

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-529905

(P2009-529905A)

(43) 公表日 平成21年8月27日(2009.8.27)

(51) Int.Cl.

C 12 N 15/09 (2006.01)
C 12 P 7/06 (2006.01)
C 12 N 1/21 (2006.01)

F 1

C 12 N 15/00
C 12 P 7/06
C 12 N 1/21

A
Z N A

テーマコード(参考)

4 B 0 2 4
4 B 0 6 4
4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 27 頁)

(21) 出願番号 特願2009-500929 (P2009-500929)
(86) (22) 出願日 平成19年3月26日 (2007.3.26)
(85) 翻訳文提出日 平成20年11月25日 (2008.11.25)
(86) 國際出願番号 PCT/GB2007/001060
(87) 國際公開番号 WO2007/110606
(87) 國際公開日 平成19年10月4日 (2007.10.4)
(31) 優先権主張番号 0605890.3
(32) 優先日 平成18年3月24日 (2006.3.24)
(33) 優先権主張国 英国(GB)

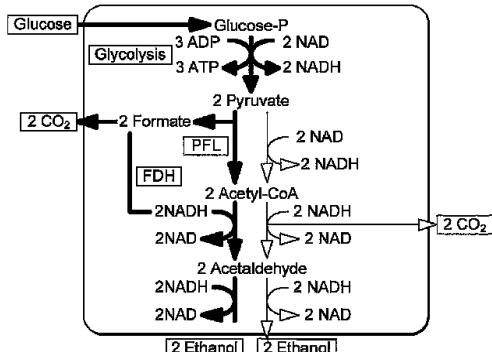
(71) 出願人 508284539
バイオコンバージョン テクノロジーズ
リミテッド
イギリス国 サリー ジーユー16 6エ
ルディー, キャンバー, ファームリー
グリーン, ファームリー グリーン ロー
ド 263
(74) 代理人 100092783
弁理士 小林 浩
(74) 代理人 100095360
弁理士 片山 英二
(74) 代理人 100120134
弁理士 大森 規雄
(74) 代理人 100104282
弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】微生物によるエタノール製造の強化

(57) 【要約】

好熱性微生物は乳酸デヒドロゲナーゼ活性を有さず、好ましくは、活性なビルビン酸ギ酸リアーゼ経路を含有する。好熱性微生物は、NAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含有する。NAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子は、好ましくは、熱安定性のNAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子のコドン最適化型である。DNA構築物は、NAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の好熱性微生物における安定な発現を可能にする。DNA構築物は、安定な発現、又は、NAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の中に挿入するための組換えを達成するための挿入配列の使用に基づいており、従って、遺伝子ノックアウト及び新しい機能性を一段階で達成する。微生物は、エタノールを製造するための糖の発酵において有用である。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

NAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含有することを特徴とする、乳酸デヒドロゲナーゼ活性を有さない、好熱性微生物。

【請求項 2】

ピルビン酸ギ酸リアーゼを発現する、請求項1に記載の好熱性微生物。

【請求項 3】

NAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする前記遺伝子が好熱性微生物のゲノムに組み込まれる、請求項1または2に記載の好熱性微生物。

【請求項 4】

NAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする前記遺伝子がそれ自体のプロモーターから発現されるか、又は、好熱性微生物のプロモーターから発現される、請求項1から3のいずれか一項に記載の好熱性微生物。

【請求項 5】

NAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする前記遺伝子が好熱性微生物の乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の中に挿入され、これにより、前記好熱性微生物の乳酸デヒドロゲナーゼ活性を不活性化する、請求項1から4のいずれか一項に記載の好熱性微生物。

【請求項 6】

NAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする前記遺伝子が熱安定性のNAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする、請求項1から5のいずれか一項に記載の好熱性微生物。

【請求項 7】

NAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする前記遺伝子が、配列番号1又は配列番号2として示されるヌクレオチド配列を含む、請求項1から6のいずれかに記載の好熱性微生物。

【請求項 8】

配列番号1として示されるヌクレオチド配列を含む熱安定性のNAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子に機能的に連結された調節配列を含むDNA構築物により形質転換されている、請求項1から7のいずれかに記載の好熱性微生物。

【請求項 9】

NAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子と、挿入配列とを含むDNA構築物により形質転換され、前記挿入配列が、前記DNA構築物により形質転換された好熱性微生物のゲノムへの、NAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする前記遺伝子の組み込みを容易にする、請求項1から7のいずれか一項に記載の好熱性微生物。

【請求項 10】

乳酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の上流領域に機能的に連結された、NAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含むDNA構築物により形質転換され、前記上流領域がプロモーターを含む、請求項1から7のいずれか一項に記載の好熱性微生物。

【請求項 11】

前記DNA構築物が、NAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする前記遺伝子の下流側に乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の少なくとも一部をさらに含むものであり、これにより、NAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする前記遺伝子の両側が、乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の十分な部分の間に挿入され、その結果NAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする前記遺伝子が、好熱性微生物のゲノムにおいて乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子との組み換えにより組み込まれることが容易となる、請求項10に記載の好熱性微生物。

【請求項 12】

好熱性細菌である、請求項1から11のいずれかに記載の好熱性微生物。

【請求項 13】

10

20

30

40

50

バチルス (Bacillus) 属である、請求項 1 2 に記載の好熱性微生物。

【請求項 1 4】

バチルス・ステアロサーモフィルス (Bacillus stearothermophilus) 又はゲオバチルス・サーモグルコシダシウス (Geobacillus thermoglucosidasius) である、請求項 1 3 に記載の好熱性微生物。

【請求項 1 5】

前記バチルス・ステアロサーモフィルスが LLD-R 又は LLD-15 の菌株に由来する、請求項 1 4 に記載の好熱性微生物。

【請求項 1 6】

配列番号 1 として示されるヌクレオチド配列を含む、熱安定性の NAD 結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子。 10

【請求項 1 7】

配列番号 1 として示されるヌクレオチド配列を含む、熱安定性の NAD 結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子に機能的に連結された調節配列を含む、DNA 構築物。

【請求項 1 8】

前記調節配列がプロモーターである、請求項 1 7 に記載の DNA 構築物。

【請求項 1 9】

前記プロモーターが、配列番号 4 として示されるヌクレオチド配列を含む、請求項 1 8 に記載の DNA 構築物。 20

【請求項 2 0】

NAD 結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子と、挿入配列とを含む DNA 構築物であって、前記挿入配列が、前記 DNA 構築物により形質転換された好熱性微生物のゲノムへの、NAD 結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする前記遺伝子の組み込みを容易にする、DNA 構築物。

【請求項 2 1】

前記挿入配列がバチルス・ステアロサーモフィルスの菌株 LLD-R 又は菌株 LLD-15 に由来する、請求項 2 0 に記載の DNA 構築物。

【請求項 2 2】

前記挿入配列が、配列番号 5 として示されるヌクレオチド配列を含む、請求項 2 1 に記載の DNA 構築物。 30

【請求項 2 3】

前記挿入配列が、配列番号 6 及び配列番号 7 として示されるヌクレオチド配列を含むプライマーと、テンプレートとしてのバチルス・ステアロサーモフィルス菌株 LLD-15 とを使用する増幅によって作製される、請求項 2 2 に記載の DNA 構築物。

【請求項 2 4】

乳酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の上流領域に機能的に連結された、NAD 結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含む DNA 構築物であって、前記上流領域がプロモーターを含む、DNA 構築物。

【請求項 2 5】

前記 DNA 構築物が、NAD 結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする前記遺伝子の下流側に乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の少なくとも一部をさらに含むものであり、これにより、NAD 結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする前記遺伝子の両側が、乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の十分な部分の間に挿入され、その結果 NAD 結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする前記遺伝子が、好熱性微生物のゲノムにおいて乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子との組み換えにより組み込まれることが容易となる、請求項 2 4 に記載の DNA 構築物。 40

【請求項 2 6】

NAD 結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする前記遺伝子が、熱安定性の NAD 結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子である、請求項 1 7 から 2 5 のいずれか一項に記載の DNA 構築物。 50

【請求項 27】

熱安定性のNAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする前記遺伝子が、配列番号1として示されるヌクレオチド配列を含む、請求項26に記載のDNA構築物。

【請求項 28】

発現ベクターである、請求項17から27のいずれか一項に記載のDNA構築物。

【請求項 29】

プラスミドである、請求項17から28のいずれか一項に記載のDNA構築物。

【請求項 30】

請求項17から29のいずれか一項に記載のDNA構築物を含む、微生物。

【請求項 31】

好熱性細菌である、請求項30に記載の微生物。

10

【請求項 32】

バチルス(Bacillus)属である、請求項31に記載の微生物。

【請求項 33】

バチルス・ステアロサーモフィルス(Bacillus stearothermophilus)又はゲオバチルス・サーモグルコシダシウス(Geobacillus thermoglucosidasius)である、請求項32に記載の微生物。

【請求項 34】

エタノールを製造するための、請求項1から15のいずれか一項に記載的好熱性微生物、又は請求項30から33のいずれか一項に記載の微生物の使用。

20

【請求項 35】

請求項1から15のいずれか一項に記載的好熱性微生物、又は請求項30から33のいずれか一項に記載の微生物に糖を与えることを含む、エタノールを製造するための発酵プロセス。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、発酵法及びそれに使用される微生物に関し、具体的には、微生物によるエタノール製造の強化に関する。より詳細には、本発明は、バイオマスの加水分解に由来する混合糖からの好熱性細菌(例えば、バチルス(Bacillus)属など)による強化されたエタノール製造に関する。具体的には、本発明では、NAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼ酵素をコードする遺伝子を、ピルビン酸ギ酸リアーゼ酵素複合体をコードする機能的な遺伝子を有するが乳酸デヒドロゲナーゼ活性を有さない微生物にクローン化することによるエタノール製造のための新規な経路が想定される。

30

【背景技術】**【0002】**

バイオエタノールは現在、穀類デンプン、サトウキビ又はテンサイに由来するグルコース、マルトース又はスクロースから作製され、しかし、これらはすべてが食料としての価値を有する。セルロース及びヘミセルロースは農業副産物の大きな部分であり、特に、低成本で、再生可能なバイオエタノールの主要な供給源となり得る。しかしながら、発酵可能な糖をセルロースから得ることは困難であり、また、費用がかかる。それに反して、ヘミセルロースはセルロースとほぼ同じくらい豊富に存在し、また、容易に加水分解することができ、しかし、酵母が発酵することができないペントース糖を主とする混合物をもたらす。

40

【0003】

この理由のために、Hartley(国際特許出願公開第WO88/09379号を参照のこと)は、バイオマスに由来する糖のすべてを70までの温度で非常に迅速に発酵する好熱性バチルス属細菌の変異体によるエタノールの製造を提案した。しかしながら、高いエタノール収率は、ストレスを受けた瀕死の細胞によってのみ達成されるだけである。

50

【0004】

多くの微生物が、ピルビン酸をアセチルCoA及びギ酸に変換するピルビン酸ギ酸リアーゼ(PFL)経路を含有する(図1A)。ヘテロ乳酸(heterolactate)発酵微生物が1つのそのような部類である。これらの微生物は最初に、流入した糖を(一般には解糖のEMP経路によって)ピルビン酸に変換し、その後、微生物は、増殖条件に依存して、乳酸、ギ酸、酢酸、エタノール及びCO₂を様々な割合で製造するために多くの経路を取ることができる。

【0005】

完全に好気性の細胞において、そのようなピルビン酸は、通常の場合、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ(PDH)経路、トリカルボン酸サイクル及び電子移動鎖によってH₂O及びCO₂に代謝される。しかしながら、これらの生物の多くにおいて、特に、好熱性のバチルス属細菌では、糖の取り込み及び解糖が調節されないようであり、乳酸が、好気的条件下でさえ、高い糖濃度では優勢な産物である。このことは、PDH流束がその後、飽和してしまうこと、及び、過剰なピルビン酸が、あふれる乳酸デヒドロゲナーゼ経路に向かされることを示唆する。これは増殖のために使用されないで、新鮮な草が堆肥の山に置かれるときに見られ得るように、周囲温度を上昇させ、好中温性の競合菌を殺す熱をもたらす。

