

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6014042号
(P6014042)

(45) 発行日 平成28年10月25日(2016.10.25)

(24) 登録日 平成28年9月30日(2016.9.30)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N	1/21	(2006.01)	C 12 N	1/21	Z N A
C 12 P	7/16	(2006.01)	C 12 P	7/16	
C 12 N	15/09	(2006.01)	C 12 N	15/00	A
C 12 R	1/145	(2006.01)	C 12 N	1/21	Z N A
			C 12 R	1:145	

請求項の数 10 (全 68 頁)

(21) 出願番号 特願2013-534846 (P2013-534846)
 (86) (22) 出願日 平成23年9月29日 (2011.9.29)
 (65) 公表番号 特表2013-543724 (P2013-543724A)
 (43) 公表日 平成25年12月9日 (2013.12.9)
 (86) 國際出願番号 PCT/NZ2011/000203
 (87) 國際公開番号 WO2012/053905
 (87) 國際公開日 平成24年4月26日 (2012.4.26)
 審査請求日 平成26年9月29日 (2014.9.29)
 (31) 優先権主張番号 13/049, 263
 (32) 優先日 平成23年3月16日 (2011.3.16)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 61/405, 871
 (32) 優先日 平成22年10月22日 (2010.10.22)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

微生物の受託番号 DSMZ DSM 24138

(73) 特許権者 510119555
 ランザテク・ニュージーランド・リミテッド
 ニュージーランド国 1052 オークラ
 ンド、パネル、バルフォー・ロード 2
 4
 (74) 代理人 100092783
 弁理士 小林 浩
 (74) 代理人 100120134
 弁理士 大森 規雄
 (74) 代理人 100176094
 弁理士 箱田 滉
 (74) 代理人 100104282
 弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】組換え微生物による一酸化炭素からのブタノールの產生

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

外因性チオラーゼ；外因性3-ヒドロキシブチリル-Co Aデヒドロゲナーゼ；外因性クロトナーーゼ／クロトニル-Co Aヒドラターゼ；外因性ブチリル-Co Aデヒドロゲナーゼ、並びに外因性電子伝達フラビンタンパク質A及びBを含む組換え微生物であって、ガス状基質から1-ブタノール及びその前駆体の少なくとも一つを主要な発酵産物として產生し、

Clostridium autoethanogenum、Clostridium jungdahlii (クロストリジウム・リュングダリイ)、Clostridium ragsdalei、及びClostridium coskati 10
からなる群から選択される、前記組換え微生物。

【請求項 2】

ブチリル-Co Aを產生する、請求項1に記載の組換え微生物。

【請求項 3】

前記微生物が、外因性ホスホトランスブチリラーゼ及び外因性酪酸キナーゼをさらに含み、酪酸を產生する、請求項1に記載の組換え微生物。

【請求項 4】

前記微生物が、内因性又は外因性フェレドキシン依存性アルデヒド酸化還元酵素をさらに含み、ブチルアルデヒドを產生する、請求項3に記載の組換え微生物。

【請求項 5】

前記微生物が、外因性ブタノールデヒドロゲナーゼをさらに含み、1 - ブタノールを產生する、請求項 4 に記載の組換え微生物。

【請求項 6】

前記微生物が、発酵プロセスのリットル当たり少なくとも 0.075 グラムの 1 - ブタノールを產生する、請求項 5 に記載の組換え微生物。

【請求項 7】

前記微生物が、発酵プロセスのリットル当たり少なくとも 0.075 ~ 20 グラムの 1 - ブタノールを產生する、請求項 6 に記載の組換え微生物。

【請求項 8】

チオラーゼが配列番号 1 の核酸配列によりコードされ、3 - ヒドロキシブチリル - C o A デヒドロゲナーゼが配列番号 2 の核酸配列によりコードされ、クロトナーゼ / クロトニル - C o A ヒドラターゼが配列番号 3 の核酸配列によりコードされ、ブチリル - C o A デヒドロゲナーゼが配列番号 4 の核酸配列によりコードされ、電子伝達フラビンタンパク質 A が配列番号 5 の核酸配列によりコードされ、電子伝達フラビンタンパク質 B が配列番号 6 の核酸配列によりコードされる、請求項 1 に記載の組換え微生物。 10

【請求項 9】

前記微生物が、*Clostridium autoethanogenum* である、請求項 1 に記載の組換え微生物。

【請求項 10】

寄託番号 D S M 2 4 1 3 8 で、D S M Z に寄託された組換え微生物。 20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、微生物発酵によるバイオ燃料の產生のための方法、及びこのような方法における使用のために適した遺伝的に改変された微生物に関する。

【背景技術】

【0002】

ブタノールは、年間 450 - 550 万トンの世界的生産を有する広い範囲の工業的用途を伴う重要な原体化学物質である。これは、アクリル酸及びメタクリル酸エステル（被覆、プラスチック、織物、接着剤、等において使用される）、グリコールエーテル（被覆、電子工学）、及び酢酸ブチル（ペンキ、インク、被覆、合成果実芳香）、並びにブチルアミン（殺虫剤及び医薬品の製造）並びにアミン樹脂の製造のための前駆体として使用される。これは、更に溶媒（インク、染料等中の）、抽出剤（薬物並びにアルカロイド、抗生素質、ホルモン、及びビタミンのような天然物質の製造のための）として、並びに凍結防止流体、化粧品及びクロマトグラフィーにおける直接的用途を有する。 30

【0003】

ブタノールは、更に第二世代のバイオ燃料としての潜在性を有し、そしてこの文脈において、バイオブタノール（Kopke & Durre, 2010）と呼ばれる。これは、ガソリンと類似の特性を、そしてエタノールより優れた特性を有する。具体的には、これは、高いエネルギー密度のために増加した総走行距離を有し、これは、いずれもの濃度でガソリンに混合することができ（一方、エタノールは 85 % までしか混合することができない）、そして吸湿性でも腐食性でもない。 40

【0004】

輸送機関のためのバイオ燃料は、ガソリンに対する魅力的な代替品であり、そして低濃度のブレンドとして燃料市場に急速に浸透している。天然の植物の供給源から誘導されるバイオ燃料は、化石供給源から誘導されるもの（ガソリンのような）より更に環境的に適しており、これらの使用は、燃料の燃焼の結果として大気に放出されるいわゆる化石二酸化炭素（CO₂）ガスのレベルの減少を可能にする。更に、バイオ燃料は、多くの地域で現地的に产生することができ、そして輸入化石エネルギー源に対する依存性を減少するために役割を果たすことができる。 50

【0005】

バイオ燃料の大部分は、伝統的な酵母による発酵法により產生され、これは、農作物由來の炭水化物を主たる炭素源として使用し、そして第一世代のバイオ燃料ととして知られている。然しながら、これらの農作物は、食料のために必要であり、そして多くの農作物は、更に肥料の形態の高い農業的入力を必要とする。これらの制約は、第一世代のバイオ燃料は、持続不可能であると考えられ、そして達成することができる温室ガスの減少は、制約されることを意味する。第二世代のバイオ燃料の目標は、温室ガス放出を減少し、そして化石燃料への依存性を減少するための、現時点の農作物の非食料部分又は他の工業廃棄物の持続可能な使用である。

【0006】

最近の1-ブタノール产生は、主としてオキソ合成(Weissermel & Arpe, 2003)によっている。原油を含む石油化学製品は、分解されて、プロピレンを形成し、これはオキソ合成中で使用される。然しながら、合成法は、再生不能資源の使用を必要とし、そして高価であり、そして形成される产物中で非特異的であることに悩まされる。

10

【0007】

ブタノールは、更に最も普通にはアセトン-ブタノール-エタノール(ABE)発酵である生物学的製造法によって产生することもでき、これは、1913年から工業的に使用されている(Kopke & Durre, 2010)。この方法は、アセトンの所望しない副産物を有し、これは、通常ブタノールの約半分の体積で产生され、従ってこれは収率を大幅に減少する。更にこの発酵の方法は、微生物に対するブタノールの毒性によって制約され、これは、増殖が、1.5%のように低いブタノール濃度において、殆ど完全に阻害される結果となる(Kopke & Durre, 2010)。更に、ABE発酵法は、原料としてトウモロコシ、デンプン、キャッサバ、及びサトウキビからの糖を使用する。これは、食料ではなく燃料を产生するための耕作地の好ましくない使用をもたらす。これは、更に森林破壊及び砂漠化に関連する問題を悪化させる。

20

【0008】

僅かな生命体のみがブタノールを天然に产生することが知られ、そしてそのいずれもが豊富な供給源(一酸化炭素-COのような)から高収率でブタノールを产生しない。COからブタノールを天然に产生することが知られた二つの生命体は、*Butyribacterium methylotrophicum*(これは、ごく僅かのみのブタノールを合成する(Heiskanen et al, 2007))、及び*Clostridium carboxidiivorans*(これは、主要な発酵産物のエタノール及び酢酸塩の副産物として、低収率の1-ブタノールを产生する(Liou et al, 2005))である。

30

【0009】

E. coli、*Bacillus subtilis*、*Saccharomyces cerevisiae*、*Pseudomonas putida*、又は*Lactobacillus brevis*を含む多くの生命体が遺伝的に改変されて、1-ブタノールを产生する。然しながら、これらの生命体の全ては、なお原料としての糖に依存している(Kopke & Durre, 2010)。250種を超えるクロストリジウム種が知られているが、僅かなもののみが遺伝子的に利用可能である。クロストリジウムにおいて天然のコンピテンス(細胞の環境からの細胞外DNAの取込み)は知られていない、そして電気的形質転換(electrotransformation)又は接合(conjugation)のみが、形質転換(トランスポーメーション)のために利用可能な方法である。これらの問題点は、クロストリジウム種を有効に形質転換することにおける有意な困難さを与える。殆どのクロストリジウム種は、一つ又はそれより多い制限/メチル化系を有して、外来及びファージDNAに対して保護し、これは、形質転換が特に困難であり、そして予測不可能であることを意味する。

40

【0010】

50

本明細書中で言及される刊行物の文献的詳細は、本記載の末尾に収集されている。従来の技術の一つ又はそれより多い不都合を克服すること、或いは少なくとも公共に既知の技術に対する有用な代替技術を提供することが本発明の目的である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0011】

- 【非特許文献1】Kopke & Durre, 2010;
- 【非特許文献2】Weissermel & Arpe, 2003;
- 【非特許文献3】Heiskanen et al., 2007;
- 【非特許文献4】Liou et al., 2005.

