

【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 29 年 4 月 13 日 (2017.4.13)

【公表番号】特表 2016-511010 (P2016-511010A)

【公表日】平成 28 年 4 月 14 日 (2016.4.14)

【年通号数】公開・登録公報 2016-023

【出願番号】特願 2016-501949 (P2016-501949)

【国際特許分類】

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 9/04 (2006.01)

C 1 2 P 7/16 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/15 Z N A

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 9/04 Z

C 1 2 P 7/16

C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成 29 年 3 月 10 日 (2017.3.10)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0326

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0326】

Agilent (Santa Clara, CA) の GeneMorph II Random Mutagenesis キットを用いて、pCPN124 に、誤りが生じやすい突然変異誘発を行わせる。得たプラスミドを菌株 BB26-36 (Bell, J. Bact. 117:1065-1076 (1974)) に入れて形質転換する。菌株 BB26-36 は plsB 遺伝子に変異を含む。さらに、菌株は、親株 BB26 のグリセロール-3-ホスフェート栄養素要求性を有していない。これは、フルクトース-1,6-ジホスフェート (fru-1,6-diP) によるグリセロールキナーゼ (GlpK) の抑制を失っているからであり、そのため、BB26-36 はグリセロール-3-ホスフェートを産生することができ、最少培地 M9 にグリセロール (3 g/L) およびグルコース (3 g/L) を加えたもので成長する (M9 は、1 リットル当たり、12.8 g のりん酸水素ナトリウム 7 水和物、3 g の第一りん酸カリウム (potassium phosphate monobasic)、0.5 g の塩化ナトリウム、1 g の塩化アンモニウム、0.24 g の硫酸マグネシウム、および 11.1 mg の塩化カルシウムを含む)。

形質転換反応物 (transformation reaction) を、5 g/L のグルコースおよび 50 mg/L のカーベニシリンを含んでいる M9 培地で平板培養した。こうしたプレート上で成長するコロニーからプラスミドを抽出し、gps 遺伝子の配列を決定する。突然変異タンパク質の GpsA 活性を測定した。またグリセロール-3-ホス

フェートの K_i を測定する。その後、野生型タンパク質と比べて K_i の大きいタンパク質を用いて酵母菌染色体の GPD1 と置き換え、イソブタノールおよびグリセロールの産生量を測定する。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0327

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0327】

以上、本発明を要約すると下記のとおりである。

1. 組換え微生物であって、

(a) 前記組換え微生物とは非相同である少なくとも1種のポリペプチドを含むブタノール生合成経路と、

(b) 異種性グリセロール-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ(GPD)であって、前記微生物の内在性GPDの K_M と比べて高いNADHの場合の K_M を有する異種性GPDと、

(c) GPDをコードする内在性遺伝子の欠失または破損と

を含む組換え微生物において、

前記組換え微生物では、前記異種性GPDのない対照組換え微生物と比べてブタノール産生が向上する、組換え微生物。

2. 前記ブタノール生合成経路が、

(a) 1-ブタノール生合成経路、

(b) 2-ブタノール生合成経路、および

(c) イソブタノール生合成経路

からなる群から選択される、上記1に記載の組換え微生物。

3. 前記1-ブタノール生合成経路が、

(a) アセチル-CoAからアセトアセチル-CoA(アセチル-CoAアセチルトランスフェラーゼによって触媒される)、

(b) アセトアセチル-CoAから3-ヒドロキシブチリル-CoA(3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼによって触媒される)、

(c) 3-ヒドロキシブチリル-CoAからクロトニル-CoA(クロトナーゼによって触媒される)、

(d) クロトニル-CoAからブチリル-CoA(ブチリル-CoAデヒドロゲナーゼによって触媒される)、

(e) ブチリル-CoAからブチルアルデヒド(ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼによって触媒される)、および

(f) ブチルアルデヒドから1-ブタノール(1-ブタノールデヒドロゲナーゼによって触媒される)

のうちの少なくとも1つの基質から生成物への変換を行うポリペプチドをコードする少なくとも1種の遺伝子を含む、上記2に記載の組換え微生物。

4. 前記2-ブタノール生合成経路が、

(a) ピルベートからアルファ-アセト乳酸(アセト乳酸合成酵素によって触媒される)、

(b) アルファ-アセト乳酸からアセトイン(アセト乳酸デカルボキシラーゼによって触媒される)、

(c) アセトインから2,3-ブタンジオール(ブタンジオールデヒドロゲナーゼによって触媒される)、

(d) 2,3-ブタンジオールから2-ブタノン(ブタンジオールデヒドラターゼによって触媒される)、および

(e) 2-ブタノンから2-ブタノール(2-ブタノールデヒドロゲナーゼによって触

媒される)

