

【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24年6月7日 (2012.6.7)

【公表番号】特表2011-519561(P2011-519561A)

【公表日】平成23年7月14日 (2011.7.14)

【年通号数】公開・登録公報2011-028

【出願番号】特願2011-507667(P2011-507667)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 P 7/40 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 P 7/40

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/00 1 0 1

【手続補正書】

【提出日】平成24年4月19日 (2012.4.19)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

天然に存在しない微生物体であって、メタクリル酸を生成するのに十分な量で発現されるメタクリル酸経路の酵素（単数または複数）をコードする少なくとも 1 つの外因性核酸を含む、メタクリル酸経路を有する微生物体を含み、前記メタクリル酸経路が、

3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼ；

4-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼ、3-ヒドロキシイソブチリル CoA シンテターゼまたは 3-ヒドロキシイソブチリル CoA ヒドロラーゼまたは 3-ヒドロキシイソブチリル CoA トランスフェラーゼ、および 3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼ；

メチルマロニル CoA ムターゼ、メチルマロニル CoA レダクターゼ、3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドロゲナーゼ、および 3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼ；

メチルマロニル CoA ムターゼ、メチルマロニル CoA エピメラーゼ、メチルマロニル CoA レダクターゼ、3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドロゲナーゼ、および 3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼ；

メチルマロニル CoA ムターゼ、アルコール／アルデヒドデヒドロゲナーゼ、および 3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼ；

メチルマロニル CoA ムターゼ、メチルマロニル CoA エピメラーゼ、アルコール／アルデヒドデヒドロゲナーゼ、および 3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼ

メチルマロニル CoA ムターゼ、メチルマロニル CoA レダクターゼ、3-アミノ-2-メチルプロピオン酸トランスアミナーゼ、および 3-アミノ-2-メチルプロピオン酸

アンモニアリアーゼ；

メチルマロニルC o A ムターゼ、メチルマロニルC o A エピメラーゼ、メチルマロニルC o A レダクターゼ、3-アミノ-2-メチルプロピオン酸トランスアミナーゼ、および3-アミノ-2-メチルプロピオン酸アンモニアリアーゼ；

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、グルタミン酸ムターゼ、3-メチルアスパルターゼ、およびメサコン酸デカルボキシラーゼ；

アルファ-ケトグルタル酸レダクターゼ、2-ヒドロキシグルタミン酸ムターゼ、3-メチルリンゴ酸デヒドラターゼ、およびメサコン酸デカルボキシラーゼ；

アセトアセチルC o A チオラーゼ、アセトアセチルC o A レダクターゼ、3-ヒドロキシブチリルC o A ムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリルC o A デヒドラターゼ、およびメタクリリルC o A トランスフェラーゼまたはメタクリリルC o A ヒドロラーゼまたはメタクリリルC o A シンテターゼ；

アセトアセチルC o A チオラーゼ、アセトアセチルC o A レダクターゼ、3-ヒドロキシブチリルC o A ムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリルC o A デヒドラターゼ、エノイルC o A ヒドラターゼ、および3-ヒドロキシイソブチリルC o A ヒドロラーゼまたは3-ヒドロキシイソブチリルC o A シンテターゼまたは3-ヒドロキシイソブチリルC o A トランスフェラーゼ、および3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼ；

4-ヒドロキシブチリルC o A デヒドラターゼ、ビニルアセチルC o A Δ-イソメラーゼ、クロトナーゼ、3-ヒドロキシブチリルC o A ムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリルC o A デヒドラターゼ、およびメタクリリルC o A ヒドロラーゼまたはメタクリリルC o A シンテターゼまたはメタクリリルC o A トランスフェラーゼのうちのいずれか；

4-ヒドロキシブチリルC o A ムターゼ、3-ヒドロキシイソブチリルC o A デヒドラターゼ、およびメタクリリルC o A シンテターゼまたはメタクリリルC o A ヒドロラーゼまたはメタクリリルC o A トランスフェラーゼ；

アセトアセチルC o A チオラーゼ、アセトアセチルC o A レダクターゼ、クロトナーゼ、ブチリルC o A デヒドロゲナーゼ、イソブチリルC o A ムターゼ、イソブチリルC o A デヒドロゲナーゼ、およびメタクリリルC o A シンテターゼまたはメタクリリルC o A ヒドロラーゼまたはメタクリリルC o A トランスフェラーゼ；

乳酸デヒドロゲナーゼ、ラクテートC o A トランスフェラーゼ、ラクトイルC o A デヒドラターゼ、アシルC o A デヒドロゲナーゼ、プロピオニルC o A カルボキシラーゼ、メチルマロニルC o A レダクターゼ、3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドロゲナーゼ、および3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼ；ならびに

バリンアミノトランスフェラーゼ、2-ケトイソ吉草酸デヒドロゲナーゼ、イソブチリルC o A デヒドロゲナーゼ、およびメタクリリルC o A シンテターゼまたはメタクリリルC o A ヒドロラーゼまたはメタクリリルC o A トランスフェラーゼ

を含むメタクリル酸経路から選択される、微生物体。

【請求項2】

天然に存在しない微生物体であって、3-ヒドロキシイソ酪酸を生成するのに十分な量で発現される3-ヒドロキシイソ酪酸経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含む、3-ヒドロキシイソ酪酸経路を有する微生物体を含み、前記3-ヒドロキシイソ酪酸経路が、4-ヒドロキシブチリルC o A ムターゼおよび3-ヒドロキシイソブチリルC o A シンテターゼまたは3-ヒドロキシイソブチリルC o A ヒドロラーゼまたは3-ヒドロキシイソブチリルC o A トランスフェラーゼを含む微生物体。

【請求項3】

天然に存在しない微生物体であって、2-ヒドロキシイソ酪酸を生成するのに十分な量で発現される2-ヒドロキシイソ酪酸経路の酵素をコードする外因性核酸を含む、2-ヒドロキシイソ酪酸経路を有する微生物体を含み、前記2-ヒドロキシイソ酪酸経路が、

アセトアセチルC o A チオラーゼ、アセトアセチルC o A レダクターゼ、3-ヒドロキシブチリルC o A ムターゼ、および2-ヒドロキシイソブチリルC o A トランスフェラーゼまたは2-ヒドロキシイソブチリルC o A ヒドロラーゼまたは2-ヒドロキシイソブチ

リルC o Aシンテターゼ；ならびに

4－ヒドロキシブチリルC o Aデヒドラターゼ、ビニルアセチルC o A Δ－イソメラーゼ、クロトナーゼ、3－ヒドロキシブチリルC o Aムターゼ、および2－ヒドロキシイソブチリルC o Aヒドロラーゼまたは2－ヒドロキシイソブチリルC o Aシンテターゼまたは2－ヒドロキシイソブチリルC o Aトランスフェラーゼのうちのいずれかを含む2－ヒドロキシイソ酪酸経路から選択される、微生物体。

【請求項4】

クエン酸シンターゼ、アコニターゼ、イソクエン酸リアーゼ、リンゴ酸シンターゼ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼおよびホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼから選択される少なくとも1つの酵素の活性を増加させる遺伝子改変をさらに含み、前記活性の増加が、前記遺伝子改変が存在しない状態と比べた増加である、請求項1～3のいずれか一項に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項5】