10

【発明の概要】

【0012】

本発明によれば、遺伝的に改変された微生物が、COを使用して1-ブタノール又はその前駆体を主要な発酵産物として产生することが可能であることが見いだされている。

最初の側面において、本発明は、カルボキシド栄養性(carboxydotrophic)酢酸產生性組換え微生物を提供し、これは、1-ブタノール及び/又はその前駆体を主要な発酵産物として产生する。

【0013】

関連する側面において、本発明は、酢酸產生性組換え微生物を提供し、これは、概略1 mM又は発酵プロスの1リットル当たり0.075g/1より高い濃度でCOを含んでなる基質からの発酵によって、1-ブタノール及び/又はその前駆体を产生することが可能である。

20

【0014】

好ましくは、微生物は、ブタノール生合成経路中の一つ又はそれより多い酵素を発現するためには適合された外因性核酸を含んでなる。

一つの態様において、一つ又はそれより多い酵素は：

チオラーゼ

3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ

クロトナーーゼ/クロトニル-CoAヒドラターゼ

ブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ

30

電子伝達フラビンタンパク質A

電子伝達フラビンタンパク質B

からなる群から選択される。

【0015】

好ましくは、微生物は、一つ又はそれより多い酵素をコードする一つ又はそれより多い外因性核酸を含んでなる。

好ましくは、一つ又はそれより多い酵素をコードする一つ又はそれより多い核酸は、配列番号1から番号6の核酸又は機能的に等価なこれらの変種から選択される。

【0016】

好ましくは、微生物は、チオラーゼ、3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ、クロトナーーゼ、ブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ、電子伝達フラビンタンパク質A及び電子伝達フラビンタンパク質Bのそれぞれをコードする一つ又はそれより多い外因性核酸を含んでなる。

40

【0017】

好ましくは、微生物は、一つ又はそれより多い、或いは好ましくはそれぞれのチオラーゼ、3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ、クロトナーーゼ、ブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ、電子伝達フラビンタンパク質A及び電子伝達フラビンタンパク質Bをコードするプラスミドを含んでなる。

【0018】

一つの態様において、微生物は、チオラーゼ、3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒド

50

ロゲナーゼ、クロトナーゼ／クロトニル - C_oA ヒドラターゼ及びブチリル - C_oA デヒドロゲナーゼ酵素のそれぞれをコードする一つ又はそれより多い外因性核酸を含んでなる。

【0019】

好ましくは、微生物は、更に外因性ホスホトランスマセチラーゼ／酢酸キナーゼプロモーターを含んでなる。好ましくは、プロモーターは、配列番号 7 又は機能的に等価なその変種に対応する。

【0020】

好ましくは、プロモーターは、本明細書中で先に言及された一つ又はそれより多い酵素をコードする構築物上に含有される。

10

一つの態様において、微生物は：

ホスホトランスマセチラーゼ；

酪酸キナーゼ；

フェレドキシン依存性アルデヒド酸化還元酵素；

ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ；

ブタノールデヒドロゲナーゼ；

二機能性ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ及びブタノールデヒドロゲナーゼ；

からなる群から選択される一つ又はそれより多い酵素を発現するために適合された外因性核酸を含んでなる。

【0021】

20

一つの態様において、微生物は、一つ又はそれより多いブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ、ブタノールデヒドロゲナーゼ及び二機能性ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ／ブタノールデヒドロゲナーゼを発現するために適合された外因性核酸を含んでなる。好ましくは、微生物は、一つ又はそれより多いブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ、ブタノールデヒドロゲナーゼ及び二機能性ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ／ブタノールデヒドロゲナーゼをコードする一つ又はそれより多い外因性核酸を含んでなる。

【0022】

一つの態様において、微生物は、一つ又はそれより多いホスホトランスマセチラーゼ、酪酸キナーゼ、フェレドキシン依存性アルデヒド酸化還元酵素、及びブタノールデヒドロゲナーゼを発現するために適合された外因性核酸を含んでなる。好ましくは、微生物は、一つ又はそれより多いホスホトランスマセチラーゼ、酪酸キナーゼ、フェレドキシン依存性アルデヒド酸化還元酵素、及びブタノールデヒドロゲナーゼをコードする一つ又はそれより多い外因性核酸を含んでなる。特別な態様において、微生物は、ホスホトランスマセチラーゼ、酪酸キナーゼ、フェレドキシン依存性アルデヒド酸化還元酵素、及びブタノールデヒドロゲナーゼのそれぞれを発現するために適合された外因性核酸を含んでなる。

30

【0023】

一つの態様において、一つ又はそれより多い酵素をコードする一つ又はそれより多い核酸は、本明細書中の以下の表 7 から 10 中に概略示される核酸及び機能的に等価なその変種から選択される。

【0024】

40

一つの態様において、微生物は、ブタノールの生合成経路中の酵素の少なくとも 2 種、少なくとも 3 種、少なくとも 4 種、少なくとも 5 種、少なくとも 6 種、少なくとも 7 種、少なくとも 8 種、少なくとも 9 種、少なくとも 10 種、少なくとも 11 種、又は少なくとも 12 種の酵素を発現するために適合された一つ又はそれより多い核酸を含んでなる。

【0025】

一つの態様において、微生物は、チオラーゼ、3 - ヒドロキシブチリル - C_oA デヒドロゲナーゼ、クロトナーゼ／クロトニル - C_oA ヒドラターゼ、ブチリル - C_oA デヒドロゲナーゼ、電子伝達フラビンタンパク質 A、電子伝達フラビンタンパク質 B、並びにブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ及びブタノールデヒドロゲナーゼ（又は二機能性酵素）の一つ又は両方を発現するために適合された一つ又はそれより多い核酸を含んでなる。

50

【0026】

一つの態様において、微生物は、チオラーゼ、3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ、クロトナーゼ/クロトニル-CoAヒドラターゼ、ブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ、電子伝達フラビンタンパク質A、電子伝達フラビンタンパク質B、並びに少なくとも一つのホスホトランスブチリラーゼ及び酪酸キナーゼ、並びにフェレドキシン依存性アルデヒド酸化還元酵素及びブタノールデヒドロゲナーゼを発現するために適合された一つ又はそれより多い核酸を含んでなる。

【0027】

好ましくは、微生物は、カルボキシド栄養性酢酸生成菌のグループから選択される。ある態様において、微生物は、*Clostridium autoethanogenum*、*Clostridium ljungdahlii*(クロストリジウム・リュングダリイ)、*Clostridium ragsdalei*、*Clostridium carboxidivorans*(クロストリジウム・カルボキシディボランス)、*Clostridium drakei*(クロストリジウム・ドラケイ)、*Clostridium scatologenes*(クロストリジウム・スカトロゲネス)、*Butyribacterium limosum*、*Butyribacterium methylotrophicum*、*Acetobacterium woodii*、*Alkalibaculum bacchii*、*Blautia producta*、*Eubacterium limosum*、*Moorella thermoacetica*、*Moorella thermautotrophica*、*Oxobacter pfennigii*及び*Thermoanaerobacter kiuvi*を含んでなる群から選択される。

10

20

20

【0028】

好ましくは、微生物は、*Clostridium autoethanogenum DSM 23693*である。

一つの態様において、本発明の組換え微生物は、寄託番号DSM 24138でDSMZ(Deutsche Sammlung fur Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany)に寄託された微生物を定義する特徴を有する。

30

【0029】

第2の側面において、本発明は、配列番号27のヌクレオシド又は機能的に等価なその変種による組換えメチルトランスフェラーゼ遺伝子を提供する。

第3の側面において、本発明は、配列番号28又は機能的に等価なそのアミノ酸変種によるメチルトランスフェラーゼを提供する。

【0030】

関連する側面において、本発明は、第2の側面によるメチルトランスフェラーゼ遺伝子を含んでなる組換え微生物を提供する。メチルトランスフェラーゼ遺伝子は、核酸構築物上に存在するか、又は微生物のゲノム中に組込まれることができる。

【0031】

第4の側面において、本発明は、配列番号1から6をいずれもの順序で含んでなる核酸、又は機能的に等価なその変種を提供する。

40

好ましくは、核酸は、図2に示す順序で配列番号1から6を含んでなる。

【0032】

好ましくは、核酸は、更にホスホトランスアセチラーゼ/酢酸キナーゼプロモーターを含んでなる。好ましくは、プロモーターは、配列番号7又は機能的に等価なその変種に対応する。

【0033】

第5の側面において、本発明は、一つ又はそれより多い核酸配列を含んでなる発現構築物を提供し、ここにおいて、構築物は、酢酸產生性微生物中で発現した場合、主要な発酵産物として產生される1-ブタノール及び/又はその前駆体をもたらす。

50

【0034】

好ましくは、一つ又はそれより多い核酸配列は、1-ブタノール生合成経路の一部である一つ又はそれより多い酵素をコードする。

好ましくは、核酸は、チオラーゼ、3-ヒドロキシブチリル-C_oAデヒドロゲナーゼ、クロトナーゼ、ブチリル-C_oAデヒドロゲナーゼ、電子伝達フラビンタンパク質A及び/又は電子伝達フラビンタンパク質Bをコードする核酸から選択される。

【0035】

好ましくは、一つ又はそれより多い核酸配列は、配列番号1から配列番号6又は機能的に等価なその変種から選択される。

一つの態様において、核酸は、更にホスホトランスプチリラーゼ、酪酸キナーゼ、フェレドキシン依存性アルデヒド酸化還元酵素、ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ、ブタノールデヒドロゲナーゼ、及び二機能性ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ/ブタノールデヒドロゲナーゼをコードする核酸から選択される。 10

【0036】

一つの態様において、核酸は、本明細書中の以下の表7から10に概略示される核酸の群及び機能的に等価なこれらの変種から選択される。

一つの態様において、発現構築物は、ブタノール生合成経路中の少なくとも2種の酵素、少なくとも3種、少なくとも4種、少なくとも5種、少なくとも6種、少なくとも7種、少なくとも8種、少なくとも9種、少なくとも10種、少なくとも11種又は少なくとも12種の酵素をコードする。 20

【0037】

好ましくは、発現構築物は、更にホスホトランスアセチラーゼ/酢酸キナーゼオペロンプロモーター含んでなる。もう一つの態様において、発現構築物は、ピルビン酸：フェレドキシン酸化還元酵素(配列番号48)、Wood-Ljungdah1遺伝子クラスター(配列番号47)、Rnfオペロン(配列番号49)又はATPシンターゼオペロン(配列番号50)のプロモーターのようなもう一つの高度に活性なプロモーターを含んでなる。好ましくは、ホスホトランスアセチラーゼ/酢酸キナーゼオペロンプロモーターは、配列番号7又は機能的に等価なその変種に対応する。

