまたはGTG開始コドン（複数可）をコードする標的遺伝子の間の化学結合を容易にするため、クローニングに必要な機能的ヌクレオチド配列は、それらの5'及び3'末端で前記ポリヌクレオチドに組み込まれてよく、前記クローニングの後でさえ少なくとも一部が保持される。

10

【0080】

「クローニングに必要な機能的ヌクレオチド配列」という用語は、本明細書では、その配列は、通常、4～8ヌクレオチドからなる、存在する任意のREII（II型制限エンドヌクレアーゼ）開裂部位を表す。

【0081】

加えて、制限エンドヌクレアーゼの開裂部位を取り除くように突然変異誘発プライマーまたはヌクレオチド配列のデノボ遺伝子合成（例えば、by GENEART AG (Regensburg, Germany)）による部位特異的な突然変異誘発は、その後のクローニング工程で前記開裂部位を有利に使用することができるために、サイレント突然変異を配列に導入してもよいことをここで言及すべきである。

20

【0082】

RNAの翻訳を確実にするリンカーポリヌクレオチドに機能的に連結した本発明によるプロモーターから得られるポリヌクレオチドは、以下で発現単位とも呼ばれる。

【0083】

発現

さらに、本発明は、微生物中で標的遺伝子またはポリヌクレオチドを発現するために、本発明によるプロモーターまたは本発明による発現単位を使用することに関する。本発明によるプロモーターまたは本発明による発現単位は、合成RNA、好ましくは、mRNAをポリペプチドに転写及び翻訳することを確実にする。本明細書で使用される場合、「宿主細胞」という用語は、微生物の形質転換細胞を指す。

30

【0084】

本開示は、先に詳しく説明した組換え核酸及び組換えベクターを含む、形質転換された宿主細胞を提供し、それを含む。本開示はさらに、2つの組換え核酸で形質転換された宿主細胞を提供し、それを含む。ある実施形態では、宿主細胞は、3つの組換え核酸で形質転換される。上で提供されるように、核酸は、所望の生成物の収率における全体的な効果に基づいた生合成経路から選択され得る。本明細書の宿主細胞に組み込まれてもよい組換え核酸の数に実質的な制限はない。発現は、Corynebacterium属の微生物中で実施されるのが好ましい。以下の種：沈着型株がDSM44549であるC. efficiens；沈着型株がATCC13032であるC. glutamicum；及び沈着型株がATCC6871であるC. アンモニア遺伝子に基づいているCorynebacterium属内の株が好ましい。種であるC. glutamicumが特に非常に好ましい。このように、相当する宿主中で存在しないかまたは検出可能ではない性質、好ましくは、酵素活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを発現することが可能である。それゆえ、例えば、Yukawa et al. は、構成的Ptrcプロモーターの制御下で、C. glutamicum R中でD-キシロースを利用するEscherichia coli 遺伝子の発現を記載している (Applied Microbiology and Biotechnology 81, 691-699 (2008))。

40

50

【 0 0 8 5 】

本明細書は、上述のプロモーターポリヌクレオチド配列の制御下で、2つ以上の遺伝子生合成経路を有する *C. glutamicum* を提供し、それを含む。種々の実施形態では、1つ以上の標的遺伝子は、上述のような配列番号1～8の配列を有するプロモーターポリヌクレオチド配列の制御下に置かれる。他の実施形態では、1つ以上の標的遺伝子は、上述のような配列番号1、5、または7を有するプロモーターポリヌクレオチド配列の制御下に置かれる。

【 0 0 8 6 】

本明細書によるある特定の実施形態では、*C. glutamicum* 宿主細胞は、配列番号1～8の配列を有する2つの標的遺伝子の制御下でプロモーターを有する。本明細書によるある特定の他の実施形態では、*C. glutamicum* 宿主細胞は、配列番号1、5、または7の配列を有する2つの標的遺伝子の制御下でプロモーターを有する。相同組換えを用いて、本開示のプロモーターは、内因性プロモーター及び内因性配列を置換して、異種遺伝子に機能的に連結したプロモーターを調製する。当業者には、組換えは内因性プロモーターの置換をもたらす一方で、その天然の遺伝子座で遺伝子を保持することが認識されるであろう。具体的な非限定例を以下の表8に示す。複数のプロモーター-異種標的対(例えば、プロモーターカセット)は、宿主細胞のゲノムに容易に組み込むことができる。ある実施形態では、プロモーターカセットは、宿主細胞に順次組み込むことができる。ある特定の実施形態では、本開示の組換えベクターは、単一構築物中に2つ以上の異なるプロモーターカセットを提供する。本明細書は、上述の方法を用いて開発することができるプロモーター置換の数に事実上の制限を設けない。

【 0 0 8 7 】

ある実施形態では、宿主細胞は、プロモーターカセットである *Pcg0007-lysA*、及び *Pcg3121-pgi* を含むトランスジェニック *C. glutamicum* 宿主細胞である。ある実施形態では、宿主細胞は、プロモーターカセットである *Pcg1860-pyc*、及び *Pcg0007-zwf* を含むトランスジェニック *C. glutamicum* 宿主細胞である。ある実施形態では、宿主細胞は、プロモーターカセットである *Pcg0007-lysA*、及び *Pcg0007-zwf* を含むトランスジェニック *C. glutamicum* 宿主細胞である。ある実施形態では、宿主細胞は、プロモーターカセットである *Pcg3121-pck*、及び *Pcg0007-zwf* を含むトランスジェニック *C. glutamicum* 宿主細胞である。ある実施形態では、宿主細胞は、プロモーターカセットである *Pcg0007_39-ppc*、及び *Pcg0007-zwf* を含むトランスジェニック *C. glutamicum* 宿主細胞である。ある実施形態では、宿主細胞は、プロモーターカセットである *Pcg3121-pck*、及び *Pcg3121-pgi* を含むトランスジェニック *C. glutamicum* 宿主細胞である。ある実施形態では、宿主細胞は、プロモーターカセットである *Pcg3381-ddh*、及び *Pcg0007-zwf* を含むトランスジェニック *C. glutamicum* 宿主細胞である。ある実施形態では、宿主細胞は、プロモーターカセットである *Pcg0007_265-dapB*、及び *Pcg0007-zwf* を含むトランスジェニック *C. glutamicum* 宿主細胞である。ある実施形態では、宿主細胞は、プロモーターカセットである *Pcg0007-zwf*、及び *Pcg3121-pgi* を含むトランスジェニック *C. glutamicum* 宿主細胞である。ある実施形態では、宿主細胞は、プロモーターカセットである *Pcg3381-ddh*、及び *Pcg3121-pgi* を含むトランスジェニック *C. glutamicum* 宿主細胞である。ある実施形態では、宿主細胞は、プロモーターカセットである *Pcg3121-pgi*、及び *Pcg1860-pyc* を含むトランスジェニック *C. glutamicum* 宿主細胞である。ある実施形態では、宿主細胞は、プロモーターカセットである *Pcg1860-pyc*、及び *Pcg0007_265-dapB* を含むトランスジェニック *C. glutamicum* 宿主細胞である。ある実施形態では、宿主細胞は、プロモーターカセットである *Pcg1860-pyc*、及び *Pcg0007-lysA* を含むトランスジェニック *C. glutamicum* 宿主細胞であ

10

20

30

40

50

施形態では、宿主細胞は、プロモーターカセットであるPcg0007__39-ppc、及びPcg1860-asdを含むトランスジェニックC.glutamium宿主細胞である。ある実施形態では、宿主細胞は、プロモーターカセットであるPcg0007__39-ppc、及びPcg0007-lysaを含むトランスジェニックC.glutamium宿主細胞である。ある実施形態では、宿主細胞は、プロモーターカセットであるPcg3381-ddh、及びPcg0007__265-dapBを含むトランスジェニックC.glutamium宿主細胞である。ある実施形態では、宿主細胞は、プロモーターカセットであるPcg0007__265-dapB、及びPcg3381-fbpを含むトランスジェニックC.glutamium宿主細胞である。ある実施形態では、宿主細胞は、プロモーターカセットであるPcg0007__39-ppc、及びPcg0007__265-dapBを含むトランスジェニックC.glutamium宿主細胞である。ある実施形態では、宿主細胞は、プロモーターカセットであるPcg3381-aspB、及びPcg3121-pckを含むトランスジェニックC.glutamium宿主細胞である。ある実施形態では、宿主細胞は、プロモーターカセットであるPcg0007__265-dapB、及びPcg0007__265-dapDを含むトランスジェニックC.glutamium宿主細胞である。ある実施形態では、宿主細胞は、プロモーターカセットであるPcg0007__39-lyse、及びPcg3381-aspBを含むトランスジェニックC.glutamium宿主細胞である。ある実施形態では、宿主細胞は、プロモーターカセットであるPcg0007__39-lyse、及びPcg0007__265-dapDを含むトランスジェニックC.glutamium宿主細胞である。ある実施形態では、宿主細胞は、プロモーターカセットであるPcg3381-aspB、及びPcg0007__265-dapBを含むトランスジェニックC.glutamium宿主細胞である。ある実施形態では、宿主細胞は、プロモーターカセットであるPcg1860-asd、及びPcg0007__265-dapDを含むトランスジェニックC.glutamium宿主細胞である。ある実施形態では、宿主細胞は、プロモーターカセットであるPcg3381-aspB、及びPcg0007-lysaを含むトランスジェニックC.glutamium宿主細胞である。ある実施形態では、宿主細胞は、プロモーターカセットであるPcg3381-aspB、及びPcg3381-ddhを含むトランスジェニックC.glutamium宿主細胞である。ある実施形態では、宿主細胞は、プロモーターカセットであるPcg0755-ptsG、及びPcg1860-pycを含むトランスジェニックC.glutamium宿主細胞である。ある実施形態では、宿主細胞は、プロモーターカセットであるPcg0755-ptsG、及びPcg3381-fbpを含むトランスジェニックC.glutamium宿主細胞である。ある実施形態では、宿主細胞は、プロモーターカセットであるPcg0007-zwf、及びPcg3381-fbpを含むトランスジェニックC.glutamium宿主細胞である。ある実施形態では、宿主細胞は、プロモーターカセットであるPcg0755-ptsG、及びPcg0007__265-dapDを含むトランスジェニックC.glutamium宿主細胞である。

【0088】

本開示は、上述のような3つ以上のプロモーターカセットを有する宿主細胞を提供し、それを含む。ある実施形態では、宿主細胞は、Pcg0007__39-zwf、Pcg0007__39-lysa、及びPcg1860-pycプロモーターカセットを含む。ある実施形態では、宿主細胞は、C.glutamium宿主細胞である。

【0089】

本発明によるプロモーターまたは本発明による発現単位はさらに、例えば、収率、力価、生産性、副産物除去、処理逸脱への耐性、最適成長温度、及び成長速度を含み得る、微生物の性能特性を改善するために使用される。いくつかの実施形態では、本発明によるプロモーターまたは本発明による発現単位は、微生物中の標的遺伝子を上方調節するために使用される（過剰発現）。過剰発現は、一般的に、後者が出発株である場合、出発株（親株）または野生型株と比較して、リボ核酸、タンパク質（ポリペプチド）、または酵素の

10

20

30

40

50

細胞内濃度または活性の増加を意味する。いくつかの実施形態では、本発明によるプロモーターまたは本発明による発現単位は、微生物中の標的遺伝子を下方調節するために使用される（過少発現）。過少発現は、一般的に、後者が出発株である場合、出発株（親株）または野生型株と比較して、リボ核酸、タンパク質（ポリペプチド）、または酵素の細胞内濃度または活性の減少を意味する。いくつかの実施形態では、プロモーター及び/または本発明による発現単位の組み合わせを使用して、微生物中の2つ以上の標的遺伝子の発現を調節し、各標的遺伝子は、上方調節されるかまたは下方調節されるかのいずれかである。いくつかの実施形態では、プロモーター及び/または発現単位の組み合わせによって上方または下方調節された標的遺伝子は、同じ代謝経路の一部である。いくつかの実施形態では、プロモーター及び/または発現単位の組み合わせによって上方または下方調節された標的遺伝子は、同じ代謝経路の一部ではない。

10

【0090】

本明細書に記載のプロモーターは、例えば、低活性を有する相当する酵素をコードし、または相当する遺伝子または酵素（タンパク質）を不活性化する弱いプロモーター、または遺伝子、または対立遺伝子を用いることで、必要に応じて、これらの対策を組み合わせ、相当するDNAによってコードされる微生物中の1つ以上の酵素（タンパク質）の細胞内活性を減衰（減少または排除）するための当該技術分野で非常に周知の他の方法と組み合わせ使用することができる。

【0091】

遺伝子発現の減少は、適当な培養によって、または遺伝子発現のシグナル構造の遺伝的改変（突然変異）によって実施することができる。遺伝子発現のシグナル構造は、例えば、リプレッサー遺伝子、活性化因子遺伝子、オペレーター、プロモーター、アテニューエーター、リボソーム結合部位、開始コドン、及び終結因子である。専門家は、例えば、特許出願国際公開第96/15246、Boyd and Murphy (Journal of Bacteriology 170:5949 (1988))、Voskuil and Chambliss (Nucleic Acids Research 26:3548 (1998))、Jensen and Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58:191 (1998))、Patek et al. (Microbiology 142:1297 (1996))、Vaslicova et al. (Journal of Bacteriology 181:6188 (1999))、及び遺伝学及び分子生物学の公知のテキストブック、例えば、Knippers ("Molekulare Genetik [分子遺伝学]", 6th edition, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany, 1995)によるテキストブック、またはWinnacker ("Gene und Klone [遺伝子及びクローン]", VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany, 1990)によるテキストブックにおいて、この情報を見つけることができる。

20

30

【0092】

酵素タンパク質の触媒特性において変化または減少をもたらす突然変異は、従来技術から公知であり、挙げる例は、Qiu and Goodman (Journal of Biological Chemistry 272:8611-8617 (1997))、Sugimoto et al. (Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61:1760-1762 (1997))、及びMockel ("Die Threonindehydratase aus Corynebacterium glutamicum: Aufhebung der allosterischen Regulation und Struktur des Enzyms [Corynebacterium glutamicum由来のスレオニンデヒドロゲナーゼ: アロステリック調節の取り消し、及び酵素の構造]", Julich Research Centreからの報告書, Jul-2906, ISSN09442952, Julich, Germany, 1994)による著作で