天然に存在しない微生物体であって、タンパク質または酵素をコードする遺伝子中に生じている1つまたは複数の遺伝子破壊を含み、前記1つまたは複数の遺伝子破壊が前記生物体における3－ヒドロキシイソ酪酸またはメタクリル酸の生成を増加させる微生物体。

【請求項6】

3－ヒドロキシイソ酪酸またはメタクリル酸の生成が増殖連結型であるか、または増殖連結型ではない、請求項5に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項7】

前記1つまたは複数の遺伝子破壊が表10または11に列挙したタンパク質または酵素をコードする、請求項5に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項8】

前記1つまたは複数の遺伝子破壊が、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼおよびアセトアルデヒドC o Aデヒドロゲナーゼからなる群から選択されるタンパク質または酵素をコードする、請求項5に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項9】

アスパルターゼ、ピルビン酸ギ酸リアーゼ、NAD(P)トランスヒドロゲナーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、ATPシンターゼ、ホスホエノールピルビン酸：ピルビン酸ホスホトランスフェラーゼ系、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、ホスホトランスアセチラーゼ、酢酸キナーゼ、6－ホスホグルコノラクトナーゼ、グルコース6－リン酸デヒドロゲナーゼおよびNADHデヒドロゲナーゼからなる群から選択されるタンパク質または酵素をコードする1つまたは複数の遺伝子破壊をさらに含む、請求項8に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項10】

前記1つまたは複数の遺伝子破壊が、前記1つまたは複数の遺伝子の欠失を含む、請求項5～9のいずれか一項に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項11】

前記天然に存在しない微生物体が、実質的に嫌気性の培地中にあるか、または前記外因性核酸のうちの少なくとも一つが異種の核酸である、請求項1～10のいずれか一項に記載の天然に存在しない微生物体。

【請求項12】

メタクリル酸を生成する方法であって、メタクリル酸を生成する条件下およびそれに十分な期間、請求項1、4、または11のいずれか一項に記載の天然に存在しない微生物体を培養することを含む方法。

【請求項13】

3－ヒドロキシイソ酪酸を生成する方法であって、3－ヒドロキシイソ酪酸を生成する条件下およびそれに十分な期間、請求項2、4、または11のいずれか一項に記載の天然に存在しない微生物体を培養することを含む方法。

【請求項 1 4】

2-ヒドロキシイソ酪酸を生成する方法であって、2-ヒドロキシイソ酪酸を生成する条件下およびそれに十分な期間、請求項 3、4、または 1 1 のいずれか一項に記載の天然に存在しない微生物体を培養することを含む方法。

【請求項 1 5】

3-ヒドロキシイソ酪酸またはメタクリル酸を生成する方法であって、3-ヒドロキシイソ酪酸またはメタクリル酸を生成する条件下およびそれに十分な期間、請求項 5～1 1 のいずれか一項に記載の天然に存在しない微生物体を培養することを含む方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 1 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 1 1】

本発明は、メタクリル酸経路を有する天然に存在しない微生物体を提供する。微生物体は、メタクリル酸経路中の酵素をコードする少なくとも 1 つの外因性の核酸を含有する。本発明は、メタクリル酸を生成する方法をさらに提供する。この方法は、メタクリル酸を生成する微生物体を培養することを含むことができ、微生物体は、メタクリル酸を生成する条件下および十分な期間、メタクリル酸を生成するのに十分な量で、メタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも 1 つの外因性核酸を発現する。本発明はまた、メタクリル酸前駆体の 3-ヒドロキシイソブチレートおよび 2-ヒドロキシイソブチレートのための生物体および生成方法についても記載する。

本発明は、例えば以下の項目を提供する。

(項目 1)

天然に存在しない微生物体であって、メタクリル酸を生成するのに十分な量で発現されるメタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも 1 つの外因性核酸を含む、メタクリル酸経路を有する微生物体を含み、前記メタクリル酸経路が、3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼを含む微生物体。

(項目 2)

前記メタクリル酸経路が、メチルマロニル C o A ムターゼ、メチルマロニル C o A レダクターゼ、および 3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドロゲナーゼをさらに含む、項目 1 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 3)

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 2 つの外因性核酸を含む、項目 1 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 4)

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 3 つの外因性核酸を含む、項目 1 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 5)

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 4 つの外因性核酸を含む、項目 1 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 6)

前記 4 つの外因性核酸が、メチルマロニル C o A ムターゼ、メチルマロニル C o A レダクターゼ、3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドロゲナーゼ、および 3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼをコードする、項目 5 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 7)

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 5 つの外因性核酸を含む、項目 1 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 8)

前記メタクリル酸経路が、メチルマロニルC o Aエピメラーゼをさらに含む、項目7に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目9)

前記5つの外因性核酸が、メチルマロニルC o Aムターゼ、メチルマロニルC o Aエピメラーゼ、メチルマロニルC o Aレダクターゼ、3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドロゲナーゼ、および3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼをコードする、項目8に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目10)

前記少なくとも1つの外因性核酸が異種の核酸である、項目1に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目11)

実質的に嫌気性の培地中にある、項目1に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目12)

クエン酸シンターゼ、アコニターゼ、イソクエン酸リアーゼ、リンゴ酸シンターゼ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼおよびホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼから選択される少なくとも1つの酵素の活性を増加させる遺伝子改変をさらに含み、活性の増加が、前記遺伝子改変が存在しない状態と比べた増加である、項目1に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目13)

メタクリル酸を生成する方法であって、メタクリル酸を生成する条件下およびそれに十分な期間、項目1に記載の天然に存在しない微生物体を培養することを含む方法。

(項目14)

前記天然に存在しない微生物体を実質的に嫌気性の培地中にある、項目13に記載の方法。

(項目15)

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする2つの外因性核酸を含む、項目13に記載の方法。

(項目16)

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする3つの外因性核酸を含む、項目13に記載の方法。

(項目17)

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする4つの外因性核酸を含む、項目13に記載の方法。

(項目18)

前記4つの外因性核酸が、メチルマロニルC o Aムターゼ、メチルマロニルC o Aレダクターゼ、3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドロゲナーゼおよび3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼをコードする、項目17に記載の方法。

(項目19)

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする5つの外因性核酸を含む、項目13に記載の方法。

(項目20)

前記メタクリル酸経路が、メチルマロニルC o Aエピメラーゼをさらに含む、項目19に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目21)

前記5つの外因性核酸が、メチルマロニルC o Aムターゼ、メチルマロニルC o Aエピメラーゼ、メチルマロニルC o Aレダクターゼ、3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドロゲナーゼおよび3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼをコードする、項目20に記載の方法。

(項目22)

前記少なくとも1つの外因性核酸が異種の核酸である、項目13に記載の方法。

(項目23)

天然に存在しない微生物体であって、メタクリル酸を生成するのに十分な量で発現されるメタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含む、メタクリル酸経路を有する微生物体を含み、前記メタクリル酸経路が、メチルマロニルC o A ムターゼ、アルコール／アルデヒドデヒドロゲナーゼ、および3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼを含む微生物体。

(項目24)

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする2つの外因性核酸を含む、項目23に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目25)

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする3つの外因性核酸を含む、項目23に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目26)

前記3つの外因性核酸が、メチルマロニルC o A ムターゼ、アルコール／アルデヒドデヒドロゲナーゼ、および3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼをコードする、項目25に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目27)

