

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成25年6月20日(2013.6.20)

【公表番号】特表2012-525156(P2012-525156A)

【公表日】平成24年10月22日(2012.10.22)

【年通号数】公開・登録公報2012-043

【出願番号】特願2012-508799(P2012-508799)

【国際特許分類】

C 12 N 1/21 (2006.01)

C 12 N 15/09 (2006.01)

C 12 P 7/04 (2006.01)

C 12 P 7/16 (2006.01)

【F I】

C 12 N 1/21 Z N A

C 12 N 15/00 A

C 12 P 7/04

C 12 P 7/16

【手続補正書】

【提出日】平成25年4月26日(2013.4.26)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

イソプロパノール経路を有する非天然微生物であって、イソプロパノールを産生するのに十分な量で発現するイソプロパノール経路酵素をコードする少なくとも1つの外来性核酸を含み、該イソプロパノール経路がアセトアセタートデカルボキシラーゼ(1G)、4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼ(1A)、クロトナーゼ(1B)、3-ヒドロキシブチリル-CoA脱水素酵素(1C)、アセトアセチル-CoAシンテターゼ(1D)、アセチル-CoA：アセトアセタート-CoAトランスフェラーゼ(1E)、アセトアセチル-CoAヒドロラーゼ(1F)、及びアセトン還元酵素(1H)からなる群から選択される酵素を含む、前記非天然微生物。

【請求項2】

請求項1に記載の非天然微生物であって、

(i) 前記少なくとも1つの外来性核酸が、異種性核酸である；

(ii) 前記微生物が、実質的に嫌気性の培地中にある；又は

(iii) 前記微生物が、細菌、酵母、真菌の種である、前記非天然微生物。

【請求項3】

1セットのイソブタノール経路酵素を含み、該イソブタノール経路酵素のセットが下記からなる群から選択される、請求項1又は2に記載の非天然微生物：

(a) (i)アセトアセタートデカルボキシラーゼ(1G)、及び(ii)アセトン還元酵素(1H)；

(b) (i)アセトアセタートデカルボキシラーゼ(1G)、(ii)アセトン還元酵素(1H)、及び(iii)アセチル-CoA：アセトアセタート-CoAトランスフェラーゼ(1E)、アセトアセチル-CoAシンテターゼ(1D)、又はアセトアセチル-CoAヒドロラーゼ(1F)；並びに

(c) (i)アセトアセタートデカルボキシラーゼ(1G)、(ii)アセトン還元酵素(1H)、(iii)アセチル-CoA：アセトアセタート-CoAトランスフェラーゼ(1E)、アセトアセチル-CoAシンテターゼ(1D)、又はアセトアセチル-CoAヒドロラーゼ(1F)；及び(iv)4-ヒドロキシブ

チリル-CoAデヒドラターゼ(1A)、クロトナーゼ(1B)、又は3-ヒドロキシブチリル-CoA脱水素酵素(1C)。

#### 【請求項4】

請求項1～3のいずれか一項に記載の非天然微生物であって、

A) 前記4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼが、fumA、fumB、fumC、fumH、fum1、MmcB、MmcC、hmd、BACCAP\_02294、ANACOL\_02527、NtherDRAFT\_2368、dmdA、dmdB、crt、crt1、paaA、paaB、phaA、phaB、maoC、paaF、paaG、abfD、及びMsed\_1220からなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる、

B) 前記クロトナーゼが、fumA、fumB、fumC、fumH、fum1、MmcB、MmcC、hmd、BACCAP\_02294、ANACOL\_02527、NtherDRAFT\_2368、dmdA、dmdB、crt、crt1、paaA、paaB、phaA、phaB、maoC、paaF、paaG、abfD、及びMsed\_1220からなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる、

C) 前記3-ヒドロキシブチリル-CoA脱水素酵素が、thrA、akthr2、hom6、hom1、hom2、fadB、fadJ、Hbd2、HbdI、hbd、HSD17B10、phbB、phaB、Msed\_1423、Msed\_0399、Msed\_0389、Msed\_1993、adh、adhA、adh-A、mdh、IdhA、Idh、及びbdhからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる、

D) 前記アセトアセチル-CoAシンテターゼが、sucC、sucD、AACS、AF1211、scs、及びPAE3250からなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる、