のうちの少なくとも1つの基質から生成物への変換を行うポリペプチドをコードする少なくとも1種の遺伝子を含む、上記2に記載の組換え微生物。

5. 前記イソブタノール合成経路が、

(a) ピルベートからアセト乳酸(アセト乳酸合成酵素によって触媒される)、

(b) アセト乳酸から2, 3-ジヒドロキシイソバレレート(アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼによって触媒される)、

(c) 2, 3-ジヒドロキシイソバレレートから α -ケトイソ吉草酸(ジヒドロキシ酸デヒドラターゼによって触媒される)、

(d) α -ケトイソ吉草酸からイソブチルアルデヒド(分岐鎖ケト酸デカルボキシラーゼによって触媒される)、および

(e) イソブチルアルデヒドからイソブタノール(分岐鎖アルコールデヒドロゲナーゼによって触媒される)

のうちの少なくとも1の基質から生成物への変換を行うポリペプチドをコードする少なくとも1種の遺伝子を含む、上記2に記載の組換え微生物。

6. 前記微生物が、クロストリジウム属(*Clostridium*)、ジモモナス属(*Zymomonas*)、エシェリキア属(*Escherichia*)、サルモネラ属(*Salmonella*)、セラチア属(*Serratia*)、エルウィニア属(*Erwinia*)、クレブシエラ属(*Klebsiella*)、赤痢菌属(*Shigella*)、ロドコッカス属(*Rhodococcus*)、シュドモナス属(*Pseudomonas*)、バシラス属(*Bacillus*)、ラクトバシラス属(*Lactobacillus*)、エンテロコッカス属(*Enterococcus*)、アルカリゲネス属(*Alcaligenes*)、パエニバチルス属(*Paenibacillus*)、アルトロバクター属(*Arthrobacter*)、コリネバクテリウム属(*Corynebacterium*)、ブレヴィバクテリウム属(*Brevibacterium*)、シゾサッカロミセス属(*Schizosaccharomyces*)、クルイベロミセス属(*Kluyveromyces*)、ヤロウイア属(*Yarrowia*)、ピキア属(*Pichia*)、ザイゴサッカロミセス属(*Zygosaccharomyces*)、デバリオミセス属(*Debaryomyces*)、カンジダ属(*Candida*)、ブレタノマイセス属(*Brettanomyces*)、パチソレン属(*Pachysolen*)、ハンゼヌラ属(*Hansenula*)、イサタケンキア属(*Issatchenkia*)、トリコスポロン属(*Trichosporon*)、ヤマダザイマ属(*Yamadazyma*)、およびサッカロミセス属(*Saccharomyces*)からなる群から選択される属のものである、上記1~5のいずれかに記載の組換え微生物。

7. 前記微生物が前記サッカロミセス属(*Saccharomyces*)のものである、上記6に記載の組換え微生物。

8. 前記異種性GPDが自然界に存在するGPDである、上記1~7のいずれかに記載の組換え微生物。

9. 前記異種性GPDが、メキシコリーシュマニア(*Leishmania mexicana*)、ドナリエラ・ヴィリディス(*Dunaliella viridis*)、オオミユビトビネズミ(*Jaculus orientalis*)、アーキオグロブス・フルジダス(*Archeoglobus fulgidus*)、発疹チフスリケッチア(*Rickettsia prowazekii*)、ベギアトア・アルバ(*Beggiatoa alba*)、カンジエラ・コレニス(*Kangielia koreensis*)、アスペルギルス・オリゼ(*Aspergillus oryzae*)、カンジダ・バーサチルス(*Candida versatilis*)、大腸菌(*Escherichia coli*)、およびアナウサギ(*Oryctolagus cuniculus*)からなる群から選択される生物からのGPDの配列を含む、上記8に記載の組換え微生物。

10. 前記異種性GPDが改変GPDである、上記1~7のいずれかに記載の組換え微生物。

11. 前記改変 GPD は、配列番号 195 の位置 42、44、45、71、73、75、95、124、126、129、151、152、183、184、185、246、310、336、337、または 339 に対応する残基に少なくとも 1 つの置換を含む、上記 10 に記載の組換え微生物。

12. 前記改変 GPD は、配列番号 195 の位置 73 に対応する残基に少なくとも 1 つの置換を含む、上記 11 に記載の組換え微生物。

13. 前記改変 GPD は、配列番号 195 の位置 129 に対応する残基に少なくとも 1 つの置換を含む、上記 11 に記載の組換え微生物。

14. 前記改変 GPD は、配列番号 195 の位置 73 に対応する残基に置換を含み、配列番号 195 の位置 129 に対応する残基に置換を含む、上記 11 に記載の組換え微生物。