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする4つの外因性核酸を含む、項目23に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目28)

前記メタクリル酸経路が、メチルマロニルC o A エピメラーゼをさらに含む、項目27に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目29)

前記4つの外因性核酸が、メチルマロニルC o A ムターゼ、メチルマロニルC o A エピメラーゼ、アルコール／アルデヒドデヒドロゲナーゼ、および3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼをコードする、項目27に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目30)

前記少なくとも1つの外因性核酸が異種の核酸である、項目23に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目31)

実質的に嫌気性の培地中にある、項目23に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目32)

クエン酸シンターゼ、アコニターゼ、イソクエン酸リアーゼ、リンゴ酸シンターゼ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼおよびホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼから選択される少なくとも1つの酵素の活性を増加させる遺伝子改変をさらに含み、活性の増加が、前記遺伝子改変が存在しない状態と比べた増加である、項目23に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目33)

メタクリル酸を生成する方法であって、メタクリル酸を生成する条件下およびそれに十分な期間、項目23に記載の天然に存在しない微生物体を培養することを含む方法。

(項目34)

前記天然に存在しない微生物体を実質的に嫌気性の培地中にある、項目33に記載の方法。

(項目35)

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする2つの外因性核酸を含む、項目33に記載の方法。

(項目36)

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする3つの外因性核酸を含む、項目33に記載の方法。

(項目37)

前記3つの外因性核酸が、メチルマロニルC o A ムターゼ、アルコール／アルデヒドデ

ヒドロゲナーゼ、および 3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼをコードする、項目 3 6 に記載の方法。

(項目 3 8)

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 4 つの外因性核酸を含む、項目 3 3 に記載の方法。

(項目 3 9)

前記メタクリル酸経路が、メチルマロニル C o A エピメラーゼをさらに含む、項目 3 8 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 4 0)

前記 4 つの外因性核酸が、メチルマロニル C o A ムターゼ、メチルマロニル C o A エピメラーゼ、アルコール／アルデヒドデヒドロゲナーゼ、および 3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼをコードする、項目 3 9 に記載の方法。

(項目 4 1)

前記少なくとも 1 つの外因性核酸が異種の核酸である、項目 3 3 に記載の方法。

(項目 4 2)

天然に存在しない微生物体であって、メタクリル酸を生成するのに十分な量で発現されるメタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも 1 つの外因性核酸を含む、メタクリル酸経路を有する微生物体を含み、前記メタクリル酸経路が、メチルマロニル C o A ムターゼ、メチルマロニル C o A レダクターゼ、3-アミノ-2-メチルプロピオン酸トランスアミナーゼ、および 3-アミノ-2-メチルプロピオン酸アンモニアリアーゼを含む微生物体。

(項目 4 3)

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 2 つの外因性核酸を含む、項目 4 2 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 4 4)

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 3 つの外因性核酸を含む、項目 4 2 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 4 5)

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 4 つの外因性核酸を含む、項目 4 2 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 4 6)

前記 4 つの外因性核酸が、メチルマロニル C o A ムターゼ、メチルマロニル C o A レダクターゼ、3-アミノ-2-メチルプロピオン酸トランスアミナーゼ、および 3-アミノ-2-メチルプロピオン酸アンモニアリアーゼをコードする、項目 4 5 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 4 7)

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 5 つの外因性核酸を含む、項目 4 2 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 4 8)

前記メタクリル酸経路が、メチルマロニル C o A エピメラーゼをさらに含む、項目 4 7 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 4 9)

前記 5 つの外因性核酸が、メチルマロニル C o A ムターゼ、メチルマロニル C o A エピメラーゼ、メチルマロニル C o A レダクターゼ、3-アミノ-2-メチルプロピオン酸トランスアミナーゼ、および 3-アミノ-2-メチルプロピオン酸アンモニアリアーゼをコードする、項目 4 8 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 5 0)

前記少なくとも 1 つの外因性核酸が異種の核酸である、項目 4 2 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 5 1)

実質的に嫌気性の培地中にある、項目 4 2 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 5 2)

クエン酸シンターゼ、アコニターゼ、イソクエン酸リアーゼ、リンゴ酸シンターゼ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼおよびホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼから選択される少なくとも 1 つの酵素の活性を増加させる遺伝子改変をさらに含み、活性の増加が、前記遺伝子改変が存在しない状態と比べた増加である、項目 4 2 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 5 3)

メタクリル酸を生成する方法であって、メタクリル酸を生成する条件下およびそれに十分な期間、項目 4 2 に記載の天然に存在しない微生物体を培養することを含む方法。

(項目 5 4)

前記天然に存在しない微生物体を実質的に嫌気性の培地中にある、項目 5 3 に記載の方法。

(項目 5 5)

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 2 つの外因性核酸を含む、項目 5 3 に記載の方法。

(項目 5 6)

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 3 つの外因性核酸を含む、項目 5 3 に記載の方法。

(項目 5 7)

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 4 つの外因性核酸を含む、項目 5 3 に記載の方法。

(項目 5 8)

前記 4 つの外因性核酸が、メチルマロニル C o A ムターゼ、メチルマロニル C o A レダクターゼ、3-アミノ-2-メチルプロピオン酸トランスアミナーゼ、および 3-アミノ-2-メチルプロピオン酸アンモニアリアーゼをコードする、項目 5 7 に記載の方法。

(項目 5 9)

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 5 つの外因性核酸を含む、項目 5 3 に記載の方法。

(項目 6 0)

前記メタクリル酸経路が、メチルマロニル C o A エピメラーゼをさらに含む、項目 5 9 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 6 1)

前記 5 つの外因性核酸が、メチルマロニル C o A ムターゼ、メチルマロニル C o A エピメラーゼ、メチルマロニル C o A レダクターゼ、3-アミノ-2-メチルプロピオン酸トランスアミナーゼ、および 3-アミノ-2-メチルプロピオン酸アンモニアリアーゼをコードする、項目 6 0 に記載の方法。

(項目 6 2)

前記少なくとも 1 つの外因性核酸が異種の核酸である、項目 5 3 に記載の方法。

(項目 6 3)

天然に存在しない微生物体であって、メタクリル酸を生成するのに十分な量で発現されるメタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも 1 つの外因性核酸を含む、メタクリル酸経路を有する微生物体を含み、前記メタクリル酸経路が、4-ヒドロキシブチリル C o A ムターゼ、3-ヒドロキシイソブチリル C o A シンターゼまたは 3-ヒドロキシイソブチリル C o A ヒドラーゼまたは 3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼを含む微生物体。

(項目 6 4)

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 2 つの外因性核酸を含む、項目 6 3 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 6 5)

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする3つの外因性核酸を含む、項目63に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目66)

前記3つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリルCoAムターゼ、3-ヒドロキシイソブチリルCoAシンテターゼ、および3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼをコードする、項目63に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目67)

前記3つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリルCoAムターゼ、3-ヒドロキシイソブチリルCoAヒドロラーゼ、および3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼをコードする、項目63に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目68)

前記3つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリルCoAムターゼ、3-ヒドロキシイソブチリルCoAトランスフェラーゼ、および3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼをコードする、項目63に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目69)

前記少なくとも1つの外因性核酸が異種の核酸である、項目63に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目70)

