

【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22年10月7日(2010.10.7)

【公表番号】特表2010-504758(P2010-504758A)

【公表日】平成22年2月18日(2010.2.18)

【年通号数】公開・登録公報2010-007

【出願番号】特願2009-530433(P2009-530433)

【国際特許分類】

C 12 N 1/21 (2006.01)

C 12 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 12 N 1/21 Z N A

C 12 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成22年8月18日(2010.8.18)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0182

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0182】

これらの株が、阻害濃度の酢酸塩の存在下で、グルコースおよびキシロースの濃縮混合物においてどの程度良好に作動するかを調べるために、振盪フラスコ実験を実施した。この分析には、ZW658およびZW800も含めた。種培養物を、75g/Lグルコース、25g/Lキシロース、10g/L酵母抽出物、2g/LのKH2PO4、1g/LのMgSO4を含有する液体培地において30で約3.0のOD600まで増殖させ、そして15mL実験培養のために10%播種物を使用した。後者を、50mL試験管において、30で、穏やかに攪拌(150rpm)しながら増殖させた。増殖培地は、10g/Lの酵母抽出物、2g/LのKH2PO4、1g/LのMgSO4、5mMソルビトル、40mMのKHC03、95g/Lグルコース、90g/Lキシロース、および7.7g/L酢酸塩を含有した；初期pHを濃リン酸で5.8に調整した。多様な時間において、実施例6において先に記載のように、発酵プロセスのHPLC分析のために、培養物のアリコートを取り出した。この実験の目的の化合物は、グルコース、キシロース、エタノールおよびキシリトールであり、そして全ての値をg/Lで報告する。

表5に示すように、ZW658は、66.35g/Lのエタノールを产生し、そして後に40.6g/Lの残留キシロースを残した。また、ZW658は機能性GFOR酵素を有したため、それは、3.19g/Lの所望されない副産物キシリトールを产生した。他の並行実験において先に観察されたものと同様に、ZW800は、ZW658より17%多いキシロースを消費し、そして6.2%多いエタノールを产生し、そしてそれは、検出可能なキシリトールを何ら产生しなかった。ZW801-4およびZW801-6では僅かに良好な結果が得られたが、これらの差異は、おそらく実験誤差の範囲内であり、そして統計的に有意ではない。この実験で観察されたZW801-5の性能がそれほど良好ではなかったことについては、解明されていないが、それ以上調べなかつた。これらの結果に基づいて、さらなる分析のために、株ZW801-4を選択した。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0183

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0183】

【表6】

表5. 高度の糖+酢酸塩におけるZW658、ZW800、ZW801-4、ZW801-4、およびZW801-5による振盪フラスコ実験

株	時間	グルコース	キシロース	キシリトール	エタノール
ZW658	0	95.7	89.3	0	3.2
ZW658	15.5	27.75	80.93	0	37.39
ZW658	38	0	42.71	1.85	66.53
ZW658	62	0	40.6	3.19	66.35
ZW800	0	95.7	89.3	0	3.2
ZW800	15.5	30.64	81.36	0	36.05
ZW800	38	0	37.29	0	69.82
ZW800	62	0	32.34	0	70.47
ZW801-4	0	95.7	89.3	0	3.2
ZW801-4	15.5	28.04	80.82	0	37.75
ZW801-4	38	0	36.13	0	70.54
ZW801-4	62	0	30.28	0	71.25
ZW801-5	0	95.7	89.3	0	3.2
ZW801-5	15.5	55.61	85.62	0	21.86
ZW801-5	38	0	46.83	0	64.92
ZW801-5	62	0	39.54	0	66.19
ZW801-6	0	95.7	89.3	0	3.2
ZW801-6	15.5	32.34	82.02	0	34.89
ZW801-6	38	0	36.39	0	70.64
ZW801-6	62	0	29.55	0	71.74

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0184

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0184】

ZW801-4が少なくともZW800と同様に作動したことを示唆した振盪フラスコ実験の結果を確認するために、これらの2つの株を、pH制御条件下で比較した。種培養物を、75g/Lグルコース、25g/Lキシロース、10g/L酵母抽出物、2g/LのKH2PO4、1g/LのMgSO4を含有する培地において、30で増殖させた。OD600が約4.6に到達したら、種培養物の17mLアリコートを使用して、153mLの増殖培地を含有するpH制御バイオリアクターに播種した。最終的な170mL培養物は、105g/Lグルコース、100g/Lキシロース、10g/L酵母抽出物、2g/LのKH2PO4、1g/LのMgSO4、5mMソルビトールおよび7.2g/Lの酢酸塩を含有した。増殖は33で行い、そしてpHを、4NのKOHの自動化された添加によって5.5に維持した；混合速度は約150rpmであった。多様な時間において、上記のように、発酵プロセスのHPLC分析のために、バイオリアクターから培養物のアリコートを取り出し、そしてまた、OD600もモニターした。これらの実験条件下では、ZW800およびZW801-4の増殖曲線は、ほとんど重ね合わせることができた（図23A）。グルコースおよびキシロース消費の時間経過はまた、事実上同一であり、