【0038】

第6の側面において、本発明は、本明細書中に記載されるようなメチルトランスフェラーゼ遺伝子を含んでなるメチル化構築物を提供する。 30

第7の側面において、本発明は、第5の側面の発現構築物及び第6の側面のメチル化構築物を含んでなる組成物を提供する。

【0039】

好ましくは、組成物は、1-ブタノール及び/又はその前駆体を主要な発酵産物として产生する、組換え微生物を产生することが可能である。

第8の側面において、本発明は：

a. (i) 発現構築物及び(ii) メチルトランスフェラーゼ遺伝子を含んでなる第6の側面によるメチル化構築物のシャトル微生物への導入；

b. メチルトランスフェラーゼ遺伝子の発現；

c. シャトル微生物からの一つ又はそれより多い構築物の単離；並びに

d. 目的微生物への少なくとも発現構築物の導入；

を含んでなる組換え微生物を产生する方法を提供し、ここにおいて、発現構築物は、目的微生物中で発現されるべき酵素をコードする一つ又はそれより多い遺伝子を含んでなる。 40

【0040】

一つの態様において、工程b.のメチルトランスフェラーゼ遺伝子の発現は恒常的である。もう一つの態様において、工程b.におけるメチルトランスフェラーゼ遺伝子の発現は導入される。

【0041】

一つの態様において、メチル化構築物及び発現構築物の両方が工程cにおいて単離され 50

る。もう一つの態様において、発現構築物が、工程 c において単離される。

一つの態様において、発現構築物のみが目的微生物に導入される。もう一つの態様において、発現構築物及びメチル化構築物の両方が目的微生物に導入される。

【0042】

好ましくは、発現構築物は第 5 の側面において定義されたとおりである。

好ましくは、組換え微生物は、1 - ブタノール及び / 又はその前駆体を、主要な発酵産物として产生する。

【0043】

関連する側面において、本発明は：

a . 配列番号 28 又は機能的に等価なその変種によるメチルトランスフェラーゼによる
in vitro の発現構築物のメチル化 10

b . 目的微生物への発現構築物の導入；

を含んでなる組換え微生物を产生する方法を提供し、ここにおいて、発現構築物は、目的微生物中で発現されるべき酵素をコードする一つ又はそれより多い遺伝子を含んでなる。

【0044】

好ましくは、発現構築物は、第 5 の側面において定義したとおりである。

好ましくは、組換え微生物は、1 - ブタノール及び / 又はその前駆体を、主要な発酵産物として产生する。

【0045】

好ましくは、メチルトランスフェラーゼは、好ましくは配列番号 27 又は機能的に等価なその変種によるメチルトランスフェラーゼ遺伝子を発現することによって微生物中で產生され、そしてメチルトランスフェラーゼ酵素は単離される。 20

【0046】

更なる関連する側面において、本発明は：

a . 好ましくは配列番号 27 又は機能的に等価なその変種によるメチルトランスフェラーゼ遺伝子のシャトル微生物のゲノムへの導入；

b . シャトル微生物への発現構築物の導入；

c . シャトル微生物からの一つ又はそれより多い構築物の単離；及び、

d . 目的微生物への少なくとも発現構築物の導入；

を含んでなる組換え微生物を产生する方法を提供し、ここにおいて、発現構築物は、目的微生物中で発現されるべき酵素をコードする一つ又はそれより多い遺伝子を含んでなる。 30

【0047】

好ましくは、発現構築物は、第 5 の側面において定義されたとおりである。

好ましくは、組換え微生物は、1 - ブタノール及び / 又はその前駆体を、主要な発酵産物として产生する。

【0048】

更なる関連する側面において、本発明は：

a . メチルトランスフェラーゼによる in vitro の第 5 の側面による発現構築物のメチル化

b . 目的微生物への発現構築物の導入；

を含んでなる組換え微生物を产生する方法を提供する。 40

【0049】

好ましくは、メチルトランスフェラーゼは、第 2 の側面で定義したとおりのメチルトランスフェラーゼ遺伝子又は第 3 の側面で定義されたとおりのメチルトランスフェラーゼによってコードされる。

【0050】

好ましくは、組換え微生物は、1 - ブタノール及び / 又はその前駆体を、主要な発酵産物として产生する。

第 9 の側面において、本発明は：

a . (i) 第 5 の側面による発現構築物及び (ii) メチルトランスフェラーゼ遺伝子 50

を含んでなるメチル化構築物のシャトル微生物への導入；

- b . メチルトランスフェラーゼ遺伝子の発現；
- c . シャトル微生物からの一つ又はそれより多い構築物の単離；並びに
- d . 目的微生物への少なくとも発現構築物の導入；

を含んでなる組換え微生物を產生する方法を提供し、ここにおいて、発現構築物は、目的微生物中で発現されるべき酵素をコードする一つ又はそれより多い遺伝子を含んでなる。

【0051】

一つの態様において、工程 b . のメチルトランスフェラーゼ遺伝子の発現は恒常性である。もう一つの態様において、工程 b . におけるメチルトランスフェラーゼ遺伝子の発現は誘導される。

10

【0052】

一つの態様において、メチル化構築物及び発現構築物の両方が工程 c において単離される。もう一つの態様において、発現構築物が、工程 c において単離される。

一つの態様において、発現構築物のみが目的微生物に導入される。もう一つの態様において、発現構築物及びメチル化構築物の両方が目的微生物に導入される。

【0053】

好ましくは、組換え微生物は、1 - ブタノール及び / 又はその前駆体を主要な発酵産物として產生する。

第10の側面において、本発明は：

a . (i) 発現構築物及び (ii) メチルトランスフェラーゼ遺伝子を含んでなるメチル化構築物のシャトル微生物への導入；

20

- b . メチルトランスフェラーゼ遺伝子の発現；

- c . シャトル微生物からの一つ又はそれより多い構築物の単離；並びに、

- d . 目的微生物への少なくとも発現構築物の導入；

を含んでなる、1 - ブタノール又はその前駆体を主要な発酵産物として產生する組換え微生物を產生する方法を提供し、ここにおいて、発現構築物は、目的微生物中で発現されるべき酵素をコードする一つ又はそれより多い遺伝子を含んでなる。

【0054】

一つの態様において、工程 b . におけるメチルトランスフェラーゼ遺伝子の発現は恒常性である。もう一つの態様において、工程 b . におけるメチルトランスフェラーゼ遺伝子の発現は誘導される。

30

【0055】

一つの態様において、メチル化構築物及び発現構築物の両方が工程 c において単離される。もう一つの態様において、発現構築物が、工程 c において単離される。

一つの態様において、発現構築物のみが目的微生物に導入される。もう一つの態様において、発現構築物及びメチル化構築物の両方が目的微生物に導入される。

【0056】

好ましくは、発現構築物は第5の側面において定義されたとおりである。

好ましくは、メチル化構築物は第6の側面において定義されたとおりである。

第11の側面において、本発明は、組換え微生物を使用して基質を発酵することを含んでなる、微生物発酵による1 - ブタノール及び / 又はその前駆体の產生の方法を提供する。

40

【0057】

好ましくは、1 - ブタノール及び / 又はその前駆体は、主要な発酵産物である。

好ましくは、組換え微生物は、第8から第10の側面のいずれかに記載したとおりである。

【0058】

好ましくは、1 - ブタノール及び / 又はその前駆体は、発酵プロセスのリットル当たり概略0 . 075グラム (g / l) から概略20g / lまでの収率で產生される。一つの態様において、収率は、概略0 . 15g / lから概略1 . 54g / lまでである。他の態様に

50

おいて、収率は、概略 10 g / l、概略 5 g / l、又は概略 2 g / l である。好ましくは、1 - ブタノールの収率は、ブタノールが周囲の媒体に対して毒性となる限度までである。

【 0 0 5 9 】

好ましくは、基質は、CO を含んでなる。好ましくは、基質は、CO を含んでなるガス状基質である。一つの態様において、基質は、工業排気ガスを含んでなる。ある態様において、ガスは、製鋼所排ガス又は合成ガスである。

【 0 0 6 0 】

一つの態様において、基質は CO を大部分含有し、典型的には少なくとも約 20 % から約 100 容量 % の CO、20 % から 70 容量 % の CO、30 % から 60 容量 % の CO、そして 45 % から 55 容量 % の CO である。特別な態様において、基質は、約 25 %、又は約 30 %、又は約 35 %、又は約 40 %、又は約 45 %、又は約 50 % の CO、又は約 55 % の CO、或いは約 60 容量 % の CO を含む。10

【 0 0 6 1 】

基質が水素を含有することは必要ではないが、H₂ の存在は、本発明の方法による産物形成に対して有害ではない筈である。特別な態様において、水素の存在は、アルコール產生の全体効率の改良をもたらす。例えば、具体的な態様において、基質は、概略 2 : 1、又は 1 : 1、或いは 1 : 2 の比の H₂ : CO を含んでなることができる。一つの態様において、基質は、約 30 容量 % 又はそれより少ない H₂、20 容量 % 又はそれより少ない H₂、約 15 容量 % 又はそれより少ない H₂ 或いは約 10 容量 % 又はそれより少ない H₂ を含んでなる。他の態様において、基質の流れは、低い、例えば、5 % より少ない、又は 4 % より少ない、又は 3 % より少ない、又は 2 % より少ない、又は 1 % より少ない濃度の H₂ を含んでなるか、或いは実質的に水素を含まない。基質は、更にある程度の CO₂ を、例えば、約 1 % から約 80 容量 % の CO₂、又は約 1 % から約 30 容量 % の CO₂ のように含有することができる。20

【 0 0 6 2 】

好ましくは、先行する側面のいずれかの方法によって產生された前駆体は、ホスホトランスブチリラーゼ、酪酸キナーゼ、フェレドキシン依存性アルデヒド酸化還元酵素、及びブタノールデヒドロゲナーゼの存在中で 1 - ブタノールに転換される。

【 0 0 6 3 】

好ましくは、微生物は、外因性核酸の導入の前及び後の両方で、ホスホトランスブチリラーゼ、酪酸キナーゼ、フェレドキシン依存性アルデヒド酸化還元酵素、及びブタノールデヒドロゲナーゼを產生する。30

【 0 0 6 4 】

好ましくは、先行する側面のいずれかの方法によって產生された前駆体は、ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ、ブタノールデヒドロゲナーゼ及び / 又は二機能性ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ / ブタノールデヒドロゲナーゼの存在中で 1 - ブタノールに転換される。