40

50

ある。包括的な記述は、遺伝学及び分子生物学の公知のテキストブック、例えば、Hagemann (“Allgemeine Genetik [一般的な遺伝学]”, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) によるものに記載されている。

【0093】

可能な突然変異は、遷移、転換、挿入、及び欠失である。酵素活性におけるアミノ酸交換の効果に応じて、ミスセンス突然変異またはノンセンス突然変異と呼ばれる。遺伝子中の少なくとも1つの塩基対の挿入または欠失は、この不正確なアミノ酸が組み込まれるかまたは翻訳が途中で中断される結果として、フレームシフト突然変異をもたらす。いくつかのコードンの欠失は、典型的には、酵素活性の完全な喪失をもたらす。そのような突然変異の生成に関する指示は、先行技術であり、遺伝学及び分子生物学の公知のテキストブック、例えば、Knippers (“Molekulare Genetik [分子遺伝学]”, 6th edition, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany, 1995) によるテキストブック、Winnacker (“Gene und Klone [遺伝子及びクローン]”, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany, 1990) によるもの、またはHagemann (“Allgemeine Genetik [一般的な遺伝学]”, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) によるものに記載されている。C. glutamicumの遺伝子を突然変異する一般的な方法は、Schwarzer and Puhler (Bio/Technology 9, 84 - 87 (1991)) によって記載されている遺伝子破壊及び遺伝子置換の方法である。

【0094】

遺伝子破壊の方法では、対象遺伝子のコード領域の中央部は、宿主（典型的には、E. coli）中で複製できるが、C. glutamicum中で複製できないプラスミドベクターでクローンされる。可能なベクターは、例えば、pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784 - 791 (1983))、pK18mobまたはpK19mob (Schaffer et al., Gene 145, 69 - 73 (1994))、pK18mobsacBまたはpK19mobsacB (Jager et al., Journal of Bacteriology 174 : 5462 - 65 (1992))、pGEM-T (Promega corporation, Madison, Wis., USA)、pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269 : 32678 - 84 ; 米国特許第5,487,993号)、pCR (登録商標) Blunt (Invitrogen, Groningen, Holland; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234 : 534 - 541 (1993))、またはpEM1 (Schrumpf et al., 1991, Journal of Bacteriology 173 : 4510 - 4516) である。その後、遺伝子のコード領域の中央部を含有するプラスミドベクターを、コンジュゲーションまたは形質転換によってC. glutamicumの所望の株に導入する。コンジュゲーションの方法は、例えば、Schaffer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756 - 759 (1994)) に記載されている。形質転換の方法は、例えば、Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356 - 362 (1988))、Dunican and Shivnan (Bio/Technology 7, 1067 - 1070 (1989))、及びTauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343 - 347 (1994)) に記載されている。「クロスオーバー」事象による相同組換え後、当該遺伝子のコード領域は、ベクター配列によって中断され、2つの不完全な対立遺伝子が得られ、1つは、3'末端が欠けており、1つは、5'末端

10

20

30

40

50

が欠けている。この方法は、*C. glutamicum*の*recA*遺伝子を排除するために、例えば、Fitzpatrick et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 42, 575 - 580 (1994))によって使用されている。

【0095】

遺伝子置換の方法では、突然変異、例えば、欠失、挿入、または塩基交換は、対象遺伝子中で、インピットで確立される。次いで、調製された対立遺伝子を、*C. glutamicum*に対して複製されないベクターでクローンされ、その後、形質転換またはコンジュゲーションによって*C. glutamicum*の所望の宿主に導入する。統合をもたらす第1の「クロスオーバー」事象、及び標的遺伝子または標的配列中で切除をもたらす適当な第2の「クロスオーバー」事象による相同組換え後、突然変異または対立遺伝子 glu t a m i c u m 伝子の組み込みが達成される。この方法は、欠失によって*C.*の pyc 遺伝子を排除するために、例えば、Peters-Wendisch (Microbiology 144, 915 - 927 (1998))によって使用された。

10

【0096】

本明細書に記載のプロモーターは、例えば、強いプロモーターを用いて、または、高活性を有する相当する酵素をコードする遺伝子を用いて、必要に応じて、これらの対策を組み合わせ、例えば、遺伝子のコピー数または遺伝子を増加することによって、相当するDNAによってコードされる微生物中の1つ以上の酵素の細胞内活性を上昇(増強)するための当該技術分野で非常に周知の他の方法と組み合わせ使用することができる。

20

【0097】

過剰発現を達成するために、相当する遺伝子のコピー数を増やすことができ、またはあるいは、プロモーター及び調節領域、または構造遺伝子の u p s t r e m e に位置するリボソーム結合部位を突然変異させることができる。構造遺伝子の u p s t r e m e に組み込まれる発現カセットは、同じように作用する。誘導性プロモーターによって、酵素アミノ酸生成の途中で発現を増加させることがさらに可能になる。発現は、 m $-$ R N A の寿命を延ばすことを目的とした対策によって同様に改善される。さらに、酵素活性は、酵素タンパク質の劣化を防ぐことによって増強される。遺伝子または遺伝子構築物は、異なるコピー数を有するプラスミドに存在してもよく、または染色体中で統合、増幅されてもよい。あるいは、関連遺伝子の過剰発現はさらに、培地の組成物、及び培養条件を変えることによって達成されてもよい。

30

【0098】

当業者は、特に、Martin et al. (Bio/Technology 5, 137 - 146 (1987))、Guerrero et al. (Gene 138, 35 - 41 (1994))、Tsuchiya and Morinaga (Bio/Technology 6, 428 - 430 (1988))、Eikmanns et al. (Gene 102, 93 - 98 (1991))、欧州特許明細書0472869、米国特許第4,601,893号、Schwarzer and Puhler (Bio/Technology 9, 84 - 87 (1991))、Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126 - 132 (1994))、LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001 - 1007 (1993))、特許出願国際公開第96/15246、Malumbres et al. (Gene 134, 15 - 24 (1993))、日本公開明細書JP-A-10-229891、Jensen and Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191 - 195 (1998))、Makrides (Microbiological Reviews 60: 512 - 538 (1996))、及び遺伝学並びに分子生物学の公知のテキストブックで上記の詳細を見つけることができる。

40

【0099】

50

遺伝子は、例えば、エピソームプラスミドによって過剰発現されてもよい。適当なプラスミドは、コリネ型細菌中で複製されるものである。多くの公知のプラスミドベクター、例えば、pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64:549-554)、pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991))、またはpHS2-1 (Sonnen et al., Gene 107:69-74 (1991))は、潜在プラスミドであるpHM1519、pBL1、またはpGA1に基づいている。他のプラスミドベクター、例えば、pCG4 (米国特許第4,489,160号)、またはpNG2 (Serworld-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66,119-124 (1990))、またはpAG1 (米国特許第5,158,891号)に基づくものを、同様の方法で使用してもよい。

10

【0100】

さらに、染色体中の統合による遺伝子増幅の処理を利用可能な助けを借りたそれらのプラスミドベクター、例えば、hom-thrBオペロンを複製及び増幅するためのReinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60,126-132 (1994))に記載されているものも適当である。この方法では、完全な遺伝子は、宿主(典型的には、E. coli)中で複製できるが、C. glutamicum中で複製できないプラスミドベクターにクローンされる。適当なベクターは、例えば、pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1,784-791 (1983))、pK18mobまたはpK19mob (Schäfer et al., Gene 145,69-73 (1994))、pGEM-T (Promega Corporation, Madison, Wis., USA)、pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; 米国特許第5,487,993号)、pCR (登録商標) Blunt (Invitrogen, Groningen, Netherlands; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234:534-541 (1993))、pEM1 (Schrumpf et al., 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516)、またはpBGS8 (Spratt et al., 1986, Gene 41:337-342)である。次いで、増幅される遺伝子を含むプラスミドベクターを、コンジュゲーションまたは形質転換によってC. glutamicumの所望の株に導入する。コンジュゲーションの方法は、例えば、Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60,756-759 (1994))に記載されている。形質転換の方法は、例えば、Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29,356-362 (1988))、Dunican and Shivanian (Bio/Technology 7,1067-1070 (1989))、及びTauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123,343-347 (1994))に記載されている。クロスオーバー事象による相同組換え後、得られた株は、関連遺伝子の少なくとも2つのコピーを含む。

20

30

40

【0101】

遺伝子発現を調節、すなわち、増加または減少する方法には、インビトロで提供されるDNA分子を用いて微生物が生成される組換え方法が含まれる。そのようなDNA分子は、例えば、プロモーター、発現カセット、遺伝子、対立遺伝子、コード領域などを含む。形質転換、コンジュゲーション、形質導入の方法、または同様の方法によって、それらを所望の微生物に導入する。

【0102】

本発明の場合には、プロモーターは、好ましくは、配列番号1、配列番号2、配列番号

50

3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、または配列番号8のポリヌクレオチドであり、発現カセットは、好ましくは、その3'末端でのヌクレオチドを介して、RNAの翻訳を確実にするリンカーポリヌクレオチドに機能的に連結される配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、または配列番号8のポリヌクレオチドである。

【0103】

本発明によるプロモーターまたは本発明による発現単位を用いた過剰発現の対策は、過剰発現に対する対策の前の株中の前記ポリペプチドの活性または濃度に基づいて、相当するポリペプチドの活性または濃度を、通常は少なくとも10%、25%、50%、75%、100%、150%、200%、300%、400%または500%、好ましくは、10,000%、20,000%、40,000%、100,000%、または200,000%未満に増加させる。

10

【0104】

発現または過剰発現の程度は、遺伝子によって転写されたmRNAの量の測定、ポリペプチドの量の測定及び酵素活性の測定によって判断することができる。

【0105】

mRNAの量は、特に、「ノーザンブロッティング」法、及び定量的RT-PCR法を使用することで決定してもよい。定量的RT-PCRでは、ポリメラーゼ連鎖反応の前に逆転写を行う。このため、Roche Diagnostics (Boehringer Mannheim GmbH, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)からのLightCycler (商標)システムを、例えば、Jungwirth et al. (FEMS Microbiology Letters 281, 190-197 (2008))に記載されているように使用してもよい。ゲル中のタンパク質の濃度は、適切な評価ソフトウェアを使用して、一次元及び二次元タンパク質ゲル分離、及びその後のタンパク質濃度の光学的同定を行うことによって測定することができる。コリネ型細菌に対するタンパク質ゲルを調製し、前記タンパク質を同定する一般的な方法は、Hermann et al. (Electrophoresis, 22: 1712-23 (2001))に記載されている手順である。同様に、タンパク質濃度は、検出対象のタンパク質に特異的な抗体を使用したウェスタンブロットハイブリダイゼーション (Sambrook et al., Molecular Cloning: a laboratory manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989)、及びその後の適切な濃度測定ソフトウェアを使用した光学的評価 (Lohaus and Meyer (1998) Biospektrum 5: 32-39; Lottspeich, Angewandte Chemie 321: 2630-2647 (1999))によって測定することができる。集めたデータの統計的有意性は、T検定によって決定する (Gosset, Biometrika 6(1): 1-25 (1908))。

20

30

【0106】

本発明によるプロモーターを用いた標的遺伝子を過剰発現する対策は、さらなる過剰発現対策と適当な方法で組み合わせてもよい。過剰発現は、従来技術で利用可能な多数の方法によって達成される。これらには、遺伝子の発現を指向または制御するヌクレオチド配列を修正することに加えて、コピー数を増すことが含まれる。コピー数は、微生物の細胞質内で複製するプラスミドによって増加してもよい。この目的のために、豊富なプラスミドが、非常に異なる群の微生物に対する従来技術に記載されており、ここで、プラスミドは、遺伝子のコピー数の所望の増加を設定するために使用することができる。Corynebacterium属に適当なプラスミドは、例えば、Tauch et al. (Journal of Biotechnology 104(1-3), 27-40, (2003))、及びStansen et al. (Applied and Environmental Microbiology 71, 5920-5928 (2005))

40

50

))に記載されている。

【0107】

さらに、コピー数は、さらなるコピーを微生物の染色体に導入することによって、少なくとも1つ(1)のコピーだけ増加してもよい。Corynebacterium属に適当な方法は、例えば、特許国際公開第03/014330、国際公開第03/040373、及び国際公開第04/069996に記載されている。

【0108】

さらに、遺伝子発現は、標的遺伝子上流の複数のプロモーターを位置決めすることで増加させてもよく、または発現される遺伝子にそれらを機能的に連結して、発現の増加をこのように達成してもよい。この例は、特許国際公開第2006/069711に記載されている。

10

【0109】

遺伝子の転写は、必要に応じて、転写を抑制するタンパク質(リプレッサータンパク質)または促進するタンパク質(活性化因子タンパク質)によって制御される。従って、過剰発現は、活性化因子タンパク質の発現を増加させる、またはリプレッサータンパク質の発現を減少または発現のスイッチをオフにする、あるいはリプレッサータンパク質の結合部位を排除することによっても同様に達成することができる。伸長速度はコドンの使用によって影響を受ける。開始株で頻繁である転移RNA(tRNA)に対するコドンの使用により、翻訳を増加させることができる。さらに、多くの微生物(E. coliの77%)において最も頻繁に生じるATGコドンによる開始コドンの交換は、大きく翻訳を改善させ得る。すなわち、RNAレベルでは、AUGコドンは、例えば、コドンGUG及びUUGよりも2~3倍効果的である(Khudyakov et al., FEBS Letters 232(2):369-71 (1988); Reddy et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 82(17):5656-60 (1985))。また、開始コドンと隣接領域との間の相乗効果が記載されているため、開始コドンを取り囲む配列を最適化することができる(Stenstrom et al., Gene 273(2):259-65 (2001); Hui et al., EMBO Journal 3(3):623-9 (1984))。

20

【0110】

DNAの取り扱い、DNAの消化及び連結、形質転換体の形質転換及び選択に関する説明は、特に、Sambrook et al. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition" (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)による公知のマニュアルに記載されている。

30

【0111】

本発明は、本発明によるポリヌクレオチドを含むベクターにも関する。

【0112】

Kirchner and Tauch (Journal of Biotechnology 104:287-299 (2003))は、C. glutamicumに使用されるベクターの選択を記載している。本発明によるベクターを用いた相同組換えにより、染色体上のDNAセグメントを、ベクターによって細胞に輸送される本発明によるポリヌクレオチドに置換することができる。ベクターの環状DNA分子と染色体上の標的DNAの間の効率的な組換えでは、本発明によるポリヌクレオチドに置換されるDNA領域は、ベクターの統合部位とDNAの置換部位を決定する標的部位に相同なヌクレオチド配列を有する末端で提供される。