E) 前記アセチル-CoA：アセトアセタート-CoAトランスフェラーゼが、atoA、atoD、actA、cg0592、ctfA、ctfB、cat1、cat2、cat3、gctA、gctB、HPAGI\_0676、HPAGI\_0677、ScoA、及びScoBからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる、

F) 前記アセトアセチル-CoAヒドロラーゼが、acot12、hibch、BC\_2292、tesB、acot8、tesA、ybgC、paal、及びybdBからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる、

G) 前記アセトアセタートデカルボキシラーゼが、pdc、pdc1、mdIC、dpgB、iIvB-1、kgd、kdcA、lysA、panD、dmpH、dmpE、xyIII、xyIIII、Reut\_B5691、Reut\_B5692、CAD、pad1、pofK、(pad)、padC、及びpadからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる、

H) 前記アセトアセタートデカルボキシラーゼが、Adc、cbei\_3835、CLL\_A2135、RBAM\_030030からなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる、又は、

I) 前記アセトン還元酵素が、thrA、akthr2、hom6、hom1、hom2、fadB、fadJ、Hbd2、HbdI、hbd、HSD17B10、phbB、phaB、Msed\_1423、Msed\_0399、Msed\_0389、Msed\_1993、adh、adhA、adh-A、mdh、IdhA、Idh、及びbdhからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる、前記非天然微生物。

#### 【請求項5】

請求項1～4のいずれか一項に記載の非天然微生物であって、

AA) 前記4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼが、abfDによってコードされる、

BB) 前記クロトナーゼが、crt、crt1、paaA、paaB、phaA、phaB、maoC、paaF、及びpaGからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる、

CC) 前記3-ヒドロキシブチリル-CoA脱水素酵素が、hbd、Hbd2、HbdI、Msed\_1423、Msed\_0399、Msed\_0389、Msed\_1993、fadB、及びfadJからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる、

DD) 前記アセトアセチル-CoAシンテターゼが、sucC、sucD、AACS、及びAF1211からなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる、

EE) 前記アセチル-CoA：アセトアセタート-CoAトランスフェラーゼが、atoA、atoD、actA、cg0592、ctfA、ctfB、HPAGI\_0676、HPAGI\_0677、ScoA、及びScoBからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる、

FF) 前記アセトアセチル-CoAヒドロラーゼが、acot12、hibch及びtesAからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる、又は

GG) 前記アセトン還元酵素が、adh、adhA、及びadh-Aからなる群から選択される1つ以

上の遺伝子によってコードされる、前記非天然微生物。

【請求項 6】

イソプロパノールを產生する方法であって、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の非天然微生物を、イソプロパノールを產生する条件下で十分な時間培養することを含む、前記方法。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の非天然微生物により產生されるイソプロパノールを含む培地。

【請求項 8】

請求項 6 に記載の方法により任意に產生される、生合成されたイソプロパノール。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の生合成されたイソプロパノールを含む、組成物。

【請求項 10】

請求項 8 に記載の生合成されたイソプロパノールを含む、または該イソプロパノールから製造された、化学化合物、ポリマー又はその他の製品。

【請求項 11】

化学化合物、ポリマー又はその他の製品製造における請求項 8 に記載の生合成された1,3-BDOの使用であって、該製造が任意に該イソプロパノールの化学的転換を含む、前記使用。

【請求項 12】

前記化学化合物、ポリマー又はその他の製品が溶媒、消毒用アルコール、塗料、ラッカー、薄め液、インク、接着剤、汎用洗剤、消毒薬、化粧品、洗面用品、除氷液、及び医薬品、モーターオイル、イソプロピルアミン、イソプロピルエーテル、又はイソプロピルエステルである、請求項 10 に記載の化学化合物、ポリマー又はその他の製品、又は請求項 11 に記載の使用。

【請求項 13】

n-ブタノール経路を有する非天然微生物であって、n-ブタノールを產生するのに十分な量で発現するn-ブタノール経路酵素をコードする少なくとも1つの外来性核酸を含み、該n-ブタノール経路が、4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼ(1A)、クロトノイル-CoA還元酵素(1I)、ブチリル-CoA還元酵素(アルデヒド形成)(1J)、ブチルアルデヒド還元酵素(1K)、及びブチリル-CoA還元酵素(アルコール形成)(1L)からなる群から選択される酵素を含む、前記非天然微生物。