10

【0006】

1dh遺伝子(これは乳酸デヒドロゲナーゼをコードする)が、例えば、国際特許出願公開第WO02/29030号に記載されるように不活性化されるならば、乳酸の製造が止まり、過剰なピルビン酸は大部分が、増殖に結び付けられるPFL経路に向けられる(図1A)。しかしながら、非常に高い糖濃度及び/又は酸性pHでは、PFL経路の流束が低下し、過剰なピルビン酸が、その後、エタノール及びCO₂をもたらすだけである嫌気性のPDH経路にあふれる(図1B)。従って、高いエタノール収率を得るための好ましい条件は、PFL経路を流れる流束を減少させ、PDH経路を介する流束を増大させる条件である(Hartley, B. S. and Shama, G., Proc. Roy. Soc. Lond., 321, 555~568(1987))。残念ながら、そのような条件の下では、細胞は代謝ストレスを受け、ATP製造が低下し、また、NAD/NADH比及びCoA/アセチルCoA比のバランスが崩れる可能性がある(図1C)。

20

【0007】

様々な発酵プロトコルが、この問題を回避するか、又は、最小限に抑えることを試みるために提案されている(例えば、上記で議論されるようなHartley, B. S.のプロトコル(国際特許出願公開第WO88/09379号を参照のこと)など)。

30

【0008】

2種類のギ酸デヒドロゲナーゼが存在する。1つ(これはfdhF遺伝子によってコードされる)はギ酸をCO₂+H₂に変換し、腸内細菌(例えば、大腸菌など)に典型的である。もう一方(これはfdh1遺伝子によってコードされる)はギ酸+NADをCO₂+NADH₂に変換し、多くの発酵性嫌気性菌に存在する。Berrios-Riveraら(Metabolic Engineering, 4, 217-219, 2002)は大腸菌におけるfdhF遺伝子を酵母のfdh1遺伝子により置き換え、還元された嫌気性産物(例えば、エタノール、乳酸及びコハク酸など)が、酸化された産物(例えば、酢酸など)と比較して増大したことを見出した。この観測結果を基にして、San, K-Y.、Berrios-Rivers, S.J.及びBennett, G.N.(国際特許出願公開第WO2003/040690号を参照のこと)は、広範囲の生物転換に関する細胞において還元力を増大させるための一般的な方法として、NAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の導入を提案した。続いて、San, K-Y.、Bennett, G.N.及びSanchez, A.(米国特許出願公開第US2005/0042736A1号)は、この概念の具体的な適用をコハク酸の製造のために提案した。これらの研究は大腸菌(糖の取り込みが調節される好中温菌の一例)において行われた。これらの実験の目的は、細胞内のNADHレベルを増大させ、その結果、強化された還元力を様々な生物転換のために提供するようにするこ

40

50

とであった。

【0009】

Senら(2004)によって提示された酵母のギ酸デヒドロゲナーゼは、バイオエタノール製造において潜在的に有用である好熱性細菌のための最低増殖温度である60において不活性である。これまでに記載された最も熱安定性のギ酸デヒドロゲナーゼは、シユードモナス種(*Pseudomonas* sp.)101の酵素である(A. Rojkova, A. Galkin, L. K. ulakova, A. Serov, P. Savitsky, V. Fedorchuk, V. Tishkov, FEBS Letters, Volume 445, Issue 1, 183-188, 1999)。

【発明の開示】

【0010】

本発明は、バイオマスからの高収率のエタノールをもたらすという問題を解決しようとするものである。具体的には、好熱性微生物(特に、細菌、例えば、バチルス属など)が最大のエタノール収率をもたらすことを可能にする新規な代謝経路が本明細書中に初めて記載される。

【0011】

本発明は、乳酸デヒドロゲナーゼ活性を有さず、従って、解糖により生じた過剰なNADHの再酸化のための代替経路を必要とする微生物に依存する。これは、NAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子(例えば、fdh1遺伝子など)を前記微生物に導入することによって提供される。好熱性微生物において、また、好中温菌(例えば、大腸菌など)とは対照的に、糖の取り込みが調節されず、このことは高レベルの糖の存在下におけるNADHの蓄積を引き起こす。このことは、図1Cに概略的に示されるように、代謝崩壊、及び、いわゆる「レドックス死」を最終的には引き起こす。NAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を微生物が取り込むことは、高い糖濃度における細胞死を防止することを、NADHレベルにおける低下及びNADレベルにおける増大を引き起こすことによって助ける。このことは部分的には、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ(PDH)経路を流れる流束を回復することによるものであり、しかし、最も重要なことは、NAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含むことにより、新規なピルビン酸ギ酸リアーゼ(PFL)-NAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼ(FDH)経路がエタノール製造のために作られる。図1Dは、高い糖レベルの存在下での迅速な解糖により生じたピルビン酸のすべてを、特に中性pH条件の下で、エタノール及びCO₂に転換することによって、このPFL-FDH経路がレドックスバランスを回復させる可能性を示す。重要なことは、この経路が、細胞増殖のための最適条件下で働き、これにより、迅速なエタノール製造及び高い収率をもたらす。これは、PFL経路が、好熱性微生物における主要な、増殖に結び付けられる嫌気性経路であるからである。

【0012】

従って、第1の態様において、本発明は、乳酸デヒドロゲナーゼ(ldh)活性を有しない微生物(具体的には、好熱性微生物)であって、NAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼ(fdh)をコードする遺伝子を含有することを特徴とする微生物(好ましくは、好熱性微生物)を提供する。

【0013】

1つの実施形態において、微生物は、乳酸デヒドロゲナーゼ活性を取り除く適切な遺伝子欠失又は他の変異によって乳酸デヒドロゲナーゼ活性を有さない。従って、好ましくは、ldh遺伝子が欠失されるか、又は、他の場合には非機能的にされる。遺伝子ノックアウト及び遺伝子欠失の方法が当分野では周知であり、好ましい例が本明細書中に詳しく記載される。その上、乳酸デヒドロゲナーゼ活性を有さない細菌の公知菌株(例えば、アクセス番号NCIMB41075で寄託されたTN-T9、及び、アクセス番号NCIMB41115で寄託されたTN-TKなど)が、本発明における使用のために好適であり得る。

【0014】

本発明の微生物は、典型的には、活性なピルビン酸ギ酸リアーゼ経路を含有する。具体

10

20

30

40

50

的には、微生物は、好ましくは、ピルビン酸ギ酸リアーゼをコードする遺伝子（例えば、p f 1 遺伝子など）を含む。本発明の微生物はまた、典型的には、活性なピルビン酸デヒドロゲナーゼ（P D H）経路を含有する。

【0015】

好ましい実施形態において、N A D 結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子が好熱性微生物のゲノムに組み込まれる。しかしながら、安定な発現が、例えば、好適なプラスミドの導入によって組み込みを伴うことなく達成されることもまた可能である。組み込みの1つの好ましい方法が、組換えによるものである。N A D 結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子は、N A D 結合型ギ酸デヒドロゲナーゼの発現を行わせるための任意の好適な調節エレメントに機能的に連結することができる。「機能的に連結される」とは、機能的な連結が、調節エレメントと、N A D 結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子との間に存在することを意味する。例えば、N A D 結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を、例えば、構成的プロモーター又は誘導可能なプロモーターであり得る好適なプロモーターに連結することができる。「プロモーター」は、転写を開始するためにR N A ポリメラーゼが結合することに関与するD N A の領域を含むことが本明細書中では定義される。

10

【0016】

典型的には、プロモーターは原核生物のプロモーターであり、従って、適切な - 1 0 配列及び - 3 5 配列（それらのコンセンサス配列が当分野では十分に定義される）を含む。遺伝子はまた、他の適切な調節配列（例えば、ターミネーターなど）に機能的に連結することができる。「ターミネーター」は、R N A ポリメラーゼに転写を終結させるヌクレオチド配列として定義される。1つの実施形態において、N A D 結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子はそれ自体のプロモーターから発現される。代わりの実施形態において、N A D 結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子は（ゲノムにおける適切な場所での組み込みのために）好熱性微生物のプロモーターから発現される。N A D 結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の発現が外来プロモーターによって駆動される構築物もまた想定され得る。これは、例えば、最大の発現レベル又は誘導可能な発現を達成するために行うことができる。一例として、ファージプロモーター（例えば、T 7 など）を、（別個のD N A 構築物又は同じD N A 構築物において提供され得る）好適なファージポリメラーゼとの併用で利用することができる。

20

【0017】

特に好ましい実施形態において、N A D 結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子は、乳酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の適切な調節領域（具体的には、上流の調節領域）に機能的に連結される。調節領域は、好ましくは、乳酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子のプロモーターを含む。プロモーターは、適切な - 1 0 配列及び - 3 5 配列を最小の機能的ユニットとして含むことが定義され得る。従って、本発明の1つの好ましい実施形態によれば、N A D 結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子は好熱性微生物の乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の中に挿入され、従って、その好熱性微生物の乳酸デヒドロゲナーゼ活性を不活性化する。本実施形態は、本発明の好熱性微生物を作製するために要求される両方の改変が一段階でもたらされるので、特に好ましい。このことを達成するための好適な構築物が本明細書中に詳しく記載される。

30

【0018】

好熱性細菌によるエタノール製造は、エタノール製造を高い温度で行うことができるので好都合である。好熱性微生物は酵母よりも低いエタノール耐性を有する一方で、エタノールを膜蒸発及び / 又は穏和な真空蒸発によって高温発酵から連続的及び好都合に除去することができる。最適な嫌気性増殖条件において、バチルス菌株L L D - Rは、ほとんどもっぱらP F L 経路によって70 ℃において非常に迅速に増殖する（H a r t l e y 及びSh a m a 、1982）。新規なP F L - F D H 経路による増殖が同等に活発であることを想定することができ、しかし、最大増殖温度は、好熱性微生物に導入されたN A D 結合型ギ酸デヒドロゲナーゼの熱安定性によって制限されると考えられる。従って、1つの好

40

50

ましい実施形態において、本発明の好熱性微生物は、熱安定性のNAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子、及び／又は、ヌクレオチド配列が、好熱性微生物による発現を容易にするためにコドン最適化されている遺伝子を取り込む。そのような熱安定性のNAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼの作製が本明細書中に詳しく記載される。具体的な実施形態において、NAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子は、配列番号1として示されるヌクレオチド配列を含むか、又は、配列番号1として示されるヌクレオチド配列から本質的になるか、又は、配列番号1として示されるヌクレオチド配列からなる。さらなる実施形態において、本発明の好熱性微生物は、バチルス属における発現のために最適化されたコドン、すなわち、配列番号2として示されるヌクレオチド配列を含むか、又は、配列番号2として示されるヌクレオチド配列から本質的になるか、又は、配列番号2として示されるヌクレオチド配列からなる、熱安定性のNAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を取り込む。この配列は、必要最小限の(basic)熱安定的なNAD結合型デヒドロゲナーゼ配列に加えて、プロモーター領域及びターミネーター領域、そしてまた、好適なDNA構築物への遺伝子のクローン化を容易にするためのXba1部位を含む。

10

【0019】

さらなる実施形態において、NAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子はfdh1遺伝子である。fdh1遺伝子は任意の好適な供給源に由来することができ、好ましくは、関連した好熱性微生物における発現のためにコドン最適化される。

20

【0020】

本発明の好熱性微生物は、本明細書中にさらに詳しく記載されるように、本発明のDNA構築物のいずれかによる形質転換によって作製することができる。従って、そこで提供される議論が本発明の本実施形態に準用される。

【0021】

本発明の好熱性微生物は、エタノールをバイオマスから製造するための任意の好適な微生物であり得る。好ましくは、本発明の好熱性微生物はヘテロ乳酸発酵微生物である。より好ましくは、好熱性微生物は好熱性細菌であり、より好ましくは、バチルス属の細菌であり、一層より好ましくは、バチルス・ステアロサーモフィルス(*Bacillus stearothermophilus*)である。1つの実施形態において、本発明の好熱性微生物は、(バチルス・ステアロサーモフィルスの)公知菌株のLLD-R又はLLD-15に由来する。さらなる実施形態において、好熱性微生物はゲオバチルス・サーモグルコシダシウス(*Geobacillus thermoglucosidasius*)である。