40

【0113】

それゆえ本発明によるプロモーターポリヌクレオチドは、1)染色体中の標的遺伝子の天然遺伝子座で天然プロモーターに置換されてもよく;または2)後者の天然遺伝子座または別の遺伝子座で標的遺伝子と統合されてもよい。

50

【0114】

「標的遺伝子の天然遺伝子座での天然プロモーターの置換」は、そのヌクレオチド配列の形態で相当する野生型または相当する出発有機体中のその遺伝子座で単一コピーによって通常自然に存在する遺伝子の天然に存在するプロモーターが置換されていることを意味する。

【0115】

「別の遺伝子座」は、ヌクレオチド配列が標的遺伝子の配列と異なる遺伝子座を意味する。前記他の遺伝子座または前記他の遺伝子座でのヌクレオチド配列は、染色体内に位置するのが好ましく、通常、所望の化学化合物の成長及び生成に必須ではない。さらに、染色体内の遺伝子間領域、すなわち、コード機能がないヌクレオチド配列を使用することが可能である。

10

【0116】

発現または過剰発現は、*Corynebacterium*属の微生物中で実施されるのが好ましい。*Corynebacterium*属内で、以下の種：沈着型株がDSM 44549である*C. efficiens*；沈着型株がATCC 13032である*C. glutamicum*；及び沈着型株がATCC 6871である*C. アンモニア*遺伝子に基づいている株が好ましい。種である*C. glutamicum*が特に非常に好ましい。

【0117】

*Corynebacterium*属、特に、*Corynebacterium glutamicum*種の適当な株は、特に、公知の野生型株：*Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032、*Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC 15806、*Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC 13870、*Corynebacterium melassecola* ATCC 17965、*Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539、*Brevibacterium flavum* ATCC 14067、*Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869、及び*Brevibacterium divaricatum* ATCC 14020；及びL-アミノ酸生成変異体、またはそれから調製された株、例えば、L-リジン生成株：*Corynebacterium glutamicum* FERM-P1709、*Brevibacterium flavum* FERM-P1708、*Brevibacterium lactofermentum* FERM-P1712、*Corynebacterium glutamicum* FERM-P6463、*Corynebacterium glutamicum* FERM-P6464、*Corynebacterium glutamicum* DM58-1、*Corynebacterium glutamicum* DG52-5、*Corynebacterium glutamicum* DSM5714、及び*Corynebacterium glutamicum* DSM12866である。

20

30

【0118】

「*Micrococcus glutamicus*」という用語は、*C. glutamicum*に対しても使用されている。*C. efficiens*種のいくつかの代表例は、従来技術における*C. thermoaminogenes*、例えば、株FERM BP-1539とも呼ばれている。

40

【0119】

本発明による発現または過剰発現対策に採用される微生物または株（出発株）は、所望のファインケミカルを周囲栄養培地で分泌し、そこに蓄積する能力をすでに持っていることが好ましい。「生成するために」という表現は、以下でこのようにも使用される。より詳細には、過剰発現対策に採用される株は、所望のファインケミカルを、細胞または栄養培地中で少なくとも0.10 g/L、少なくとも0.25 g/L、少なくとも0.5 g/L、少なくとも1.0 g/L、少なくとも1.5 g/L、少なくとも2.0 g/L、少なくとも4.0 g/L、または少なくとも10.0 g/Lの濃度で、120時間未満、96

50

時間未満、48時間未満、36時間未満、24時間未満、または12時間未満蓄積する能力を持っている。出発株は、突然変異誘発及び選択、組換えDNA技術、または両方の方法の組み合わせによって調製される株が好ましい。

【0120】

当業者には、本発明の対策に適切な微生物が、野生株、例えば、*C. glutamicum*型株ATCC13032または株ATCC14067における標的遺伝子の過剰発現のために、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、または配列番号8の本発明によるプロモーターをまず採用した後、従来技術に記載のさらなる遺伝的対策によって、微生物に所望のファインケミカル（複数可）を生成させることによって得ることもできることが理解される。

10

【0121】

「生体分子」という用語は、本発明の対策に関する、アミノ酸、有機酸、ビタミン、ヌクレオシド、及びヌクレオチドを意味する。タンパク質を構成するアミノ酸、タンパク質を構成しないアミノ酸、マクロ分子、及び有機酸が特に好ましい。

【0122】

「タンパク質を構成するアミノ酸」は、天然タンパク質、すなわち、微生物、植物、動物、及びヒトのタンパク質で発生するアミノ酸を意味する。それらは、ペプチド結合を介して互いに結合するタンパク質の構造単位として機能する。

【0123】

L-アミノ酸またはアミノ酸が以下に記載される場合、それらは、L-アスパラギン、L-スレオニン、L-セリン、L-グルタミン酸、L-グリシン、L-アラニン、L-システイン、L-バリン、L-メチオニン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-チロシン、L-フェニルアラニン、L-ヒスチジン、L-リジン、L-トリプトファン、及びL-アルギニンからなる群から選択される、それらの塩を含む1つ以上のアミノ酸を意味するものとして理解されるべきである。L-リジンは特に好ましい。L-アミノ酸、特に、リジンは、ヒトの医学、製薬業界、食品業界、及び非常に特に動物栄養で使用される。したがって、アミノ酸、特に、L-リジンを調製するために新しい改善処理を提供することに一般的な関心がある。

20

【0124】

「タンパク質」及び「ポリペプチド」という用語は、交換可能である。

30

【0125】

本発明は、ファインケミカルを生成する微生物を提供し、前記微生物は、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、または配列番号8の本発明によるプロモーターを用いることで、特定の出発株と比較して1つ以上の遺伝子の発現が増加している。

【0126】

発酵調製物

本発明はさらに、

a) 本発明による上述の微生物を適当な培地内において培養して発酵液を得る工程；及び

40

b) 工程a)で得られた発酵液または微生物の細胞内においてファインケミカルを濃縮する工程

を含む、ファインケミカルの発酵調製物のための処理を提供する。

【0127】

ファインケミカル含有発酵液、ファインケミカル、または液体または固体のファインケミカル含有生成物から得られることが好ましい。生成された微生物は、例えば、国際公開第05/021772に開示されているように連続的に培養するか、または所望の有機化学化合物を生成する目的で、回分培養処理（回分培養）、流加培養処理、または繰り返し流加培養処理によって不連続的に培養してもよい。公知の培養方法についての一般的な性質の概要は、Chmiel (Bioprozechnik, 1, Einfuhrung

50

ng in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991))によるテキストブック、またはStorhas (Bioreaktoren and periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig / Wiesbaden, 1994))によるテキストブックで入手可能である。

【0128】

使用される培養培地または発酵培地は、それぞれの株に関する要件を適切に満たしていなければならない。種々の微生物に対する培養培地の説明は、“Manual of Methods for General Bacteriology”, of the American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981)に存在している。「培養培地」及び「発酵培地」という用語は、互いに置き替え可能である。

10

【0129】

炭素源、糖、及び炭水化物として、例えば、グルコース、スクロース、ラクトース、フルクトース、マルトース、糖蜜、砂糖大根またはサトウキビの処理によって得られるスクロース含有溶液、でんぷん、でんぷん加水分解物、及びセルロース；油、及び脂肪、例えば、大豆油、ひまわり油、落花生油、及びココナツ油；脂肪酸、例えば、パルミチン酸、ステアリン酸、及びリノール酸；アルコール、例えば、グリセロール、メタノール、及びエタノール；及び有機酸、例えば、酢酸及び乳酸を使用することができる。

20

【0130】

窒素源として、ペプトンなどの有機含窒素化合物、酵母抽出物、肉抽出物、麦芽抽出物、コーンステープリカー、きなこ、及び尿素；または硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、及び硝酸アンモニウムなどの無機化合物を使用することができる。窒素源は、単独または混合物として使用することができる。

【0131】

リン源として、リン酸、リン酸二水素カリウム、またはリン酸水素二カリウム、または相当するナトリウム含有塩を使用することができる。

【0132】

培養培地は、成長に必要な、例えば、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、及び鉄などの金属の塩化物または硫酸塩の形態の塩、例えば、硫酸マグネシウムまたは硫酸鉄をさらに含んでもよい。最終的に、アミノ酸、例えば、ホモセリン及びビタミン、例えば、チアミン、ピオチン、またはパントテン酸などの必須発育因子は、上述した物質に加えて使用することができる。

30

【0133】

前記開始物質は、単一バッチの形態で培養物に添加してもよく、または培養時に適当な方法で供給してもよい。

【0134】

培養物のpHは、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニア、またはアンモニア水などの塩基性化合物；またはリン酸または硫酸などの酸性化合物を適当な方法で使用して制御することができる。pHは、一般的に、6.0~8.5、好ましくは6.5~8の値に調節される。泡を抑制するために、例えば、脂肪酸ポリグリコールエステルなどの消泡剤を使用することができる。プラスミドの安定性を維持するために、例えば、抗生物質などの適当な選択的作用物質を培地に添加することができる。発酵は、好気性条件下で実施することが好ましい。これらの条件を維持するために、酸素または含酸素気体混合物（空気など）を培養物に導入する。同様に、過酸化水素を濃縮した液体を使用することもできる。必要に応じて、高圧下、例えば、0.03~0.2MPaの高圧下で発酵を実施する。培養物の温度は、通常は20~45、好ましくは25~40、特に好ましくは30~37である。回分培養処理または流加培養処理では、所望の有機化学化合物が回収に十分な量となるまで培養を継続するのが好ましい。この目的は、通常、10~160時間以内に達成される。連続培養処理では、培養時間をさらに長くしてもよい。微生

40

50

物の活性により、発酵培地及び/または前記微生物の細胞内で有機化学化合物の濃縮（蓄積）が生じる。

【0135】

適当な発酵培地の例としては、特に、米国特許第5,770,409号、米国特許第5,990,350号、米国特許第5,275,940号、国際公開第2007/012078号、米国特許第5,827,698号、国際公開第2009/043803号、米国特許第5,756,345号、及び米国特許第7,138,266号に記載されている。

【0136】

発酵中に一回以上（複数可）の濃度決定のためのL-アミノ酸の分析は、Spackman et al.に記載されているように、イオン交換クロマトグラフィー、好ましくは、カチオン交換クロマトグラフィーと、ニンヒドリンを使用したポストカラム誘導体化によるL-アミノ酸の分離によって実施することができる（Analytical Chemistry 30:1190-1206(1958)）。ニンヒドリンの代わりに、オルトフタルジアルデヒドをポストカラム誘導体化に使用することもできる。イオン交換クロマトグラフィーの概要論文は、Pickering (LC-GC (Magazine of Chromatographic Science) 7(6), 484-487(1989))に記載されている。

10

【0137】

また、例えば、オルトフタルジアルデヒドまたはフェニルイソチオシアネートを使用したプレカラム誘導体化を実施し、逆相（RP）クロマトグラフィー、好ましくは、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）の形態によって得られたアミノ酸誘導体を分離することもできる。この種の方法は、例えば、Lindroth et al. (Analytical Chemistry 51:1167-1174(1979))に記載されている。

20

【0138】

検出は、光度測定（吸収率、蛍光）によって行う。

【0139】

アミノ酸分析に関するレビューは、特に、Lottspeich and Zorbasからのテキストブック“Bioanalytik”に記載されている（Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Germany 1998）。

30

【0140】

発酵時における1つ以上の時点（複数可）での α -ケト酸の濃度の決定は、H⁺形態におけるスルホン化スチレン-ジビニルベンゼン重合体、例えば、0.025M硫酸によって、215nm（あるいは、230または275nm）でのUV検出を使用したイオン交換クロマトグラフィー、好ましくは、カチオン交換クロマトグラフィーによるケト酸及びその他の分泌物の分離によって実施することができる。好ましくは、REZEX RFQ-Fast Fruit H⁺カラム（Phenomenex）を使用することができるが、分離相の他の供給業者（例えば、BioRad製のAminex）が実現可能である。同様な分離手法は、供給業者の応用例に記載されている。

40

【0141】

本発明によるプロモーター変異体を含有する処理または発酵処理の性能は、濃度（単位体積当たり形成された化合物）、収率（消費された炭素源当たり形成された化合物）、生成量（体積及び時間当たり形成された化合物）、特定の生成量（細胞乾燥質量または生体乾燥質量、及び時間当たり形成された化合物、または細胞タンパク質及び時間当たり形成された化合物）、あるいはその他の処理パラメータ、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される1つ以上のパラメータにおいて、本発明によるプロモーター変異体を含有しない微生物を使用する処理または発酵処理に基づいて、少なくとも0.5%、少なくとも1%、少なくとも1.5%、少なくとも2%、少なくとも3%、少なくとも4%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少な

50

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%、少なくとも90%、または少なくとも100%増加される。これは、大規模な工業処理では非常に有益であると考えられる。

【0142】

発酵対策により、所望のファインケミカル、好ましくは、アミノ酸、有機酸、ビタミン、ヌクレオシド、またはヌクレオチドを含有する発酵液が得られる。

【0143】

次に、ファインケミカルを含有する生成物は、液体または固体形態で提供、または生成、または回収される。

【0144】

発酵液は、微生物を所定の時間にわたって所定の温度で培養した発酵培地または培養液を意味する。発酵中に使用する発酵培地または培地は、所望の化合物の生成並びに典型的には繁殖または生存を可能とする、全ての物質または成分を含む。

【0145】

発酵が完了すると、それによって得られた発酵液は、以下の成分を含む：

- a) 微生物の細胞の繁殖によって得られた微生物のバイオマス（細胞集団）；
- b) 発酵中に形成された所望のファインケミカル；
- c) 発酵中に任意に形成された有機副生成物；及び
- d) 発酵で消費されない、例えば、ピオチンなどのビタミンまたは硫酸マグネシウムなどの塩の、使用された発酵培地または出発材料の成分。