実質的に嫌気性の培地中にある、項目63に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目71)

クエン酸シンターゼ、アコニターゼ、イソクエン酸リアーゼ、リンゴ酸シンターゼ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼおよびホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼから選択される少なくとも1つの酵素の活性を増加させる遺伝子改変をさらに含み、活性の増加が、前記遺伝子改変が存在しない状態と比べた増加である、項目63に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目72)

メタクリル酸を生成する方法であって、メタクリル酸を生成する条件下およびそれに十分な期間、項目63に記載の天然に存在しない微生物体を培養することを含む方法。

(項目73)

前記天然に存在しない微生物体を実質的に嫌気性の培地中にある、項目72に記載の方法。

(項目74)

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする2つの外因性核酸を含む、項目72に記載の方法。

(項目75)

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする3つの外因性核酸を含む、項目72に記載の方法。

(項目76)

前記3つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリルCoAムターゼ、3-ヒドロキシイソブチリルCoAシンテターゼ、および3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼをコードする、項目75に記載の方法。

(項目77)

前記3つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリルCoAムターゼ、3-ヒドロキシイソブチリルCoAヒドロラーゼ、および3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼをコードする、項目75に記載の方法。

(項目78)

前記3つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリルCoAムターゼ、3-ヒドロキシイソブチリルCoAトランスフェラーゼ、および3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼをコードする、項目75に記載の方法。

(項目79)

前記少なくとも 1 つの外因性核酸が異種の核酸である、項目 7 2 に記載の方法。

(項目 8 0)

天然に存在しない微生物体であって、メタクリル酸を生成するのに十分な量で発現されるメタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも 1 つの外因性核酸を含む、メタクリル酸経路を有する微生物体を含み、前記メタクリル酸経路が、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、グルタミン酸ムターゼ、3-メチルアスパルターゼ、およびメサコン酸デカルボキシラーゼを含む微生物体。

(項目 8 1)

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 2 つの外因性核酸を含む、項目 8 0 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 8 2)

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 3 つの外因性核酸を含む、項目 8 0 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 8 3)

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 4 つの外因性核酸を含む、項目 8 0 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 8 4)

前記 4 つの外因性核酸が、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、グルタミン酸ムターゼ、3-メチルアスパルターゼ、およびメサコン酸デカルボキシラーゼをコードする、項目 8 3 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 8 5)

前記少なくとも 1 つの外因性核酸が異種の核酸である、項目 8 0 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 8 6)

実質的に嫌気性の培地中にある、項目 8 0 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 8 7)

メタクリル酸を生成する方法であって、メタクリル酸を生成する条件下およびそれに十分な期間、項目 8 0 に記載の天然に存在しない微生物体を培養することを含む方法。

(項目 8 8)

前記天然に存在しない微生物体の実質的に嫌気性の培地中にある、項目 8 7 に記載の方法。

(項目 8 9)

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 2 つの外因性核酸を含む、項目 8 7 に記載の方法。

(項目 9 0)

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 3 つの外因性核酸を含む、項目 8 7 に記載の方法。

(項目 9 1)

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 4 つの外因性核酸を含む、項目 8 7 に記載の方法。

(項目 9 2)

前記 4 つの外因性核酸が、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、グルタミン酸ムターゼ、3-メチルアスパルターゼ、およびメサコン酸デカルボキシラーゼをコードする、項目 9 1 に記載の方法。

(項目 9 3)

前記少なくとも 1 つの外因性核酸が異種の核酸である、項目 8 7 に記載の方法。

(項目 9 4)

天然に存在しない微生物体であって、メタクリル酸を生成するのに十分な量で発現されるメタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも 1 つの外因性核酸を含む、メタクリル酸経路を有する微生物体を含み、前記メタクリル酸経路が、アルファーケトグルタル酸レ

ダクターゼ、2-ヒドロキシグルタミン酸ムターゼ、3-メチルリンゴ酸デヒドラターゼ、およびメサコン酸デカルボキシラーゼを含む微生物体。

(項目 9 5)

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 2 つの外因性核酸を含む、項目 9 4 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 9 6)

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 3 つの外因性核酸を含む、項目 9 4 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 9 7)

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 4 つの外因性核酸を含む、項目 9 4 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 9 8)

前記 4 つの外因性核酸が、アルファーケトグルタル酸レダクターゼ、2-ヒドロキシグルタミン酸ムターゼ、3-メチルリンゴ酸デヒドラターゼ、およびメサコン酸デカルボキシラーゼをコードする、項目 9 7 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 9 9)

前記少なくとも 1 つの外因性核酸が異種の核酸である、項目 9 4 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 1 0 0)

実質的に嫌気性の培地中にある、項目 9 4 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 1 0 1)

メタクリル酸を生成する方法であって、メタクリル酸を生成する条件下およびそれに十分な期間、項目 9 4 に記載の天然に存在しない微生物体を培養することを含む方法。

(項目 1 0 2)

前記天然に存在しない微生物体を実質的に嫌気性の培地中にある、項目 1 0 1 に記載の方法。

(項目 1 0 3)

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 2 つの外因性核酸を含む、項目 1 0 1 に記載の方法。

(項目 1 0 4)

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 3 つの外因性核酸を含む、項目 1 0 1 に記載の方法。

(項目 1 0 5)

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 4 つの外因性核酸を含む、項目 1 0 1 に記載の方法。

(項目 1 0 6)

前記 4 つの外因性核酸が、アルファーケトグルタル酸レダクターゼ、2-ヒドロキシグルタミン酸ムターゼ、3-メチルリンゴ酸デヒドラターゼ、およびメサコン酸デカルボキシラーゼをコードする、項目 1 0 1 に記載の方法。

(項目 1 0 7)

前記少なくとも 1 つの外因性核酸が異種の核酸である、項目 1 0 1 に記載の方法。

(項目 1 0 8)

天然に存在しない微生物体であって、メタクリル酸を生成するのに十分な量で発現されるメタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも 1 つの外因性核酸を含む、メタクリル酸経路を有する微生物体を含み、前記メタクリル酸経路が、アセトアセチル CoA チオラーゼ、アセトアセチル CoA レダクターゼ、3-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリル CoA デヒドラターゼ、およびメタクリル CoA トランスフェラーゼまたはメタクリル CoA ヒドロラーゼまたはメタクリル CoA シンテターゼを含む微生物体。

(項目 1 0 9)

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする2つの外因性核酸を含む、項目108に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目110)

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする3つの外因性核酸を含む、項目108に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目111)

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする4つの外因性核酸を含む、項目108に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目112)

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする5つの外因性核酸を含む、項目108に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目113)

前記5つの外因性核酸が、アセトアセチルC o Aチオラーゼ、アセトアセチルC o Aレダクターゼ、3-ヒドロキシブチリルC o Aムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリルC o Aデヒドラターゼ、およびメタクリルC o Aトランスフェラーゼをコードする、項目112に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目114)

前記5つの外因性核酸が、アセトアセチルC o Aチオラーゼ、アセトアセチルC o Aレダクターゼ、3-ヒドロキシブチリルC o Aムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリルC o Aデヒドラターゼ、およびメタクリルC o Aヒドロラーゼをコードする、項目112に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目115)