30

【0022】

本発明によって容易にされる発酵プロセスでは、好ましくは、適切な好熱性微生物(例えば、バチルス菌株LLD-Rなど)のコドン選択の使用に起因する熱安定的なアミノ酸配列を発現するように設計される合成されたNAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼが利用される。そのような合成遺伝子は、好ましくは、乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子内への挿入を助けるための操作された制限部位を含有する。それにより、LDH経路の欠失及びPFL-FDH経路の作製が1回の操作で達成される。従って、第2の態様において、本発明は熱安定性のNAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼを提供する。好ましくは、熱安定性のNAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼは60の温度またはそれよりも高い温度で機能を保持したままである。好ましくは、熱安定性の酵素は、好熱性微生物における発現のためにコドン最適化されているヌクレオチド配列によってコードされる。ギ酸デヒドロゲナーゼは、1つの実施形態において、配列番号3として示されるアミノ酸配列を含むことができ、又は、配列番号3として示されるアミノ酸配列から本質的になることができ、又は、配列番号3として示されるアミノ酸配列からなることができる。

40

【0023】

具体的な熱安定性のNAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼが、下記の詳細な説明においてより詳しく議論されるように、シュードモナス種(*Pseudomonas* sp.)101のギ酸デヒドロゲナーゼのアミノ酸配列(配列番号3)に基づいて、また、ゲオバチルス・サーモグ

50

ルコシダシウスについての最適化されたコドンの使用によって設計されている。当業者は、この基本的配列の様々な誘導体が機能性を保持することを理解する。例えば、保存的置換及び半保存的置換は熱安定性のNAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをもたらすことができ、また、これらの誘導体は、それらが、好熱性微生物を使用するエタノール製造において有用であるような効果的な触媒作用活性及び熱安定性を保持するならば、本発明の範囲内であることが意図される。同様に、アミノ酸の軽微な欠失及び／又は付加は、適切な機能性を保持する誘導体をもたらすことができる。

【0024】

第3の態様において、本発明は、熱安定性のNAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする合成遺伝子に関する。好ましくは、この遺伝子は、配列番号1として示されるヌクレオチド配列を含むか、又は、配列番号1として示されるヌクレオチド配列から本質的になるか、又は、配列番号1として示されるヌクレオチド配列からなる。この配列は、コドンが熱安定性のNAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼの製造のために最適化される新規のfdh遺伝子配列を表す。より具体的な実施形態において、熱安定性のNAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子は、配列番号2として示されるヌクレオチド配列を含むか、又は、配列番号2として示されるヌクレオチド配列から本質的になるか、又は、配列番号2として示されるヌクレオチド配列からなる。この配列は、熱安定性のNAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼのためのコード領域をバチルス属の好適なプロモーター及びrhh非依存性ターミネーターと一緒に取り込む。この配列はまた、クローン化を助けるための好適な制限部位（具体的には、Xba1部位）を取り込む。当業者は、ヌクレオチド配列に対する軽微な改変体が、例えば、最適化されたコドンを適切な好熱性微生物の翻訳系において好まれる他のコドンにより置き換えることによって、得られた酵素の機能性又は熱安定性を変化させることなく、作製され得ることを容易に理解する。

10

20

30

40

【0025】

本発明はまた、NAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼ（具体的には、熱安定性のNAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼ）をコードする遺伝子を含有するDNA構築物に関し、この場合、遺伝子の両側には、好適なDNA構築物（例えば、発現ベクター又はプラスミドなど）への遺伝子のクローン化を容易にするための制限部位が存在する。

【0026】

関連した態様において、本発明はまた、熱安定性のNAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子に機能的に連結された調節配列を含むDNA構築物を提供する。従って、このDNA構築物は、最大のエタノール収率を与える効率的な発酵を行うことができる好熱性微生物を作製するために、好熱性微生物（具体的には、乳酸デヒドロゲナーゼ活性を有さない好熱性微生物）の形質転換を容易にする。上記で述べられたように、本明細書中で使用される用語「機能的に連結された」は、調節配列が遺伝子発現に影響を及ぼすことができるよう、調節配列と、NAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子との間ににおける機能的な連結を示す。例えば、好ましい調節配列はプロモーターである。上記で述べられたように、NAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子は、好ましくは、配列番号1として示されるヌクレオチド配列を含むか、又は、配列番号1として示されるヌクレオチド配列から本質的になるか、又は、配列番号1として示されるヌクレオチド配列からなる。好ましい調節配列はプロモーターであるが、DNA構築物は、好適なターミネーター配列をさらに取り込むことができる。1つの具体的な実施形態において、プロモーターは、配列番号4として示されるヌクレオチド配列を含む。他のプロモーターを、上記で議論されたように、高レベルの発現及び／又は誘導可能な発現のために利用することができる。

【0027】

本発明のさらなる態様において、NAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子と、挿入配列とを含むDNA構築物が提供され、この場合、挿入配列は、このDNA構築物により形質転換された好熱性微生物のゲノムへの、NAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の組み込みを容易にする。「挿入配列」とは、適切な好熱性微生物

50

のゲノムへの組み込みを可能にする転移可能なDNAエレメントを意味する。挿入配列はまた、挿入配列エレメント(IE)として示される場合があり、天然に存在し得る。1つの具体的な実施形態において、挿入配列はバチルス・ステアロサーモフィルスの菌株LLD-R又は菌株LLD-15に由来する。

【0028】

より具体的な実施形態において、挿入配列は、配列番号5として示されるヌクレオチド配列(図3)を含むか、又は、配列番号5として示されるヌクレオチド配列(図3)から本質的になるか、又は、配列番号5として示されるヌクレオチド配列(図3)からなる。好ましい挿入配列を、配列番号6及び配列番号7として示されるヌクレオチド配列を含むプライマー、又は、配列番号6及び配列番号7として示されるヌクレオチド配列から本質的になるプライマー、又は、配列番号6及び配列番号7として示されるヌクレオチド配列からなるプライマーを使用する増幅によって作製することができる。この場合、公知のバチルス・ステアロサーモフィルス菌株LLD-15に由来するゲノムDNAをテンプレートとして使用することができる。1つの特に好ましいDNA構築物が、(下記の実験の節及び図5に記載されるような)プラスミドpUB-ISF1である。

【0029】

さらなる態様において、本発明は、乳酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の適切な調節領域(具体的には、上流の調節領域)に機能的に連結された、NAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする(fdh)遺伝子を含むDNA構築物に関する。調節領域は、好ましくは、乳酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子(1dh)のプロモーターを含む。プロモーターは、RNAポリメラーゼの効果的な結合を可能にするために、適切な-10配列及び-35配列を最小の機能的ユニットとして含むことが定義され得る。乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子のプロモーターは、好熱性微生物(例えば、バチルス属など)における高レベルの発現を行わせるために好適であり、これはまた、乳酸デヒドロゲナーゼ活性の欠失及びNAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼ活性の導入の両方を同じ工程において達成するためのクローン化戦略の一部としても都合よく使用することができる。従って、DNA構築物はまた、乳酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子(1dh)のプロモーターを含む核酸分子に機能的に連結された、NAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含むものとして定義することができる。

【0030】

DNA構築物はまた、好ましくは、宿主の乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子のコード配列の一部を、NAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の下流側に含有する。このことは、DNA構築物により形質転換された微生物における遺伝子の組み込みを容易にする。「少なくとも一部」とは、乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を含有する微生物のゲノムへの組換え(好ましくは、2回の交差による組換え)による遺伝子組み込みを可能にするための十分な長さの遺伝子の一部分を意味する。コード配列の一部は、好ましくは、乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の末端を取り込む。1つの実施形態において、乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の少なくとも100ヌクレオチド、200ヌクレオチド、300ヌクレオチド、400ヌクレオチド、500ヌクレオチド、600ヌクレオチド、700ヌクレオチド又は750ヌクレオチドが、NAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の下流側に取り込まれる。従って、本発明の1つの実施形態において、DNA構築物は、NAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含み、この場合、NAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子には、(対象の好熱性微生物に由来する)乳酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子に由来するヌクレオチド配列が隣接する。そのような隣接する配列は、乳酸デヒドロゲナーゼをコードする宿主遺伝子への、NAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の組み込みを可能にし、それにより、NAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼ活性の導入及び乳酸デヒドロゲナーゼ活性のノックアウトを1回のクローン化工程においてもたらすための十分な長さである。好ましくは、NAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子には、組換えによる組み込みの後で、NAD結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子がプロモーターに機能的に連結されるように、

10

20

30

40

50

少なくとも、乳酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子のプロモーター領域が上流側に隣接する。特に好ましい実施形態において、乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の下流側部分は、菌株 LLD-R をテンプレートとして使用するとき、配列番号 8 及び配列番号 9 として示されるヌクレオチド配列を含むプライマー、又は、配列番号 8 及び配列番号 9 として示されるヌクレオチド配列から本質的になるプライマー、又は、配列番号 8 及び配列番号 9 として示されるヌクレオチド配列からなるプライマーを使用する 1 d h 遺伝子の増幅によって得ることができる部分である。上流側の隣接領域（これは、好ましくは、1 d h プロモーターを取り込む）は、好ましくは、宿主ゲノムとの組換えによる組み込み効率を最大にするために、適切な 1 d h 上流領域の少なくとも 100 ヌクレオチド、200 ヌクレオチド、300 ヌクレオチド、400 ヌクレオチド、500 ヌクレオチド、600 ヌクレオチド、700 ヌクレオチド又は 750 ヌクレオチドを含む。この上流領域は、当業者によって容易に決定されるように、対象の具体的な好熱性微生物における 1 d h 遺伝子の配列状況に依存し得る。従って、1 d h 遺伝子配列の知識を有する当業者は、組換えによる組み込みを可能にするための適切な隣接領域を容易に決定する。例えば、発表されたゲノム配列を調べることができ、又は、配列決定反応を行うことができ、又は、隣接領域を、1 d h 遺伝子配列に由来するプライマーを使用する PCR によって増幅することができる。従って、f d h 遺伝子は、f d h 遺伝子が、読み枠を一致させて、1 d h 遺伝子の少なくとも一部に取り替えられるように、1 d h 遺伝子に由来する 2 つのヌクレオチド配列の間に置かれる。10

【0031】

従って、DNA 構築物は一般に、対象の遺伝子（NAD 結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子）が、組み込み時にノックアウトされる遺伝子（この場合には、乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子）のコード配列（ORF）の内部に挿入される遺伝子組み込みカセットを含む。組換えにより組み込まれたとき、対象の遺伝子の発現は、事実上、ノックアウトされた遺伝子の制御下にある。そのような構築物は、1 つの遺伝子が、異種遺伝子の発現に有利なようにノックアウトされることが必要である状況において一般的な適用性を有し得る。1 つの好ましい実施形態において、NAD 結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子は熱安定性の NAD 結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする。本明細書中に提供される熱安定的な NAD 結合型ギ酸デヒドロゲナーゼの議論が、本発明のこの態様に準用される。具体的には、1 つの実施形態において、熱安定性の NAD 結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子は、配列番号 1 もしくは配列番号 2 として示されるヌクレオチド配列を含むか、又は、配列番号 1 もしくは配列番号 2 として示されるヌクレオチド配列から本質的になるか、又は、配列番号 1 もしくは配列番号 2 として示されるヌクレオチド配列からなる。特に好ましい DNA 構築物が、（下記の実験の節及び図 8 に記載されるような）プラスミド pUCK-LF1 である。30

【0032】

本発明のすべての DNA 構築物について、好ましい形態が発現ベクターである。従って、本発明の DNA 構築物は、構築物により形質転換された微生物における、熱安定性の NAD 結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の確実な発現を可能にする。特に好ましい実施形態において、DNA 構築はプラスミドである。好ましくは、DNA 構築物は、宿主の好熱性微生物のゲノムとの組換えを介して宿主の好熱性微生物において複製することができるだけである。40

【0033】

本発明の DNA 構築物はまた、好ましくは、好適なレポーター遺伝子を、成功した形質転換の指標物として取り込む。1 つの実施形態において、レポーター遺伝子は抗生物質耐性遺伝子（例えば、カナマイシン耐性遺伝子又はアンピシリン耐性遺伝子など）である。他のレポーター（例えば、緑色蛍光タンパク質（GFP）及び - ガラクトシダーゼ（lacZ）など）を適するように利用することができる。DNA 構築物は多数のレポーター遺伝子を適するように取り込むことができる。レポーター機能の喪失は、その後の世代においてであるが、熱安定性の NAD 結合型ギ酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の、50