【0146】

有機副生成物は、特に所望の化合物に加えて発酵に使用した微生物によって生成され、必要に応じて分泌される物質を含む。

【0147】

発酵液は、培養容器または発酵容器から取り出され、必要に応じて回収され、液体または固体形態のファインケミカルを含有する生成物を提供するために使用される。この場合にも、「ファインケミカル含有生成物を回収する」という表現を使用する。最も単純な場合には、発酵容器から取り出したファインケミカル含有発酵液自体は、回収された生成物を構成する。

【0148】

以下からなる群から選択される1つ以上の対策により、所望の有機化学化合物の濃縮または精製を達成する：

- a) 水の部分的 (> 0% ~ < 80%)、完全 (100%) またはほぼ完全 (80%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%) な除去；
- b) 除去前に必要に応じて非活性化されているバイオマスの部分的 (> 0% ~ < 80%)、完全 (100%)、またはほぼ完全 (80%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%) な除去；
- c) 発酵中に形成された有機副生成物の部分的 (> 0% ~ < 80%)、完全 (100%)、またはほぼ完全 (80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.3%、または99.7%) な除去；及び
- d) 発酵で消費されなかった、使用された発酵培地または出発材料の成分の、発酵液からの部分的 (> 0%)、完全 (100%)、またはほぼ完全 (80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.3% または 99.7%) な除去。これにより、所望の化合物含有量を有する生成物が単離される。

【0149】

水の部分的 (> 0% ~ < 80%)、完全 (100%)、またはほぼ完全 (80% ~ < 100%) な除去 (手段 a)) は、乾燥とも呼ばれる。

【0150】

処理の一変形例では、水、バイオマス、有機副生成物、及び使用した発酵培地の消費されなかった成分の完全またはほぼ完全な除去は、所望の有機化学化合物の純粋 (80重

10

20

30

40

50

量%または 90重量%)、または非常に純粋(95%重量、97重量%、または99重量%)な生成物形態をもたらす。対策a)、b)、c)、及びd)に対する多くの技術的説明は、従来技術で入手可能である。

【0151】

要件に応じて、バイオマスは、分離方法、例えば、遠心分離、濾過、デカンテーション、またはそれらの組み合わせによって発酵液から完全にまたは一部を除去することができ、または発酵液に完全に留置される。必要に応じて、バイオマスまたはバイオマス含有発酵液は、適当な処理工程中、例えば、熱処理(加熱)中、または酸を添加によって不活性化される。

【0152】

一手順では、バイオマスは、完全またはほぼ完全に除去されるため、全く(0%)、または多くても30%、多くても20%、多くても10%、多くても5%、多くても1%または多くても0.1%のバイオマスが、調製された生成物中に残る。さらなる手順では、バイオマスは、除去されない、または小さな割合でしか除去されないため、全て(100%)、または70%、80%、90%、95%、99%、または99.9%以上のバイオマスが、調製された生成物中に残る。本発明による一処理では、従って、バイオマスは、0%~100%の割合で除去される。

【0153】

最終的に、発酵後に得られた発酵液は、最終生成物の取扱適性を改善するように、バイオマスの完全または部分除去の前または後に、無機酸、例えば、塩酸、硫酸、またはリン酸;または有機酸、例えば、プロピオン酸で酸性pHに調整することができる(GB1,439,728またはEP1331220)。発酵液を完全な含有量のバイオマスで酸性化することも可能である。最終的に、発酵液は、亜硫酸水素ナトリウム(NaHSO₃、GB1,439,728)または別の塩、例えば、亜硫酸のアンモニウム塩、アルカリ金属塩、またはアルカリ土類金属塩を添加することによっても安定化することができる。

【0154】

バイオマスの除去中、発酵液に存在する任意の有機または無機固体は、部分的または完全に除去される。発酵液に溶解した有機副生成物、及び発酵培地の溶解した消費されていない成分(出発材料)は、少なくとも部分的(>0%)、好ましくは、少なくとも25%の程度まで、特に好ましくは、少なくとも50%の程度まで、及び非常に特に好ましくは、少なくとも75%の程度まで生成物中に残る。必要に応じて、それらは、完全(100%)またはほぼ完全(>95%または>98%または>99%を意味する)に生成物中に残る。この意味における生成物が、発酵液の成分の少なくとも一部を含む場合、これは、「発酵液に基づく生成物」という用語によっても記載される。

【0155】

その後、公知の方法、例えば、ロータリーエバポレーター、薄膜蒸発器、流下膜式蒸発器を用いて、逆浸透膜、またはナノ濾過によって、水を発酵液から除去し、または前記発酵液を濃くまたは濃縮する。次いで、例えば、PCT/EP2004/006655に従って記載されているように、凍結乾燥、噴霧乾燥、噴霧造粒の方法によって、または循環流動層などの他の処理によって、この濃縮発酵液を、自由流動性の生成物、特に、微粉、または好ましくは、粗顆粒にワークアップすることができる。所望の生成物は、スクリーニングまたは除塵によって得られた顆粒から必要に応じて単離される。発酵液を、直接、すなわち、噴霧乾燥または噴霧造粒による予備濃縮せずに乾燥することも可能である。

【0156】

「自由流動性」は、異なるサイズのオリフィスを有する一連のガラスオリフィス容器から、5mmオリフィスを有する容器の外に少なくとも妨げられずに流れる粉末を意味する(Klein:Seifen,Ole,Fette,Wachse 94,12(1968))。

【0157】

「微」は、20~200µmの直径の粒径を主に(>50%)有する粉末を意味する。

10

20

30

40

50

【0158】

「粗」は、200～2000 μmの直径の粒径を主に(>50%)有する生成物を意味する。

【0159】

粒径判断は、レーザー回析分析法の方法によって実施することができる。対応する方法は、R. H. Muller and R. Schuhmann, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (1996)によるテキストブック“Teilchengroenmessung in der Laborpraxis”、またはWiley & Sons (1998)により公開されたM. Rhodesによるテキストブック“Introduction to Particle Technology”に記載されている。

10

【0160】

自由流動性の微粉は、次いで、適当な圧密または造粒処理によって、粗く、非常に自由流動性で、保存可能で、及び実質的に無塵の生成物に形質転換することができる。

【0161】

「無塵」という用語は、直径で100 μmを下回る粒径を小さな割合(<5%)でしか含まない生成物を意味する。

【0162】

本発明の意味における「保存可能」は、発生しているそれぞれの有機化学化合物の任意の実質的な損失をせずに乾燥し、涼しい環境で、少なくとも1年以上、好ましくは、少なくとも1.5年以上、特に好ましくは、2年以上保存することができる生成物を意味する。「実質的な損失」は、>5%の損失を意味する。

20

【0163】

結合剤、ゲル化剤または増粘剤として食品または飼料、またはさらなる物質、例えば、シリカ、ケイ酸塩(E P 0 7 4 3 0 1 6 A)、及びステアリン酸塩の処理に通常使用されるように、通常の有機または無機補助剤または担体、例えば、スターチ、ゼラチン、セルロース誘導体または同様の物質を造粒または圧密中に使用することが有利である。

【0164】

国際公開第04/054381に記載されているように、得られた顆粒の表面を油または脂質で処理することがさらに有利である。使用され得る油は、鉱油、野菜油、または野菜油の混合物である。そのような油の例は、大豆油、オリーブ油、大豆油/レシチン混合物である。このように、シリコン油、ポリエチレングリコール、またはヒドロキシエチルセルロースも適している。前記油による顆粒の表面の処理により、生成物の耐摩耗性の増加、及び含塵率の減少が達成される。生成物中の油含有量は、飼料添加物の総量に基づいて、0.02～2.0重量%、好ましくは、0.02～1.0重量%、及び非常に特に好ましくは、0.2～1.0重量%である。

30

【0165】

好ましい生成物は、100～1800 μmの粒径を持つ97重量%の割合、または直径300～1800 μmの粒径を持つ95重量%割合を有する。塵、すなわち、<100 μmの粒径の粒子の割合は、好ましくは、>0～1重量%、特に好ましくは、0.5重量%を超えないものである。

40

【0166】

しかしながら、あるいは、生成物は、飼料、例えば、シリカ、ケイ酸塩、食事、ぬか類、小麦粉、スターチ、砂糖、または他のものの処理において、公知及び習慣的な有機または無機担体上に吸収されてもよく、及び/または一般的な増粘剤または結合剤と混合し、安定化してもよい。その使用及び処理の例は、文献(Die Muhle + Mischfuttertechnik 132 (1995) 49, page 817)に記載されている。

【0167】

実施形態：

50

1. 少なくとも1つの異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号1～8からなる群から選択されるプロモーターポリヌクレオチド配列を含む、組換え核酸分子。

2. 前記プロモーターポリヌクレオチド配列が、配列番号1、5、及び7からなる群から選択される、請求項1に記載の組換え核酸分子。

3. リンカーオリゴヌクレオチドまたはリンカーポリヌクレオチドをさらに含む、実施形態1または2に記載の組換え核酸分子。

4. 前記少なくとも1つの異種標的遺伝子が、アミノ酸、有機酸、タンパク質、及びポリマーからなる群から選択される生体分子を生成する生合成経路の成分である遺伝子である、実施形態1に記載の組換え核酸分子。

5. 前記少なくとも1つの異種標的遺伝子が、

エントリーM00020の遺伝子を含むセリン生合成経路；

KEGGエントリーM00018の遺伝子を含むスレオニン生合成経路；

KEGGエントリーM00021の遺伝子を含むシステイン生合成経路；

KEGGエントリーM00338の遺伝子を含むシステイン生合成経路；

KEGGエントリーM00609の遺伝子を含むシステイン生合成経路；

KEGGエントリーM00017の遺伝子を含むメチオニン生合成経路；

KEGGエントリーM00019の遺伝子を含むバリン/イソロイシン生合成経路；

KEGGエントリーM00535の遺伝子を含むイソロイシン生合成経路；

KEGGエントリーM00570の遺伝子を含むイソロイシン生合成経路；

KEGGエントリーM00432の遺伝子を含むロイシン生合成経路；

KEGGエントリーM00016の遺伝子を含むリジン生合成経路；

KEGGエントリーM00525の遺伝子を含むリジン生合成経路；

KEGGエントリーM00526の遺伝子を含むリジン生合成経路；

KEGGエントリーM00527の遺伝子を含むリジン生合成経路；

KEGGエントリーM0030の遺伝子を含むリジン生合成経路；

KEGGエントリーM00433の遺伝子を含むリジン生合成経路；

KEGGエントリーM0031の遺伝子を含むリジン生合成経路；

KEGGエントリーM00015の遺伝子を含むプロリン生合成経路；

KEGGエントリーM00028の遺伝子を含むオルニチン生合成経路；

KEGGエントリーM00763の遺伝子を含むオルニチン生合成経路；

KEGGエントリーM00026の遺伝子を含むヒスチジン生合成経路；

KEGGエントリーM00022の遺伝子を含むシキミ酸生合成経路；

エントリーM00023の遺伝子を含むトリプトファン生合成経路；

KEGGエントリーM00024の遺伝子を含むフェニルアラニン生合成経路；

KEGGエントリーM00025の遺伝子を含むチロシン生合成経路；

KEGGエントリーM00040の遺伝子を含むチロシン生合成経路；及び

それらの生合成経路のいずれかの遺伝子の組み合わせ

からなる群から選択される生合成経路のアミノ酸の成分である遺伝子である、実施形態4に記載の組換え核酸分子。

6. 配列番号1～8からなる群から選択される1つ以上の追加のプロモーターポリヌクレオチド配列をさらに含み、各プロモーターが、少なくとも1つの追加の異種遺伝子に機能的に連結している、実施形態1に記載の組換え核酸分子。

7. 前記組換え核酸分子が単離されている、実施形態1に記載の組換え核酸分子。

8. 配列番号1～8からなる群から選択されるプロモーターポリヌクレオチド配列、及びそれらの組み合わせを含む、各プロモーターが、少なくとも1つの異種標的遺伝子に機能的に連結している、組換えベクター。

9. 前記プロモーターポリヌクレオチド配列が、配列番号1、5、及び7からなる群から選択される、実施形態8に記載の組換え核酸分子。

10. 配列番号1～8からなる群から選択されるプロモーターポリヌクレオチド配列、及びそれらの組み合わせを含む2つ以上の組換え核酸分子の組み合わせを含み、各プロモ

10

20

30

40

50

ーターが、少なくとも1つの異種標的遺伝子に機能的に連結している、実施形態8または9に記載の組換えベクター。

11. 前記プロモーターポリヌクレオチド配列の各々が、異なる異種標的遺伝子に機能的に連結している、実施形態10に記載の組換えベクター。

12. 前記標的遺伝子が、同じ代謝経路の一部である、実施形態11に記載の組換えベクター。

13. 前記標的遺伝子が、同じ代謝経路の一部ではない、実施形態11に記載の組換えベクター。

14. 実施形態1~6のいずれか1項に記載の組換え核酸分子、または実施形態10に記載のそれらの組み合わせ、または実施形態8~13のいずれか1項に記載の組換えベクターを含む、宿主細胞。

10

15. プロモーターポリヌクレオチド配列の組み合わせを含み、前記プロモーターポリヌクレオチド配列の各々が、異なる異種標的遺伝子に機能的に連結している、実施形態14に記載の宿主細胞。

16. 前記異なる異種標的遺伝子の各々が、同じ代謝経路の一部である、実施形態15に記載の宿主細胞。

17. 前記異なる異種標的遺伝子の各々が、同じ代謝経路の一部ではない、実施形態15に記載の宿主細胞。

18. *Corynebacterium*属に属する、実施形態14~17のいずれか1項に記載の宿主細胞。

20

19. *Corynebacterium glutamicum*である、実施形態18に記載の宿主細胞。

20. 実施形態12~19のいずれか1項に記載の宿主細胞を培養することを含み、前記1つ以上の標的遺伝子の各々が、配列番号1~8からなる群から選択されるポリヌクレオチド配列に機能的に連結した異なる異種標的遺伝子であり、各異種標的遺伝子の発現の改変が、上方調節または下方調節から独立して選択される、1つ以上の標的遺伝子の発現を改変する方法。

21. 実施形態12~19のいずれか1項に記載の宿主細胞を培養することを含み、前記1つ以上の標的遺伝子の各々が、配列番号1~8からなる群から選択されるポリヌクレオチド配列に機能的に連結した異なる異種標的遺伝子であり、各異種標的遺伝子の発現の改変が、上方調節または下方調節から独立して選択される、1つ以上の標的遺伝子の発現を改変する方法。