【 0 0 6 5 】

好ましくは、微生物は、外因性核酸の導入の前及び後で、ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ、ブタノールデヒドロゲナーゼ及び / 又は二機能性ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ / ブタノールデヒドロゲナーゼを產生する。40

【 0 0 6 6 】

第 12 の側面において、本発明は、第 11 の側面の方法によって產生された場合、1 - ブタノール又はその前駆体を提供する。

第 13 の側面において、本発明は、本明細書中で定義されるとおりのメチル化構築物を含んでなるシャトル微生物を提供する。

【 0 0 6 7 】

好ましくは、シャトル微生物は、更に本明細書中で定義されるとおりの発現構築物を含んでなる。50

好ましくは、シャトル微生物は、*E. coli*、*Bacillus subtilis* 又は *Lactococcus lactis* である。

【0068】

好ましくは、上述の側面のいずれかのメチル化構築物は、lac プロモーター及びメチルトランスフェラーゼ遺伝子を含んでなり、そしてイソプロピル -D- チオ - ガラクトシド (IPTG) によって導入される。メチルトランスフェラーゼの発現は、更に ara、tet、又は T7 のような他の誘導性プロモーター系によって制御することができる。

【0069】

第14の側面において、本発明は、配列番号8から13からなる群から選択される配列を有する核酸を提供する。
10

第15の側面において、本発明は、配列番号16から23からなる群から選択される配列を有する核酸を提供する。

【0070】

第16の側面において、本発明は、少なくとも配列番号7又は機能的に等価なその変種の核酸配列を含んでなる核酸、核酸構築物又は同一物を含んでなるベクター、並びに前記核酸又は核酸構築物或いはベクターを含んでなる微生物を提供する。

【0071】

第17の側面において、本発明は、配列番号28によるメチルトランスフェラーゼをコードする核酸を提供する。
20

第18の側面において、本発明は、本明細書中の以下の表7から10に記載される群及びこれらの機能的に等価ないずれもの一つ又はそれより多い変種から選択されるポリペプチドのアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸を含んでなる核酸を提供する。

【0072】

第19の側面において、本発明は、本明細書中の以下の表7から10に記載される群及びこれらの機能的に等価ないずれもの一つ又はそれより多い変種から選択される核酸を含んでなる核酸を提供する。

【0073】

第20の側面において、本発明は、本発明の第18又は第19の側面の核酸を含んでなる構築物及び微生物を提供する。
30

第21の側面において、本発明は、配列番号32から38及び123から135からなる群から選択される配列を有する核酸を提供する。

【0074】

第22の側面において、本発明は、本明細書中の以下の表7から10に記載された群及びこれらの機能的に等価ないずれもの一つ又はそれより多い変種から選択されるポリペプチドのアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドを提供する。

【0075】

本発明は、更に広範には、本出願の明細書中で個別に又は集合的に言及され或いは示された部分、要素及び特徴、二つ若しくはそれより多い前記の部分、要素又は特徴のいずれもの或いは全ての組合せにもあると言うことができ、そして本発明が関係する技術における既知の当量を有する具体的な整数が記述された場合、このような既知の当量は、個別に記述されたかのように本明細書中に組込まれるとみなされる。
40

【0076】

図面の簡単な説明

全てがその新規な側面と考えられるべき本発明のこれらの及び他の側面は、以下の説明から明白となり、これは、付属する図面を参照して実施例によって与えられる。

【図面の簡単な説明】

【0077】

【図1】図1は、COからのブタノール生合成経路を示す。

50

【図2】図2は、1-ブタノール生合成に関係する遺伝子をコードする例示的な発現プラスミドを示す。

【図3】図3は、pMTL85245-th1A-crt-hbdの配列決定の結果を示し、これは、発現プラスミド上に見出された1-ブタノール生合成遺伝子が変異を含まないことを示している。

【図4-1】図4a、4b及び4cは、C. autoethanogenum(CAU)、C. jungdahlii(CLJ)、C. ragsdalei(CRA)及び設計されたメチルトランスフェラーゼ(DMT)遺伝子のヌクレオチド整列を示す。

【図4-2】図4a。

【図4-3】図4a続き。

10

【図4-4】図4a続き。

【図4-5】図4b。

【図4-6】図4b続き。

【図4-7】図4b続き。

【図4-8】図4c。

【図4-9】図4dは、C. autoethanogenum(CAU1+2)、C. jungdahlii(CLJ)、C. ragsdalei(CRA1+2)及び設計されたメチルトランスフェラーゼ(DMT)からのメチルトランスフェラーゼのアミノ酸整列を示す。

【図5】図5は、本発明の例示的なメチル化プラスミドを示す。

20

【図6】図6は、単離されたプラスミドDNAのアガロースゲル電気泳動の画像を示す。レーン1、6、11、16、21及び26は、100bpプラスDNAラダーを示す。レーン2-5は、次の順序：ermB、ColE1、th1A、crtのテンプレートとしての本来のメチル化プラスミド混合物によるPCRを示す。レーン7-10、12-15、17-20、22-25及び27-30は、それぞれ次の順序ermB、ColE1、th1A、crtのテンプレートとしての4種の異なったクローニングから単離されたプラスミドによるPCRを示す。レーン32-35は、4種の異なったクローニングからのプラスミドプレップを示す。レーン36は、本来のC. autoethanogenum DSM23693からのプラスミドプレップを示す。

【図7】図7は、ブタノールプラスミドpMTL85245-th1A-crt-hbdを内部に持つC. autoethanogenumによる、1-ブタノール産生を示すHPLCの結果を示す。

30

【図8】図8は、異種遺伝子の発現に対する適当なプロモーター領域を確認するための、リアルタイムPCRを使用する標準的条件におけるClostridium autoethanogenumによる典型的な発酵中の200を超える遺伝子の発現の分析を示す。

【図9】図9は、配列番号1、2及び3の配列を示す。

【図10】図10は、配列番号4、5及び6の配列を示す。

【図11】図11は、配列番号7、47、48、49及び50によってコードされたプロモーター領域の配列を示す。

40

【図12】図12は、配列番号14の配列を示す。

【図13】図13は、配列番号15の配列を示す。

【図14】図14は、配列番号24及び25の配列を示す。

【図15】図15は、配列番号26の配列を示す。

【図16】図16は、配列番号27の配列を示す。

【図17】図17は、配列番号28の配列を示す。

【図18】図18は、配列番号29の配列を示す。

【図19】図19は、C. autoethanogenum(Y18178, GI:7271109)の16s rRNA遺伝子を示す。

【図20】図20は、配列番号31の配列を示す。

50

【図21】図21は、配列番号31の配列を示す。

【図22】図22は、配列番号39:C. autoethanogenumの二機能性ブタノール/ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼのヌクレオチド酸配列を示す。

【図23】図23は、配列番号40:C. autoethanogenumの二機能性ブタノール/ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼのヌクレオチド酸配列を示す。

【図24】図24は、配列番号41:C. autoethanogenumのブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼのヌクレオチド酸配列；及び配列番号42:C. autoethanogenumのブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列を示す。

【図25】図25は、配列番号43:C. autoethanogenumのブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼのヌクレオチド酸配列；及び配列番号44:C. autoethanogenumのブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列を示す。 10

【図26】図26は、配列番号45:C. autoethanogenumのブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼのヌクレオチド酸配列を示す。

【図27】図27は、配列番号46:C. autoethanogenumのブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列；及び配列番号119:C. autoethanogenumのブタノールデヒドロゲナーゼのヌクレオチド酸配列を示す。

【図28】図28は、配列番号120:C. autoethanogenumのブタノールデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列；及び配列番号121:C. autoethanogenumのブタノールデヒドロゲナーゼのヌクレオチド酸配列を示す。

【図29】図29は、配列番号122:C. autoethanogenumのブタノールデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列；及び配列番号51:C. autoethanogenumのブタノールデヒドロゲナーゼのヌクレオチド酸配列を示す。 20

【図30】図30は、配列番号52:C. autoethanogenumのブタノールデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列；及び配列番号53:C. autoethanogenumのブタノールデヒドロゲナーゼのヌクレオチド酸配列を示す。

【図31】図31は、配列番号54:C. autoethanogenumのブタノールデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列；及び配列番号55:C. autoethanogenumのブタノールデヒドロゲナーゼのヌクレオチド酸配列を示す。

【図32】図32は、配列番号56:C. autoethanogenumのブタノールデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列；及び配列番号57:C. autoethanogenumのブタノールデヒドロゲナーゼのヌクレオチド酸配列を示す。 30

【図33】図33は、配列番号58:C. autoethanogenumのブタノールデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列；並びに配列番号59:C. autoethanogenumからのリン酸アセチル/ブチリルトランスフェラーゼのヌクレオチド酸配列；及び配列番号60:C. autoethanogenumからのリン酸アセチル/ブチリルトランスフェラーゼのアミノ酸配列を示す。

【図34】図34は、配列番号61:C. autoethanogenumからの酢酸/酪酸キナーゼのヌクレオチド配列；及び配列番号62:C. autoethanogenumからの酢酸/酪酸キナーゼのアミノ酸配列を示す。

【図35】図35は、配列番号63:C. autoethanogenumからのアルデヒド：フェレドキシン酸化還元酵素のヌクレオチド配列；及び配列番号64:C. autoethanogenumからのアルデヒド：フェレドキシン酸化還元酵素のアミノ酸配列を示す。 40

【図36】図36は、配列番号65:C. autoethanogenumからのアルデヒド：フェレドキシン酸化還元酵素のヌクレオチド配列；及び配列番号66:C. autoethanogenumからのアルデヒド：フェレドキシン酸化還元酵素のアミノ酸配列を示す。

【図37】図37は、配列番号67:C. jungdahliiの二機能性ブタノール/ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼのヌクレオチド酸配列を示す。

【図38】図38は、配列番号68:C. jungdahliiの二機能性ブタノール 50

/ブチルアルデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列を示す。

【図39】図39は、配列番号69:C.1jungdah1iiの二機能性ブタノール/ブチルアルデヒドロゲナーゼのヌクレオチド酸配列を示す。

【図40】図40は、配列番号70:C.1jungdah1iiの二機能性ブタノール/ブチルアルデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列；及び配列番号71:C.1jungdah1iiのブチルアルデヒドロゲナーゼのヌクレオチド酸配列を示す。

【図41】図41は、配列番号72:C.1jungdah1iiのブチルアルデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列；及び配列番号73:C.1jungdah1iiのブチルアルデヒドロゲナーゼのヌクレオチド酸配列；並びに配列番号74:C.1jungdah1iiのブチルアルデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列を示す。10