【請求項 14】

請求項 13 に記載の非天然微生物であって、

- (i) 前記少なくとも1つの外来性核酸が、異種性核酸である；
- (ii) 前記非天然微生物が、実質的に嫌気性培地中にある；又は
- (iii) 前記微生物が、細菌、酵母、真菌の種である；前記非天然微生物。

【請求項 15】

1セットのn-ブタノール経路酵素を含み、該セットのn-ブタノール経路酵素が、下記からなる群から選択される、請求項 13 ~ 14 のいずれか一項に記載の非天然微生物：

- (a) (i)クロトノイル-CoA還元酵素(1I)、(ii)ブチリル-CoA還元酵素(アルデヒド形成)(1J)及び(iii)ブチルアルデヒド還元酵素(1K)；
- (b) (i)クロトノイル-CoA還元酵素(1I)、(ii)ブチリル-CoA還元酵素(アルデヒド形成)(1J)、(iii)ブチルアルデヒド還元酵素(1K)及び(iv)4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼ(1A)；
- (c) (i)クロトノイル-CoA還元酵素(1I)、(ii)ブチリル-CoA還元酵素(アルコール形成)(1L)、及び(iii)ブチルアルデヒド還元酵素(1K)；並びに
- (d) (i)クロトノイル-CoA還元酵素(1I)、(ii)ブチリル-CoA還元酵素(アルコール形成)(1L)、(iii)ブチルアルデヒド還元酵素(1K)、及び(iv)4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼ(1A)。

**【請求項 1 6】**

請求項 1 3 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の非天然微生物であって、

A) 前記4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼが、fumA、fumB、fumC、fumH、fuml、MmcB、MmcC、hmd、BACCAP\_02294、ANACOL\_02527、NtherDRAFT\_2368、dmdA、dmdB、crt、crt1、paaA、paaB、phaA、phaB、maoC、paaF、paaG、abfD、及びMsed\_1220からなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる、

B) 前記クロトノイル-CoA還元酵素が、bcd、etfA、etfB、Ter、TDE0597、IBD、RPA3448、FadH、及びenrからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる、

C) 前記ブチリル-CoA還元酵素（アルデヒド形成）が、acrl、sucD、bphG、adhE、Msed\_0709、mcr、asd-2、Saci\_2370、Ald、及びeutEからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる、

D) 前記ブチルアルデヒド還元酵素が、alrA、ADH2、yqhD、bdhl、bdhII、adhA、4hbd、adhI、P84067、mmsb、dhat、及び3hidhからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる、又は

E) 前記ブチリル-CoA還元酵素（アルコール形成）が、adhE、adhE2、mcr、Rcas\_2929、NAPI\_02720、MGP2080\_00535、及びFARからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる、前記非天然微生物。

**【請求項 1 7】**

請求項 1 3 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の非天然微生物であって、

AA) 前記4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼが、abfDによってコードされる、

BB) 前記クロトノイル-CoA還元酵素が、bcd、etfA、etfB、Ter、及びTDE0597からなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる、

CC) 前記ブチリル-CoA還元酵素（アルデヒド形成）が、sucD、bphG、Msed\_0709、mcr、及びAldからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる、

DD) 前記ブチルアルデヒド還元酵素が、alrA、ADH2、yqhD、bdhl、bdhII、4hbd、adhI及びmmsbからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる、又は

EE) 前記ブチリル-CoA還元酵素（アルコール形成）が、adhE2、mcr、及びFARからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる、前記非天然微生物。

**【請求項 1 8】**

n-ブタノールを產生する方法であって、請求項 1 3 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の非天然微生物を、n-ブタノールを產生する条件下で十分な時間培養することを含む、前記方法。

**【請求項 1 9】**

請求項 1 3 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の非天然微生物により產生されるn-ブタノールを含む培地。

**【請求項 2 0】**

請求項 1 8 に記載の方法により任意に產生される、生合成されたn-ブタノール。

**【請求項 2 1】**

請求項 2 0 に記載の生合成されたn-ブタノールを含む、組成物。

**【請求項 2 2】**

請求項 2 0 に記載の生合成されたn-ブタノールを含む、または該n-ブタノールから製造された、化学化合物、ポリマー又はその他の製品。

**【請求項 2 3】**

化学化合物、ポリマー又はその他の製品製造における請求項 2 0 に記載の生合成されたn-ブタノールの使用であって、該製造が任意に該n-ブタノールの化学的転換を含む、前記使用。