30

22. 生体分子を生成するのに適した条件下で、実施形態12~19のいずれか1項に記載の宿主細胞を培養することを含む、生体分子を生成する方法。

23. 前記生体分子が、L-アミノ酸である、実施形態20に記載の方法。

24. 前記L-アミノ酸が、L-リジンである、実施形態22に記載の方法。

25. 前記少なくとも1つの異種標的遺伝子が、アスパラギン酸-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(EC:1.2.1.11); 4-ヒドロキシ-テトラヒドロジピコリン酸シンターゼ(EC:4.3.3.7); ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ(EC:1.1.7.1.8); 2,3,4,5-テトラヒドロピリジン-2-カルボン酸N-スクシニルトランスフェラーゼ(EC:2.3.1.117); 2,3,4,5-テトラヒドロピリジン-2-カルボン酸N-スクシニルトランスフェラーゼ(EC:2.3.1.117); N-スクシニルジアミノピメリン酸アミノトランスフェラーゼ(EC:2.6.1.17); スクシニル-ジアミノピメリン酸デサクシニラーゼ(EC:3.5.1.18); ジアミノピメリン酸エピメラーゼ(EC:5.1.1.7); ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ(EC:4.1.1.20); ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ(EC:1.4.1.16); アスパルトキナーゼ *Ly s c* アルファ及びベ-タサブユニット(EC:2.7.2.4); アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(EC:2.6.1.1); ホスホトランスフェラーゼシステム(PTS); PTSのグルコース-特異的酵素 I I B C 成分(EC:2.7.1.69); グルコース-6-リン酸1-デヒドロ

40

50

ゲナーゼ (EC: 1.1.1.49 1.1.1.363); グルコース - 6 - リン酸イソメラーゼ (EC: 5.3.1.9); トランスケトラーゼ (EC: 2.2.1.1); 6 - ホスホフルクトキナーゼ 1 (EC: 2.7.1.11); ホスホエノ - ルピルビン酸カルボキシラーゼ (EC: 4.1.1.31); ピルビン酸カルボキシラーゼ (EC: 6.4.1.1); イソクエン酸デヒドロゲナーゼ (EC: 1.1.1.42); ホスホエノ - ルピルビン酸カルボキシキナーゼ (GTP) (EC: 4.1.1.32); オキサロ酢酸デカルボキシラーゼ (EC: 4.1.1.3); ホモセリンキナーゼ (EC: 2.7.1.39); ホモセリンデヒドロゲナーゼ (EC: 1.1.1.3); スレオニンシンターゼ (EC: 4.2.3.1)、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるタンパク質をコードする遺伝子である、実施形態 20 に記載の方法。

10

26. 異種標的遺伝子に機能的に連結した少なくとも 1 つのプロモーターポリヌクレオチドを含み、プロモーターポリヌクレオチドが、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、及び配列番号 8 からなる群から選択される配列を含む、宿主細胞。

27. 異種標的遺伝子に機能的に連結した 2 つ以上のプロモーターポリヌクレオチド配列の組み合わせを含み、各プロモーターポリヌクレオチドが、異なる異種標的遺伝子に機能的に連結している、実施形態 25 に記載の宿主細胞。

28. 前記組み合わせが、アスパラギン酸 - セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ (EC: 1.2.1.11); 4 - ヒドロキシ - テトラヒドロジピコリン酸シンターゼ (EC: 4.3.3.7); ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ (EC: 1.17.1.8); 2, 3, 4, 5 - テトラヒドロピリジン - 2 - カルボン酸 N - スクシニルトランスフェラーゼ (EC: 2.3.1.117); 2, 3, 4, 5 - テトラヒドロピリジン - 2 - カルボン酸 N - スクシニルトランスフェラーゼ (EC: 2.3.1.117); N - スクシニルジアミノピメリン酸アミノトランスフェラーゼ (EC: 2.6.1.17); スクシニル - ジアミノピメリン酸デサクシニラーゼ (EC: 3.5.1.18); ジアミノピメリン酸エピメラーゼ (EC: 5.1.1.7); ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ (EC: 4.1.1.20); ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ (EC: 1.4.1.16); アスパルトキナーゼ Lysc アルファ及びベ - タサブユニット (EC: 2.7.2.4); アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (EC: 2.6.1.1); ホスホトランスフェラーゼシステム (PTS); PTS のグルコース - 特異的酵素 I I B C 成分 (EC: 2.7.1.69); グルコース - 6 - リン酸 1 - デヒドロゲナーゼ (EC: 1.1.1.49 1.1.1.363); グルコース - 6 - リン酸イソメラーゼ (EC: 5.3.1.9); トランスケトラーゼ (EC: 2.2.1.1); 6 - ホスホフルクトキナーゼ 1 (EC: 2.7.1.11); ホスホエノ - ルピルビン酸カルボキシラーゼ (EC: 4.1.1.31); ピルビン酸カルボキシラーゼ (EC: 6.4.1.1); イソクエン酸デヒドロゲナーゼ (EC: 1.1.1.42); ホスホエノ - ルピルビン酸カルボキシキナーゼ (GTP) (EC: 4.1.1.32); オキサロ酢酸デカルボキシラーゼ (EC: 4.1.1.3); ホモセリンキナーゼ (EC: 2.7.1.39); ホモセリンデヒドロゲナーゼ (EC: 1.1.1.3); 及びスレオニンシンターゼ (EC: 4.2.3.1) からなる群から選択された 2 つの異種標的遺伝子を含み、各々が、配列番号 1 ~ 8 からなる群から選択されるプロモーターに機能的に連結している、実施形態 26 に記載の宿主細胞。

20

30

40

29. 前記組み合わせが、前記異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号 1、5、及び 7 からなる群から選択されるプロモーターを含む、実施形態 27 に記載の宿主細胞。

30. 前記組み合わせが、アスパラギン酸 - セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ (EC: 1.2.1.11); 4 - ヒドロキシ - テトラヒドロジピコリン酸シンターゼ (EC: 4.3.3.7); ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ (EC: 1.17.1.8); 2, 3, 4, 5 - テトラヒドロピリジン - 2 - カルボン酸 N - スクシニルトランスフェラーゼ (EC: 2.3.1.117); 2, 3, 4, 5 - テトラヒドロピリジン - 2 - カルボン酸 N - スクシニルトランスフェラーゼ (EC: 2.3.1.117); N - スクシニルジ

50

アミノピメリン酸アミノトランスフェラーゼ (EC: 2.6.1.17); スクシニル-ジアミノピメリン酸デサクシニラーゼ (EC: 3.5.1.18); ジアミノピメリン酸エピメラーゼ (EC: 5.1.1.7); ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ (EC: 4.1.1.20); ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ (EC: 1.4.1.16); アスパルトキナーゼ Lysc アルファ及びベ-タサブユニット (EC: 2.7.2.4); アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (EC: 2.6.1.1); ホスホトランスフェラーゼシステム (PTS); PTSのグルコース-特異的酵素 I I BC成分 (EC: 2.7.1.69); グルコース-6-リン酸1-デヒドロゲナーゼ (EC: 1.1.1.49 1.1.1.363); グルコース-6-リン酸イソメラーゼ (EC: 5.3.1.9); トランスケトラーゼ (EC: 2.2.1.1); 6-ホスホフルクトキナーゼ1 (EC: 2.7.1.11); ホスホエノ-ルピルビン酸カルボキシラーゼ (EC: 4.1.1.31); ピルビン酸カルボキシラーゼ (EC: 6.4.1.1); イソクエン酸デヒドロゲナーゼ (EC: 1.1.1.42); ホスホエノ-ルピルビン酸カルボキシキナーゼ (GTP) (EC: 4.1.1.32); オキサロ酢酸デカルボキシラーゼ (EC: 4.1.1.3); ホモセリンキナーゼ (EC: 2.7.1.39); ホモセリンデヒドロゲナーゼ (EC: 1.1.1.3); 及びスレオニンシンターゼ (EC: 4.2.3.1) からなる群から選択される3つの異種標的遺伝子を含み、各々が、配列番号1~8からなる群から選択されるプロモーターに機能的に連結している、実施形態26に記載の宿主細胞。

10

31. 前記組み合わせが、前記異種標的遺伝子に機能的に連結した配列番号1、5、及び7からなる群から選択されるプロモーターを含む、実施形態29に記載の宿主細胞。

20

32. 前記異種標的遺伝子が、同じ代謝経路の一部である、実施形態26に記載の宿主細胞。

33. 前記異種標的遺伝子が、同じ代謝経路の一部ではない、実施形態26に記載の宿主細胞。

34. *Corynebacterium* 属に属する、実施形態25~32のいずれか1項に記載の宿主細胞。

35. *Corynebacterium glutamicum* である、実施形態25~33のいずれか1項に記載の宿主細胞。

36. 実施形態25~34のいずれか1項に記載の宿主細胞を培養することを含み、各異種標的遺伝子の改変が、上方調節または下方調節から独立して選択され、前記上方調節または下方調節が、内因性プロモーターの制御下で前記標的遺伝子の発現のレベルに相対的である、1つ以上の標的遺伝子の発現を改変する方法。

30

37. 生体分子を生成するのに適した条件下で、実施形態25~35のいずれか1項に記載の宿主細胞を培養することを含む、生体分子を生成する方法。

38. 前記生体分子が、L-アミノ酸である、実施形態36に記載の方法。

39. 前記L-アミノ酸が、L-リジンである、実施形態37に記載の方法。

40. 前記少なくとも1つの異種標的遺伝子が、アスパラギン酸-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ (EC: 1.2.1.11); 4-ヒドロキシ-テトラヒドロジピコリン酸シンターゼ (EC: 4.3.3.7); ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ (EC: 1.1.7.1.8); 2,3,4,5-テトラヒドロピリジン-2-カルボン酸N-スクシニルトランスフェラーゼ (EC: 2.3.1.117); 2,3,4,5-テトラヒドロピリジン-2-カルボン酸N-スクシニルトランスフェラーゼ (EC: 2.3.1.117); N-スクシニルジアミノピメリン酸アミノトランスフェラーゼ (EC: 2.6.1.17); スクシニル-ジアミノピメリン酸デサクシニラーゼ (EC: 3.5.1.18); ジアミノピメリン酸エピメラーゼ (EC: 5.1.1.7); ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ (EC: 4.1.1.20); ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ (EC: 1.4.1.16); アスパルトキナーゼ Lysc アルファ及びベ-タサブユニット (EC: 2.7.2.4); アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (EC: 2.6.1.1); ホスホトランスフェラーゼシステム (PTS); PTSのグルコース-特異的

40

50

酵素 I I B C 成分 (E C : 2 . 7 . 1 . 6 9) ; グルコース - 6 - リン酸 1 - デヒドロゲナーゼ (E C : 1 . 1 . 1 . 4 9 1 . 1 . 1 . 3 6 3) ; グルコース - 6 - リン酸イソメラーゼ (E C : 5 . 3 . 1 . 9) ; トランスケトラーゼ (E C : 2 . 2 . 1 . 1) ; 6 - ホスホフルクトキナーゼ 1 (E C : 2 . 7 . 1 . 1 1) ; ホスホエノ - ルピルビン酸カルボキシラーゼ (E C : 4 . 1 . 1 . 3 1) ; ピルビン酸カルボキシラーゼ (E C : 6 . 4 . 1 . 1) ; イソクエン酸デヒドロゲナーゼ (E C : 1 . 1 . 1 . 4 2) ; ホスホエノ - ルピルビン酸カルボキシキナーゼ (G T P) (E C : 4 . 1 . 1 . 3 2) ; オキサロ酢酸デカルボキシラーゼ (E C : 4 . 1 . 1 . 3) ; ホモセリンキナーゼ (E C : 2 . 7 . 1 . 3 9) ; ホモセリンデヒドロゲナーゼ (E C : 1 . 1 . 1 . 3) ; スレオニンシンターゼ (E C : 4 . 2 . 3 . 1) 、 及びそれらの組み合わせからなる群から選択される、
実施形態 3 8 に記載の方法。

10

4 1 . 異種標的遺伝子に機能的に連結した少なくとも 1 つのプロモーターポリヌクレオチドを含み ; プロモーターポリヌクレオチドが、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、及び配列番号 8 から選択される配列を含み ; プロモーターポリヌクレオチドが、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 6、または配列番号 8 から選択される配列を含み、標的遺伝子が、プロモーターポリヌクレオチドの内因性遺伝子以外である、組換えベクター。

4 2 . 少なくとも 2 つのプロモーターポリヌクレオチドを含み、各プロモーターポリヌクレオチドが、異なる標的遺伝子に機能的に連結している、実施形態 4 0 に記載の組換えベクター。

20

4 3 . 標的遺伝子が、同じ代謝経路の一部である、実施形態 4 1 に記載の組換えベクター。

4 4 . 標的遺伝子が、同じ代謝経路の一部ではない、実施形態 4 2 に記載の組換えベクター。

4 5 . 実施形態 4 0 ~ 4 3 のいずれか 1 項に記載の組換えベクターで形質転換された、宿主細胞。

4 6 . *Corynebacterium* 属に属する、実施形態 4 4 に記載の宿主細胞。

4 7 . *Corynebacterium glutamicum* である、実施形態 4 6 に記載の宿主細胞。

4 8 . 実施形態 4 4 ~ 4 6 のいずれか 1 項に記載の宿主細胞を培養することを含み、各標的遺伝子の改変が、上方調節、及び下方調節から独立して選択される、1 つ以上の標的遺伝子の発現を改変する方法。

30

4 9 . 生体分子を生成するのに適した条件下で、実施形態 4 4 ~ 4 7 のいずれか 1 項に記載の宿主細胞を培養することを含む、生体分子を生成する方法。

5 0 . 前記生体分子が、L - アミノ酸である、実施形態 4 8 に記載の方法。

【 0 1 6 8 】

以下の実施例は、例示の目的で限定せずに提供される。

【 実施例 】

【 0 1 6 9 】

実施例 1 : 候補プロモーターの同定

40

以下の手順を使用して、天然の *C. glutamicum* プロモーターは、以下の基準 : 1) 構成的プロモーターのラダーを表すこと ; 及び 2) 短い DNA 配列、理想的には、1 0 0 未満の塩基対によってコードされ得ることの両方を満たした天然の *C. glutamicum* プロモーターを同定した。 *C. glutamicum* ATCC 13032 においてグローバル遺伝子発現レベルを記述している公開されたデータセット (Lee et al . , *Biotechnology Letters* , 2 0 1 3) を検査して、異なる成長条件にわたって恒常的に発現された遺伝子を同定した。発現レベルが、2 つの成長条件にわたって一定 (0 . 3 3 ~ 3 の間の発現比として定義される) のままであった、すなわち、過酸化水素の添加の有無し両方の最少培地におけるケモスタット成長であった遺伝子は、第 1 の基準を満たした。 *C. glutamicum* ATCC 13032 ト