【図42】図42は、配列番号75:C.1jungdah1iiのブタノールデヒドロゲナーゼのヌクレオチド酸配列；及び配列番号76:C.1jungdah1iiのブタノールデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列；並びに配列番号77:C.1jungdah1iiのブタノールデヒドロゲナーゼのヌクレオチド酸配列を示す。

【図43】図43は、配列番号78:C.1jungdah1iiのブタノールデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列；及び配列番号79:C.1jungdah1iiのブタノールデヒドロゲナーゼのヌクレオチド酸配列；並びに配列番号80:C.1jungdah1iiのブタノールデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列を示す。

【図44】図44は、配列番号81:C.1jungdah1iiのブタノールデヒドロゲナーゼのヌクレオチド酸配列；及び配列番号82:C.1jungdah1iiのブタノールデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列；並びに配列番号83:C.1jungdah1iiのブタノールデヒドロゲナーゼのヌクレオチド酸配列を示す。20

【図45】図45は、配列番号84:C.1jungdah1iiのブタノールデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列；及び配列番号85:C.1jungdah1iiからのリン酸アセチル/ブチリルトランスフェラーゼのヌクレオチド配列；及び配列番号86:C.1jungdah1iiからのリン酸アセチル/ブチリルトランスフェラーゼのアミノ酸配列；並びに配列番号87:C.1jungdah1iiからの酢酸/酪酸キナーゼのヌクレオチド配列を示す。

【図46】図46は、配列番号88:C.1jungdah1iiからの酢酸/酪酸キナーゼのアミノ酸配列；並びに配列番号89:C.1jungdah1iiからのアルデヒド：フェレドキシン酸化還元酵素のヌクレオチド配列；及び配列番号90:C.1jungdah1iiからのアルデヒド：フェレドキシン酸化還元酵素のアミノ酸配列を示す。30

【図47】図47は、配列番号91:C.1jungdah1iiからのアルデヒド：フェレドキシン酸化還元酵素のヌクレオチド配列；及び配列番号92:C.1jungdah1iiからのアルデヒド：フェレドキシン酸化還元酵素のアミノ酸配列を示す。

【図48】図48は、配列番号93:C.ragsdaleiからの二機能性ブタノール/ブチルアルデヒドロゲナーゼのヌクレオチド酸配列を示す。

【図49】図49は、配列番号94:C.ragsdaleiからの二機能性ブタノール/ブチルアルデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列を示す。

【図50】図50は、配列番号95:C.ragsdaleiからの二機能性ブタノール/ブチルアルデヒドロゲナーゼのヌクレオチド酸配列を示す。40

【図51】図51は、配列番号96:C.ragsdaleiからの二機能性ブタノール/ブチルアルデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列；及び配列番号97:C.ragsdaleiからのブチルアルデヒドロゲナーゼのヌクレオチド酸配列を示す。

【図52】図52は、配列番号98:C.ragsdaleiからのブチルアルデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列；配列番号99:C.ragsdaleiからのブチルアルデヒドロゲナーゼのヌクレオチド酸配列；及び配列番号100:C.ragsdaleiからのブチルアルデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列を示す。

【図53】図53は、配列番号101:C.ragsdaleiからのブタノールデヒドロゲナーゼのヌクレオチド酸配列；及び配列番号102:C.ragsdaleiからの50

ブタノールデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列；並びに配列番号 103 : C . r a g s d a l e i からのブタノールデヒドロゲナーゼのヌクレオチド酸配列を示す。

【図 54】図 54 は、配列番号 104 : C . r a g s d a l e i からのブタノールデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列；及び配列番号 105 : C . r a g s d a l e i からのブタノールデヒドロゲナーゼのヌクレオチド酸配列；並びに配列番号 106 : C . r a g s d a l e i からのブタノールデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列を示す。

【図 55】図 55 は、配列番号 107 : C . r a g s d a l e i からのブタノールデヒドロゲナーゼのヌクレオチド酸配列；及び配列番号 108 : C . r a g s d a l e i からのブタノールデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列；並びに配列番号 109 : C . r a g s d a l e i からのブタノールデヒドロゲナーゼのヌクレオチド酸配列を示す。 10

【図 56】図 56 は、配列番号 110 : C . r a g s d a l e i からのブタノールデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列；及び配列番号 111 : C . r a g s d a l e i からのリン酸アセチル / ブチリルトランスフェラーゼのヌクレオチド配列；及び配列番号 112 : C . r a g s d a l e i からのリン酸アセチル / ブチリルトランスフェラーゼのアミノ酸配列；並びに配列番号 113 : C . r a g s d a l e i からの酢酸 / 酪酸キナーゼのヌクレオチド配列を示す。

【図 57】図 57 は、配列番号 114 : C . r a g s d a l e i からの酢酸 / 酪酸キナーゼのアミノ酸配列；並びに配列番号 115 : C . r a g s d a l e i からのアルデヒド : フェレドキシン酸化還元酵素のヌクレオチド配列；及び配列番号 116 : C . r a g s d a l e i からのアルデヒド : フェレドキシン酸化還元酵素のアミノ酸配列を示す。 20

【図 58】図 58 は、配列番号 117 : C . r a g s d a l e i からのアルデヒド : フェレドキシン酸化還元酵素のヌクレオチド配列；及び配列番号 118 : C . r a g s d a l e i からのアルデヒド : フェレドキシン酸化還元酵素のアミノ酸配列を示す。

【図 59】図 59 は、配列番号 136 : C l o s t r i d i u m 1 j u n g d a h l i i (C P 0 0 1 6 6 6 . 1 , G I : 3 0 0 4 3 3 3 4 7) の 16S rRNA 遺伝子を示す。

【図 60】図 60 は、(A) 二機能性ブタノール / ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ (配列番号 39) ; (B) ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ (配列番号 41) ; (C) ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ (配列番号 45) ; (D) ブタノールデヒドロゲナーゼ (配列番号 53) ; (E) ブタノールデヒドロゲナーゼ (配列番号 57) ; (F) リン酸アセチル / ブチリルトランスフェラーゼ (配列番号 57) ; (G) 酢酸 / 酪酸キナーゼ (配列番号 59) ; (H) アルデヒド : フェレドキシン酸化還元酵素 (配列番号 63) ; (O I) アルデヒド : フェレドキシン酸化還元酵素 (配列番号 65) の遺伝子発現パターンを示す。 30

【発明を実施するための形態】

【0078】

以下は、本発明の、一般的用語で与えられるその好ましい態様を含む説明である。本発明は、更に本明細書中で以下に“実施例”の表題で与えられる開示から明らかにされ、これは、本発明を支持する実験データ、本発明の各種の側面の具体的な実施例、及び本発明を行う手段を提供する。 40

【0079】

特に、密接に関連する微生物 C . a u t o e t h a n o g e n u m 、 C . 1 j u n g d a h l i i (クロストリジウム・リュングダリイ) 、及び C . r a g s d a l e i は、一酸化炭素からのバイオ燃料としてのエタノールの產生のために有用であることが知られている。ガス状基質からバイオ燃料として 1 - ブタノールを产生するために、このような生命体のための普遍的なトランスフォーメーション系が開発され、そして CO からの主要な発酵産物としての 1 - ブタノールの产生が示される。

【0080】

本発明人等は、 1 - ブタノールの生合成経路 (図 1) 中のタンパク質をコードする特定の遺伝子が、酢酸產生性微生物中に導入された場合、このような微生物が、ガス状基質を 50

使用して、1 - ブタノール又はその前駆体を主要な発酵産物として产生することが可能であることを見出してた。幾つかの改変されていない微生物が1 - ブタノールを产生することが知られているが、このような改変されていない微生物によってCOから产生される1 - ブタノールの收率は、非常に低い。結果として、ガス状基質からのバイオ燃料の产生のためのこれらの有用性は、その低い効率及びそれに続くの実用化の欠如のために、極めて制約される。*Clostridium autoethanogenum*は、エタノール、酢酸、2 , 3 - ブタンジオール及び乳酸を天然に产生するが、しかし1 - ブタノールを产生することは知られていない。

【0081】

図1に示すように、Wood - Ljungdahl経路は、COをアセチル - CoAに10 転換する。この化合物は、更に酢酸產生性微生物中で、チオラーゼ、3 - ヒドロキシブチリル - CoAデヒドロゲナーゼ、クロトナーーゼ / クロトニル - CoAヒドラターゼ、ブチリル - CoAデヒドロゲナーゼ、ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ及びブタノールデヒドロゲナーゼ酵素の作用によって、1 - ブタノールに転換することができる。本発明の特別な態様において、微生物は、配列番号1から4の核酸によってコードされ得る最初の四つの酵素又は機能的に等価なこれらの変種を発現する。本発明は、組換え核酸並びに天然に存在する酵素によってコードされる酵素の作用によるアセチル - CoAの1 - ブタノールへの転換を促進する微生物を提供する。本発明は、更に、Wood - Ljungdahl 20 経路又はブタノール生合成経路の他の段階の酵素をコードする他の組換え核酸配列を発現する微生物の使用を提供する。本発明人は、更に多くの新規な酵素及び核酸を確認している。

【0082】

天然のコンピテンス（形質転換受容性、細胞の環境からの細胞外DNAの取込み）がクロストリジウムにおいて知られていなく、そして電気的形質転換又は接合のみが形質転換のために利用可能な方法である。これらの問題点は、クロストリジウム種を有効に形質転換することにおける有意な困難さを与える。更に、クロストリジウムにおいて見いだされる制限 / メチル化系は、外来及びファージDNAに対して保護し、そしてその遺伝子的形質転換を特別に面倒にする。幾つかのクロストリジウム系 (*C. acetobutylicum* ATCC824、*C. cellulolyticum* ATCC35319、*C. botulinum* (ボツリヌス菌) ATCC25765、及び*C. difficile* (ディフィシレ菌) CD3及びCD6) の形質転換は、DNAが*E. coli*中で ³⁰ *in vivo*でメチル化されるか、又は形質転換の前に特異的パターンで *in vitro*でメチル化される場合にのみ可能であることが示された (Mermelstein et al, 1993; Herbert et al, 2003; Jenner et al, 2000; Davis et al, 2000)。然しながら、正確なメチル化のパターンの決定は、非特異的エキソヌクレアーゼ、等のためにしばしば不可能である。更に、多くのクロストリジウム種は、更に制限系を保有し、これは、DNAを消化し、これは、特異的な（“間違った”）位置でメチル化される。

