

【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3月29日(2012.3.29)

【公表番号】特表2011-515107(P2011-515107A)

【公表日】平成23年5月19日(2011.5.19)

【年通号数】公開・登録公報2011-020

【出願番号】特願2011-501997(P2011-501997)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 P 7/06 (2006.01)

C 1 2 N 9/90 (2006.01)

C 1 2 N 9/12 (2006.01)

C 1 2 N 9/10 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 1/21 Z N A

C 1 2 P 7/06

C 1 2 N 9/90

C 1 2 N 9/12

C 1 2 N 9/10

【手続補正書】

【提出日】平成24年2月9日(2012.2.9)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 6 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 6 3】

株 Z W 6 5 8 の P g a p x y l A B オペロンのプロモーター配列の場合と同様に、新規の配列の制御下でのコード領域からのタンパク質の産生が部分的に適応された株由来の同じプロモーターの配列よりも多く産生されることを可能にする新規の配列への適応中に、株 8 b において P g a p x y l A B オペロンのプロモーター配列が変化した。

更に本発明の具体的実施態様を以下に列挙する。

(1) キメラ遺伝子を含むザイモナス (Z y m o m o n a s) およびザイモバクター (Z y m o b a c t e r) からなる群から選択される組換え細菌株であって、前記キメラ遺伝子が：

a) 改善された P g a p である、116位、217位、並びに、116位および217位の両方、からなる群から選択される位置に塩基置換を有する Z . モビリス (Z . m o b i l i s) グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子プロモーターを含み、前記位置番号が配列番号 1 における位置番号である、単離された核酸分子；ならびに

b) キシロースイソメラーゼ酵素をコードする作動可能に連結された単離された核酸分子、を含む、前記組換え細菌株。

(2) 塩基置換が：

a) 116位における G から T への置き換え；および

b) 217位における C から T への置き換えである、(1) に記載の組換え株。

(3) 改善された P g a p が、配列番号 4、5、6、7、8、9、10、11、および 12 からなる群から選択される配列を含む、(2) に記載の組換え株。

(4) キシルロキナーゼ、トランスアルドラーゼおよびトランスケトラーゼの発現のための遺伝子でさらに形質転換された、(1)に記載の組換え株。

(5) キメラ遺伝子がキシルロキナーゼをコードする作動可能に連結された単離された核酸分子をさらに含んでオペロンを形成している、(1)に記載の組換え株。

(6) キシロースイソメラーゼ酵素が、4つの触媒部位残基：ストレプトマイセス・アルプス (*Streptomyces albus*) キシロースイソメラーゼ配列 (配列番号 84) に対する位置番号でヒスチジン 54、アスパラギン酸 57、グルタミン酸 181、およびリジン 183 を有し、表 3 に示される xylA ファミリーのタンパク質に関する Pfam Profile HMM を使用して調査した場合、 3×10^{-10} 以下の E-値パラメータを有するタンパク質である、(1)に記載の組換え株。

(7) キシロースイソメラーゼ酵素が、配列番号 42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、および 104 からなる群から選択される配列に 90% アミノ酸同一性を有するアミノ酸配列を有する、(1)に記載の組換え株。

(8) ザイモモナス (*Zymomonas*) およびザイモバクター (*Zymobacter*) からなる群から選択される細菌株を操作するための方法であって：

a) 改善された Pgap である、116位、217位、並びに、116位および217位の両方、からなる群から選択される位置に塩基置換を有する Z. モビリス (*Z. mobilis*) グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子プロモーターを含み、前記位置番号が配列番号 1 における位置番号である、単離された核酸分子；ならびに

b) キシロースイソメラーゼ酵素をコードする作動可能に連結された単離された核酸分子、を含むキメラ遺伝子で前記細菌を形質転換する工程を含む、前記方法。

(9) ザイモモナス (*Zymomonas*) およびザイモバクター (*Zymobacter*) からなる群から選択されるキシロース資化細菌株を操作するための方法であって、任意の順序で、以下の工程：

a) トランスアルドラーゼおよびトランスケトラーゼの発現のための遺伝子またはオペロンで前記細菌を形質転換する工程；ならびに

b) キシロースイソメラーゼおよびキシシルロキナーゼの発現のための遺伝子またはオペロンで形質転換する工程であって、前記キシロースイソメラーゼ酵素が116位、217位、並びに、116位および217位の両方、からなる群から選択される位置に塩基置換を有する Z. モビリス (*Z. mobilis*) グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子プロモーター (改善された Pgap) から発現され、前記位置番号が配列番号 1 における位置番号である、前記工程、を含む、前記方法。