15. 前記微生物が、NADH を利用するケトール酸レダクトイソメラーゼ (KARI) を含む、上記 5 ~ 14 のいずれかに記載の組換え微生物。

16. 配列番号 195 との少なくとも 85 % の同一性を有する改変グリセロール - 3 - ホスフェートデヒドロゲナーゼ (GPD) 酵素。

17. 前記酵素が、配列番号 195 の位置 42、44、45、71、73、75、95、124、126、129、151、152、183、184、185、246、310、336、337、または 339 に対応する残基に少なくとも 1 つの置換を含む、上記 15 に記載の改変 GPD 酵素。

18. 前記酵素が、配列番号 195 の位置 73 に対応する少なくとも 1 つの置換を含む、上記 17 に記載の改変 GPD 酵素。

19. 前記酵素が、配列番号 195 の位置 129 に対応する少なくとも 1 つの置換を含む、上記 17 に記載の改変 GPD 酵素。

20. 前記酵素が、配列番号 195 の位置 73 に対応する置換および配列番号 195 の位置 129 に対応する置換を含む、上記 17 に記載の改変 GPD 酵素。

21. NADH の場合の前記 K_M が約 0.01 mM ~ 約 1 mM である、上記 16 ~ 20 のいずれかに記載の改変 GPD 酵素。

22. 上記 16 ~ 21 のいずれかに記載の改変 GPD 酵素を含む組換え微生物。

23. 前記微生物が、前記組換え微生物とは非相同である少なくとも 1 種の遺伝子を含むブタノール生合成経路を含み、前記微生物が、GPD をコードする内在性遺伝子の欠失または破損を含み、前記組換え微生物が、前記改変 GPD 酵素のない微生物と比べてブタノール産生が向上する、上記 22 に記載の組換え微生物。

24. 前記ブタノール生合成経路が、

(a) 1 - ブタノール生合成経路、

(b) 2 - ブタノール生合成経路、および

(c) イソブタノール生合成経路

からなる群から選択される、上記 23 に記載の組換え微生物。

25. 前記 1 - ブタノール生合成経路が、

(a) アセチル - CoA からアセトアセチル - CoA (アセチル - CoA アセチルトランスフェラーゼによって触媒される)、

(b) アセトアセチル - CoA から 3 - ヒドロキシブチリル - CoA (3 - ヒドロキシブチリル - CoA デヒドロゲナーゼによって触媒される)、

(c) 3 - ヒドロキシブチリル - CoA からクロトニル - CoA (クロトナーゼによって触媒される)、

(d) クロトニル - CoA からブチリル - CoA (ブチリル - CoA デヒドロゲナーゼによって触媒される)、

(e) ブチリル - CoA からブチルアルデヒド (ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼによって触媒される)、および

(f) ブチルアルデヒドから 1 - ブタノール (1 - ブタノールデヒドロゲナーゼによって触媒される)

のうちの少なくとも 1 つの基質から生成物への変換を行うポリペプチドをコードする少な

くとも 1 種の遺伝子を含む、上記 24 に記載の組換え微生物。

26．前記 2 - ブタノール生合成経路が、

(a) ピルベートからアルファ - アセト乳酸 (アセト乳酸合成酵素によって触媒される)、

(b) アルファ - アセト乳酸からアセトイン (アセト乳酸デカルボキシラーゼによって触媒される)、

(c) アセトインから 2, 3 - ブタンジオール (ブタンジオールデヒドロゲナーゼによって触媒される)、

(d) 2, 3 - ブタンジオールから 2 - ブタノン (ブタンジオールデヒドラターゼによって触媒される)、および

(e) 2 - ブタノンから 2 - ブタノール (2 - ブタノールデヒドロゲナーゼによって触媒される)

のうちの少なくとも 1 つの基質から生成物への変換を行うポリペプチドをコードする少なくとも 1 種の遺伝子を含む、上記 24 に記載の組換え微生物。

27．前記イソブタノール生合成経路が、

(a) ピルベートからアセト乳酸 (アセト乳酸合成酵素によって触媒される)、

(b) アセト乳酸から 2, 3 - ジヒドロキシイソバレレート (アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼによって触媒される)、

(c) 2, 3 - ジヒドロキシイソバレレートから α - ケトイソ吉草酸 (ジヒドロキシ酸デヒドラターゼによって触媒される)、

(d) α - ケトイソ吉草酸からイソブチルアルデヒド (分枝鎖ケト酸デカルボキシラーゼによって触媒される)、および

(e) イソブチルアルデヒドからイソブタノール (分枝鎖アルコールデヒドロゲナーゼによって触媒される)