【0083】

上述の主要なハードルが、本発明の組換え微生物を開発することにおいて本発明人等によって克服された。新規なメチルトランセフェラーゼ遺伝子を含んでなる新規なメチル化系が、天然の酢酸產生性微生物中に存在する天然に存在する制限障害を回避するために開発された。従って、本発明のメチル化法及びメチルトランスフェラーゼ遺伝子は、微生物中の所望の組換え核酸の有効な導入及び発現を阻害する制限障害を有する多くの適合性の微生物に適用することができる。

【0084】

定義

本明細書中で言及する場合、“1 - ブタノールの前駆体”は、ブチリルCoA、ブチル ⁴⁰ リン酸、酪酸、及びブチルアルデヒドを含む。

【0085】

10

20

30

40

50

本明細書中で言及する場合、“発酵プロセス”は、少なくとも一つの栄養培地及び細菌細胞を含んでなる培養培地である。

本明細書中で言及する場合、“シャトル微生物”は、その内でメチルトランスフェラーゼ酵素が発現する微生物であり、そして目的微生物とは別個である。

【0086】

本明細書中で言及する場合、“目的微生物”は、その内で発現構築物上に含まれる遺伝子が発現される微生物であり、そしてシャトル微生物とは別個である。

本明細書中で言及する場合、“主要な発酵産物”は、最高の濃度及び／又は収率で產生される一つの発酵産物を意味することを意図する。

【0087】

用語“効率を増加すること”、“増加した収率”等は、発酵法に関して使用される場合、制約されるものではないが、発酵を触媒する微生物の増殖の速度、消費される基質（等のような）の体積当たりに產生される所望の産物（アルコールのような）の体積、所望の産物の產生の速度又は產生のレベル、及び発酵の他の副産物と比較した產生される所望の産物の相対比率の一つ又はそれより多くを増加することを含む。

【0088】

語句“一酸化炭素を含んでなる基質”及び類似の用語は、その中で一酸化炭素が一つ又はそれより多い細菌の系にとって、例えば増殖及び／又は発酵のために利用可能であるいすれもの基質を含むと理解されるべきである。

【0089】

語句“一酸化炭素を含んでなるガス状基質”及び類似の語句及び用語は、一定のレベルの一酸化炭素を含有するいすれものガスを含む。ある態様において、基質は、少なくとも約20%から約100容量%のCO、20%から70容量%までのCO、30%から60容量%までのCO、そして40%から55容量%までのCOを含有する。特別な態様において、基質は、約25%、又は約30%、又は約35%、又は約40%、又は約45%、又は約50%のCO、又は約55%のCO、或いは約60容量%のCOを含んでなる。

【0090】

基質が何ら水素を含有することは必要ではないが、H₂の存在は、本発明の方法による産物形成に対して有害ではない筈である。特別な態様において、水素の存在は、アルコール產生の改良された全体効率をもたらす。例えば、特別な態様において、基質は、概略2:1、又は1:1、或いは1:2の比のH₂:COを含んでなることができる。一つの態様において、基質は、約30容量%又はそれより少ないH₂、20容量%又はそれより少ないH₂、約15容量%又はそれより少ないH₂或いは約10容量%又はそれより少ないH₂を含んでなる。他の態様において、基質流は、低い、例えば、5%より少ない、又は4%より少ない、又は3%より少ない、又は2%より少ない、又は1%より少ない濃度のH₂を含んでなるか、或いは実質的に水素を含まない。基質は、更にある程度のCO₂を、例えば、約1%から約80容量%のCO₂、又は1%から約30容量%のCO₂のように含有することができる。一つの態様において、基質は、約20容量%より少ない又はそれに等しいCO₂を含んでなる。特別な態様において、基質は、約15容量%より少ないか又はそれに等しいCO₂、約10容量%より少ないか又はそれに等しいCO₂、約5容量%より少ないか又はそれに等しいCO₂含んでなるか、或いはCO₂を含まない。

【0091】

以下の記載において、本発明の態様は、“COを含有するガス状基質”を供給し、そして発酵することに関する記載される。然しながら、ガス状基質が、別の形態で提供されることはできることは認識されるべきである。例えば、COを含有するガス状基質は、液体中に溶解されて提供されることがある。本質的に、液体は、一酸化炭素を含有するガスで飽和され、そして次いでこの液体はバイオ反応器に加えられる。これは、標準的な方法論を使用して達成することができる。例として、マイクロバブル分散発生器(Hensis risisak et al. Scale-up of microbubble dispersion generator for aerobic fermentation)

10

20

30

40

50

n ; Applied Biochemistry and Biotechnology Volume 101, Number 3 / October, 2002) を使用することができる。更なる例として、COを含有するガス状基質は、固体支持体上に吸着させることができる。このような別の方法は、用語“COを含有する基質”等の使用によって包含される。

【0092】

本発明の特別な態様において、COを含有するガス状基質は、工業排気又は廃棄ガスである。“工業排気又は廃棄ガス”は、工業的過程によって產生されるCOを含んでなるいざれものガスを含み、そして鉄金属製品製造、非鉄製品製造、石油精製過程、石炭のガス化、バイオマスのガス化、電力製造、カーボンブラック製造、及びコークス製造の結果として產生されるガスを含むために幅広く解釈されるべきである。更なる例は、本明細書中のどこかで提供されることがある。

10

【0093】

文脈が他に要求しない限り、語句“発酵”、“発酵法”又は“発酵反応”等は、本明細書中で使用される場合、方法の増殖期及び産物生合成期の両方を包含することを意図している。本明細書中で更に記載されるものであるように、バイオ反応器の幾つかの態様は、最初の増殖反応器及び二番目の発酵反応器を含んでなることができる。このように、発酵反応への金属又は組成物の添加は、これらの反応器のいずれか又は両方への添加を含むと理解されるべきである。

【0094】

20

用語“バイオ反応器”は、一つ又はそれより多い容器及び／又は塔或いは配管からなる発酵デバイスを含み、これは、連続式攪拌タンク反応器（CSTR）、固定化細胞反応器（ICR）、トリクルベッド反応器（TBR）、バブルカラム、ガスリフト発酵器、静的ミキサー、或いはガス・液接触に適した他の容器又は他のデバイスを含む。本明細書中で以下に記載されるように、幾つかの態様において、バイオ反応器は、最初の増殖反応器及び二番目の発酵反応器を含んでなることができる。このように、バイオ反応器又は発酵反応への基質の添加に言及する場合、これらの反応器のいずれか又は両方への添加を適宜に含むと理解されるべきである。

【0095】

“外因性核酸”は、これらが導入される微生物の外部に起源する核酸である。外因性核酸は、制約されるものではないが、これらが導入される微生物、これらが導入される生命体と異なった微生物の系又は種含むいざれもの適した供給源から誘導することができるか、或いはこれらは人工的に又は組換え的に作成することができる。一つの態様において、外因性核酸は、これらが導入される微生物内に天然に存在する核酸配列を表し、そしてこれらは、特定の遺伝子の発現又は過剰発現を増加するために導入される（例えば、配列（例えば遺伝子）のコピーの数を増加することによって）。もう一つの態様において、外因性核酸は、これらが導入される微生物内に天然には存在しない核酸配列を表し、そして微生物内に天然に存在しない産物の発現を可能にするか、又は微生物にとって天然の遺伝子の発現を増加する（例えば、プロモーターのような制御要素の導入の場合）。外因性核酸は、これが導入される微生物のゲノムに組込まれるために適合される能够があるか、又は余分な染色体状態のままである。

30

【0096】

本発明が、これらが実質的に同一の機能を行うことを条件に、本明細書中に具体的に例示される配列と異なった配列の核酸を使用して実施することは認識されるべきである。タンパク質又はペプチドをコードする核酸配列に対して、これは、コードされたタンパク質又はペプチドが、実質的に同一の機能を有することを意味する。プロモーター配列を表す核酸配列に対して、変種の配列は、一つ又はそれより多い遺伝子の発現を促進する能力を有するものである。このような核酸は、本明細書中で“機能的に等価な変種”と呼ばれる。例として、核酸の機能的に等価な変種は、対立遺伝子の変種、遺伝子の断片、変異を含む遺伝子（欠失、挿入、ヌクレオチド置換等）及び／又は多形等を含む。酪

40

50

酸又はブタノール発酵が可能な他の細菌からの相同遺伝子は、更に本明細書中に具体的に例示した配列の機能的に等価な変種の例と考えることができる。これらは、*Clostridium acetobutylicum*(クロストリジウム・アセトブチリカム)、*Clostridium beijerinckii*(クロストリジウム・ベイジェリンキイ)、*Clostridium tetani*(クロストリジウム・テタニ / 破傷風菌)、*Clostridium pasteurianum*(クロストリジウム・パステリアヌム)、*Clostridium kluyveri*(クロストリジウム・クリュイベリ)、*Clostridium cellulovorans*(クロストリジウム・セルロボランス)、*Clostridium perfringens*(ウェルシュ菌 / クロストリジウム・パークリンゲンス)、*Clostridium botulinum* 10(クロストリジウム・ボツリヌム / ボツリヌス菌)、*Clostridium butyricum*(クロストリジウム・ブチリカム)DSM10702株、*Clostridium tyrobutyricum*(クロストリジウム・チロブチリカム)ATCC25755株、*Anaerococcus prevotii* DSM20548、*Thermoaerobacter tengcongensis*、*Brachyspira pilosicoli*、*Bacillus megaterium*、*Streptococcus pyogenes*及び*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*のような種の相同遺伝子を含み、これらの詳細は、遺伝子銀行又はNCBIのようなウェブサイトから公共的に入手可能である。語句“機能的に等価な変種”は、更にその配列が特別の生命体に対するコドン最適化の結果として変化する核酸を含むと解釈されるべきである。本明細書中の核酸の“機能的に等価な変種”は、好ましくは少なくとも概略70%、好ましくは概略80%、更に好ましくは概略85%、好ましくは概略90%、好ましくは概略95%又はそれより多い確認された核酸との核酸配列の同一性を有するものである。特別な態様において、本明細書内で定義されるとおりのチオラーゼ遺伝子の機能的に等価な変種は、*E. coli*中の`a to A B`遺伝子(NC_000913.2; `a to A`=GeneID:946719; `a to B`=GeneID:946727)であることができる。本明細書内で定義されるとおりの`e ft A B`遺伝子の機能的に等価な変種は、*Tsai and Saier*(1995)中に見出すことができる。