適切な隣接領域と一緒にでの組み込みを示す。

【0034】

さらなる態様において、本発明は、本発明のDNA構築物を含む微生物に関する。好ましいレシピエント微生物はヘテロ乳酸発酵微生物である。具体的には、本発明は、好ましくは、好熱性細菌、例えば、バチルス属の細菌などに関し、特に、バチルス・ステアロサーモフィルスに関する。細菌は、例えば、LLD-R又はLLD-15の菌株に由来することができる。さらなる実施形態において、好熱性微生物はゲオバチルス・サーモグルコシダシウスである。

【0035】

さらなる態様において、本発明は、発酵における本発明の微生物又は本発明の好熱性微生物の使用、具体的には、エタノールを製造するためのそれらの使用に関する。

10

【0036】

同様に、本発明は、本発明の好熱性微生物又は本発明の微生物に糖を与えることを含む、エタノールを製造するための発酵プロセスに関する。本発明に従って構築された微生物は、最適な増殖条件の下での高いエタノール収率及び体積生産性のために特に好適である。従って、本発明の微生物はどれも、任意の発酵槽形態（例えば、回分式発酵プロセス、流加回分（fed-batch）式発酵プロセス又は連続発酵プロセスなど）において使用することができる。1つの好ましい実施形態において、発酵プロセスは流加回分式発酵プロセスである。

20

【0037】

バイオエタノールを製造するために微生物（例えば、好熱性微生物など）を使用することの主要な利点の1つは、酵母とは異なり、そのような微生物は、農業廃棄産物（例えば、ヘミセルロースなど）に由来する広範囲の糖を発酵することができることである。従って、1つの実施形態において、本発明の発酵プロセスにおいて使用される糖はバイオマスに由来する。さらなる実施形態において、発酵は混合糖の発酵である。具体的な実施形態において、混合糖には、ペントース糖（好ましくは、ペントース糖の大部分）が含まれる。

30

【0038】

さらなる実施形態において、発酵プロセスは、レドックスバランスが保たれた状態で維持される。このことは、好熱菌に関しては特に重要である。これは、好中温菌とは異なり、糖の取り込みがこれらの微生物では調節されないようであるからである。好ましくは、これはフィードバックセンサーの使用によって達成される。

30

【0039】

好熱性細菌はエタノールに対する低い抵抗性を有するが、これは、エタノールの定期的な除去又は連続した除去によって本発明の発酵プロセスにおいて都合よく克服することができる。このことは、発酵におけるエタノール濃度が本発明の好熱性微生物又は微生物のエタノール許容度よりも低く保たれることを保証する。エタノールは、蒸発又は蒸留（例えば、膜蒸発及び／又は穏和な真空蒸発など）によって高温発酵から連続的かつ都合良く除去することができる。

40

【0040】

次に、本発明は、下記の限定されない説明及び図を参照して記載される。

【実施例】

【0041】

発明の説明

材料

培地及び緩衝液

L B 培地：トリプトン 10 g ; 酵母抽出物 5 g ; N a C l 10 g ; 脱イオン水 (1 L にする)。

p H を 7 に調節し、オートクレーブ処理して殺菌した。

50

平板培地については、20 g / 1 の寒天を培地に加え、その後、オートクレーブ処理し

、55に冷却し、無菌のペトリ皿に注いだ（平板あたり約20ml）。

L B - a m p 平板については、ろ過滅菌したアンピシリン溶液を50μg/mlの最終濃度に加え、その後、ペトリ皿に注いだ。

【0042】

S O C 培地：トリプトン 2.0g；酵母抽出物 0.5g；N a C l 0.05g；M g C l₂ · 6 H₂O 0.204g；M g S O₄ · 7 H₂O 0.247g；グルコース 0.36g；脱イオン化H₂O（100mlにする）。

溶解し、pHを7に調節し、ろ過滅菌した。

【0043】

T G P 培地：トリプトン 17g；ダイズペプトン 3g；K₂H P O₄ 2.5g；N a C l 5g；ピルビン酸Na 4g；グリセロール 4ml；脱イオン水（1Lにする）。pHを7に調節し、オートクレーブ処理して殺菌した。 10

平板培地については、20g/lの寒天を培地に加え、その後、オートクレーブ処理し、55に冷却し、無菌のペトリ皿に注いだ（平板あたり約25ml）。

T G P - k a n 平板については、10μg/mlの最終濃度にするためのろ過滅菌されたカナマイシン溶液を、ペトリ皿に注ぐ前に加えた。

【0044】

T H 緩衝液：トレハロース 272mM；H E P E S (KOHによりpH7.5) 8mM；2回蒸留H₂O（1Lにする）。

【0045】

微生物菌株

大腸菌D H 5 - の化学的コンピテント細胞をI n v i t r o g e n から購入した（Cat. 18265 - 017）。

バチルス・ズブチリス亜種ズブチリス（Bacillus subtilis subsp. Subtilis）、ドイツ培養物コレクションD S M Z（DSM番号10）。

バチルス・ステアロサーモフィルス菌株L L D - R、これはN C I M B 1 2 4 0 3として寄託された。

バチルス・ステアロサーモフィルス菌株L L D - 1 5、これはN C I M B 1 2 4 2 8として寄託された。

【0046】

プラスミド

プラスミドのp C R - B l u n t 及びp C R - T O P O 2をI n v i t r o g e n から得た。

プラスミドp U B 1 1 0、このプラスミドを保有する枯草菌（Bacillus subtilis）B D 1 7 0をドイツ培養コレクションD S M Zから得た（DSM番号4514）。

プラスミドp U C 1 8をS i g m a - A l d r i c h から得た。

【0047】

実施例1. 合成されたギ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の構築（図2）

シュードモナス種101のギ酸デヒドロゲナーゼのアミノ酸配列（N C B I タンパク質データベースアクセスション番号P 3 3 1 6 0 - 配列番号3）を、ゲオバチルス・サーモグルコシダシウスについての最適化されたコドンを有するD N A配列に逆翻訳した。バチルス属菌株に由来するプロモーター領域及びr h o 非依存性ターミネーター領域を、翻訳された配列の上流側及び下流側にそれぞれ加えた（図2）。この新規な配列は公知のf d h 遺伝子配列との40%未満の類似性（公知のf d h 1 遺伝子との37%の同一性）を示した。X b a 1部位が、好適なベクターへのそのクローン化を容易にするために構築物の両側に設計された。

【0048】

所望の配列を、G a o らの方法（Xinxin Gao、Peggy Yo、Andrew Keith、Timothy J. R agan及びThomas K. Harris (2003)、Nucleic Acids Research、31 (22)、e143を参照のこと）を使用して合成し、p C R - B l u n t にその唯一のX b a 1位置においてクローン

化した。得られたベクター p C R - F 1 (図 4) を大腸菌 D H 5 細胞に導入し、陽性クローンを P C R 分析及び制限分析によって確認した。

【 0 0 4 9 】

2 つの代替戦略を、下記の実施例において示されるように、この合成 f d h 遺伝子を標的バチルス属細菌のゲノムに挿入し、発現するために利用することができる。

【 0 0 5 0 】

実施例 2 . 多重 (I S) 部位への f d h 遺伝子の挿入

この戦略は、多重挿入部位において組換えが頻繁に生じる挿入配列 (I S) を含有する菌株（例えば、バチルス・ステアロサーモフィルス菌株 L L D - R など）に適用される。 f d h 遺伝子及びこの I S 配列を有するベクターは、そのような場所の 1 又はそれ以上における安定な組み込みをもたらすことが予想される。

10

【 0 0 5 1 】

プラスミド p U B - I S F 1 の構築 (図 5)

最初に、菌株 L L D - R の公知の挿入配列（配列番号 5 及び図 3 ）を、フォワードプライマー (A G T A C T G A A A T C C G G A T T T G A T G G C G - 配列番号 6) 及びリバースプライマー (A G T A C T G C T A A A T T T C C A A G T A G C - 配列番号 7) をテンプレートとしての B . ステアロサーモフィルス菌株 L L D - 1 5 とともに使用して P C R 増幅する。 S c a 1 制限部位が配列の両側に導入される。 P C R 生成物を最初にプラスミド p C R - T O P O 2 . 1 にクローン化し、その後、得られたプラスミド p C R - I S を大腸菌 D H 5 細胞に導入し、 I S 領域を S c a 1 制限消化によって単離するために使用する。その後、単離された I S を p U B 1 1 0 にその唯一の S c a 1 部位においてクローン化し、得られたプラスミド p U B - I S を枯草菌に導入する。

20

【 0 0 5 2 】

その後、 l d h プロモーターを含有する 1 . 5 k b のフラグメントと、 f d h 遺伝子とを、 X b a 1 制限酵素を使用して p C R - F 1 プラスミドから消化し、同じ酵素により既に線状化されたプラスミド p U B - I S にクローン化する。その後、得られたプラスミド p U B - I S F 1 (図 5) を B . s u b t i l i s に導入し、陽性クローンを T G P - K a n 平板において選択し、 P C R 分析及び制限分析によって確認する。

30

【 0 0 5 3 】

菌株 L L D - R への f d h 遺伝子の組み込み

その後、プラスミド p U B - I S F 1 を H a e I I I メチラーゼ酵素によりインピトロでメチル化し、その後、バチルス・ステアロサーモフィルス菌株 L L D - R 又はその l d h 欠失菌株（実施例 3 を参照のこと）の細胞をメチル化 p U B - I S F 1 プラスミドにより形質転換する。陽性クローンを 5 0 において T G P - K a n 平板において 4 8 時間後に選択し、 f d h 遺伝子の P C R 増幅によって分析する。

30

【 0 0 5 4 】

その後、 f d h 遺伝子を、形質転換クローンを 6 0 ~ 6 5 で数世代にわたって T G P - K a n 培地で増殖させ、 T G P - K a n 平板において選択することによって染色体に組み込ませる。陽性クローンを f d h 遺伝子の存在について分析し、その後、振とうフラスコ及び発酵装置においてエタノール製造ならびに C 5 (ペントース) 糖及び C 6 (ヘキソース) 糖の利用についてスクリーニングする。

40

【 0 0 5 5 】

実施例 3 . l d h 欠失菌株の構築

最初の工程は、バチルス属のカナマイシン耐性マーカー (k a n) と、 B . ステアロサーモフィルス菌株 L L D - R の l d h 遺伝子を有するカセットとをプラスミド p U C 1 8 (これはグラム陰性微生物においてのみ複製することができる) にクローン化することである。

【 0 0 5 6 】

バチルス属クローニングベクターの構築。プラスミド p U C K (図 6)

カナマイシン耐性遺伝子 (k a n) を、プラスミド p U C 1 8 に、プラスミドにおける

50

任意のコード領域の外側及びレポーター遺伝子(*lacZ*)の外側に位置するその唯一の *Zra1* 部位においてクローニングした。 *k an* 遺伝子をクローニングするために、カナマイシン耐性遺伝子を含有する 1.13 kb のフラグメントを、プラスミド pUB110 をテンプレートとして使用して、下記のプライマー：

k an - BsZ - F (A C A C A G A C G T C G G C G A T T T G A T T C A T A C - 配列番号 10) および

k an - BsZ - R (C G C C A T G A C G T C C A T G A T A A T T A C T A A T A C T A G G - 配列番号 11)

により PCR 増幅した。 *Zra1* 部位をプライマーを介して *k an* 遺伝子の両端に導入した。その後、PCR 生成物を *Zra1* 制限エンドヌクレアーゼ酵素により消化し、事前に *Zra1* 消化され、脱リン酸化されたプラスミド pUC18 と連結した。その後、得られたプラスミド pUCK (図 6) を大腸菌 DH5 細胞に導入した。陽性クローニングを LB-amp 平板において選択し、PCR 分析及び制限分析によって確認した。

【 0057 】

欠失を有する *ldh* 遺伝子を有するプラスミド pUCK - LC の構築 (図 7)

1.36 kb の *ldh* カセットを、その ORF の 363 bp が欠失された菌株 LLD-R の *ldh* 遺伝子全体と、その隣接部とを含有するように設計した。このカセットを、菌株 LLD-R をテンプレートとして使用する *ldh* 遺伝子の上部領域及び下部領域の PCR 増幅によって構築した。その後、これらの領域を連結し、プラスミド pUCK にクローニングした。 *BglII* 部位を内側プライマーに導入した。上部領域を、下記のプライマーを使用して PCR 増幅した。