50

ランスクリプトームを記述している公開されたデータセット (Pfeifer-Sancar et al., BMC Genomics 2013, 14:888) は、コンパクトプロモーターを有する遺伝子、すなわち、60塩基対コアプロモーター領域と、26~40の長さの塩基対の間の5プライム非翻訳領域とからなる遺伝子を見つけるために検査した。2つのデータセットを相互参照して、両方の基準を満たしたプロモーターを同定した。図1を参照されたい。5つ候補プロモーター (配列番号2、3、4、6、及び8) を選択して、さらに評価した。

【0170】

実施例2：候補プロモーター活性の評価

候補プロモーター活性を評価するため、蛍光レポーター構築物に基づく一連のプラスミドを設計した。簡単に言えば、各プロモーターを、eyfp、シャトルベクターpK18rep中の黄色の蛍光タンパク質をコードする遺伝子の前にクローニングした。これらのプラスミドを、C. glutamicum NRRL B-11474に形質転換し、分光分析法によるYFPタンパク質の蓄積を測定することによって、プロモーター活性を評価した。

【0171】

シャトルベクターpK18repは、pK18mobSacB (ATCC87087) 中のsacB遺伝子をpBL1複製起点 (GenBank: AF092037.1) と置き換えることによって構築し、E. coli及びC. glutamicumの両方で繁殖可能なベクターが得られた。簡単に言えば、プライマーpK18F (TCATGACC AAAATCCCTTAACGTG (配列番号9)) 及びpK18R (GCGTACTCTTCGATGGTGAAAACATCTC (配列番号10)) を用いて、E. coli複製起点及びカナマイシン耐性遺伝子nptIIを含有するpK18mobSacBの一部をPCR増幅し、pBL1複製起点をコードする合成DNAをプライマーpBL1F (GACCTAAAATGTGTAAAGGGCAAGTGATACaacaacaagacccatcatagtttgc (配列番号11))、及びpBL1R (CACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAcacatgcagtcattcgtgc (配列番号12)) でPCR増幅した。PCR生成物をDpnI (New England Biolabs) で必要に応じて処理し、DNA Clean & Concentrate-5 (Zymo Research) で精製し、製造者の指示書に従って、ギブソンアセンブリマスターミックス (NEB) によるギブソンアセンブリ方法を用いて組み立てた。製造者の指示書に従って、ギブソンアセンブリ反応をNEBターボコンピテント細胞 (New England Biolabs) に形質転換した。形質転換体をLB寒天+25µg/mLカナマイシン上で選択し、サンガーシークエンシングによって確認した。

【0172】

リポーター構築物pK18rep-Psod-eyfpは、pK18repの制限消化及びライゲーション、及びeyfp遺伝子上流のC. glutamicum ATCC13032からスーパーオキシドジスムターゼ (GenBank: BA000036.3) プロモーターをコードする191塩基対のDNA配列、続いて、EcoRI及びSalI制限部位が隣接したC. glutamicum ATCC13032からsod終結因子をコードする77塩基対のDNA配列からなる合成DNA構築物によって構築された。親ベクター及び合成DNA挿入をEcoRI-HF、及びSalI-HF (New England Biolabs) で消化し、得られた生成物をアガロースゲル上で実行した。製造者の指示書に従って、DNAをゲルから抽出し、Zymo Clean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research) を用いて精製し、T4 DNAリガーゼ (New England Biolabs) でライゲーションした。製造者の指示書に従って、ライゲーション反応をNEBターボコンピテント細胞 (New England Biolabs) に形質転換した。形質転換体をLB寒天+25µg/mLカナマイシン上で選択し、サンガーシークエンシングによって確認した。

10

20

30

40

50

【0173】

さらなるプロモーターリポーター構築物は、pK18rep-Psod-eyfp中のsodプロモーターを置き換えることによって構築された。sodプロモーターを除外するpK18rep-Psod-eyfpをプライマーpK18repR(gcttgcatgcctgcaggtcga(配列番号13))、及びyfpF(ATGGTGAGCAAGGCGAGGAGC(配列番号14))でPCR増幅した。PCR生成物をDpnI(New England Biolabs)で処理し、DNA Clean & Concentrate-5(Zymo Research)で精製し、製造者の指示書に従って、ギブソニアセンブリマスターミックス(NEB)によるギブソニアセンブリ方法を用いて、対象プロモーター+目的ベクターに対する25塩基対の相同配列をコードする合成DNA構築物と組み立てた。製造者の指示書に従って、ギブソニアセンブリ反応をNEBターボコンピテント細胞(New England Biolabs)に形質転換した。形質転換体をLB寒天+25µg/mLカナマイシン上で選択し、サンガーシークエンシングによって確認した。

10

【0174】

さらに、強力な構成的プロモーターPcg0007(配列番号2)を突然変異誘発のために選択した。C.glutamicumでは、-10要素は、プロモーター活性を決定するのに重要な役割を果たすと考えられる(Pfeifer-Sancar et al., BMC Genomics 2013, 14:888)ため、予測されたPc0007の-10要素(TAAGAT)における6つの位置のうちの4つを無作為化し、予測されたPcg0007の-10要素(TAAGAT)における6つの位置のうちの4つを無作為化し、より強力なプロモーター変異体と、減衰したプロモーター変異体(配列番号1、5、及び7)の両方を生成した。このライブラリーは、pK18rep-Pc0007-eyfpをPcg0007Fwd(GGAACGTCTGTATCGGATAAGTAG(配列番号15))及びPc0007Rev(CTACTTATCCGATACAGACGTTTCCANNNNACACGCTTAGGTCCCCACGTAGTACCA(配列番号16))でPCR増幅し、DpnI(New England Biolabs)で処理し、製造者の指示書に従って、ギブソニアセンブリマスターミックス(NEB)によるギブソニアセンブリ方法を用いて組み立てることによって生成された。製造者の指示書に従って、ギブソニアセンブリ反応をNEBターボコンピテント細胞(New England Biolabs)に形質転換した。形質転換体をLB寒天+25µg/mLカナマイシン上で選択し、個々のコロニーをサンガーシークエンシングによって特徴付けた。寒天を削り取ることによってコロニーをプールし、精製されたプラスミドDNAをZippyミニプレップキット(Zymo Research)を用いて単離した。

20

30

【0175】

精製されたりポーター構築物プラスミドを、エレクトロポレーションによってC.glutamicumNRRL B-11474に形質転換した(Haynes et al., Journal of General Microbiology, 1990)。形質転換体をBHI寒天+25µg/mLカナマイシン上で選択した。形質転換ごとに、複数の単一コロニーを選び、300µLのBHI培地+25µg/mLのカナマイシンを含有する96ミッドウェルブロックの個々のウェルに接種した。1,000rpmで撹拌しながら30にて48時間インキュベーションによって、細胞を飽和に成長させた。インキュベーション後、培養物を3,500rpmで5分間遠心分離し、吸引によって培地を除去した。300µLのPBS中の再懸濁によって細胞を1回洗浄し、3,500rpmで5分間遠心分離した後、上清を吸引し、300µLのPBS中で最終の再懸濁をした。この混合物の20µLのアリコート、180µLのPBSを含有する96ウェルの全領域が黒の透明底のアッセイプレートに移した。SpectraMax M5マイクロプレートリーダーで600nmでの細胞の光学密度を測定し、514nmで励起し、527nmでの放射を測定することによって、TECAN M1000マイクロプレートリーダーで蛍光を測定した。ウェルごとに、蛍光を光学密度で割ることによって、正規化された

40

50

蛍光活性を算出した。親プラスミド pK18rep は、陰性対照として作用した。正規化された蛍光活性をリポーター構築物間、及び生物学的複製物間で比較した（図2）。プロモーター活性の数値的な概要を以下の表5に提示する。

【0176】

【表5】

表5：プロモーターの制御下で黄色蛍光タンパク質を発現する組換え *C. glutamicum*

株	配列番号	複製の番号	平均活性	標準偏差	平均の標準誤差	95%信頼区間	相対発現
0007_lib_39	1	12	114402	52987.9	15296	80735-148069	1167
Pcg1860-eyfp	2	19	89243	16162.2	3708	81453-97033	911
Pcg0007-eyfp	3	19	44527	18110.3	4155	35798-53256	454
Pcg0755-eyfp	4	10	43592	3643	1152	40986-46198	445
0007_lib_265	5	11	11286	10459.4	3154	4260-18313	115
Pcg3381-eyfp	6	19	4723	1854.3	425	3829-5617	48
0007_lib_119	7	18	661	731.9	173	297-1025	7
Pcg3121-eyfp	8	14	98	537.5	144	-212-409	1
pK18rep	-	20	-45	214.9	48	-145-56	

【0177】

実施例3：L-リジン生合成経路への候補プロモーターの適用

本開示のプロモーターは、宿主細胞中の生体分子の生成のための処理を改善するのに有用である。本開示のプロモーターの適用及び使用の例は、アミノ酸L-リジンの生成に関する。図3は、L-リジンの生成のための生合成経路を提示し、中間体を経路から分岐させて、全体のL-リジン収率を減少させる遺伝子 *pck*、*odx*、*icd*、及び *hom*（例えば、ホモセリン/スレオニンシンターゼ経路）を含む。*C. glutamicum* 株 ATCC 13032 の記号、遺伝子名、酵素委員会番号（EC番号）、及びマップ位置を以下の表3に提供する。

【0178】

表3に提供される標的遺伝子に機能的に連結した配列番号1~8のプロモーターを含む組換えベクターを、酵母菌相同組換えクローニング技術を用いて、*Corynebacterium* クローニングベクターにクローニングし、直接繰り返し領域に各プロモーターが隣接しているベクターを組み立て、標的遺伝子座での *Corynebacterium glutamicum* の相同組換えを提供した。組換え時には、内因性プロモーターは、内因性 *C. glutamicum* 遺伝子座におけるそれぞれの標的遺伝子に機能的に連結した配列番号1~8のプロモーターによって置き換えられる。プロモーター及び機能的に連結した標的遺伝子を含む種々の標的ベクターは、0.5Kb、1Kb、2Kb、及び5Kbの範囲の相同組換え（homology directed）繰り返しアーム長さ範囲を含んだ。各DNA挿入は、テンプレートとして、市販供給されるオリゴ、及び上述の宿主株ゲノムDNAを用いて相同領域のPCR増幅によって生成された。ゲノムに導入されるプロモーターは、オリゴ尾においてコードされる。酵母菌中の相同組換えを用いて、PCR断片をベクターバックボーンに組み立てた。

【0179】

標準的なヒートショック形質転換技術を用いて、ベクターをまず *E. coli* に形質転換し、正しく組み立てられたクローンを同定し、検証する。形質転換された *E. coli* 細菌は、組み立てが成功したか試験する。各 *E. coli* 形質転換プレートから4つのコ

コロニーを培養し、PCRを介して組み立てが正しいか試験する。E. coli 宿主中でベクターを増幅し、Corynebacterium 形質転換のためのベクターDNAを提供する。

【0180】

検証されたクローンは、エレクトロポレーションを介してCorynebacterium glutamicum 宿主細胞に形質転換される。形質転換ごとに、DNA 1 µg 当たりのコロニー形成単位(CFU)の数を、挿入サイズの関数として決定する。コリネゲノム統合は、相同アーム長さの関数として分析される。より短いアームは、効率がより低かった。

【0181】

挿入カセットの統合が成功したのものとして同定されたCorynebacterium の培養を、5%スクロースを含有する培地上で培養し、sacB 選択遺伝子のループアウトについてカウンターセレクトした。種々の相同組換え繰り返しアームのスクロース耐性頻度は、アーム長さで著しく変動しない。これらの結果は、ループアウト効率が、0.5 kb ~ 5 kb の相同アーム長さにわたって一定に保たれることを示唆している。

【0182】

ループアウト事象をさらに検証するために、スクロース耐性を示すコロニーを培養し、シーケンシングを介して分析した。挿入ゲノム領域のシーケンシングの結果を以下の表6にまとめる。

【0183】

【表6】

表6：ループアウト検証の頻度

結果	頻度 (サンプリング誤差 95%信頼)
ループアウトが成功	13% (9%/20%)
ループがまだ存在	42% (34%/50%)
混合読み取り	44% (36%/52%)

【0184】

シーケンシング結果は、ループアウトにおいて10~20%の効率を示す。任意の特定の理論に限定されないが、ループアウトは、挿入配列に依存してもよい。正しい場合であっても、10~20%スクロース耐性コロニーのピッキングは、高い成功率につながる。

【0185】

統合の際に、組換えベクターは、内因性プロモーター配列を、Pcg1860 (配列番号2)、Pcg0007 (配列番号3)、Pcg0755 (配列番号4)、Pcg0007__lib__265 (配列番号5)、Pcg3381 (配列番号6)、Pcg007__lib__119 (配列番号7)、及びPcg3121 (配列番号8) からなる群から選択されるプロモーターと置き換える。得られた組換え株のリストを以下の表7に提供する。

【0186】

複数の単一コロニー(表7ではN)を選択し、接種し、小規模培養として成長させる。試験プロモーターを含む新しく作成された各株を、生成物力価性能を評価するように設計された小規模培養におけるリジン収率について試験する。工業規模培養からの培地を用いて、小規模培養を実施する。生成物力価は、標準比色アッセイによる炭素消費(すなわち、単一バッチ収率の代表例)で光学的に測定される。簡単に言えば、濃縮アッセイ混合物を調製し、試薬の最終濃度が、160 mMのリン酸ナトリウム緩衝液、0.2 mMのAm

10

20

30

40

50

plex Red、0.2 U/mLの西洋ワサビペルオキシダーゼ、及び0.005 U/mLのリジンオキシダーゼであるように発酵試料を添加する。反応を完了まで進行し、Tecan M1000プレート分光光度計を用いて、560 nm波長での光学密度を測定する。