前記5つの外因性核酸が、アセトアセチルC o Aチオラーゼ、アセトアセチルC o Aレダクターゼ、3-ヒドロキシブチリルC o Aムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリルC o Aデヒドラターゼ、およびメタクリルC o Aシンテターゼをコードする、項目112に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目116)

前記少なくとも1つの外因性核酸が異種の核酸である、項目108に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目117)

実質的に嫌気性の培地中にある、項目108に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目118)

メタクリル酸を生成する方法であって、メタクリル酸を生成する条件下およびそれに十分な期間、項目108に記載の天然に存在しない微生物体を培養することを含む方法。

(項目119)

前記天然に存在しない微生物体を実質的に嫌気性の培地中にある、項目118に記載の方法。

(項目120)

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする2つの外因性核酸を含む、項目118に記載の方法。

(項目121)

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする3つの外因性核酸を含む、項目118に記載の方法。

(項目122)

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする4つの外因性核酸を含む、項目118に記載の方法。

(項目123)

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする5つの外因性核酸を含む、項目118に記載の方法。

(項目124)

前記 5 つの外因性核酸が、アセトアセチル C o A チオラーゼ、アセトアセチル C o A レダクターゼ、3-ヒドロキシブチリル C o A ムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリル C o A デヒドラターゼ、およびメタクリリル C o A トランスフェラーゼをコードする、項目 1 2 3 に記載の方法。

(項目 1 2 5)

前記 5 つの外因性核酸が、アセトアセチル C o A チオラーゼ、アセトアセチル C o A レダクターゼ、3-ヒドロキシブチリル C o A ムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリル C o A デヒドラターゼ、およびメタクリリル C o A ヒドロラーゼをコードする、項目 1 2 3 に記載の方法。

(項目 1 2 6)

前記 5 つの外因性核酸が、アセトアセチル C o A チオラーゼ、アセトアセチル C o A レダクターゼ、3-ヒドロキシブチリル C o A ムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリル C o A デヒドラターゼ、およびメタクリリル C o A シンテターゼをコードする、項目 1 2 3 に記載の方法。

(項目 1 2 7)

前記少なくとも 1 つの外因性核酸が異種の核酸である、項目 1 1 8 に記載の方法。

(項目 1 2 8)

天然に存在しない微生物体であって、メタクリル酸を生成するのに十分な量で発現されるメタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも 1 つの外因性核酸を含む、メタクリル酸経路を有する微生物体を含み、前記メタクリル酸経路が、アセトアセチル C o A チオラーゼ、アセトアセチル C o A レダクターゼ、3-ヒドロキシブチリル C o A ムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリル C o A デヒドラターゼ、エノイル C o A ヒドラターゼ、および 3-ヒドロキシイソブチリル C o A ヒドロラーゼまたは 3-ヒドロキシイソブチリル C o A シンテターゼまたは 3-ヒドロキシイソブチリル C o A トランスフェラーゼ、および 3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼを含む微生物体。

(項目 1 2 9)

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 2 つの外因性核酸を含む、項目 1 2 8 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 1 3 0)

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 3 つの外因性核酸を含む、項目 1 2 8 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 1 3 1)

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 4 つの外因性核酸を含む、項目 1 2 8 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 1 3 2)

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 5 つの外因性核酸を含む、項目 1 2 8 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 1 3 3)

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 6 つの外因性核酸を含む、項目 1 2 8 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 1 3 4)

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 7 つの外因性核酸を含む、項目 1 2 8 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 1 3 5)

前記 7 つの外因性核酸が、アセトアセチル C o A チオラーゼ、アセトアセチル C o A レダクターゼ、3-ヒドロキシブチリル C o A ムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリル C o A デヒドラターゼ、エノイル C o A ヒドラターゼ、3-ヒドロキシイソブチリル C o A ヒドロラーゼ、および 3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼをコードする、項目 1 3 4 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 1 3 6)

前記7つの外因性核酸が、アセトアセチルC o Aチオラーゼ、アセトアセチルC o Aレダクターゼ、3-ヒドロキシブチリルC o Aムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリルC o Aデヒドラターゼ、エノイルC o Aヒドラターゼ、3-ヒドロキシイソブチリルC o Aシンテターゼ、および3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼをコードする、項目134に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目137)

前記7つの外因性核酸が、アセトアセチルC o Aチオラーゼ、アセトアセチルC o Aレダクターゼ、3-ヒドロキシブチリルC o Aムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリルC o Aデヒドラターゼ、エノイルC o Aヒドラターゼ、3-ヒドロキシイソブチリルC o Aトランスフェラーゼ、および3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼをコードする、項目134に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目138)

前記少なくとも1つの外因性核酸が異種の核酸である、項目128に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目139)

実質的に嫌気性の培地中にある、項目128に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目140)

メタクリル酸を生成する方法であって、メタクリル酸を生成する条件下およびそれに十分な期間、項目128に記載の天然に存在しない微生物体を培養することを含む方法。

(項目141)

前記天然に存在しない微生物体を実質的に嫌気性の培地中にある、項目140に記載の方法。

(項目142)

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする2つの外因性核酸を含む、項目140に記載の方法。

(項目143)

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする3つの外因性核酸を含む、項目140に記載の方法。

(項目144)

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする4つの外因性核酸を含む、項目140に記載の方法。

(項目145)

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする5つの外因性核酸を含む、項目140に記載の方法。

(項目146)

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする6つの外因性核酸を含む、項目140に記載の方法。

(項目147)

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする7つの外因性核酸を含む、項目140に記載の方法。

(項目148)

前記7つの外因性核酸が、アセトアセチルC o Aチオラーゼ、アセトアセチルC o Aレダクターゼ、3-ヒドロキシブチリルC o Aムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリルC o Aデヒドラターゼ、エノイルC o Aヒドラターゼ、3-ヒドロキシイソブチリルC o Aヒドロラーゼ、および3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼをコードする、項目147に記載の方法。

(項目149)

前記7つの外因性核酸が、アセトアセチルC o Aチオラーゼ、アセトアセチルC o Aレダクターゼ、3-ヒドロキシブチリルC o Aムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリルC o Aデヒドラターゼ、エノイルC o Aヒドラターゼ、3-ヒドロキシイソブチリルC o Aシ

ンテターゼ、および 3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼをコードする、項目 147 に記載の方法。

(項目 150)

前記 7 つの外因性核酸が、アセトアセチル CoA チオラーゼ、アセトアセチル CoA レダクターゼ、3-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリル CoA デヒドラターゼ、エノイル CoA ヒドラターゼ、3-ヒドロキシイソブチリル CoA トランスフェラーゼ、および 3-ヒドロキシイソ酪酸デヒドラターゼをコードする、項目 147 に記載の方法。

(項目 151)

前記少なくとも 1 つの外因性核酸が異種の核酸である、項目 140 に記載の方法。

(項目 152)

天然に存在しない微生物体であって、3-ヒドロキシイソ酪酸を生成するのに十分な量で発現される 3-ヒドロキシイソ酪酸経路の酵素をコードする少なくとも 1 つの外因性核酸を含む、3-ヒドロキシイソ酪酸経路を有する微生物体を含み、前記 3-ヒドロキシイソ酪酸経路が、4-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼおよび 3-ヒドロキシイソブチリル CoA シンテターゼまたは 3-ヒドロキシイソブチリル CoA ヒドロラーゼまたは 3-ヒドロキシイソブチリル CoA トランスフェラーゼを含む微生物体。