LC - U - F1 (A G G G C A A T C T G A A A G G A A G G G A A A A T T C C - 配列番号 12) 及び

LC - UB - R1 (T G C A C A G A T C T C C A C C A A A T C G G C G T C - 配列番号 13) 。

【 0058 】

下部領域を、下記のプライマーを使用して PCR 增幅した。

LC - DB - F1 (T T G A G C A G A T C T T G A T G C A A A A C G A T A A C - 配列番号 14) 及び

LC - D - R1 (T A A A G C C G A T G A G C A G C A G T T G A A G - 配列番号 15) 。

【 0059 】

これらの PCR 生成物を *BglII* 制限エンドヌクレアーゼ酵素により消化し、T4DNALi によるリガーゼ酵素を使用して連結した。連結物をテンプレートとして使用して、その後、 *ldh* カセットを、プライマーとして、

LC - UX - F2 (A T A T T A T C T A G A C A T T A C G G A A A T G A T A A T G G C - 配列番号 16) 及び

LC - DX - R2 (T C A C A A T C T A G A C A A T C G G C C A T A A A C - 配列番号 17)

を使用して PCR 増幅した。

【 0060 】

XbaI 部位をプライマーを介してカセットの両端に導入した。その後、PCR 生成物を *XbaI* 酵素により消化し、同じ酵素により事前に消化され、脱リン酸化されたプラスミド pUCK にクローニングした。その後、得られたプラスミド pUCK - LC を大腸菌 DH5 に導入した。陽性クローニングを LB-amp 平板において選択し、PCR 分析及び制限分析によって確認した。

【 0061 】

ldh 欠失菌株の構築

プラスミド pUCK - LC を *HaeIII* メチラーゼ酵素によりインビトロでメチル化し、野生型の好熱性細胞 (例えは、菌株 LLD-R) をエレクトロポレーション (100

10

20

30

40

50

0 V、201オーム、25マイクロファラデー及び5ミリ秒)によってメチル化プラスミドにより形質転換する。陽性クローンを65でTGP-Kan平板において選択し、kan遺伝子のPCR増幅によって1回の交差事象体(single cross-over event)として確認する。

【0062】

2回の交差による遺伝子欠失を達成するために、陽性クローンを数世代にわたってTGP培地で増殖させ(約5回の継代培養)、TGP平板において増殖することができるがTGP-kan平板においては増殖することができないクローンを選択する。その後、陽性クローンを、1dh遺伝子欠失体として、PCR分析によってカナマイシン遺伝子の不在について確認する。その後、クローンを振とうフラスコ及び発酵装置においてエタノール製造ならびにC5糖及びC6糖の利用について特徴づける。10

【0063】

実施例4. 同時でのfdh遺伝子の導入及び1dh遺伝子の欠失

この代替戦略は、広範囲の種類のヘテロ乳酸発酵微生物に対して、好熱性バチルス属と同様に広く適用可能であるが、後者が例示として使用される。

【0064】

プラスミドpUCK-LFの構築(図9)

fdh遺伝子を含有し、それに加えて、1dh遺伝子全体、ならびに、約300bpの上流側及び下流側の隣接領域を含有する遺伝子組み込みカセットをプラスミドpUCKにクローン化する。この構築物では、1dhオープンリーディングフレームの最初の450bpが、遺伝子発現が1dh遺伝子のプロモーターの制御下になるような方法でfdh遺伝子により置き換えられる。20

【0065】

これを達成するために、1dh遺伝子の下流側領域を含有する約750bpのDNAフラグメントを、

L D H B - X - F 1 (G A A C G A T T C T A G A T A C A G C A A G A T T C C G C - 配列番号8) 及び

L D H B - E - R 1 (G T T T G C G A A T T C A T A G A C G G A C G C A G - 配列番号9)

をプライマーとして、バチルス・ステアロサーモフィルス菌株LLD-Rをテンプレートとして使用してPCR増幅する。従って、Xba1部位及びEcoR1部位がPCRフラグメントの端部に導入される。その後、PCRフラグメントを消化し、Xba1部位と、EcoR1部位との間ににおいてプラスミドpUCKに一定方向でクローン化する。得られたプラスミドpUCK-1dhB(図8)を大腸菌DH5⁺に導入し、陽性クローンをLB-amp平板において選択し、PCR分析及び制限分析によって確認する。30

【0066】

その後、1dhプロモーター及びfdh遺伝子を含有する1.5kbのフラグメントを、Xba1制限酵素を使用してPCR-F1プラスミドから消化し、同じ酵素により既に線状化されたプラスミドpUCK-1dhBにクローン化する(図8)。得られたプラスミドpUCK-LF1(図9)を大腸菌DH5⁺細胞に導入し、クローンをLB-amp平板において選択する。陽性クローン及び構築物の正しい配向をPCR分析及び制限分析によって確認する。40

【0067】

エタノールを新規なPFL-FDH経路によって作製する菌株の構築

プラスミドpUCK-LF1をHaeIIIメチラーゼ酵素によりインビトロでメチル化し、標的の野生型細胞(例えば、菌株LLD-R細胞)をメチル化プラスミドにより形質転換し、TGP-Kan平板において60で選択する。陽性クローンは1回の交差事象体を表し、陽性クローンをfdh遺伝子のPCR増幅によって分析する。

【0068】

2回の交差による遺伝子組み込みを達成するために、TGP平板において増殖するがT

10

20

30

40

50

G P - K a n 平板においては増殖しないクローンを選択する。その後、陽性クローンを f d h 遺伝子の存在及びカナマイシン遺伝子の不在について確認する。最後に、クローンを振とうフラスコ及び発酵装置においてエタノール製造ならびに C 5 糖及び C 6 糖の利用についてスクリーニングする。

【0069】

すべての参考文献はその全体が本明細書中に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0070】

【図 1 A】乳酸デヒドロゲナーゼ経路が不活性化されている好熱性微生物における代謝経路に対する様々な条件の影響を示す。矢の濃淡及び太さは個々の代謝経路の相対的な優勢を示す。中性 pH 及び低い糖の存在下で活性である代謝経路。この場合、ピルビン酸ギ酸リーゼ経路が優勢である。

【図 1 B】乳酸デヒドロゲナーゼ経路が不活性化されている好熱性微生物における代謝経路に対する様々な条件の影響を示す。矢の濃淡及び太さは個々の代謝経路の相対的な優勢を示す。低い pH 及び低い糖の存在下で活性である代謝経路。この場合、嫌気性ピルビン酸デヒドロゲナーゼ経路が優勢である。

【図 1 C】乳酸デヒドロゲナーゼ経路が不活性化されている好熱性微生物における代謝経路に対する様々な条件の影響を示す。矢の濃淡及び太さは個々の代謝経路の相対的な優勢を示す。低い pH 及び高い糖の存在下で活性である代謝経路。この場合、細胞は代謝ストレスを受け、レドックスバランスが崩れ、これにより、いわゆる「レドックス死」を引き起こす。

【図 1 D】乳酸デヒドロゲナーゼ経路が不活性化されている好熱性微生物における代謝経路に対する様々な条件の影響を示す。矢の濃淡及び太さは個々の代謝経路の相対的な優勢を示す。中性 pH 及び高い糖の存在下で本発明の好熱性微生物において活性である代謝経路。この場合、新規な P F L - F D H 経路が優勢となり、エタノール及び C O₂ が唯一の嫌気性産物である。

【図 2】熱安定性を最大にするためのコドン最適化によって作製された合成 f d h 遺伝子のヌクレオチド配列を示す。f d h オープンリーディングフレームのDNA配列には、プロモーター及びターミネーター（斜体字）の領域が隣接する。プロモーターの - 35 ボックス及び - 10 ボックスには下線が付される。構築物を好適なベクターにクローン化するために、XbaI 部位が配列の両側に導入された。

【図 3】B.ステアロサーモフィルスの LLD-15 菌株の挿入配列 (IS) のヌクレオチド配列を示す。9bp の逆方向反復の末端が太字フォントで示される。

【図 4】pCR-Blunt 誘導体プラスミドの pCR-F1 の概略図である。このプラスミドは、唯一の XbaI 部位において pCR-Blunt にクローン化された、1dh プロモーターの制御下にあるコドン最適化された f dh1 遺伝子を含む。

【図 5】pUB110 誘導体プラスミドの pUB-ISF1 の概略図である。このプラスミドは、pCR-F1 プラスミドに由来する、1dh プロモーターの制御下にあるコドン最適化された f dh1 遺伝子を含み、公知のバチルス属菌株 LLD-15 に由来する挿入配列 (IS) もまた含む。

【図 6】pUCK と呼ばれる pUC18 誘導体プラスミドの概略図である。このプラスミドは、プラスミド pUB100 から pUC18 における唯一の Zra1 制限部位にクローン化されたカナマイシン耐性遺伝子を含む。

【図 7】pUCK 誘導体の pUCK-LC の概略図である。このプラスミドは、ORF の中央における 363bp の欠失を伴う 1dh 遺伝子を有する。

【図 8】pUCK 誘導体の pUCK-1dhB の概略図である。このプラスミドは、遺伝子の下流側領域を含む、1dh 遺伝子の 750bp を含有する。

【図 9】pUCK-LF1 プラスミドの概略図である。このプラスミドは、f dh 遺伝子を 1dh プロモーターの制御下に含有する遺伝子組み込みカセットを取り込む pUCK 誘導体である。