のうちの少なくとも 1 つの基質から生成物への変換を行うポリペプチドをコードする少なくとも 1 種の遺伝子を含む、上記 24 に記載の組換え微生物。

28．前記微生物が、クロストリジウム属 (*Clostridium*)、ジモモナス属 (*Zymomonas*)、エシェリキア属 (*Escherichia*)、サルモネラ属 (*Salmonella*)、セラチア属 (*Serratia*)、エルウィニア属 (*Erwinia*)、クレブシエラ属 (*Klebsiella*)、赤痢菌属 (*Shigella*)、ロドコッカス属 (*Rhodococcus*)、シュードモナス属 (*Pseudomonas*)、バシラス属 (*Bacillus*)、ラクトバシラス属 (*Lactobacillus*)、エンテロコッカス属 (*Enterococcus*)、アルカリゲネス属 (*Alcaligenes*)、パエニバチルス属 (*Paenibacillus*)、アルトロバクター属 (*Arthrobacter*)、コリネバクテリウム属 (*Corynebacterium*)、ブレヴィバクテリウム属 (*Brevibacterium*)、シゾサッカロミセス属 (*Schizosaccharomyces*)、クルイベロミセス属 (*Kluveromyces*)、ヤロウイア属 (*Yarrowia*)、ピキア属 (*Pichia*)、ザイゴサッカロミセス属 (*Zygosaccharomyces*)、デバリオミセス属 (*Debaryomyces*)、カンジダ属 (*Candida*)、ブレタノマイセス属 (*Brettanomyces*)、パチソレン属 (*Pachysolen*)、ハンゼヌラ属 (*Hansenula*)、イサタケンキア属 (*Issatchenkia*)、トリコスポロン属 (*Trichosporon*)、ヤマダザイマ属 (*Yamadazyma*)、およびサッカロミセス属 (*Saccharomyces*) からなる群から選択される属のものである、上記 22 ~ 27 のいずれかに記載の組換え微生物。

29．前記微生物が前記サッカロミセス属 (*Saccharomyces*) のものである、上記 28 に記載の組換え微生物。

30．前記微生物が、NADH を利用するケトール酸レダクトイソメラーゼ (KARI) を含む、上記 27 ~ 29 のいずれかに記載の組換え微生物。

31．(a)

i . 改変イソブタノール生合成経路と、

i i . G P D 1 をコードする内在性遺伝子の欠失または破損と、

i i i .

a . 上記 1 6 ~ 2 2 のいずれかに記載の前記改変 G P D 酵素；または

b . 異種性グリセロール - 3 - ホスフェートデヒドロゲナーゼ (G P D) であって、前記微生物の内在性 G P D の K_M と比べて高い N A D H の場合の K_M を有する異種性 G P D の少なくとも 1 種と

を含む組換え微生物を用意するステップと、

(b) イソブタノールが産生される条件下で、前記組換え微生物を少なくとも 1 種の発酵性炭素物質と接触させるステップと

を含む、イソブタノールを製造するための方法。

3 2 . 前記組換え微生物が嫌気条件下で成長する、上記 3 1 に記載の方法。

3 3 . 前記改変 G P D が、配列番号 1 9 5 の 4 2、4 4、4 5、7 1、7 3、7 5、9 5、1 2 4、1 2 6、1 2 9、1 5 1、1 5 2、1 8 3、1 8 4、1 8 5、2 4 6、3 1 0、3 3 6、3 3 7、または 3 3 9 に対応する残基に少なくとも 1 つの置換を含む、上記 3 1 ~ 3 2 のいずれかに記載の方法。

3 4 . 前記 G P D の N A D H の場合の K_M が約 0 . 0 1 m M ~ 約 1 m M である、上記 3 1 ~ 3 3 のいずれかに記載の方法。

3 5 . 組換え微生物であって、

(a) 前記組換え微生物とは非相同である少なくとも 1 種のポリペプチドを含むブタノール生合成経路と、

(b) 異種性グリセロール - 3 - ホスフェートデヒドロゲナーゼ (G P D) であって、前記微生物の内在性 G P D の K_M と比べて高い N A D H の場合の K_M を有する異種性 G P D と、

(c) G P D をコードする内在性遺伝子の欠失または破損と

を含む組換え微生物であって、

前記組換え微生物では、前記異種性 G P D のない対照組換え微生物と比べてグリセロール産生が減少する、組換え微生物。

3 6 . 組換え微生物であって、

(a) 前記組換え微生物とは非相同である少なくとも 1 種のポリペプチドを含むブタノール生合成経路と、

(b) 異種性グリセロール - 3 - ホスフェートデヒドロゲナーゼ (G P D) であって、前記微生物の内在性 G P D の K_M と比べて高い N A D H の場合の K_M を有する異種性 G P D と、