**【請求項 2 4】**

前記化学化合物、ポリマー又はその他の製品がブチルアクリラート、ブチルメタクリラート、乳化されたポリマー、溶液のポリマー、ラテックスコーティング、エナメル、ラッカー、酢酸ブチル、グリコールブチルエーテル、溶媒又はバイオ燃料である、請求項 2 2

に記載の化学化合物、ポリマー又はその他の製品、又は請求項23に記載の使用。

**【請求項25】**

イソブタノール経路を有する非天然微生物であって、イソブタノールを產生するのに十分な量で発現するイソブタノール経路酵素をコードする少なくとも1つの外来性核酸を含み、該イソブタノール経路が、4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼ(1A)、クロトノイル-CoA還元酵素(1I)、イソブチリル-CoAムターゼ(1M)、4-ヒドロキシブチリル-CoAムターゼ(1Q)、3-ヒドロキシイソブチリル-CoAデヒドラターゼ(1R)、メタクリリル-CoA-還元酵素(1S)、イソブチリル-CoA還元酵素(アルデヒド形成)(1N)、イソブチルアルデヒド還元酵素(1O)、及びイソブチリル-CoA還元酵素(アルコール形成)(1P)からなる群から選択される酵素を含む、前記非天然微生物。

**【請求項26】**

請求項25に記載の非天然微生物であって、

- (i) 前記少なくとも1つの外来性核酸が異種性核酸である；
- (ii) 前記非天然微生物が、実質的に嫌気性培地中にある；又は
- (iii) 前記非天然微生物が、細菌、酵母、真菌の種である；前記非天然微生物。

**【請求項27】**

請求項25又は26に記載の非天然微生物であって、1セットのイソブタノール経路酵素を含み、該セットのイソブタノール経路酵素が、下記からなる群から選択される：

- (a) 4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼ(1A)、クロトノイル-CoA還元酵素(1I)、イソブチリル-CoAムターゼ(1M)、イソブチリル-CoA還元酵素(アルデヒド形成)(1N)、及びイソブチルアルデヒド還元酵素(1O)；
- (b) 4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼ(1A)、クロトノイル-CoA還元酵素(1I)、イソブチリル-CoAムターゼ(1M)、及びイソブチリル-CoA還元酵素(アルコール形成)(1P)；
- (c) 4-ヒドロキシブチリル-CoAムターゼ(1Q)、3-ヒドロキシイソブチリル-CoAデヒドラターゼ(1R)、メタクリリル-CoA還元酵素(1S)、イソブチリル-CoA還元酵素(アルデヒド形成)(1N)、及びイソブチルアルデヒド還元酵素(1O)；並びに
- (d) 4-ヒドロキシブチリル-CoAムターゼ(1Q)、3-ヒドロキシイソブチリル-CoAデヒドラターゼ(1R)、メタクリリル-CoA-還元酵素(1S)、及びイソブチリル-CoA還元酵素(アルコール形成)(1P)、前記非天然微生物。

**【請求項28】**

請求項25～27のいずれか一項に記載の非天然微生物であって、

- A) 前記4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼが、fumA、fumB、fumC、fumH、fumI、MmcB、MmcC、hmd、BACCAP\_02294、ANACOL\_02527、NtherDRAFT\_2368、dmdA、dmdB、crt、crt1、paaA、paaB、phaA、phaB、maoC、paaF、paaG、abfD、及びMsed\_1220からなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる、
- B) 前記クロトノイル-CoA還元酵素が、bcd、etfA、etfB、Ter、TDE0597、IBD、RPA3448、FadH、及びenrからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる、
- C) 前記イソブチリル-CoAムターゼが、icm、icmB、icmA、Mpe\_B0538、Mpe\_B0541、scpA、mutA、mutB、mcmA、mcmB、sbm、SARI\_04585、YfreA\_01000861、argK、PPA0597、及びmeaBからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる、
- D) 前記4-ヒドロキシブチリル-CoAムターゼが、icm、icmB、icmA、Mpe\_B0538、Mpe\_B0541、scpA、mutA、mutB、mcmA、mcmB、sbm、SARI\_04585、YfreA\_01000861、argK、PPA0597、及びmeaBからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる、
- E) 前記3-ヒドロキシイソブチリル-CoAデヒドラターゼが、fumA、fumB、fumC、fumH、fumI、MmcB、MmcC、hmd、BACCAP\_02294、ANACOL\_02527、NtherDRAFT\_2368、dmdA、dmdB、crt、crt1、paaA、paaB、phaA、phaB、maoC、paaF、paaG、abfD、及びMsed\_1220からなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる、
- F) 前記メタクリリル-CoA還元酵素が、bcd、etfA、etfB、Ter、TDE0597、IBD、RPA3448、FadH、及びenrからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる、