(10) キシロースを含む培地において、(1)に記載の組換え細菌株を培養する工程；任意のシステムにおいてエタノール産生に適切な発酵条件を維持する工程、それによって、培養した(1)に記載の組換え細菌株が、キシロースをエタノールに変換することを容易にする工程、を含む、エタノールの産生のための方法。

(11) 0.256 mM の NADH、50 mM キシロース、10 mM の $MgSO_4$ 、10 mM トリエタノールアミン、および 1 U/mL ソルビトールデヒドロゲナーゼを含む反応混合物中 20 μ L の無細胞抽出物を 30 分で反応させることによって測定した際に、少なくとも約 0.1 μ mol 産物 / mg タンパク質 / 分を産生させるレベルでキシロースイソメラーゼを発現するように操作されたザイモモナス (*Zymomonas*) およびザイモバクター (*Zymobacter*) からなる群から選択される組換え細菌株であって、D-キシロースが産物である、前記組換え細菌株。

【手続補正 2】

【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】

キメラ遺伝子を含むザイモモナス (*Zymomonas*) およびザイモバクター (*Zymobacter*) からなる群から選択される組換え細菌株であって、前記キメラ遺伝子が：

a) 改善された P g a p である、116位、217位、並びに、116位および217位の両方、からなる群から選択される位置に塩基置換を有する Z . モビリス (*Z . mobilis*) グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子プロモーターを含み、前記位置番号が配列番号 1における位置番号である、単離された核酸分子；ならびに

b) キシロースイソメラーゼ酵素をコードする作動可能に連結された単離された核酸分子、を含む、前記組換え細菌株。

【請求項 2】

ザイモモナス (*Zymomonas*) およびザイモバクター (*Zymobacter*) からなる群から選択される細菌株を操作するための方法であって：

a) 改善された P g a p である、116位、217位、並びに、116位および217位の両方、からなる群から選択される位置に塩基置換を有する Z . モビリス (*Z . mobilis*) グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子プロモーターを含み、前記位置番号が配列番号 1における位置番号である、単離された核酸分子；ならびに

b) キシロースイソメラーゼ酵素をコードする作動可能に連結された単離された核酸分子、を含むキメラ遺伝子で前記細菌を形質転換する工程を含む、前記方法。

【請求項 3】

ザイモモナス (*Zymomonas*) およびザイモバクター (*Zymobacter*) からなる群から選択されるキシロース資化細菌株を操作するための方法であって、任意の順序で、以下の工程：

a) トランスアルドラーゼおよびトランスケトラーゼの発現のための遺伝子またはオペロンで前記細菌を形質転換する工程；ならびに

b) キシロースイソメラーゼおよびキシロキナーゼの発現のための遺伝子またはオペロンで形質転換する工程であって、前記キシロースイソメラーゼ酵素が116位、217位、並びに、116位および217位の両方、からなる群から選択される位置に塩基置換を有する Z . モビリス (*Z . mobilis*) グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子プロモーター (改善された P g a p) から発現され、前記位置番号が配列番号 1における位置番号である、前記工程、を含む、前記方法。

【請求項 4】

キシロースを含む培地において、請求項 1 に記載の組換え細菌株を培養する工程；任意のシステムにおいてエタノール産生に適切な発酵条件を維持する工程、それによって、培養した請求項 1 に記載の組換え細菌株が、キシロースをエタノールに変換することを容易にする工程、を含む、エタノールの産生のための方法。

【請求項 5】

0 . 2 5 6 m M の N A D H、5 0 m M キシロース、1 0 m M の M g S O、1 0 m M トリエタノールアミン、および 1 U / m l ソルビトールデヒドロゲナーゼを含む反応混合物中 2 0 μ L の無細胞抽出物を 3 0 で反応させることによって測定した際に、少なくとも約 0 . 1 μ モル産物 / m g タンパク質 / 分を産生させるレベルでキシロースイソメラーゼを発現するように操作されたザイモモナス (*Zymomonas*) およびザイモバクター (*Zymobacter*) からなる群から選択される組換え細菌株であって、D - キシロースが産物である、前記組換え細菌株。