10

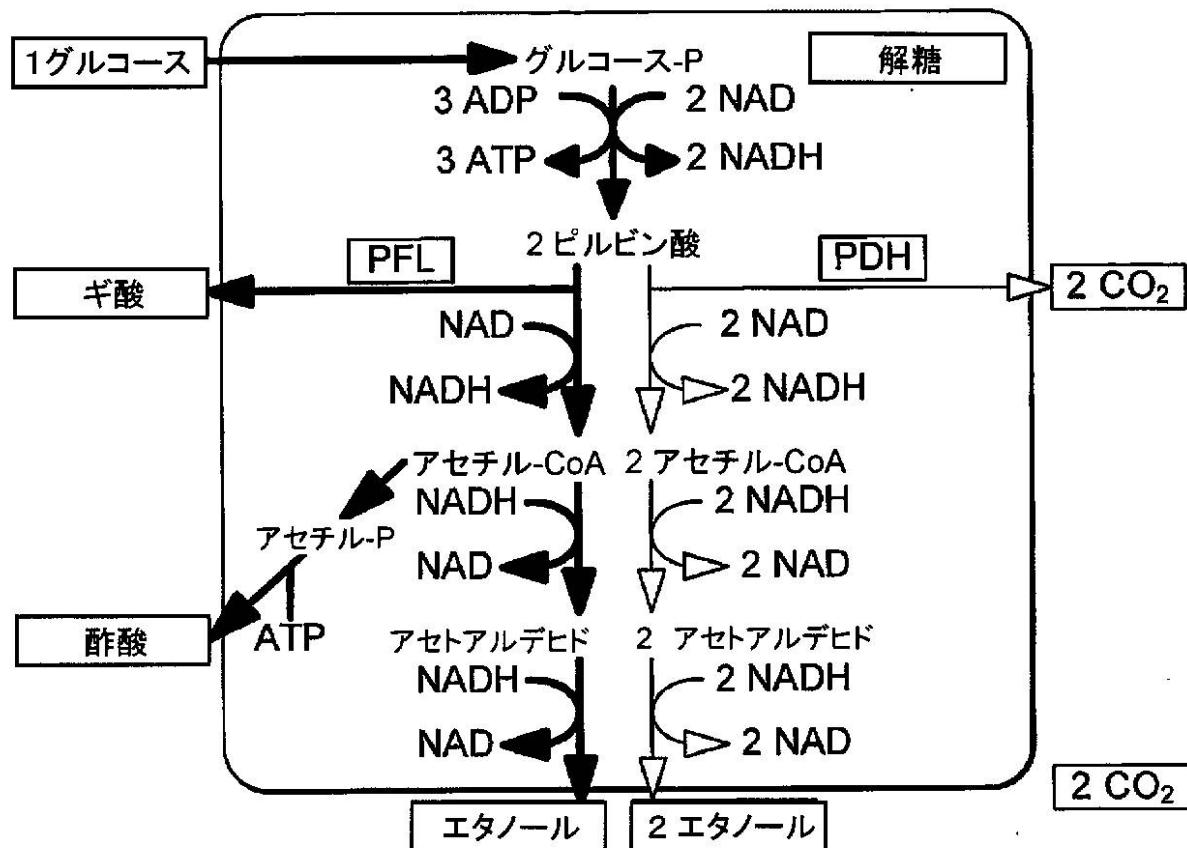
20

30

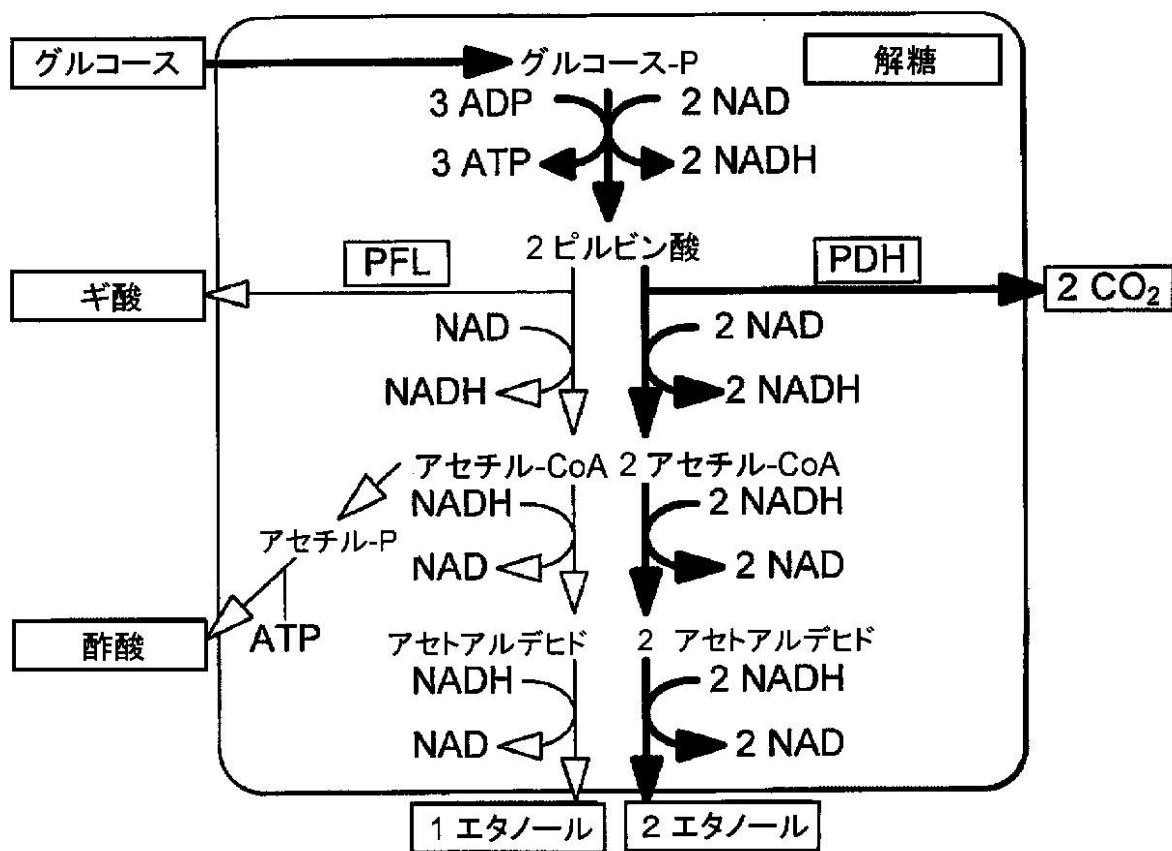
40

50

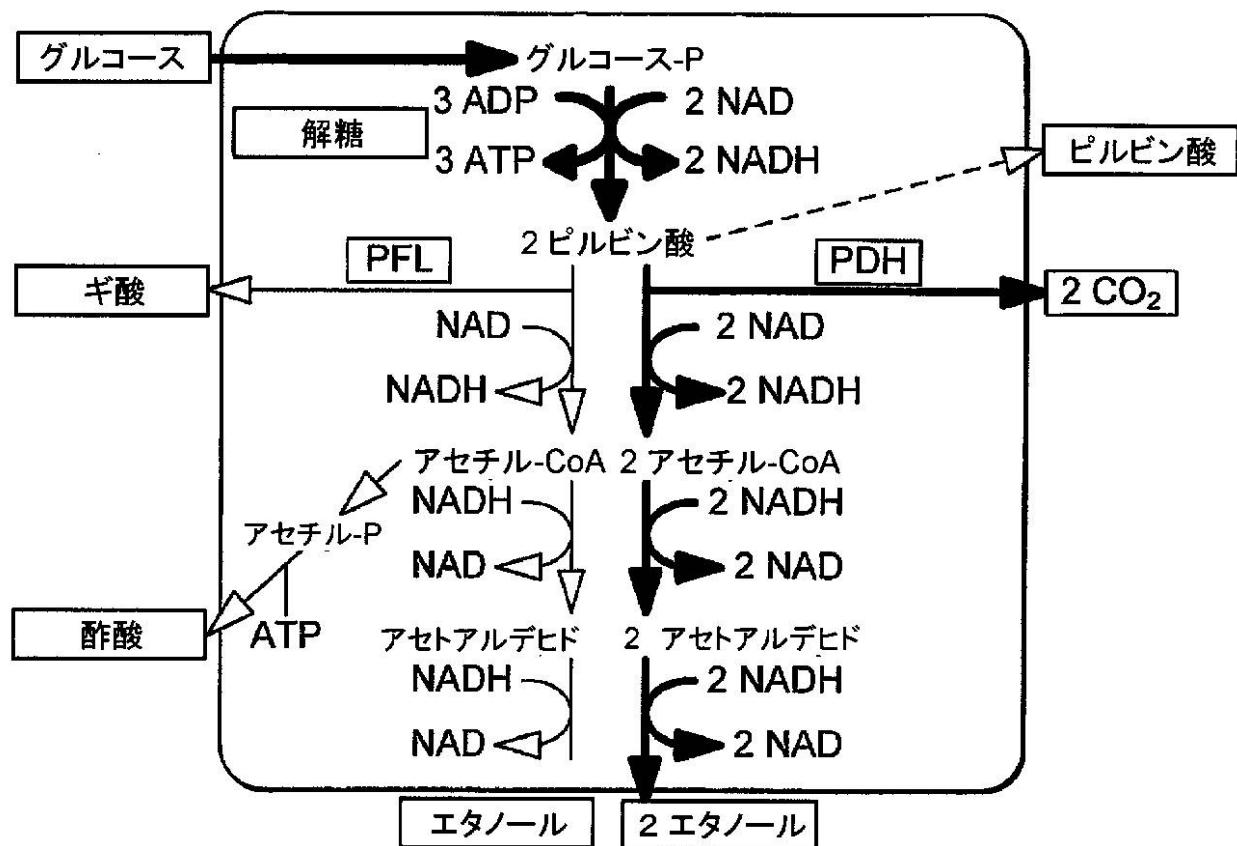
【図 1 A】



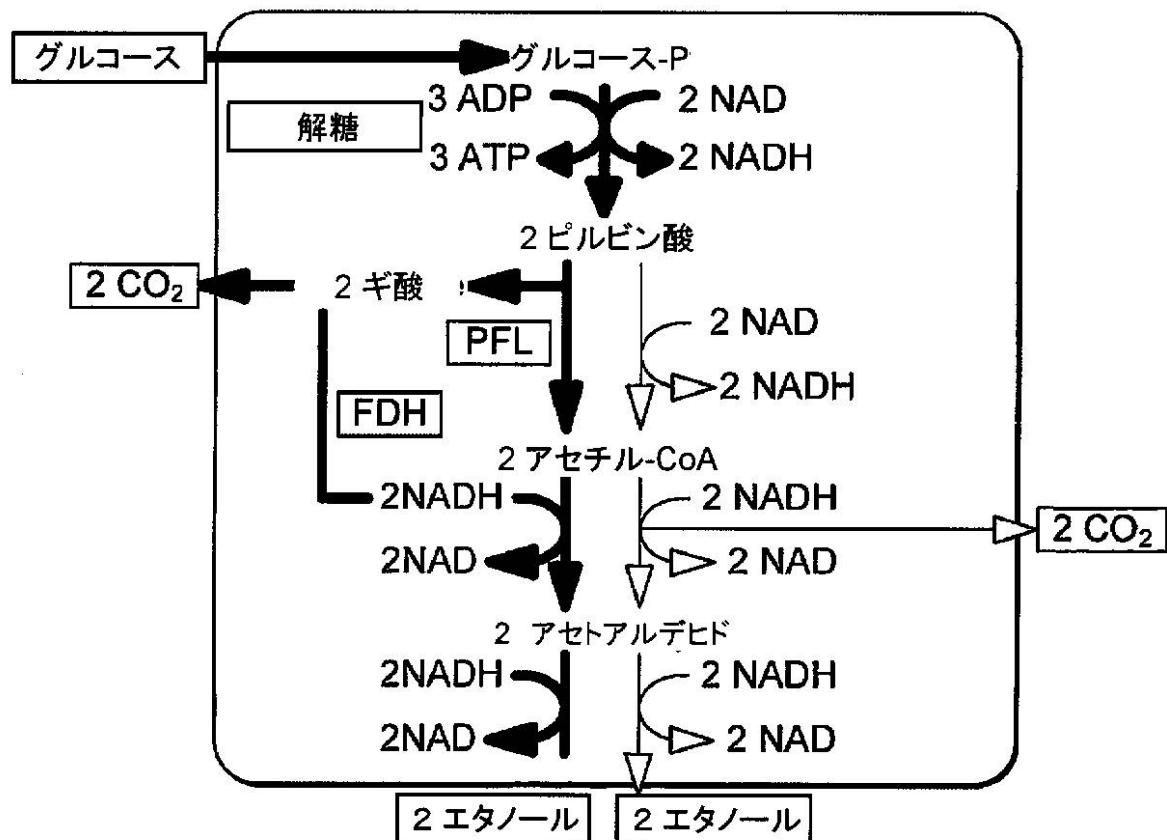
【図 1 B】



【図 1 C】



【図 1 D】



【図2】

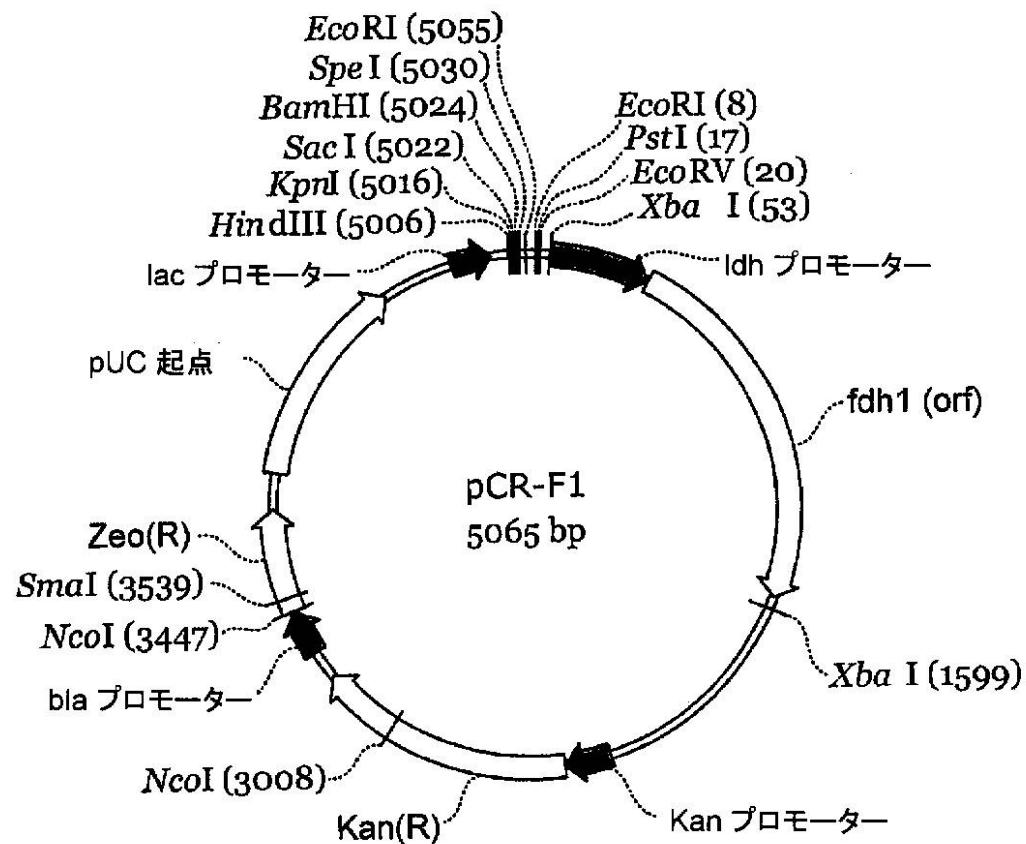
GCCTCTAGA

AGGGCAATCTGAAAGGAAGGGAAAATTCCCTTCGGATTGTCCTTTAGTTATTT
TATGGGGAGTGAATATTATAGCATTACGGAAATGATAATGGCAGAGTTTTT
CATTATTAGACTGCTGATGTAATTGGATGTGATGATAACAAAAATAATGTTGTGT
AAACAAAATGTTAACAAAAAGACAAATTCAITCATAGTTGATACTTGATAAAGA
TTGTGAAATAATGCACAATATCAATGTATGAGCAGTTCACAAATTCAITTTT
GGAAAGGATGACAGACAGCG
ATGGCAAAAGTACTTTGCGTTCTTATGATGATCCGGTAGATGGCTATCCG
AAGACGTATGCCGAGATGATTACCGAAGATAGATCACTATCCAGGAGG
GCAAACATTGCCGACGCCGAAAGCAATTGACTTCACGCCTGGCAATTGT
TAGGAAGCGTATCTGGCGAGCTGGACTTAGAAAGTATCTTGAGTCCAAT
GGACATACGTTAGTGGTAACTAGCGATAAGGATGGGCCAGACTCAGTGT
TGAACGGGAGTTAGTGGATGCCGATGTTGTCATTAGTCACCGTTCTGGC
CTGCATATCTTACGCCGAAAGAATCGCAAAAGCGAAGAACTTGAAACTA
GCCCTGACAGCAGGAATTGGAAGCGATCATGTGGATTGCAAAGCGCTAT
TGATCGCAATGTTACCGTGGCAGAGGTGACATATTGTAATTCTATTAGTGT
AGCTGAGCATGTGGTAATGATGATTTCATCCTAGTTAGAAATTACTTGCC
GAGCCACGAATGGGCTCGTAAAGGGGGTGGAAATTGCAAGATTGCGTT
CTCATGCTTATGATTAGAGCGATGCATGTTGGCACGGTTGGCGGG
CGTATAAGGCTTGGCAGTCTGCGTCAGTAGCACCCTTGACGTTCAATT
CACTATACTGATCGACATCGTCTCCAGAGTCCGTTGAGAAAGAACTTAA
CTTAACCTGGCATGCAACCGTGAAGATATGTATCCGGTGTGACGTGG
TAACATTGAATTGCCGTTACATCCTGAAACTGAACACATGATCAATGAC
GAAACGTTGAAACTGTTAAACGAGGCGCTTATATCGTAAACACAGCCAG
AGGGAAACTTGTGATGGGATGCTGTAGCCAGAGCACTGAGAGCGGAC
GCTTAGCCGGGTATGCAGGGACGTGTTCCACAAACCTGCCGGAAA
GATCATCCGTGGAGAACGATGCCGTATAATGGAATGACGCCACATATT
AGGCAC TACGTTAACAGCACAAGCACGTTATGCCGGCACCCTGAAA
TTCTTGAGTGCTTCTCGAAGGCCGTCGACAGGAGCACATAGTTAGCAAAGG
CAATGCTACGGGAGGC
AGCGAGGAAGCAGCTAAATTAAAGAAAGCGGTITAA
CACAGCAGGGCTGATCGGCCCTGTTATGTTCA
TCTAGAGCC

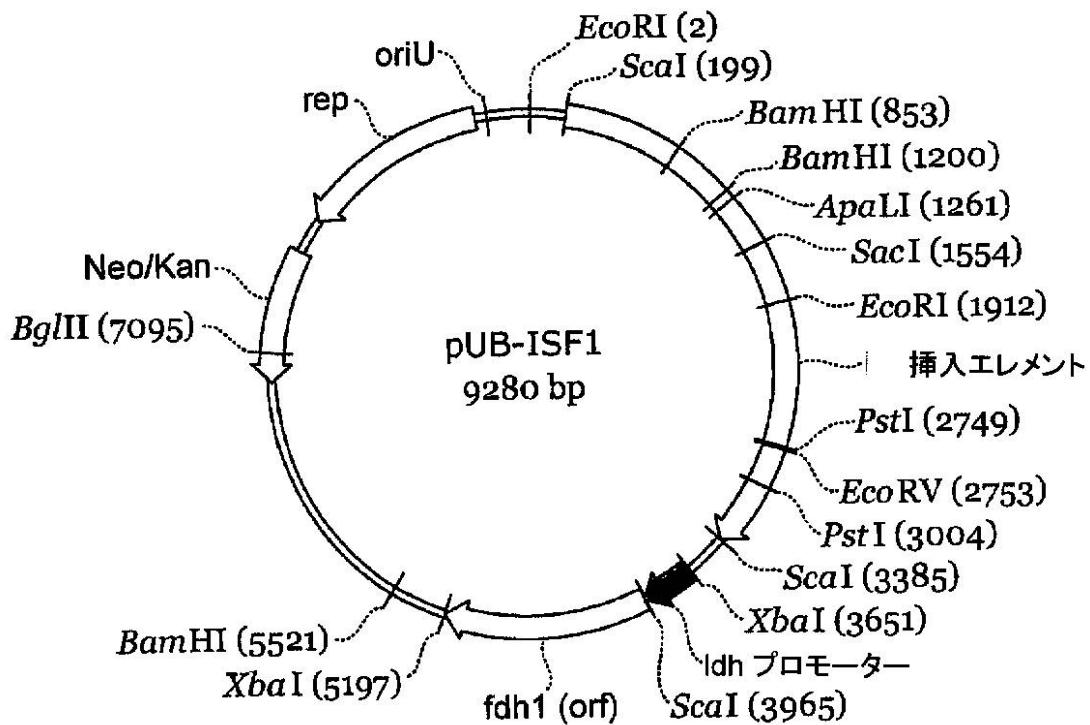
【図3】

TGTAAATTACITTTCCGCACAAAAAGACTCTTTGCACATTCTTCGGAAT
 ATCCCTCTCCCCCTTCCGAAAGAACATGTGCTAAATTTCGTGAATTATTCGGAATGGG
 ACATGGGTGATTCCAGAGGGGGACGAGGACGTGATTCCGTTATGACTTCAGGTC
 GATGTCCAGACATATGCCAGCGGGAAAACAAAACGACTTCCCTCTAAGCGGT
 GCCCTCATTGCCAGGCAAACGCCCTCTTATGCCATGGTACTACGAACGAAATGCC
 GTGACGTCGCATCAGTCTTATGCATTGGATCGCTCGGTATCGCTGCCGGAGTGCAG
 GAGGACGGTGGCGTGTGCCTCATTCCTCCCTATTTCAGTATAACGTTGCCAC
 CATATGGAGAGTGGTGAAGAACGGTTGGCCTGACTCCGAAACGGGGATGGAGGA
 GGCTCCACTCCTACGGATGAAGGGTTTATTTATGTCCCACGTTATTCCGAA