【0097】

30

本発明を、その配列が本明細書中に具体的に例示されるアミノ酸配列と異なる配列のポリペプチドを使用して実行することができることも更に認識されるべきである。これらの変種は、本明細書内で“機能的に等価な変種”と呼ばれることができる。タンパク質又はペプチドの機能的に等価な変種は、興味あるペプチド又はタンパク質と確認され、そして実質的に同一の機能を有するタンパク質又はペプチドと、少なくとも40%、好ましくは50%、好ましくは60%、好ましくは70%、好ましくは75%、好ましくは80%、好ましくは85%、好ましくは90%、好ましくは95%又はそれより大きいアミノ酸同一性を共有するタンパク質又はペプチドを含む。このような変種は、その範囲に、断片が、欠損が1から5、から10、から15、から20、から25アミノ酸であることができ、そしてポリペプチドのいずれかの末端において1から25の残基から延長することができるポリペプチドの切断形態を含んでなるタンパク質又はペプチドの断片を含み、そして、ここにおいて欠損は、領域内のいずれもの長さであることができるか；又は内部部位であることができる。本明細書中の特異的なポリペプチドの機能的に等価な変種は、更に例えば先の段落で例示されたように、細菌の他の種中で相同遺伝子によって発現されたポリペプチドを含むと解釈されるべきである。

40

【0098】

50

“実質的に同一の機能”は、本明細書で使用される場合、核酸又はポリペプチドが、それが変種であるものの核酸又はポリペプチドの機能を行うことが可能であることを意味することを意図する。例えば、本発明の酵素の変種は、その酵素と同一の反応を触媒することが可能であるものである。然しながら、変種は、それが変種であるもののポリペプチ

ド又は核酸と同一のレベルの活性を有することを意味すると解釈されるべきではない。

【0099】

機能的に等価な変種が、それが変種であるものの核酸又はポリペプチドと同一の機能を実質的に有するか否かを、いずれもの多くの既知の方法を使用して評価することができる。然しながら、例として、Inui et al (2008) 中に概略記載された方法を酵素活性を評価するために使用することができる。

【0100】

“過剰に発現する”、“過剰発現”等の用語及び語句は、本発明に関して使用される場合、同一条件下の親微生物のタンパク質の発現レベルと比較した、一つ又はそれより多いタンパク質の発現のいずれもの増加を含むために幅広く解釈されるべきである。タンパク質が、いずれもの特定のレベルで発現することを意味すると解釈すべきではない。10

【0101】

“親微生物”は、本発明の組換え微生物を発生するために使用される微生物である。親微生物は、天然に存在するもの（即ち野生型微生物）であるか、又は先に改変されたが、しかし本発明の主題の一つ又はそれより多い酵素を発現又は過剰発現しなかったものであることができる。従って、本発明の組換え微生物は、親微生物中で発現又は過剰発現しなかった一つ又はそれより多い酵素を発現又は過剰発現するために改変されている。

【0102】

用語核酸“構築物”又は“ベクター”及び類似の用語は、細胞に遺伝子材料を運搬するためのベヒクルとして使用するために適したいずれもの核酸（DNA及びRNAを含む）を含むために幅広く解釈されるべきである。この用語は、プラスミド、ウイルス（バクテリオファージを含む）、コスミド及び人工染色体を含むと解釈されるべきである。構築物又はベクターは、他の要素、部位及びマーカー間で、一つ又はそれより多い制御要素、複製開始点、マルチクローニング部位及び/又は選択可能なマーカーを含むことができる。一つの特別な態様において、構築物又はベクターは、構築物又はベクターによってコードされる一つ又はそれより多い遺伝子の発現を可能にするために適合される。核酸構築物及びベクターは、裸の核酸、並びに細胞への供給を容易にするための一つ又はそれより多い薬剤と共に処方された核酸を含む（例えば、リポソームと複合した核酸、核酸が含有された生命体）。

【0103】

本発明の核酸が、二本鎖及び一本鎖核酸を含むRNA、DNA、又はcDNAを含むいざれもの適当な形態であることは認識されるべきである。

一つの側面において、本発明は、1-ブタノール及び/又はその前駆体を主要な発酵産物として产生するためにCOを使用することが可能な遺伝子組換え微生物を提供する。微生物は、好ましくは1-ブタノール及び/又はその前駆体を主要な発酵産物として产生する酢酸産生性組換え微生物である。一つの特別な態様において、酢酸産生性組換え微生物は、概略1mM又は発酵プロセスのリットル当たり0.075g/lより大きい濃度でCOを含んでなる基質からの発酵によって1-ブタノール又はその前駆体を产生することが可能である。

【0104】

一つの特別な態様において、微生物は、ブタノール生合成経路中の一つ又はそれより多い酵素を発現或いは過剰発現するために適合された一つ又はそれより多い外因性核酸を含んでなる。一つの態様において、微生物は、これが誘導される親微生物中には天然には存在しないブタノール生合成経路中の一つ又はそれより多い酵素を発現するか、或いは、親微生物中に天然に存在するブタノール生合成経路中の一つ又はそれより多い酵素を過剰発現するために適合される。

【0105】

微生物は、例えば、微生物内の天然の遺伝子の発現を増加する（例えば、遺伝子の発現を推進するためのより強力な又は恒常的なプロモーターを導入することによる）、酵素を発現するためにコードし、そして適合された外因性核酸を導入することによって特定の酵

10

20

30

40

50

素をコードする遺伝子のコピーの数を増加する、親微生物内に天然には存在しない酵素をコードし、そして発現するために適合された外因性核酸を導入することを含む、多くの組換え法によって、一つ又はそれより多い酵素を発現又は過剰発現するために適合することができる。

【 0 1 0 6 】

ある態様において、親微生物は、親微生物にとって天然の一つ又はそれより多い遺伝子の増加又は過剰発現、及び親微生物にとって天然ではない一つ又はそれより多い遺伝子の導入の組合せを提供するために形質転換することができる。

【 0 1 0 7 】

好ましくは、微生物は：チオラーゼ；3 - ヒドロキシブチリル - C o A デヒドロゲナーゼ；クロトナーゼ / クロトニル - C o A ヒドラターゼ；ブチリル - C o A デヒドロゲナーゼ；電子伝達フラビンタンパク質 A；及び、電子伝達フラビンタンパク質 B からなる群から選択される一つ又はそれより多い酵素をコードする一つ又はそれより多い外因性核酸を含んでなる。一つの態様において、一つ又はそれより多い酵素をコードする一つ又はそれより多い核酸は、配列番号 1 から配列番号 6 の核酸又は機能的に等価な変種から選択される。

10

【 0 1 0 8 】

一つの態様において、組換え微生物は、チオラーゼ (I U B M B 酵素命名法 E C : 2 . 3 . 1 . 9) (t h 1 A)、3 - ヒドロキシブチリル - C o A デヒドロゲナーゼ (E C : 1 . 1 . 1 . 1 5 7) (h b d)、クロトナーゼ / クロトニル - C o A ヒドラターゼ (E C : 1 . 1 . 1 . 1 5 7) (c r t 又は c c h) 及び / 又はブチリル - C o A デヒドロゲナーゼ (E C 4 . 2 . 1 . 5 5) (b c d) 酵素をコードする一つ又はそれより多い遺伝子を発現するために適合される。一つの態様において、微生物は、これらの酵素の全てを発現するために適合される。更なる態様において、遺伝子は、配列番号 1 から 4 又は機能的に等価なこれらの変種から選択される一つ又はそれより多い核酸配列に対応する。本発明の組換え微生物は、更に二つの電子伝達タンパク質を含有することができる。一つの態様において、電子伝達タンパク質は、配列番号 5 及び 6 、又は機能的に等価なその変種によってコードされる電子伝達フラビンタンパク質 (E C 1 . 3 . 9 9 . 2) (e t f A B) である。これらの電子伝達フラビンタンパク質の使用は、微生物の 1 - ブタノールを產生する効率を向上する。フラビンタンパク質は、B c d の活性のために必要な安定した複合体を提供する。

20

【 0 1 0 9 】

一つの特別な態様において、微生物は、チオラーゼ、3 - ヒドロキシブチリル - C o A デヒドロゲナーゼ、クロトナーゼ、ブチリル - C o A デヒドロゲナーゼ、電子伝達フラビンタンパク質 A 及び電子伝達フラビンタンパク質 B のそれぞれをコードする一つ又はそれより多い外因性核酸を含んでなる。

30

【 0 1 1 0 】

一つの態様において、微生物は、チオラーゼ、3 - ヒドロキシブチリル - C o A デヒドロゲナーゼ、クロトナーゼ、ブチリル - C o A デヒドロゲナーゼ、電子伝達フラビンタンパク質 A 及び電子伝達フラビンタンパク質 B の一つ又はそれより多くを、好ましくはそれをコードするプラスミドを含んでなる。

40

【 0 1 1 1 】

一つの態様において、微生物は別に又は更に：ホスホトランスブチリラーゼ；酪酸キナーゼ；フェレドキシン依存性アルデヒド酸化還元酵素（又は言い換えればアルデヒド：フェレドキシン酸化還元酵素）；ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ；ブタノールデヒドロゲナーゼ；二機能性ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ / ブタノールデヒドロゲナーゼからなる群から選択される一つ又はそれより多い酵素を発現するために適合された外因性核酸を含んでなる。

【 0 1 1 2 】

一つの態様において、微生物は、一つ又はそれより多いブチルアルデヒドデヒドロゲナ

50

ーゼ、ブタノールデヒドロゲナーゼ及び二機能性ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ／ブタノールデヒドロゲナーゼを発現するために適合された外因性核酸を含んでなる。好ましくは、微生物は、一つ又はそれより多いブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ、ブタノールデヒドロゲナーゼ及び二機能性ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ／ブタノールデヒドロゲナーゼをコードする一つ又はそれより多い外因性核酸を含んでなる。

【0113】

一つの態様において、微生物は、一つ又はそれより多いホスホトランスブチリラーゼ、酪酸キナーゼ、フェレドキシン依存性アルデヒド酸化還元酵素、及びブタノールデヒドロゲナーゼを発現するために適合された外因性核酸を含んでなる。好ましくは、微生物は、一つ又はそれより多いホスホトランスブチリラーゼ、酪酸キナーゼ、フェレドキシン依存性アルデヒド酸化還元酵素、及びブタノールデヒドロゲナーゼをコードする一つ又はそれより多い外因性核酸を含んでなる。特別な態様において、微生物は、ホスホトランスブチリラーゼ、酪酸キナーゼ、フェレドキシン依存性アルデヒド酸化還元酵素、及びブタノールデヒドロゲナーゼのそれぞれを発現するために適合された外因性核酸を含んでなる。