(c) G P D をコードする内在性遺伝子の欠失または破損と

を含む組換え微生物において、

前記組換え微生物では、前記異種性 G P D のない対照組換え微生物と比べてブタノールとグリセロールとのモル比が増大する、組換え微生物。

3 7 . 組換え微生物であって、

(a) 異種性グリセロール - 3 - ホスフェートデヒドロゲナーゼ (G P D) であって、前記微生物の内在性 G P D の K_M と比べて高い N A D H の場合の K_M を有する異種性 G P D と、

(b) G P D をコードする内在性遺伝子の欠失または破損と

を含む組換え微生物において、

前記組換え微生物では、前記異種性 G P D のない対照組換え微生物と比べてグリセロール産生が減少する、組換え微生物。

3 8 . 組換え微生物であって、

(a) 前記組換え微生物とは非相同である少なくとも 1 種のポリペプチドを含む改変ブタノール生合成経路と、

(b) 異種性グリセロール - 3 - ホスフェートデヒドロゲナーゼ (G P D) であって、

NADHおよびNADPHに対して実質的に同じ親和性を有する異種性GPDと、

(c) GPDをコードする内在性遺伝子の欠失または破損と

を含む組換え微生物において、

前記組換え微生物では、前記異種性GPDのない対照組換え微生物と比べてブタノール産生が向上する、組換え微生物。

39. 組換え微生物であって、

(a) 前記組換え微生物とは非相同である少なくとも1種のポリペプチドを含む改変ブタノール生合成経路と、

(b) 異種性グリセロール-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ(GPD)であって、NADHおよびNADPHに対して実質的に同じ親和性を有する異種性GPDと、

(c) GPDをコードする内在性遺伝子の欠失または破損と

を含む組換え微生物において、

前記組換え微生物では、前記異種性GPDのない対照組換え微生物と比べてグリセロール産生が減少する、組換え微生物。

40. 組換え微生物であって、

(a) 前記組換え微生物とは非相同である少なくとも1種のポリペプチドを含む改変ブタノール生合成経路と、

(b) 異種性グリセロール-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ(GPD)であって、NADHおよびNADPHに対して実質的に同じ親和性を有する異種性GPDと、

(c) GPDをコードする内在性遺伝子の欠失または破損と

を含む組換え微生物において、

前記組換え微生物では、前記異種性GPDのない対照組換え微生物と比べてブタノールとグリセロールとのモル比が増大する、組換え微生物。

41. 前記改変ブタノール生合成経路が、

(a) 1-ブタノール生合成経路、

(b) 2-ブタノール生合成経路、および

(c) イソブタノール生合成経路

からなる群から選択される、上記38~40のいずれかに記載の組換え微生物。

42. 前記微生物が、クロストリジウム属(*Clostridium*)、ジモモナス属(*Zymomonas*)、エシェリキア属(*Escherichia*)、サルモネラ属(*Salmonella*)、セラチア属(*Serratia*)、エルウィニア属(*Erwinia*)、クレブシエラ属(*Klebsiella*)、赤痢菌属(*Shigella*)、ロドコッカス属(*Rhodococcus*)、シュードモナス属(*Pseudomonas*)、バシラス属(*Bacillus*)、ラクトバシラス属(*Lactobacillus*)、エンテロコッカス属(*Enterococcus*)、アルカリゲネス属(*Alcaligenes*)、パエニバチルス属(*Paenibacillus*)、アルトロバクター属(*Arthrobacter*)、コリネバクテリウム属(*Corynebacterium*)、ブレヴィバクテリウム属(*Brevibacterium*)、シゾサッカロミセス属(*Schizosaccharomyces*)、クルイベロミセス属(*Kluveromyces*)、ヤロウイア属(*Yarrowia*)、ピキア属(*Pichia*)、ザイゴサッカロミセス属(*Zygosaccharomyces*)、デバリオミセス属(*Debaryomyces*)、カンジダ属(*Candida*)、ブレタノマイセス属(*Brettanomyces*)、パチソレン属(*Pachysolen*)、ハンゼヌラ属(*Hansenula*)、イサタケンキア属(*Issatchenkia*)、トリコスポロン属(*Trichosporon*)、ヤマダザイマ属(*Yamadazyma*)、およびサッカロミセス属(*Saccharomyces*)からなる群から選択される属のものである、上記38~41のいずれかに記載の組換え微生物。

43. 前記微生物が前記サッカロミセス属(*Saccharomyces*)のものである、上記42に記載の組換え微生物。

44. 前記異種性GPDが、EC番号1.1.1.94を有するGPDである、上記38

～ 43 のいずれかに記載の組換え微生物。

45．前記異種性 GPD が、大腸菌 (*E. coli*) GPD、カンジダ・バーサチルス (*Candida versatilis*) GPD、およびアスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) GPD から選択される、上記 44 に記載の組換え微生物。