G) 前記イソブチリル-CoA還元酵素（アルデヒド形成）が、acr1、sucD、bphG、adhE、Msed\_0709、mcr、asd-2、SacI\_2370、Ald、及びeutEからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる、

H) 前記イソブチルアルデヒド還元酵素が、alrA、ADH2、yqhD、bdhI、bdhII、adhA、4hbd、adhI、P84067、mmsb、dhat、及び3hidhからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる、又は

I) 前記イソブチリル-CoA還元酵素（アルコール形成）が、adhE、ahdE2、mcr、Rcas\_2929、NAP1\_02720、MGP2080\_00535、及びFARからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる、前記非天然微生物。

#### 【請求項 29】

請求項25～28のいずれか一項に記載の非天然微生物であって、

AA) 前記4-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドラターゼが、abfDによってコードされる、

BB) 前記クロトノイル-CoA還元酵素が、bcd、etfA、etfB、Ter及びTDE0597からなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる、

CC) 前記イソブチリル-CoAムターーゼが、icmB、icmA、Mpe\_B0538及びMpe\_B0541からなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる、

DD) 前記4-ヒドロキシブチリル-CoAムターーゼが、icmB、icmA、Mpe\_B0538及びMpe\_B0541からなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる、

EE) 前記3-ヒドロキシイソブチリル-CoAデヒドラターゼが、crt、crt1、paaA、paaB、phaA、phaB、maoC、paaF及びpaaGからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる、

FF) 前記メタクリリル-CoA還元酵素が、bcd、etfA、etfB、Ter及びTDE0597からなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる、

GG) 前記イソブチリル-CoA還元酵素（アルデヒド形成）が、sucD、bphG、Msed\_0709、mcr及びAldから選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる、

HH) 前記イソブチルアルデヒド還元酵素が、alrA、ADH2、yqhD、bdhI、bdhII、4hbd、adhI、P84067及びmmsbからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる、又は

II) 前記イソブチリル-CoA還元酵素（アルコール形成）が、adhE2、mcr、及びFARからなる群から選択される1つ以上の遺伝子によってコードされる、前記非天然微生物。

#### 【請求項 30】

イソブタノールを產生する方法であって、請求項25～29のいずれか一項に記載の非天然微生物を、イソブタノールを產生する条件下で十分な時間培養することを含む、前記方法。

#### 【請求項 31】

請求項25～29のいずれか一項に記載の非天然微生物により產生されるイソブタノールを含む培地。

#### 【請求項 32】

請求項30に記載の方法により任意に產生される、生合成されたイソブタノール。

#### 【請求項 33】

請求項32に記載の生合成されたイソブタノールを含む、組成物。

#### 【請求項 34】

請求項32に記載の生合成されたイソブタノールを含む、または該イソブタノールから製造された、化学化合物、ポリマー又はその他の製品。

#### 【請求項 35】

化学化合物、ポリマー又はその他の製品製造における請求項32に記載の生合成されたイソブタノールの使用であって、該製造が任意に該イソブタノールの化学的転換を含む、前記使用。

#### 【請求項 36】

前記化学化合物、ポリマー又はその他の製品がバイオ燃料、酢酸イソブチル、溶媒、ラ

ッカ、コーティング、調味料、イソブチルエステル、プラスチック、ゴム、塗料、ワニス除去剤、又はインクである、請求項3-4に記載の化学化合物、ポリマー又はその他の製品、又は請求項3-5に記載の使用。