(項目 153)

それぞれ 3-ヒドロキシイソ酪酸経路の酵素をコードする 2 つの外因性核酸を含む、項目 152 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 154)

前記 2 つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼおよび 3-ヒドロキシイソブチリル CoA シンテターゼをコードする、項目 153 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 155)

前記 2 つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼおよび 3-ヒドロキシイソブチリル CoA ヒドロラーゼをコードする、項目 153 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 156)

前記 2 つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼおよび 3-ヒドロキシイソブチリル CoA トランスフェラーゼをコードする、項目 153 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 157)

前記少なくとも 1 つの外因性核酸が異種の核酸である、項目 152 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 158)

実質的に嫌気性の培地中にある、項目 152 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 159)

クエン酸シンターゼ、アコニターゼ、イソクエン酸リアーゼ、リンゴ酸シンターゼ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼおよびホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼから選択される少なくとも 1 つの酵素の活性を増加させる遺伝子改変をさらに含み、活性の増加が、前記遺伝子改変が存在しない状態と比べた増加である、項目 152 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 160)

3-ヒドロキシイソ酪酸を生成する方法であって、3-ヒドロキシイソ酪酸を生成する条件下およびそれに十分な期間、項目 152 に記載の天然に存在しない微生物体を培養することを含む方法。

(項目 161)

前記天然に存在しない微生物体を実質的に嫌気性の培地中にある、項目 160 に記載の方法。

(項目 1 6 2)

前記微生物体が、それぞれ 3-ヒドロキシイソ酪酸経路の酵素をコードする 2 つの外因性核酸を含む、項目 1 6 0 に記載の方法。

(項目 1 6 3)

前記 2 つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼおよび 3-ヒドロキシイソブチリル CoA シンテターゼをコードする、項目 1 6 2 に記載の方法。

(項目 1 6 4)

前記 2 つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼおよび 3-ヒドロキシイソブチリル CoA ヒドロラーゼをコードする、項目 1 6 2 に記載の方法。

(項目 1 6 5)

前記 2 つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼおよび 3-ヒドロキシイソブチリル CoA トランスフェラーゼをコードする、項目 1 6 2 に記載の方法。

(項目 1 6 6)

前記少なくとも 1 つの外因性核酸が異種の核酸である、項目 1 6 0 に記載の方法。

(項目 1 6 7)

天然に存在しない微生物体であって、2-ヒドロキシイソ酪酸を生成するのに十分な量で発現される 2-ヒドロキシイソ酪酸経路の酵素をコードする少なくとも 1 つの外因性核酸を含む、2-ヒドロキシイソ酪酸経路を有する微生物体を含み、前記 2-ヒドロキシイソ酪酸経路が、アセトアセチル CoA チオラーゼ、アセトアセチル CoA レダクターゼ、3-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼ、および 2-ヒドロキシイソブチリル CoA トランスフェラーゼまたは 2-ヒドロキシイソブチリル CoA ヒドロラーゼまたは 2-ヒドロキシイソブチリル CoA シンテターゼを含む微生物体。

(項目 1 6 8)

それぞれ 2-ヒドロキシイソ酪酸経路の酵素をコードする 2 つの外因性核酸を含む、項目 1 6 7 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 1 6 9)

それぞれ 2-ヒドロキシイソ酪酸経路の酵素をコードする 3 つの外因性核酸を含む、項目 1 6 7 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 1 7 0)

それぞれ 2-ヒドロキシイソ酪酸経路の酵素をコードする 4 つの外因性核酸を含む、項目 1 6 7 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 1 7 1)

前記 4 つの外因性核酸が、アセトアセチル CoA チオラーゼ、アセトアセチル CoA レダクターゼ、3-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼ、および 2-ヒドロキシイソブチリル CoA トランスフェラーゼをコードする、項目 1 7 0 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 1 7 2)

前記 4 つの外因性核酸が、アセトアセチル CoA チオラーゼ、アセトアセチル CoA レダクターゼ、3-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼ、および 2-ヒドロキシイソブチリル CoA ヒドロラーゼをコードする、項目 1 7 0 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 1 7 3)

前記 4 つの外因性核酸が、アセトアセチル CoA チオラーゼ、アセトアセチル CoA レダクターゼ、3-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼ、および 2-ヒドロキシイソブチリル CoA シンテターゼをコードする、項目 1 7 0 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 1 7 4)

前記少なくとも 1 つの外因性核酸が異種の核酸である、項目 1 6 7 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 1 7 5)

実質的に嫌気性の培地中にある、項目 1 6 7 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 1 7 6)

2-ヒドロキシイソ酪酸を生成する方法であって、2-ヒドロキシイソ酪酸を生成する条件下およびそれに十分な期間、項目167に記載の天然に存在しない微生物体を培養することを含む方法。

(項目177)

前記天然に存在しない微生物体を実質的に嫌気性の培地中にある、項目176に記載の方法。

(項目178)

前記微生物体が、それぞれ2-ヒドロキシイソ酪酸経路の酵素をコードする2つの外因性核酸を含む、項目176に記載の方法。

(項目179)

前記微生物体が、それぞれ2-ヒドロキシイソ酪酸経路の酵素をコードする3つの外因性核酸を含む、項目176に記載の方法。

(項目180)

前記微生物体が、それぞれ2-ヒドロキシイソ酪酸経路の酵素をコードする4つの外因性核酸を含む、項目176に記載の方法。

(項目181)

前記4つの外因性核酸が、アセトアセチルCoAチオラーゼ、アセトアセチルCoAレダクターゼ、3-ヒドロキシブチリルCoAムターゼ、および2-ヒドロキシイソブチリルCoAトランスフェラーゼをコードする、項目180に記載の方法。

(項目182)

前記4つの外因性核酸が、アセトアセチルCoAチオラーゼ、アセトアセチルCoAレダクターゼ、3-ヒドロキシブチリルCoAムターゼ、および2-ヒドロキシイソブチリルCoAヒドロラーゼをコードする、項目180に記載の方法。

(項目183)

前記4つの外因性核酸が、アセトアセチルCoAチオラーゼ、アセトアセチルCoAレダクターゼ、3-ヒドロキシブチリルCoAムターゼ、および2-ヒドロキシイソブチリルCoAシンテターゼをコードする、項目180に記載の方法。

(項目184)

前記少なくとも1つの外因性核酸が異種の核酸である、項目176に記載の方法。

(項目185)

天然に存在しない微生物体であって、メタクリル酸を生成するのに十分な量で発現されるメタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含む、メタクリル酸経路を有する微生物体を含み、前記メタクリル酸経路が、4-ヒドロキシブチリルCoAデヒドラターゼ、ビニルアセチルCoA Δ -イソメラーゼ、クロトナーゼ、3-ヒドロキシブチリルCoAムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリルCoAデヒドラターゼ、およびメタクリルCoAヒドロラーゼまたはメタクリルCoAシンテターゼまたはメタクリルCoAトランスフェラーゼのいずれかを含む微生物体。

(項目186)

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする2つの外因性核酸を含む、項目185に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目187)

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする3つの外因性核酸を含む、項目185に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目188)

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする4つの外因性核酸を含む、項目185に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目189)

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする5つの外因性核酸を含む、項目185に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目190)