46．(a) 上記 38～40 のいずれかに記載の組換え微生物を用意するステップと、

(b) ブタノールが産生される条件下で、前記組換え微生物を少なくとも 1 種の発酵性炭素物質と接触させるステップと

を含む、ブタノールを製造するための方法。

47．前記改変ブタノール生合成経路が、

(a) 1 - ブタノール生合成経路、

(b) 2 - ブタノール生合成経路、および

(c) イソブタノール生合成経路

からなる群から選択される、上記 9 に記載の方法。

48．前記微生物が、クロストリジウム属 (*Clostridium*)、ジモモナス属 (*Zymomonas*)、エシェリキア属 (*Escherichia*)、サルモネラ属 (*Salmonella*)、セラチア属 (*Serratia*)、エルウィニア属 (*Erwinia*)、クレブシエラ属 (*Klebsiella*)、赤痢菌属 (*Shigella*)、ロドコッカス属 (*Rhodococcus*)、シュドモナス属 (*Pseudomonas*)、バシラス属 (*Bacillus*)、ラクトバシラス属 (*Lactobacillus*)、エンテロコッカス属 (*Enterococcus*)、アルカリゲネス属 (*Alcaligenes*)、パエニバチルス属 (*Paenibacillus*)、アルトロバクター属 (*Arthrobacter*)、コリネバクテリウム属 (*Corynebacterium*)、ブレヴィバクテリウム属 (*Brevibacterium*)、シゾサッカロミセス属 (*Schizosaccharomyces*)、クルイベロミセス属 (*Kluveromyces*)、ヤロウイア属 (*Yarrowia*)、ピキア属 (*Pichia*)、ザイゴサッカロミセス属 (*Zygosaccharomyces*)、デバリオミセス属 (*Debaryomyces*)、カンジダ属 (*Candida*)、ブレタノマイセス属 (*Brettanomyces*)、パチソレン属 (*Pachysolen*)、ハンゼヌラ属 (*Hansenula*)、イサタケンキア属 (*Issatchenkia*)、トリコスポロン属 (*Trichosporon*)、ヤマダザイマ属 (*Yamadazyma*)、およびサッカロミセス属 (*Saccharomyces*) からなる群から選択される属のものである、上記 46 または 47 に記載の方法。

49．前記微生物が前記サッカロミセス属 (*Saccharomyces*) のものである、上記 48 に記載の方法。

50．前記異種性 GPD が、EC 番号 1.1.1.94 を有する GPD である、上記 46～49 のいずれかに記載の方法。

51．前記異種性 GPD が、大腸菌 (*E. coli*) GPD、カンジダ・バーサチルス (*Candida versatilis*) GPD、およびアスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) GPD から選択される、上記 50 に記載の方法。

52．(a) 異種性グリセロール - 3 - ホスフェートデヒドロゲナーゼ (GPD) であって、NADH および NADPH に対して実質的に同じ親和性を有する異種性 GPD と、

(b) GPD をコードする内在性遺伝子の欠失または破損と

を含む組換え微生物であって、

前記組換え微生物では、前記異種性 GPD のない対照組換え微生物と比べてグリセロール産生が減少する、組換え微生物。

53．異種性グリセロール - 3 - ホスフェートデヒドロゲナーゼ (GPD) を含む組換え微生物であって、前記異種性 GPD が NADH または NADPH に対して実質的に同じ親和性を有し、かつ前記組換え微生物では、前記異種性 GPD のない対照組換え微生物と比べてグリセロール産生が減少する、組換え微生物。

54. 組換え微生物であって、

(a) 前記組換え微生物とは非相同である少なくとも1種のポリペプチドを含む改変ブタノール生合成経路と、

(b) 異種性グリセロール-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ(GPD)であって、グリセロール-3-ホスフェートによって抑制される異種性GPDと、

(c) GPDをコードする内在性遺伝子の欠失または破損と

を含む組換え微生物において、

前記組換え微生物では、前記異種性GPDのない対照組換え微生物と比べてブタノール産生が向上する、組換え微生物。

55. 組換え微生物であって、

(a) 前記組換え微生物とは非相同である少なくとも1種のポリペプチドを含む改変ブタノール生合成経路と、

(b) 異種性グリセロール-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ(GPD)であって、グリセロール-3-ホスフェートによって抑制される異種性GPDと、