そして両方の株は、同様の動態で同じ量のエタノールを產生した（図23B）。さらに加えて、これらの株のいずれも、検出可能なキシリトールを何ら產生しなかった。これらの観察に基づいて、本発明者らは、GFORオープンリーディングフレームからSpecr-カセットを取り出しても、GFOR酵素活性が回復または部分的に回復しなかったこと、およびこの操作は発酵性能に有害な影響を及ぼさなかったことを結論付けている。ZW800およびZW801-4は両方とも機能性GFOR酵素を有する親株（ZW658）より良好に作動したが、ZW801-4は抗生物質に対する耐性を付与する外来遺伝子を含有しないため、商業的アプリケーションに好適な株は、ZW801-4である。ZW801-4由来のゲノムDNAの配列解析は、正確なCre切り出し事象が実際に生じた明白な証拠を提供した。ZW801-4における破壊されたGFORオープンリーディングの完全なヌクレオチド配列（本来の開始コドンから本来の終止コドンまで）を配列番号37に示し、そして図24は、翻訳された変異体配列と野生型GFORタンパク質とのアラインメントを示し；後者は、ジェンバンク（GenBank）受託番号AE008692のnt683751~685052の逆相補鎖によってコードされる。予想したとおり、Specr-カセットのCre切り出しは、GFORオープンリーディングフレームの中間ににおいて単一の野生型loxP部位を残し、そしてこの挿入事象は、タンパク質を未熟な状態で切り詰めるインフレーム終止コドンを生じた；「lox scar」の局在を、灰色で強調された残基によって示す。自殺構築物の設計の結果として、変異体ヌクレオチド配列もまた、同じ場所で生来の野生型GFORヌクレオチド配列のうち約72bpを失っている。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0185

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0185】

以上、本発明を要約すると下記のとおりである。

1. グルコース - フルクトースオキシドレダクターゼ活性を減少させる少なくとも1つの遺伝子改変を含む、キシロースを資化して、エタノールを产生することが可能な組み換えザイモモナス株。

2. グルコース - フルクトースオキシドレダクターゼ活性を減少させる遺伝子改変は、挿入、欠失、変異、共抑制、およびアンチセンスRNA発現からなる群から選択される、上記1に記載の組み換えザイモモナス株。

3. グルコース - フルクトースオキシドレダクターゼ活性を減少させる遺伝子改変は、相同組み換えによって、株のグルコース - フルクトースオキシドレダクターゼ遺伝子に導入される挿入である、上記1に記載の組み換えザイモモナス株。

4. ZW800、ZW801-4およびZW801-6からなる群から選択された株として同定される、上記1に記載のザイモモナス株。

5. グルコース - フルクトースオキシドレダクターゼ活性を減少させる遺伝子改変を伴わない株と比較して、低減した量のキシリトールを产生する、上記1に記載のザイモモナス株。

6. 実質的にキシリトールを产生しない、上記5に記載のザイモモナス株。

7. a) キシロースを資化して、適切な条件下でエタノールを产生することが可能な組み換えザイモモナス株を提供する工程；および

b) (a)のキシロースを資化してエタノールを产生することが可能な組み換えザイモモナス株に少なくとも1つの遺伝子改変を導入する工程であって、該改変は、グルコース - フルクトースオキシドレダクターゼ活性を減少させる工程

を含む、低減したGFOR活性を有する、キシロースを資化してエタノールを产生することが可能なザイモモナス株を作製するための方法。

8. (a)のキシロースを資化してエタノールを产生することが可能な組み換えザイモモ

ナス株は、A T C C 3 1 8 2 1 / p Z B 5、Z . モビリス 8 b、Z W 6 5 8、Z M 4 (p Z B 5) および Z . モビリス C P 4 : p Z B 5 からなる群から選択される、上記 7 に記載の方法。

9 . 遺伝子改変は、挿入、欠失、変異、共抑制、およびアンチセンス R N A 発現からなる群から選択される、上記 8 に記載の方法。

【手続補正 5】

【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】

グルコース - フルクトースオキシドレダクターゼ活性を減少させる少なくとも 1 つの遺伝子改変を含む、キシロースを資化して、エタノールを产生することが可能な組み換えザイモナス株。

【請求項 2】

a) キシロースを資化して、適切な条件下でエタノールを产生することが可能な組み換えザイモナス株を提供する工程；および

b) (a) のキシロースを資化してエタノールを产生することが可能な組み換えザイモナス株に少なくとも 1 つの遺伝子改変を導入する工程であって、該改変は、グルコース - フルクトースオキシドレダクターゼ活性を減少させる工程を含む、低減した G F O R 活性を有する、キシロースを資化してエタノールを产生することが可能なザイモナス株を作製するための方法。