【0187】

表7に示すように、L-リジンの収率は、操作されていない株よりも24%以上に増加する(例えば、組換え株7000007840)。他の実施形態では、L-リジンの収率は、ほぼ90%減少する(例えば、組換え株700000773)。表7に提供されるように、pgi及びzwfのプロモーターの置換は、L-リジン生成に対して10%を超える改善をもたらす。

10

【0188】

とりわけ、L-リジンの生成は、最も活性なプロモーターの組み込みに単に依存していることはない。図4に示すように、リジン収率は、比較的弱いプロモーター(例えば、1、7x、または48xの相対プロモーター発現を有するpgi、または7xの相対プロモーター強度でのdapB)によって最大になり、または中間発現(例えば、454xの相対プロモーター発現を有するlysA)によって最大になる。場合によっては、相対プロモーター強度が最大になる場合に(例えば、ppc)、発現は最大になる。図5で例示されるように、遺伝的経路(図3)における遺伝子の位置は、L-リジン収率または最適プロモーター強度の相対増加または相対減少を確実に予測しない。例えば、高レベルのcg0931の発現は、収率の改善をもたらす一方、より高レベルのdapDは、収率を全く改善しないかまたは収率の減少をもたらす。

20

【0189】

【表 7 - 1】

表 7 : L-リジン生合成遺伝子の発現が改変された *C. glutamicum* の組換え株

株	プロモーター-標的	N	平均 (A_{560})	標準誤差	ベースから収率の%変化量
7000007713	Pcg1860-asd	8	0.84595	0.00689	3.927615
7000007736	Pcg0755-asd	4	0.84036	0.00974	3.240866
7000007805	Pcg0007_119-asd	8	0.82493	0.00689	1.345242
7000007828	Pcg3121-asd	8	0.8246	0.00689	1.3047
7000007759	Pcg0007_265-asd	8	0.81155	0.00689	-0.29853
7000007782	Pcg3381-asd	8	0.8102	0.00689	-0.46438
7000007712	Pcg1860-ask	8	0.83958	0.00689	3.14504
7000007735	Pcg0755-ask	8	0.81673	0.00689	0.337846
7000007827	Pcg3121-ask	8	0.81498	0.00689	0.122853
7000007804	Pcg0007_119-ask	8	0.81492	0.00689	0.115482
7000007758	Pcg0007_265-ask	8	0.80381	0.00689	-1.24942
7000007781	Pcg3381-ask	8	0.80343	0.00689	-1.2961
7000007780	Pcg3381-aspB	8	0.84072	0.00689	3.285093
7000007803	Pcg0007_119-aspB	8	0.82106	0.00689	0.8698
7000007809	Pcg0007_119-cg0931	8	0.83446	0.00689	2.516032
7000007717	Pcg1860-cg0931	4	0.83129	0.00974	2.126588
7000007763	Pcg0007_265-cg0931	4	0.82628	0.00974	1.511094
7000007671	Pcg0007_39-cg0931	8	0.82554	0.00689	1.420182
7000007740	Pcg0755-cg0931	8	0.81921	0.00689	0.642522
7000007694	Pcg0007-cg0931	8	0.80444	0.00689	-1.17202
7000007691	Pcg0007-dapA	8	0.8299	0.00689	1.955822
7000007783	Pcg3381-dapA	8	0.80951	0.00689	-0.54915
7000007760	Pcg0007_265-dapA	8	0.76147	0.00689	-6.45102
7000007806	Pcg0007_119-dapA	8	0.35394	0.00689	-56.5174
7000007761	Pcg0007_265-dapB	8	0.84157	0.00689	3.389518
7000007738	Pcg0755-dapB	4	0.84082	0.00974	3.297378
7000007692	Pcg0007-dapB	8	0.83088	0.00689	2.076218
7000007784	Pcg3381-dapB	8	0.82474	0.00689	1.3219
7000007715	Pcg1860-dapB	8	0.82232	0.00689	1.024595
7000007830	Pcg3121-dapB	8	0.81236	0.00689	-0.19902
7000007807	Pcg0007_119-dapB	4	0.69622	0.00974	-14.4672
7000007762	Pcg0007_265-dapD	8	0.84468	0.00689	3.771591
7000007808	Pcg0007_119-dapD	8	0.83869	0.00689	3.035701
7000007785	Pcg3381-dapD	8	0.83397	0.00689	2.455834
7000007670	Pcg0007_39-dapD	8	0.81698	0.00689	0.368559
7000007831	Pcg3121-dapD	4	0.8155	0.00974	0.186737
7000007693	Pcg0007-dapD	8	0.8117	0.00689	-0.28011

10

20

30

40

【表 7 - 2】

株	プロモーター-標的	N	平均 (A ₅₆₀)	標準誤差	ベースから収率の%変化量
7000007716	Pcg1860-dapD	8	0.79044	0.00689	-2.89196
7000007739	Pcg0755-dapD	8	0.78694	0.00689	-3.32195
7000007787	Pcg3381-dapE	8	0.83814	0.00689	2.968132
7000007833	Pcg3121-dapE	8	0.83721	0.00689	2.853878
7000007741	Pcg0755-dapE	8	0.83263	0.00689	2.291211
7000007810	Pcg0007_119-dapE	8	0.83169	0.00689	2.175729
7000007718	Pcg1860-dapE	8	0.81855	0.00689	0.561439
7000007672	Pcg0007_39-dapE	8	0.80932	0.00689	-0.5725
7000007765	Pcg0007_265-dapF	8	0.8327	0.00689	2.299811
7000007788	Pcg3381-dapF	8	0.82942	0.00689	1.896853
7000007811	Pcg0007_119-dapF	8	0.82926	0.00689	1.877196
7000007696	Pcg0007-dapF	8	0.82099	0.00689	0.861201
7000007719	Pcg1860-dapF	8	0.82067	0.00689	0.821888
7000007673	Pcg0007_39-dapF	8	0.82062	0.00689	0.815745
7000007789	Pcg3381-ddh	8	0.84817	0.00689	4.200349
7000007835	Pcg3121-ddh	8	0.82141	0.00689	0.912799
7000007812	Pcg0007_119-ddh	8	0.82093	0.00689	0.853829
7000007674	Pcg0007_39-ddh	8	0.81494	0.00689	0.117939
7000007720	Pcg1860-ddh	8	0.81473	0.00689	0.09214
7000007766	Pcg0007_265-ddh	8	0.81427	0.00689	0.035627
7000007743	Pcg0755-ddh	8	0.80655	0.00689	-0.9128
7000007697	Pcg0007-ddh	8	0.80621	0.00689	-0.95457
7000007779	Pcg3381-fbp	8	0.85321	0.00689	4.819529
7000007802	Pcg0007_119-fbp	4	0.81425	0.00974	0.03317
7000007710	Pcg1860-fbp	4	0.40253	0.00974	-50.5479
7000007687	Pcg0007-fbp	8	0.14881	0.00689	-81.7182
7000007825	Pcg3121-fbp	4	0.12471	0.00974	-84.679
7000007733	Pcg0755-fbp	4	0.08217	0.00974	-89.9052
7000007746	Pcg0755-hom	8	0.81925	0.00689	0.647436
7000007792	Pcg3381-hom	4	0.77674	0.00974	-4.57505
7000007723	Pcg1860-hom	8	0.71034	0.00689	-12.7325
7000007838	Pcg3121-hom	8	0.559	0.00689	-31.3251
7000007800	Pcg0007_119-icd	8	0.83236	0.00689	2.258041
7000007823	Pcg3121-icd	8	0.83155	0.00689	2.15853
7000007777	Pcg3381-icd	8	0.82844	0.00689	1.776456
7000007708	Pcg1860-icd	8	0.82384	0.00689	1.211332
7000007662	Pcg0007_39-icd	12	0.82008	0.00562	0.749404
7000007685	Pcg0007-icd	8	0.81257	0.00689	-0.17322
7000007754	Pcg0007_265-icd	4	0.81172	0.00974	-0.27765

10

20

30

40

【表 7 - 3】

株	プロモーター-標的	N	平均 (A_{560})	標準誤差	ベースから収率の%変化量
7000007698	Pcg0007-lysA	4	0.8504	0.00974	4.474311
7000007675	Pcg0007_39-lysA	8	0.84414	0.00689	3.705251
7000007836	Pcg3121-lysA	4	0.83545	0.00974	2.637657
7000007767	Pcg0007_265-lysA	8	0.83249	0.00689	2.274012
7000007813	Pcg0007_119-lysA	8	0.83096	0.00689	2.086046
7000007790	Pcg3381-lysA	8	0.8118	0.00689	-0.26782
7000007676	Pcg0007_39-lysE	8	0.84394	0.00689	3.68068
7000007699	Pcg0007-lysE	4	0.83393	0.00974	2.45092
7000007768	Pcg0007_265-lysE	8	0.83338	0.00689	2.383351
7000007837	Pcg3121-lysE	4	0.83199	0.00974	2.212585
7000007791	Pcg3381-lysE	8	0.81476	0.00689	0.095825
7000007814	Pcg0007_119-lysE	8	0.81315	0.00689	-0.10197
7000007775	Pcg3381-odx	8	0.82237	0.00689	1.030738
7000007752	Pcg0007_265-odx	8	0.81118	0.00689	-0.34399
7000007729	Pcg0755-odx	8	0.81103	0.00689	-0.36242
7000007683	Pcg0007-odx	8	0.80507	0.00689	-1.09462
7000007706	Pcg1860-odx	4	0.79332	0.00974	-2.53815
7000007660	Pcg0007_39-odx	8	0.79149	0.00689	-2.76297
7000007798	Pcg0007_119-odx	8	0.77075	0.00689	-5.31094
7000007821	Pcg3121-odx	4	0.74788	0.00974	-8.12059
7000007822	Pcg3121-pck	8	0.85544	0.00689	5.093491
7000007776	Pcg3381-pck	8	0.8419	0.00689	3.43006
7000007799	Pcg0007_119-pck	8	0.83851	0.00689	3.013588
7000007753	Pcg0007_265-pck	8	0.82738	0.00689	1.646232
7000007730	Pcg0755-pck	4	0.81785	0.00974	0.475442
7000007661	Pcg0007_39-pck	8	0.80976	0.00689	-0.51844
7000007684	Pcg0007-pck	8	0.79007	0.00689	-2.93742
7000007707	Pcg1860-pck	8	0.71566	0.00689	-12.0789
7000007840	Pcg3121-pgi	4	1.01046	0.00974	24.13819
7000007817	Pcg0007_119-pgi	7	0.99238	0.00736	21.917
7000007794	Pcg3381-pgi	7	0.99008	0.00736	21.63444
7000007771	Pcg0007_265-pgi	8	0.94665	0.00689	16.29893
7000007725	Pcg1860-pgi	8	0.85515	0.00689	5.057864
7000007702	Pcg0007-pgi	4	0.8056	0.00974	-1.02951
7000007658	Pcg0007_39-ppc	4	0.85221	0.00974	4.696676
7000007750	Pcg0007_265-ppc	8	0.84486	0.00689	3.793705
7000007727	Pcg0755-ppc	8	0.84166	0.00689	3.400575
7000007773	Pcg3381-ppc	4	0.82883	0.00974	1.824369
7000007796	Pcg0007_119-ppc	8	0.82433	0.00689	1.27153

10

20

30

40

【表 7 - 4】

株	プロモーター-標的	N	平均 (A_{560})	標準誤差	ベースから収率の%変化量
7000007704	Pcg1860-ppc	8	0.81736	0.00689	0.415244
7000007819	Pcg3121-ppc	8	0.79898	0.00689	-1.8428
7000007732	Pcg0755-ptsG	8	0.84055	0.00689	3.264208
7000007709	Pcg1860-ptsG	8	0.81075	0.00689	-0.39682
7000007663	Pcg0007_39-ptsG	8	0.80065	0.00689	-1.63763
7000007778	Pcg3381-ptsG	8	0.23419	0.00689	-71.229
7000007801	Pcg0007_119-ptsG	8	0.17295	0.00689	-78.7525
7000007824	Pcg3121-ptsG	8	0.16035	0.00689	-80.3005
7000007705	Pcg1860-pyc	8	0.85143	0.00689	4.60085
7000007728	Pcg0755-pyc	8	0.79803	0.00689	-1.95951
7000007659	Pcg0007_39-pyc	8	0.75539	0.00689	-7.19797
7000007751	Pcg0007_265-pyc	8	0.73664	0.00689	-9.50146
7000007682	Pcg0007-pyc	4	0.73142	0.00974	-10.1428
7000007774	Pcg3381-pyc	4	0.66667	0.00974	-18.0975
7000007797	Pcg0007_119-pyc	4	0.52498	0.00974	-35.5046
7000007820	Pcg3121-pyc	8	0.52235	0.00689	-35.8277
7000007841	Pcg3121-tkt	8	0.82565	0.00689	1.433696
7000007818	Pcg0007_119-tkt	8	0.81674	0.00689	0.339075
7000007749	Pcg0755-tkt	8	0.81496	0.00689	0.120396
7000007703	Pcg0007-tkt	4	0.76763	0.00974	-5.69424
7000007795	Pcg3381-tkt	8	0.72213	0.00689	-11.2841
7000007772	Pcg0007_265-tkt	8	0.68884	0.00689	-15.3738
7000007701	Pcg0007-zwf	4	0.95061	0.00974	16.78542
7000007747	Pcg0755-zwf	8	0.92595	0.00689	13.75587
7000007770	Pcg0007_265-zwf	8	0.9029	0.00689	10.9241
7000007724	Pcg1860-zwf	8	0.79309	0.00689	-2.5664
7000007839	Pcg3121-zwf	4	0.13379	0.00974	-83.5635

10

20

30

【0190】

実施例 4 : L - リジン生合成経路の操作

L - リジンの収率は、表 8 に提供されるように、標的遺伝子に対するプロモーターの対をスワッピングすることで修正される。実施例 3 の構築物を使用して、表 8 に提供されるように、組換え有機体を調製する。示すように、Pcg0007-lysA と Pcg3121-pgi の組み合わせは、最も高い収率の L - リジンをもたらす。