(c) GPDをコードする内在性遺伝子の欠失または破損と

を含む組換え微生物において、

前記組換え微生物では、前記異種性GPDのない対照組換え微生物と比べてグリセロール産生が減少する、組換え微生物。

56. 組換え微生物であって、

(a) 前記組換え微生物とは非相同である少なくとも1種のポリペプチドを含む改変ブタノール生合成経路と、

(b) 異種性グリセロール-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ(GPD)であって、グリセロール-3-ホスフェートによって抑制される異種性GPDと、

(c) GPDをコードする内在性遺伝子の欠失または破損と

を含む組換え微生物において、

前記組換え微生物では、前記異種性GPDのない対照組換え微生物と比べてブタノールとグリセロールとのモル比が増大する、組換え微生物。

57. 前記改変ブタノール生合成経路が、

(a) 1-ブタノール生合成経路、

(b) 2-ブタノール生合成経路、および

(c) イソブタノール生合成経路

からなる群から選択される、上記54～56のいずれかに記載の組換え微生物。

58. 前記微生物が、クロストリジウム属(*Clostridium*)、ジモモナス属(*Zymomonas*)、エシェリキア属(*Escherichia*)、サルモネラ属(*Salmonella*)、セラチア属(*Serratia*)、エルウィニア属(*Erwinia*)、クレブシエラ属(*Klebsiella*)、赤痢菌属(*Shigella*)、ロドコッカス属(*Rhodococcus*)、シュドモナス属(*Pseudomonas*)、バシラス属(*Bacillus*)、ラクトバシラス属(*Lactobacillus*)、エンテロコッカス属(*Enterococcus*)、アルカリゲネス属(*Alcaligenes*)、パエニバチルス属(*Paenibacillus*)、アルトロバクター属(*Arthrobacter*)、コリネバクテリウム属(*Corynebacterium*)、ブレヴィバクテリウム属(*Brevibacterium*)、シゾサッカロミセス属(*Schizosaccharomyces*)、クルイベロミセス属(*Kluveromyces*)、ヤロウイア属(*Yarrowia*)、ピキア属(*Pichia*)、ザイゴサッカロミセス属(*Zygosaccharomyces*)、デバリオミセス属(*Debaryomyces*)、カンジダ属(*Candida*)、ブレタノマイセス属(*Brettanomyces*)、パチソレン属(*Pachysolen*)、ハンゼヌラ属(*Hansenula*)、イサタケンキア属(*Issatchenkia*)、トリコスポロン属(*Trichosporon*)、ヤマダザイマ属(*Yamadazyma*)、およびサッカロミセス属(*Saccharomyces*)からなる群から選択される属のものである、

上記 54 ~ 57 のいずれかに記載の組換え微生物。

59. 前記異種性 GPD が、EC 番号 1.1.1.94 を有する GPD である、上記 54 ~ 58 のいずれかに記載の組換え微生物。

60. 前記異種性 GPD が、大腸菌 (*E. coli*) GPD、カンジダ・バーサチルス (*Candida versatilis*) GPD、およびアスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) GPD から選択される、上記 59 に記載の組換え微生物。

61. (a) 上記 54 ~ 60 のいずれかに記載の組換え微生物を用意するステップと、

(b) ブタノールが産生される条件下で、前記組換え微生物を少なくとも 1 種の発酵性炭素物質と接触させるステップと

を含む、ブタノールを製造するための方法。

62. (a) グリセロール - 3 - ホスフェートによって抑制される異種性グリセロール - 3 - ホスフェートデヒドロゲナーゼ (GPD) と、

(b) GPD をコードする内在性遺伝子の欠失または破損と

を含む組換え微生物であって、

前記組換え微生物では、前記異種性 GPD のない対照組換え微生物と比べてグリセロール産生が減少する、組換え微生物。

63. 異種性グリセロール - 3 - ホスフェートデヒドロゲナーゼ (GPD) を含む組換え微生物であって、前記異種性 GPD がグリセロール - 3 - ホスフェートによって抑制され、前記組換え微生物では、前記異種性 GPD のない対照組換え微生物と比べてグリセロール産生が減少する、異種性グリセロール - 3 - ホスフェートデヒドロゲナーゼ (GPD) を含む組換え微生物。

【手続補正 3】

【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】

改変グリセロール - 3 - ホスフェートデヒドロゲナーゼ (GPD) 酵素であって、前記酵素が、配列番号 195 の位置 42、44、45、71、73、75、95、124、126、129、151、152、183、184、185、246、310、336、337、または 339 に対応する残基に少なくとも 1 つの置換を含む、改変グリセロール - 3 - ホスフェートデヒドロゲナーゼ (GPD) 酵素。