 ATTGAACCACCTCATTGGTTTGCAGGCGCTGGAGAAAAATTGGTCTGCCATC
 GCCCAAGCCGAGAGAACGGAGCCCTATGGTGGATCCAGACGATGGAGGAGATCGGCTC
 TTTTCGTCACTCAAGAGATATGGGAGCACCGATCGACGCATCTTGCACGTACATT
 CAGTTCTGATTACTTATATCCCTATATGGAATCATTATAGATTCCAAACCTTC
 CTCTCGACGGTGGGGAAATGATCCGATAGGATAGAGACAGGATGGACCATAAGGTC
 CTAGAATGGGATGAACGAAGGAGGAGATCGAAATGAATGAGTCGATGAGACAGGAGA
 TCGCTTATTTCGGTATGGATTGATCGCTCCATTGGTAATGGACAAGTCGATCCAAA
 CGTACTTGAAGGAAGTAGCGGAACGGATCCATCAAGTCCCCACCATGGAGAGAAACG
 CATCGCCGCCAAACGATCCTCGACTGGTCACGCAGTACAAAAAAGGGGGTTGAG
 GCGCTGAAGCCGAAACGACGGTCGGACCGTGGCATTCCGGAGGCTGTACCTGAAG
 AAGAGGATCACATTAGCCCTGAGAAAAAACACCCCCACATGCCGTGACGGTGT
 TTACCAACACCTATCGAGCAGGGGAAATCCAATCCATCTTATTCACTATATACC
 GACTTTAAAAAAATACAACCTCGTGGGGAAAGAAATTTACCGATTCCCTGAACGAAA
 ACGATTCGCGTACGATCAGGTCAATGAGCTCTGGCAAGGTGATTGTCCTATGGCCGT
 TGATTCGCGTGAATGGCAAACGCAAAACGTTTTGATTGCCTATATCGATGACTGC
 TCGCGGGTCGTGCCGTACGCTCAGTTTCTCTCCGAGAAATTGACGGTTGCGGAT
 CGTAACCGCGCGAGTTAGGGATCACCTGATCCATACCCAGCCGTACGATCCGAAA
 GCAAAGGGAAAATCGAACGATTTCCGACCGTACAGACGCCGTTTACCGTTGCTC
 GAAATGAATTACCGAACGCTCGAAGAGCTAACGAGCGATTGGAAAGTGGTTGG
 AGGAAGATTACCATCGAAAACCGCATGCCCTCGTGAACGGGAAGACGCCACATGAAGT
 GTTCAATCGCAAGTCCATTGGTGTCTCGTCAAGGATTGGATGGCTCAGTTGAACAA
 GCAGCTGTATGAAGTTCCGCCCCGGTCATCGGACAATCGATCGAACCTCGTATGATG
 AACAAAGCGTGTATGTGTACGAAGACGGTCAACGGTCGCCGAAGCGTCTTGT
 CTTCGAGGACAATGCCATGTGAAACGCCATCGGTACCGTTGCCGGTTCCGGTAG
 AGGGAGGCGAAAACGATGTATAAACGTTTATTCCCTTCCGAGAGCGTTTCGAA
 GGAGACGAATCCACCAAGAGGTTATCAAGGGGCCGTATCAAGAGGCCCTGCC
 TTGGACTACGTGAAACGAACAAGAGGGATCGGGCTATTGATCGGTGAACCAGGGCCG
 GCAAGACATTGCCCTCGGGCTTAAGGAATCCCTGAATCCGTACTGTATCACGTC
 GTTATTTCATTGTCACGGGAAGCGTGATGGACTTTATCGCGCCCTGCCCTCGGG
 CTGGGGAAAGAGCGAAAATACCGCAAGGTCGACTGTTATTCAAATCCAACAAGGGA
 TCGAGCGCTTGTATCATGAACAAACGGTACGTCAGTGTCTACCTCGATGAAATGCAT
 TTAGCGAAGGATGCCATTCTGCAGGATATCGCATCCCTGTTCAACTTCACATGGACTC
 AACAAATCCGTTGTCTGATTGGCGGGCTGCCATTACAGGCAAAACTACGGT
 TGAATCAACACCGTCCGCTCACCAACGAATCATCATCGCATACAGATGGGCCCT
 GATAAGGAAGAAGTGGTAGGATATCGAACACCCGCTGAAACAGGCGGGGGCGAAA
 CACCGATTTCACCCAGCTGCCATTAGAAGCGATGCCCTGCAGTCGAGGGTGGCC
 GCGGATCATCAACAAACCTGCCACCACTGCCCTGTTATACGGCGCTCAATTAAAAAAAC
 ATATGATTGACGAAGACATTGTGCGTATGGCAGCCGAAGAAATGGGGTACTGACACAG
 CAGGGGCTGATCGGCCCCGTATGTTCATCCGATCCATCCTCATTCTAGTTAATCAT
 CGGAAATAATGTGCAAATGTCGAAATAATCTGAAAACCTGGAATAATTGAAAAAGGGATTCTGAAATAA
 TGTGCTAATTAC