前記 5 つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリル CoA デヒドラターゼ、ビニルアセチル CoA Δ-イソメラーゼ、クロトナーゼ、3-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリル CoA デヒドラターゼ、およびメタクリリル CoA ヒドロラーゼをコードする、項目 189 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 191)

前記 5 つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリル CoA デヒドラターゼ、ビニルアセチル CoA Δ-イソメラーゼ、クロトナーゼ、3-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリル CoA デヒドラターゼ、およびメタクリリル CoA シンターゼをコードする、項目 189 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 192)

前記 5 つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリル CoA デヒドラターゼ、ビニルアセチル CoA Δ-イソメラーゼ、クロトナーゼ、3-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリル CoA デヒドラターゼ、およびメタクリリル CoA トランスフェラーゼをコードする、項目 189 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 193)

前記少なくとも 1 つの外因性核酸が異種の核酸である、項目 185 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 194)

実質的に嫌気性の培地中にある、項目 185 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 195)

クエン酸シンターゼ、アコニターゼ、イソクエン酸リアーゼ、リンゴ酸シンターゼ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼおよびホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼから選択される少なくとも 1 つの酵素の活性を増加させる遺伝子改変をさらに含み、活性の増加が、前記遺伝子改変が存在しない状態と比べた増加である、項目 185 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 196)

メタクリル酸を生成する方法であって、メタクリル酸を生成する条件下およびそれに十分な期間、項目 185 に記載の天然に存在しない微生物体を培養することを含む方法。

(項目 197)

前記天然に存在しない微生物体を実質的に嫌気性の培地中にある、項目 196 に記載の方法。

(項目 198)

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 2 つの外因性核酸を含む、項目 196 に記載の方法。

(項目 199)

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 3 つの外因性核酸を含む、項目 196 に記載の方法。

(項目 200)

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 4 つの外因性核酸を含む、項目 196 に記載の方法。

(項目 201)

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 5 つの外因性核酸を含む、項目 196 に記載の方法。

(項目 202)

前記 5 つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリル CoA デヒドラターゼ、ビニルアセチル CoA Δ-イソメラーゼ、クロトナーゼ、3-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリル CoA デヒドラターゼ、およびメタクリリル CoA ヒドロラーゼをコードする、項目 201 に記載の方法。

(項目 203)

前記 5 つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリル CoA デヒドラターゼ、ビニルアセ

チルC o A Δ-イソメラーゼ、クロトナーゼ、3-ヒドロキシブチリルC o A ムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリルC o A デヒドラターゼ、およびメタクリリルC o A シンテターゼをコードする、項目201に記載の方法。

(項目204)

前記5つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリルC o A デヒドラターゼ、ビニルアセチルC o A Δ-イソメラーゼ、クロトナーゼ、3-ヒドロキシブチリルC o A ムターゼ、2-ヒドロキシイソブチリルC o A デヒドラターゼ、およびメタクリリルC o A トランスフェラーゼをコードする、項目201に記載の方法。

(項目205)

前記少なくとも1つの外因性核酸が異種の核酸である、項目196に記載の方法。

(項目206)

天然に存在しない微生物体であって、2-ヒドロキシイソ酪酸を生成するのに十分な量で発現される2-ヒドロキシイソ酪酸経路の酵素をコードする少なくとも1つの外因性核酸を含む、2-ヒドロキシイソ酪酸経路を有する微生物体を含み、前記2-ヒドロキシイソ酪酸経路が、4-ヒドロキシブチリルC o A デヒドラターゼ、ビニルアセチルC o A Δ-イソメラーゼ、クロトナーゼ、3-ヒドロキシブチリルC o A ムターゼ、および2-ヒドロキシイソブチリルC o A ヒドロラーゼまたは2-ヒドロキシイソブチリルC o A シンテターゼまたは2-ヒドロキシイソブチリルC o A トランスフェラーゼのいずれかを含む微生物体。

(項目207)

それぞれ2-ヒドロキシイソ酪酸経路の酵素をコードする2つの外因性核酸を含む、項目206に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目208)

それぞれ2-ヒドロキシイソ酪酸経路の酵素をコードする3つの外因性核酸を含む、項目206に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目209)

それぞれ2-ヒドロキシイソ酪酸経路の酵素をコードする4つの外因性核酸を含む、項目206に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目210)

前記4つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリルC o A デヒドラターゼ、ビニルアセチルC o A Δ-イソメラーゼ、クロトナーゼ、3-ヒドロキシブチリルC o A ムターゼ、および2-ヒドロキシイソブチリルC o A ヒドロラーゼをコードする、項目209に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目211)

前記4つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリルC o A デヒドラターゼ、ビニルアセチルC o A Δ-イソメラーゼ、クロトナーゼ、3-ヒドロキシブチリルC o A ムターゼ、および2-ヒドロキシイソブチリルC o A シンテターゼをコードする、項目209に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目212)

前記4つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリルC o A デヒドラターゼ、ビニルアセチルC o A Δ-イソメラーゼ、クロトナーゼ、3-ヒドロキシブチリルC o A ムターゼ、および2-ヒドロキシイソブチリルC o A トランスフェラーゼをコードする、項目209に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目213)

前記少なくとも1つの外因性核酸が異種の核酸である、項目206に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目214)

実質的に嫌気性の培地中にある、項目206に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目215)

2-ヒドロキシイソ酪酸を生成する方法であって、2-ヒドロキシイソ酪酸を生成する

条件下およびそれに十分な期間、項目 2 0 6 に記載の天然に存在しない微生物体を培養することを含む方法。

(項目 2 1 6)

前記天然に存在しない微生物体を実質的に嫌気性の培地中にある、項目 2 1 5 に記載の方法。

(項目 2 1 7)

前記微生物体が、それぞれ 2-ヒドロキシイソ酪酸経路の酵素をコードする 2 つの外因性核酸を含む、項目 2 1 5 に記載の方法。

(項目 2 1 8)

前記微生物体が、それぞれ 2-ヒドロキシイソ酪酸経路の酵素をコードする 3 つの外因性核酸を含む、項目 2 1 5 に記載の方法。

(項目 2 1 9)

前記微生物体が、それぞれ 2-ヒドロキシイソ酪酸経路の酵素をコードする 4 つの外因性核酸を含む、項目 2 1 5 に記載の方法。

(項目 2 2 0)

前記 4 つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリル CoA デヒドラターゼ、ビニルアセチル CoA Δ-イソメラーゼ、クロトナーゼ、3-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼ、および 2-ヒドロキシイソブチリル CoA ヒドロラーゼをコードする、項目 2 1 9 に記載の方法。

(項目 2 2 1)

前記 4 つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリル CoA デヒドラターゼ、ビニルアセチル CoA Δ-イソメラーゼ、クロトナーゼ、3-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼ、および 2-ヒドロキシイソブチリル CoA シンテターゼをコードする、項目 2 1 9 に記載の方法。

(項目 2 2 2)

前記 4 つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリル CoA デヒドラターゼ、ビニルアセチル CoA Δ-イソメラーゼ、クロトナーゼ、3-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼ、および 2-ヒドロキシイソブチリル CoA トランスフェラーゼをコードする、項目 2 1 9 に記載の方法。

(項目 2 2 3)