【請求項 2】

前記酵素が、配列番号 195 の位置 73 に対応する少なくとも 1 つの置換を含む、請求項 1 に記載の改変 GPD 酵素。

【請求項 3】

前記酵素が、配列番号 195 の位置 129 に対応する少なくとも 1 つの置換を含む、請求項 1 に記載の改変 GPD 酵素。

【請求項 4】

前記酵素が、配列番号 195 の位置 73 に対応する置換および配列番号 195 の位置 129 に対応する置換を含む、請求項 1 に記載の改変 GPD 酵素。

【請求項 5】

NADH の場合の前記 K_M が約 0.01 mM ~ 約 1 mM である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の改変 GPD 酵素。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の改変 GPD 酵素を含む組換え微生物。

【請求項 7】

前記微生物がアルコール生合成経路を含み、前記微生物が GPD をコードする内在性遺

伝子の欠失または破損を含み、さらに前記組換え微生物では、改変 G P D 酵素のない微生物と比べてアルコール産生が向上する、請求項 6 に記載の組換え微生物。

【請求項 8】

組換え微生物であって、

(a) 異種性グリセロール - 3 - ホスフェートデヒドロゲナーゼ (G P D) であって、前記微生物の内在性 G P D の K_M と比べて高い N A D H の場合の K_M を有する異種性 G P D と、

(b) G P D をコードする内在性遺伝子の欠失または破損とを含む組換え微生物において、

前記組換え微生物では、前記異種性 G P D のない対照組換え微生物と比べてグリセロール産生が減少する、組換え微生物。

【請求項 9】

前記微生物が、クロストリジウム属 (*Clostridium*)、ジモモナス属 (*Zymomonas*)、エシェリキア属 (*Escherichia*)、サルモネラ属 (*Salmonella*)、セラチア属 (*Serratia*)、エルウィニア属 (*Erwinia*)、クレブシエラ属 (*Klebsiella*)、赤痢菌属 (*Shigella*)、ロドコッカス属 (*Rhodococcus*)、シュードモナス属 (*Pseudomonas*)、バシラス属 (*Bacillus*)、ラクトバシラス属 (*Lactobacillus*)、エンテロコッカス属 (*Enterococcus*)、アルカリゲネス属 (*Alcaligenes*)、パエニバチルス属 (*Paenibacillus*)、アルトロバクター属 (*Arthrobacter*)、コリネバクテリウム属 (*Corynebacterium*)、ブレヴィバクテリウム属 (*Brevibacterium*)、シゾサッカロミセス属 (*Schizosaccharomyces*)、クルイベロミセス属 (*Kluveromyces*)、ヤロウイア属 (*Yarrowia*)、ピキア属 (*Pichia*)、ザイゴサッカロミセス属 (*Zygosaccharomyces*)、デバリオミセス属 (*Debaryomyces*)、カンジダ属 (*Candida*)、ブレタノマイセス属 (*Brettanomyces*)、パチソレン属 (*Pachysolen*)、ハンゼヌラ属 (*Hansenula*)、イサタケンキア属 (*Issatchenkia*)、トリコスポロン属 (*Trichosporon*)、ヤマダザイマ属 (*Yamadazyma*)、およびサッカロミセス属 (*Saccharomyces*) からなる群から選択される属のものである、請求項 6 ~ 8 のいずれか一項に記載の組換え微生物。

【請求項 10】

前記微生物が前記サッカロミセス属 (*Saccharomyces*) のものである、請求項 9 に記載の組換え微生物。

【請求項 11】

前記異種性 G P D が、E C 番号 1 . 1 . 1 . 9 4 を有する G P D である、請求項 6 ~ 10 のいずれか一項に記載の組換え微生物。

【請求項 12】

前記異種性 G P D が、大腸菌 (*E. coli*) G P D、カンジダ・バーサチルス (*Candida versatilis*) G P D、およびアスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) G P D から選択される、請求項 11 に記載の組換え微生物。

【請求項 13】

(a) 異種性グリセロール - 3 - ホスフェートデヒドロゲナーゼ (G P D) であって、N A D H および N A D P H に対して実質的に同じ親和性を有する異種性 G P D

を含む組換え微生物であって、

前記組換え微生物では、前記異種性 G P D のない対照組換え微生物と比べてグリセロール産生が減少する、組換え微生物。

【請求項 14】

(a) グリセロール - 3 - ホスフェートによって抑制される異種性グリセロール - 3 -

ホスフェートデヒドロゲナーゼ（GPD）と、
（b）

を含む組換え微生物であって、

前記組換え微生物では、前記異種性GPDのない対照組換え微生物と比べてグリセロール
産生が減少する、組換え微生物。

【請求項15】

（b）GPDをコードする内在性遺伝子の破損の欠失をさらに含む、請求項13または
14のいずれか一項に記載の組換え微生物。