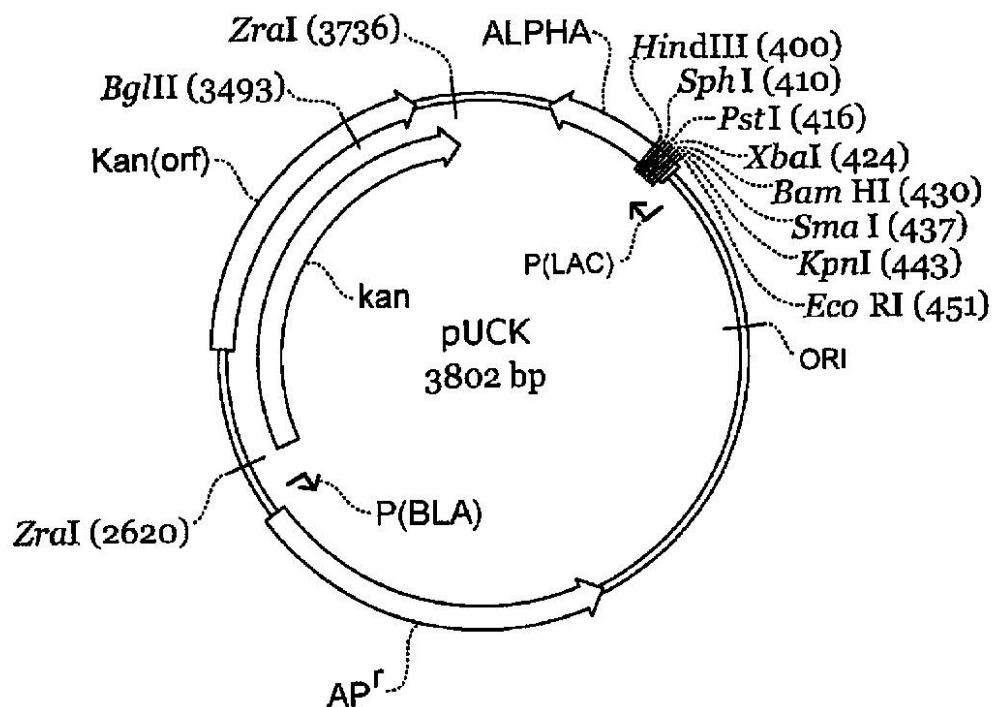
【図4】



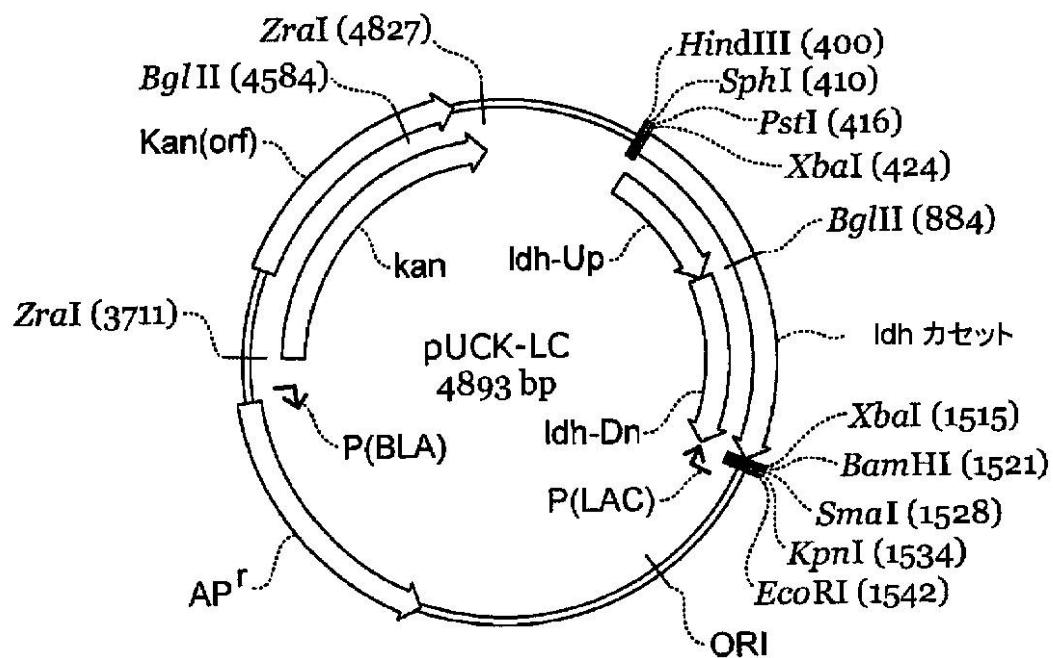
【図5】



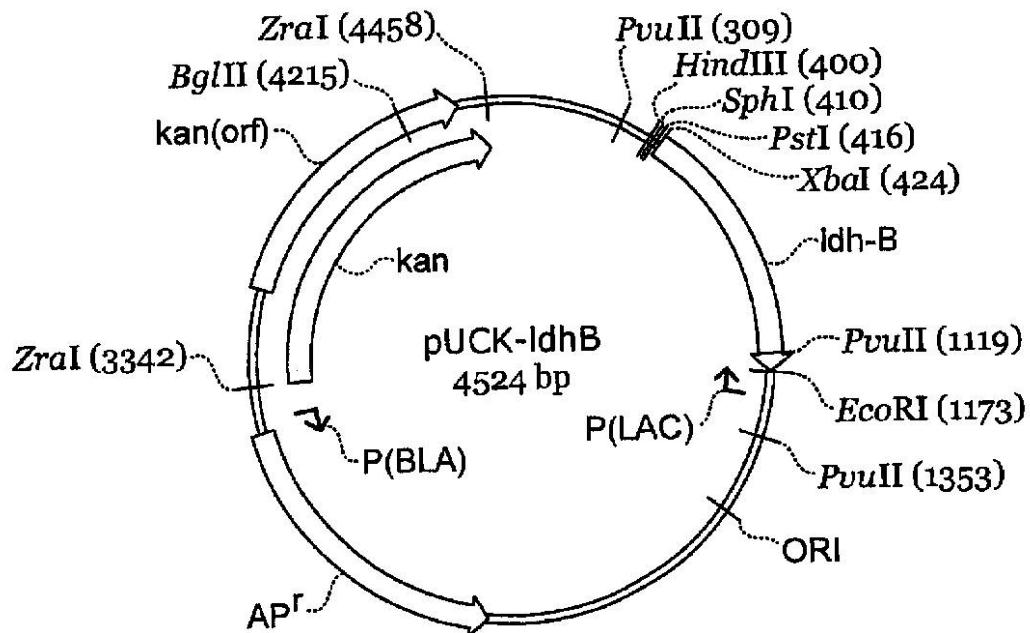
【図6】



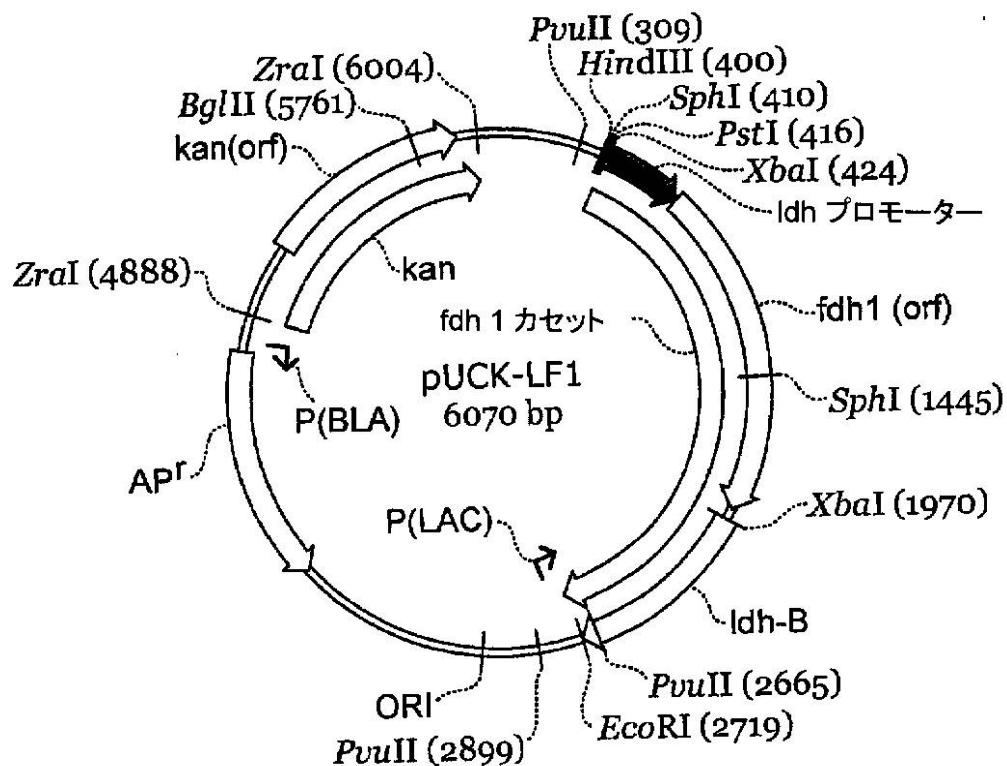
【図7】



【図 8】



【図 9】



【配列表】

2009529905000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT																
				International application No PCT/GB2007/001060												
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12P7/06 C12N15/53 C12N9/02 C12N1/21 C12N15/90																
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N C12P C12R																
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched																
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search																
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">A</td> <td style="padding: 2px;">WO 01/49865 A1 (ELSWORTH BIOTECH LTD [GB]; GREEN EDWARD [GB]; BAGHAEI YAZDI NAMDAR [GB] 12 July 2001 (2001-07-12) claims</td> <td style="padding: 2px;">1-35</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">A</td> <td style="padding: 2px;">WO 02/29030 A (ELSWORTH BIOTECH LTD [GB]; JAVED MUHAMMAD [GB]; CUSDIN FIONA [GB]; MIL) 11 April 2002 (2002-04-11) claims</td> <td style="padding: 2px;">1-35</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">A</td> <td style="padding: 2px;">US 2005/042736 A1 (SAN KA-YIU [US] ET AL) 24 February 2005 (2005-02-24) claims</td> <td style="padding: 2px;">1-35</td> </tr> </tbody> </table>					Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	A	WO 01/49865 A1 (ELSWORTH BIOTECH LTD [GB]; GREEN EDWARD [GB]; BAGHAEI YAZDI NAMDAR [GB] 12 July 2001 (2001-07-12) claims	1-35	A	WO 02/29030 A (ELSWORTH BIOTECH LTD [GB]; JAVED MUHAMMAD [GB]; CUSDIN FIONA [GB]; MIL) 11 April 2002 (2002-04-11) claims	1-35	A	US 2005/042736 A1 (SAN KA-YIU [US] ET AL) 24 February 2005 (2005-02-24) claims	1-35
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.														
A	WO 01/49865 A1 (ELSWORTH BIOTECH LTD [GB]; GREEN EDWARD [GB]; BAGHAEI YAZDI NAMDAR [GB] 12 July 2001 (2001-07-12) claims	1-35														
A	WO 02/29030 A (ELSWORTH BIOTECH LTD [GB]; JAVED MUHAMMAD [GB]; CUSDIN FIONA [GB]; MIL) 11 April 2002 (2002-04-11) claims	1-35														
A	US 2005/042736 A1 (SAN KA-YIU [US] ET AL) 24 February 2005 (2005-02-24) claims	1-35														
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.																
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																
T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family																
Date of the actual completion of the international search 8 August 2007		Date of mailing of the international search report 24/08/2007														
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Sommer, Birgit														

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members				International application No PCT/GB2007/001060	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date	
WO 0149865	A1 12-07-2001	AU 2385601 A EP 1278873 A1 GB 2377448 A		16-07-2001 29-01-2003 15-01-2003	
WO 0229030	A 11-04-2002	AU 9209401 A BR 0114477 A CA 2424890 A1 EP 1322775 A2 JP 2004510435 T		15-04-2002 13-01-2004 11-04-2002 02-07-2003 08-04-2004	
US 2005042736	A1 24-02-2005	NONE			

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ジェーブド , ムハマド

イギリス国 , エセックス アールエム8 1ワイビー , ダゲナム , グリーンサイド 10

(72)発明者 バガエイ - ヤズディ , ナムダー

イギリス国 , ロンドン ダブリュ9 1エスエフ ,マイダ ベール , クライブ コート 400

F ターム(参考) 4B024 AA03 BA77 BA80 CA01 DA05 DA07 GA11 HA01

4B064 AC03 CA02 CA19 CC24 CD09 DA01 DA10

4B065 AA01X AA15X AB01 AC02 AC14 BA02 BB14 BC03 CA06 CA41

CA44