前記少なくとも 1 つの外因性核酸が異種の核酸である、項目 2 1 5 に記載の方法。

(項目 2 2 4)

天然に存在しない微生物体であって、メタクリル酸を生成するのに十分な量で発現されるメタクリル酸経路の酵素をコードする少なくとも 1 つの外因性核酸を含む、メタクリル酸経路を有する微生物体を含み、前記メタクリル酸経路が、4-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼ、3-ヒドロキシイソブチリル CoA デヒドラターゼ、およびメタクリリル CoA シンテターゼまたはメタクリリル CoA ヒドロラーゼまたはメタクリリル CoA トランスフェラーゼを含む微生物体。

(項目 2 2 5)

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 2 つの外因性核酸を含む、項目 2 2 4 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 2 2 6)

それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする 3 つの外因性核酸を含む、項目 2 2 4 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 2 2 7)

前記 3 つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼ、メタクリリル CoA シンテターゼ、および 3-ヒドロキシイソブチリル CoA デヒドラターゼをコードする、項目 2 2 4 に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目 2 2 8)

前記 3 つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリル CoA ムターゼ、メタクリリル CoA

Aヒドロラーゼ、および3-ヒドロキシイソブチリルCoAデヒドラターゼをコードする、項目224に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目229)

前記3つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリルCoAムターゼ、メタクリリルCoAトランスフェラーゼ、および3-ヒドロキシイソブチリルCoAデヒドラターゼをコードする、項目224に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目230)

前記少なくとも1つの外因性核酸が異種の核酸である、項目224に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目231)

実質的に嫌気性の培地中にある、項目224に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目232)

クエン酸シンターゼ、アコニターゼ、イソクエン酸リアーゼ、リンゴ酸シンターゼ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼおよびホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼから選択される少なくとも1つの酵素の活性を増加させる遺伝子改変をさらに含み、活性の増加が、前記遺伝子改変が存在しない状態と比べた増加である、項目224に記載の天然に存在しない微生物体。

(項目233)

メタクリル酸を生成する方法であって、メタクリル酸を生成する条件下およびそれに十分な期間、項目224に記載の天然に存在しない微生物体を培養することを含む方法。

(項目234)

前記天然に存在しない微生物体を実質的に嫌気性の培地中にある、項目233に記載の方法。

(項目235)

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする2つの外因性核酸を含む、項目233に記載の方法。

(項目236)

前記微生物体が、それぞれメタクリル酸経路の酵素をコードする3つの外因性核酸を含む、項目233に記載の方法。

(項目237)

前記3つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリルCoAムターゼ、メタクリリルCoAシンテターゼ、および3-ヒドロキシイソブチリルCoAデヒドラターゼをコードする、項目236に記載の方法。

(項目238)

前記3つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリルCoAムターゼ、メタクリリルCoAヒドロラーゼ、および3-ヒドロキシイソブチリルCoAデヒドラターゼをコードする、項目236に記載の方法。

(項目239)

前記3つの外因性核酸が、4-ヒドロキシブチリルCoAムターゼ、メタクリリルCoAトランスフェラーゼ、および3-ヒドロキシイソブチリルCoAデヒドラターゼをコードする、項目236に記載の方法。

(項目240)

前記少なくとも1つの外因性核酸が異種の核酸である、項目233に記載の方法。

(項目241)

天然に存在しない微生物体であって、タンパク質または酵素をコードする遺伝子中に生じている1つまたは複数の遺伝子破壊を含み、前記1つまたは複数の遺伝子破壊が前記生物体における3-ヒドロキシイソ酪酸またはメタクリル酸の生成の増加を付与する微生物体。

(項目242)

3-ヒドロキシイソ酪酸またはメタクリル酸の生成が増殖連結型である、項目241に

記載の天然に存在しない生物体。

(項目 2 4 3)

3-ヒドロキシイソ酪酸またはメタクリル酸の生成が増殖連結型でない、項目 2 4 1 に記載の天然に存在しない生物体。

(項目 2 4 4)

前記 1 つまたは複数の遺伝子破壊が表 1 0 または 1 1 に列挙したタンパク質または酵素をコードする、項目 2 4 1 に記載の天然に存在しない生物体。

(項目 2 4 5)

前記 1 つまたは複数の遺伝子破壊が、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼおよびアセトアルデヒド C o A デヒドロゲナーゼからなる群から選択されるタンパク質または酵素をコードする、項目 2 4 1 に記載の天然に存在しない生物体。

(項目 2 4 6)

アスパルターゼ、ピルビン酸ギ酸リアーゼ、N A D (P) トランスヒドロゲナーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、A T P シンターゼ、ホスホエノールピルビン酸：ピルビン酸ホスホトランスフェラーゼ系、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、ホスホトランスアセチラーゼ、酢酸キナーゼ、6-ホスホグルコノラクトナーゼ、グルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼおよび N A D H デヒドロゲナーゼからなる群から選択されるタンパク質または酵素をコードする 1 つまたは複数の遺伝子破壊をさらに含む、項目 2 4 5 に記載の天然に存在しない生物体。

(項目 2 4 7)

前記 1 つまたは複数の遺伝子破壊が、前記 1 つまたは複数の遺伝子の欠失を含む、項目 2 4 1 に記載の生物体。

(項目 2 4 8)

前記細胞が実質的に嫌気性の培地中にある、項目 2 4 1 に記載の生物体。

(項目 2 4 9)

3-ヒドロキシイソ酪酸またはメタクリル酸を生成する方法であって、3-ヒドロキシイソ酪酸またはメタクリル酸を生成する条件下およびそれに十分な期間、項目 2 4 1 に記載の天然に存在しない微生物体を培養することを含む方法。

(項目 2 5 0)

3-ヒドロキシイソ酪酸またはメタクリル酸の生成が増殖連結型である、項目 2 4 9 に記載の方法。

(項目 2 5 1)

3-ヒドロキシイソ酪酸またはメタクリル酸の生成が増殖連結型でない、項目 2 4 9 に記載の方法。

(項目 2 5 2)

前記 1 つまたは複数の遺伝子破壊が表 1 0 または 1 1 に列挙したタンパク質または酵素をコードする、項目 2 4 9 に記載の方法。

(項目 2 5 3)

前記 1 つまたは複数の遺伝子破壊が、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼおよびアセトアルデヒド C o A デヒドロゲナーゼからなる群から選択されるタンパク質または酵素をコードする、項目 2 4 9 に記載の生物体。

(項目 2 5 4)

アスパルターゼ、ピルビン酸ギ酸リアーゼ、N A D (P) トランスヒドロゲナーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、A T P シンターゼ、ホスホエノールピルビン酸：ピルビン酸ホスホトランスフェラーゼ系、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、ホスホトランスアセチラーゼ、酢酸キナーゼ、6-ホスホグルコノラクトナーゼ、グルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼおよび N A D H デヒドロゲナーゼからなる群から選択されるタンパク質または酵素をコードする 1 つまたは複数の遺伝子破壊をさらに含む、項目 2 5 3 に記載の生物体。

(項目 2 5 5)

前記培養が実質的に嫌気性の培地中で行われる、項目 2 4 9 に記載の方法。

(項目 2 5 6)

前記 1 つまたは複数の遺伝子破壊が、前記 1 つまたは複数の遺伝子の欠失を含む、項目 2 4 9 に記載の方法。