40

【0191】

【表 8 - 1】

表 8 : L-リジン生合成経路における標的遺伝子の対プロモータースイッチング

株 ID	番号	PRO スワップ 1	PRO スワップ 2	平均収率 (A ₅₆₀)	標準偏差
7000008489	4	Pcg0007-lysA	Pcg3121-pgi	1.17333	0.020121
7000008530	8	Pcg1860-ptyc	Pcg0007-zwf	1.13144	0.030023
7000008491	7	Pcg0007-lysA	Pcg0007-zwf	1.09836	0.028609
7000008504	8	Pcg3121-pck	Pcg0007-zwf	1.09832	0.021939
7000008517	8	Pcg0007_39-ppc	Pcg0007-zwf	1.09502	0.030777
7000008502	4	Pcg3121-pck	Pcg3121-pgi	1.09366	0.075854
7000008478	4	Pcg3381-ddh	Pcg0007-zwf	1.08893	0.025505
7000008465	4	Pcg0007_265-dapB	Pcg0007-zwf	1.08617	0.025231
7000008535	8	Pcg0007-zwf	Pcg3121-pgi	1.06261	0.019757
7000008476	6	Pcg3381-ddh	Pcg3121-pgi	1.04808	0.084307
7000008510	8	Pcg3121-pgi	Pcg1860-ptyc	1.04112	0.021087
7000008525	8	Pcg1860-ptyc	Pcg0007_265-dapB	1.0319	0.034045
7000008527	8	Pcg1860-ptyc	Pcg0007-lysA	1.02278	0.043549
7000008452	5	Pcg1860-asd	Pcg0007-zwf	1.02029	0.051663
7000008463	4	Pcg0007_265-dapB	Pcg3121-pgi	1.00511	0.031604
7000008524	8	Pcg1860-ptyc	Pcg1860-asd	1.00092	0.026355
7000008458	4	Pcg3381-aspB	Pcg1860-ptyc	1.00043	0.020083
7000008484	8	Pcg3381-fbp	Pcg1860-ptyc	0.99686	0.061364
7000008474	8	Pcg3381-ddh	Pcg3381-fbp	0.99628	0.019733
7000008522	8	Pcg0755-ptsG	Pcg3121-pgi	0.99298	0.066021
7000008528	8	Pcg1860-ptyc	Pcg3121-pck	0.99129	0.021561
7000008450	4	Pcg1860-asd	Pcg3121-pgi	0.98262	0.003107
7000008448	8	Pcg1860-asd	Pcg3381-fbp	0.97814	0.022285
7000008494	8	Pcg0007_39-lysE	Pcg3381-fbp	0.97407	0.027018
7000008481	8	Pcg3381-fbp	Pcg0007-lysA	0.9694	0.029315
7000008497	8	Pcg0007_39-lysE	Pcg1860-ptyc	0.9678	0.028569
7000008507	8	Pcg3121-pgi	Pcg3381-fbp	0.96358	0.035078
7000008501	8	Pcg3121-pck	Pcg0007-lysA	0.96144	0.018665
7000008486	8	Pcg0007-lysA	Pcg0007_265-dapB	0.94523	0.017578
7000008459	8	Pcg0007_265-dapB	Pcg1860-asd	0.94462	0.023847
7000008506	2	Pcg3121-pgi	Pcg0007_265-dapD	0.94345	0.014014
7000008487	8	Pcg0007-lysA	Pcg3381-ddh	0.94249	0.009684
7000008498	8	Pcg3121-pck	Pcg1860-asd	0.94154	0.016802
7000008485	8	Pcg0007-lysA	Pcg1860-asd	0.94135	0.013578
7000008499	8	Pcg3121-pck	Pcg0007_265-dapB	0.93805	0.013317
7000008472	8	Pcg3381-ddh	Pcg1860-asd	0.93716	0.012472
7000008511	8	Pcg0007_39-ppc	Pcg1860-asd	0.93673	0.015697

10

20

30

40

【表 8 - 2】

株 ID	番号	PRO スワップ 1	PRO スワップ 2	平均収率 (A ₅₆₀)	標準偏差
7000008514	8	Pcg0007_39-ppc	Pcg0007-lysA	0.93668	0.027204
7000008473	8	Pcg3381-ddh	Pcg0007_265-dapB	0.93582	0.030377
7000008461	7	Pcg0007_265-dapB	Pcg3381-fbp	0.93498	0.037862
7000008512	8	Pcg0007_39-ppc	Pcg0007_265-dapB	0.93033	0.017521
7000008456	8	Pcg3381-aspB	Pcg3121-pck	0.92544	0.020075
7000008460	8	Pcg0007_265-dapB	Pcg0007_265-dapD	0.91723	0.009508
7000008492	8	Pcg0007_39-lysE	Pcg3381-aspB	0.91165	0.012988
7000008493	8	Pcg0007_39-lysE	Pcg0007_265-dapD	0.90609	0.031968
7000008453	8	Pcg3381-aspB	Pcg0007_265-dapB	0.90338	0.013228
7000008447	8	Pcg1860-asd	Pcg0007_265-dapD	0.89886	0.028896
7000008455	8	Pcg3381-aspB	Pcg0007-lysA	0.89531	0.027108
7000008454	6	Pcg3381-aspB	Pcg3381-ddh	0.87816	0.025807
7000008523	8	Pcg0755-ptsG	Pcg1860-pyc	0.87693	0.030322
7000008520	8	Pcg0755-ptsG	Pcg3381-fbp	0.87656	0.018452
7000008533	4	Pcg0007-zwf	Pcg3381-fbp	0.84584	0.017012
7000008519	8	Pcg0755-ptsG	Pcg0007_265-dapD	0.84196	0.025747

10

20

【0192】

本明細書において参照される全ての米国特許、米国特許出願公開広報、米国特許出願、外国特許、外国特許出願、及び非特許刊行物は、本記述と矛盾しない範囲でその全体を参照により本明細書に組み込まれる。

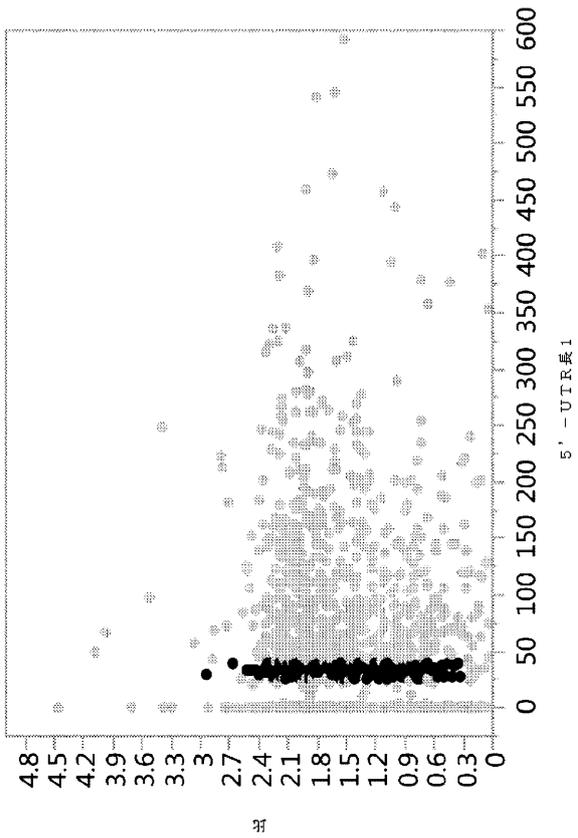
【0193】

上記のことから、本明細書に記載の特定の実施形態は例示の目的のために本明細書に記載されているが、本明細書に記載の精神及び範囲から逸脱することなく種々の修正がなされ得ることが理解されるであろう。したがって、本開示は、添付される特許請求の範囲による場合を除いて限定されない。

30

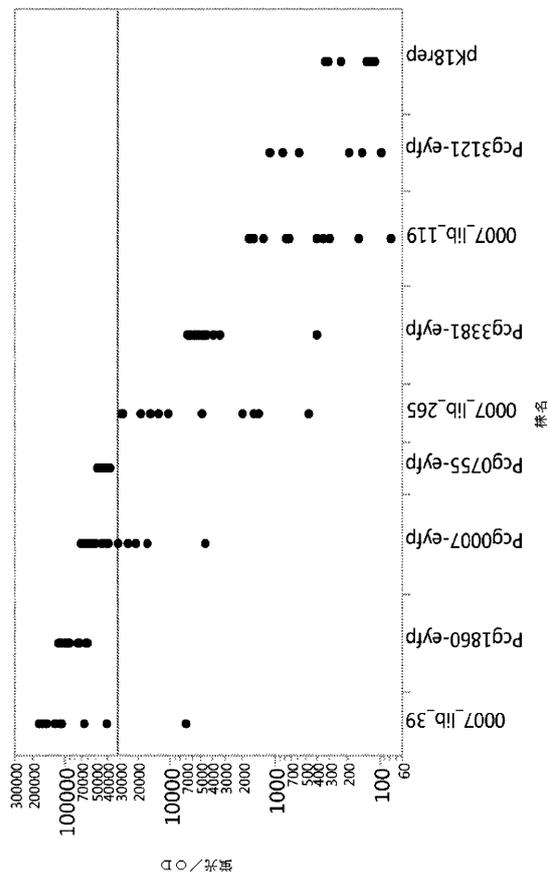
【 図 1 】

【 図 1 】



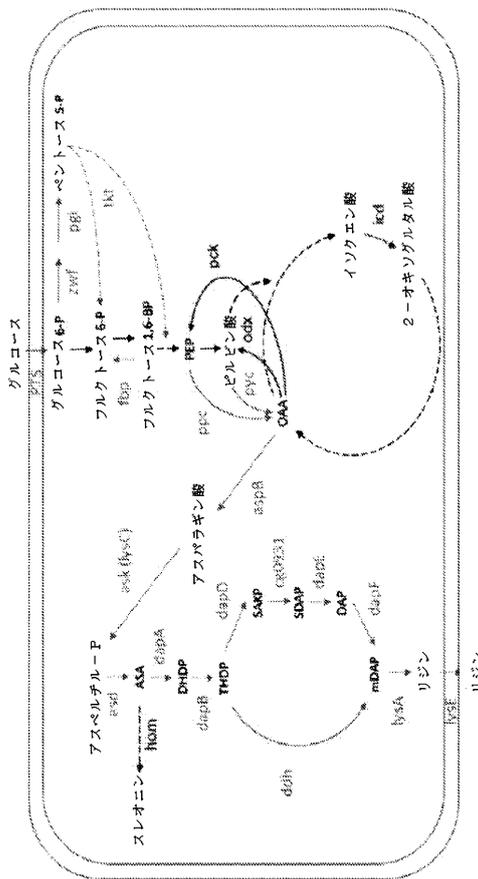
【 図 2 】

【 図 2 】



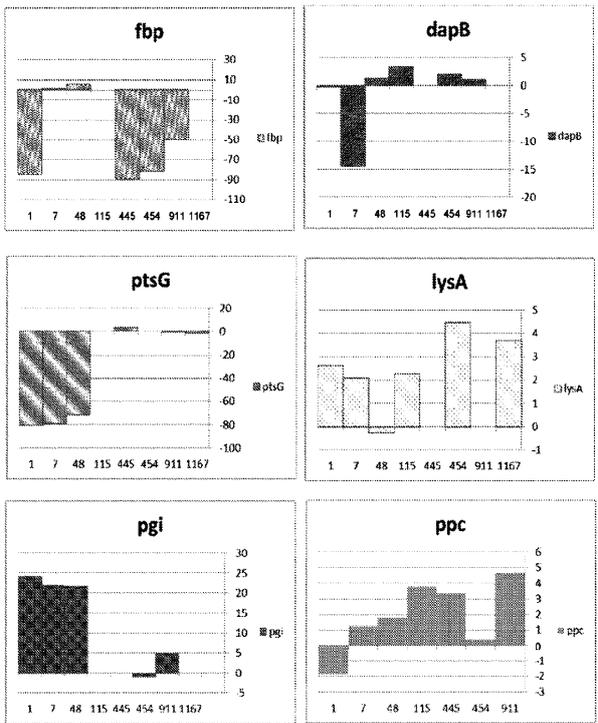
【 図 3 】

【 図 3 】



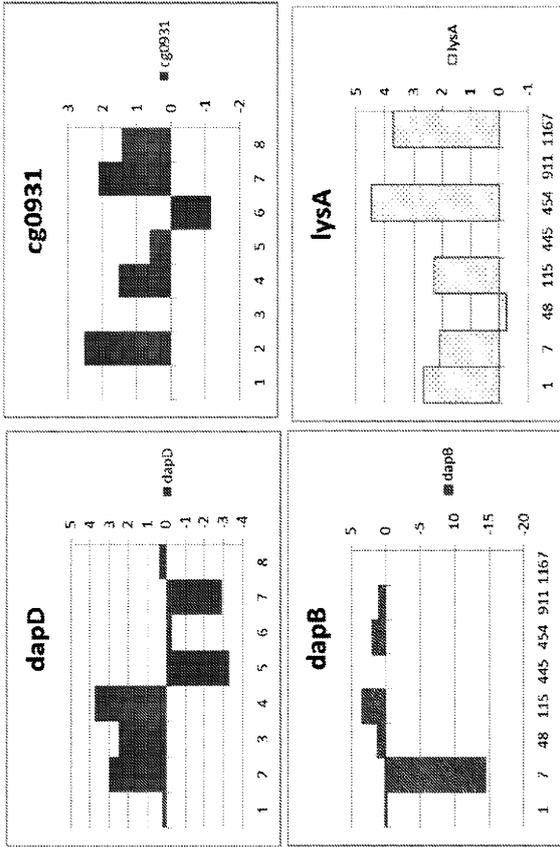
【 図 4 】

【 図 4 】



【 5 】

【 図 5 】



【 配列表 】

0006821598000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 サーバー, ザック
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94965, ソーサリト, エブタイト アベニュー 100, アパートメント 230
- (72)発明者 ゴラ, キャサリン ジー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94609, オークランド, 60ティーエイチ ストリート 649
- (72)発明者 マンチェスター, ショーン ピー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94611, オークランド, 38ティーエイチ ストリート 278

審査官 福澤 洋光

- (56)参考文献 国際公開第2006/028063(WO, A1)
Trop. J. Pharm. Res., 2013, 12(1), pp.51-56
Bioeng. Bugs, 2010, 1(2), pp.116-131
J. Biotechnol., 2003, 104(1-3), pp.311-323
Microbiology, 1996, 142(Pt 5), pp.1297-1309

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/00 - 15/90
CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
PubMed