10

【0114】

一つの態様において、微生物は、1 - ブタノール生合成経路中の酵素の少なくとも2種、少なくとも3種、少なくとも4種、少なくとも5種、少なくとも6種、少なくとも7種、少なくとも8種、少なくとも9種、少なくとも10種、少なくとも11種、又は少なくとも12種の酵素を発現するために適合された一つ又はそれより多い核酸を含んでなる。

20

【0115】

一つの態様において、微生物は、他のプロモーターも使用することができるが、更に外因性ホスホトランスマセチラーゼ／酢酸キナーゼプロモーターを含んでなる。好ましくは、このプロモーターは、配列番号7又は機能的に等価なその変種に対応する。好ましくは、プロモーターは、本明細書中で先に言及された一つ又はそれより多い酵素をコードする構築物上に含有される。

【0116】

好ましくは、親微生物は、カルボキシド栄養性酢酸產生性細菌の群から選択される。ある態様において、微生物は、*Clostridium autoethanogenum*、*Clostridium ljungdahlii*、*Clostridium ragsdalei*、*Clostridium carboxidivorans*、*Clostridium drakei*、*Clostridium scatologenes*、*Butyribacterium limosum*、*Butyribacterium methylotrophicum*、*Acetobacterium woodii*、*Alkalibaculum bacchii*、*Blautia producta*、*Eubacterium limosum*、*Moorella thermoacetica*、*Moorella thermautotrophica*、*Oxobacter pfennigii*、及び*Thermoanaerobacter kiuvii*を含んでなる群から選択される。

30

【0117】

一つの特別な態様において、親微生物は、*C. autoethanogenum*、*C. ljungdahlii*、及び*C. ragsdalei*種並びに関連する分離菌を含んでなるエタノール生産、酢酸產生性クロストリジウムのクラスターから選択される。これらは、制約されるものではないが、*C. autoethanogenum* JAI-1^T (DSM10061) [Abrini J, Naveau H, Nyens E-J : *Clostridium autoethanogenum*, spp. nov., an anaerobic bacterium that produces ethanol from carbon monoxide. Arch Microbiol 1994, 161: 345-351]、*C. autoethanogenum* LBS1560 (DSM19630) [Simpson SD, Forster RL, Tran PT, Rowe MJ, Warner IL : Novel bacteria and methods

40

50

thereof. 国際特許2009, WO/2009/064200]、C. autoethanogenum LBS1561(DSM23693)、C. ljungdahlii PETCT(DSM13528=ATCC 55383)[Tanner RS, Miller LM, Yang D: Clostridium ljungdahlii sp.nov., an Acetogenic Species in Clostridial rRNA Homology Group I. Int J Syst Bacteriol 1993, 43: 232-236]、C. ljungdahlii ERI-2(ATCC 55380)[Gaddy JL: Clostridium stain which produces acetic acid from waste gases. 米国特許1997, 5, 593, 886]、C. ljungdahlii C-01(ATCC 55988)[Gaddy JL, Clausen EC, Ko C-W: Microbial process for the preparation of acetic acid as well as solvent for its extraction from the fermentation broth. 米国特許2002, 6, 368, 819]、C. ljungdahlii O-52(ATCC 55989)[Gaddy JL, Clausen EC, Ko C-W: Microbial process for the preparation of acetic acid as well as solvent for its extraction from the fermentation broth. 米国特許2002, 6, 368, 819]、C. ragsdalei P11^Tの系(ATCC BAA-622)[Huhnke RL, Lewis RS, Tanner RS: Isolation and Characterization of novel Clostridial Species. 国際特許2008, WO2008/028055]、“C. coskatii”[Zahn JA, Saxena J, Do Y, Patel M, Fishein S, Datta R, Tobey R: Clostridium coskatii, sp.nov., an Anaerobic Bacterium that Produces Ethanol from Synthesis Gas. Poster SIM Annual Meeting and Exhibition, San Francisco, 2010]のような関連する分離菌、又はC. ljungdahlii OTA-1(Tirado-Acevedo O. Production of Bioethanol from Synthesis Gas Using Clostridium ljungdahlii. PhD thesis, North Carolina State University, 2010)のような変異された系を含む。これらの系は、クロストリジウムのrRNAクラスターIのサブクラスターを形成し、そしてこれらの16S rRNA遺伝子は、概略30%の同様な低いGC含有率と99%より多く同一である。然しながら、DNA-DNA再会合及びDNAフィンガープリント法の実験は、これらの系が個別の種に属することを示した[Huhnke RL, Lewis RS, Tanner RS: Isolation and Characterization of novel Clostridial Species. 国際特許2008, WO2008/028055]。

【0118】

このクラスターの全ての種は、類似の形態及び大きさ(対数増殖期細胞は0.5-0.7×3-5 μm間である)を有し、そして中温性(最適増殖温度は30-37℃)で、そして厳密に嫌気性である[Tanner RS, Miller LM, Yang D: Clostridium ljungdahlii sp.nov., an Acetogenic Species in Clostridial rRNA Homology Group I. Int J Syst Bacteriol 1993, 43: 232-236; Abrini J, Naveau H, Nyens E-J: Clostridium autoethanogenum, sp.nov., an anaerobic bacterium that produces ethanol from

10

20

30

40

50

carbon monoxide. Arch Microbiol 1994, 4: 345 - 351; Huhnke RL, Lewis RS, Tanner RS: Isolation and Characterization of novel Clostridial Species. 国際特許2008, WO2008/028055]。更に、これらは全て、同一のpH範囲(pH 4 - 7.5、5.5 - 6)の最適な初期pHを伴う)、類似の増殖速度を持つCOを含有するガス上の強力な独立栄養性増殖、及び主要な発酵最終産物としてのエタノール及び酢酸との類似の代謝特性のような、同一の主要な系統的特色を共有し、そしてある条件下で少量の2,3-ブタンジオール及び乳酸が形成される。[Tanner RS, Miller LM, Yang D: Clostridium ljungdahlii sp. nov., an Acetogenic Species in Clostridial rRNA Homology Group I. Int J Syst Bacteriol 1993, 43: 232 - 236; Abrini J, Naveau H, Nyens E-J: Clostridium autoethanogenum, sp. nov., an anaerobic bacterium that produces ethanol from carbon monoxide. Arch Microbiol 1994, 4: 345 - 351; Huhnke RL, Lewis RS, Tanner RS: Isolation and Characterization of novel Clostridial Species. 国際特許2008, WO2008/028055]。インドールの産生が、全ての三つの種において同様に観察された。然しながら、種は、各種の糖(例えばラムノース、アラビノース)、酸(例えばグルコン酸、クエン酸)、アミノ酸(例えばアルギニン、ヒスチジン)、又は他の基質(例えばベタイン、ブタノール)の基質の利用において違いが出た。更に、幾つかの種は、ある種のビタミン(例えばチアミン、ビオチン)に対して栄養要求体であることが見いだされたが、一方他はそうではなかった。

【0119】

一つの態様において、微生物は、外因性核酸の導入の前及び後の両方で、ホスホトランスチリラーゼ、酪酸キナーゼ、フェレドキシン依存性アルデヒド酸化還元酵素、及びブタノールデヒドロゲナーゼを産生する。

【0120】

一つの態様において、微生物は、外因性核酸の導入の前及び後の両方で、ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ及び/又はブタノールデヒドロゲナーゼを産生する。

一つの特別な態様において、微生物は、*Clostridium autoethanogenum DSM 23693*である。

【0121】

一つの態様において、本発明の組換え微生物は、寄託番号DSM 24138でDSMZ (Deutsche Sammlung fur Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany)に寄託された微生物を定義する特徴を有する。

【0122】

一つ又はそれより多い外因性核酸は、裸の核酸として親微生物に供給することができるか、又は形質転換過程を容易にするために一つ又はそれより多い薬剤と処方することができる(例えば、リポソームと複合された核酸、核酸が含有された生命体)。一つ又はそれより多い核酸は、適宜に、DNA、RNA、又はこれらに組合せであることができる。

【0123】

本発明の微生物は、親微生物及び一つ又はそれより多い外因性核酸から、組換え微生物を産生するための等技術において既知の多くの技術を使用して調製することができる。例のみとして、形質転換(形質移入又は遺伝子移入を含む)は、電気穿孔、共役、又は化学的及び天然の形質転換受容性によって達成することができる。適した形質転換技術は、例えばSambrook et al, 1989中に記載されている。

【0124】

10

20

30

40

50

ある態様において、形質転換される微生物中で活性である制限系のために、微生物中に導入するために核酸をメチル化することが必要である。これは、以下に記載され、そして本明細書中の以下の実施例のセクションで更に例示されるものを含む各種の技術を使用して行うことができる。

【0125】

もう一つの側面において、本発明は、以下の工程：

- a . (i) 発現構築物及び (ii) メチルトランスフェラーゼ遺伝子を含んでなるメチル化構築物のシャトル微生物への導入；
- b . メチルトランスフェラーゼ遺伝子の発現；
- c . シャトル微生物からの一つ又はそれより多い構築物の単離；並びに、10
- d . 一つ又はそれより多い構築物の目的微生物への導入；

を含んでなる組換え微生物を產生する方法を提供し、ここにおいて、発現構築物は、目的微生物中で発現されるべき酵素をコードする一つ又はそれより多い遺伝子を含んでなる。

【0126】

一つの態様において、工程 B のメチルトランスフェラーゼ遺伝子は、恒常に発現される。もう一つの態様において、工程 B のメチルトランスフェラーゼ遺伝子の発現は、導入される。

【0127】

シャトル微生物は、微生物、好ましくは発現構築物を構成する核酸配列のメチル化を容易にする制限陰性の微生物である。特別な態様において、シャトル微生物は、制限陰性的 *E. coli*、*Bacillus subtilis* 又は *Lactococcus lactis* である。20

【0128】

発現構築物及びメチル化構築物がシャトル微生物中に導入された後、メチル化構築物上に存在するメチルトランスフェラーゼ遺伝子が発現する。一つの態様において、発現が導入されなければならない場合、導入は、本発明の一つの特別な態様において、メチル化構築物は、誘導性 lac プロモーター（好ましくは配列番号 28 によってコードされる）を含んでなり、そしてラクトース又はその類似体、更に好ましくはイソプロピル - - D - チオ - ガラクトシド (IPTG) の添加によって導入されるが、いずれもの適したプロモーター系によることができる。他の適したプロモーターは、ara、tet、又は T7 系を含む。本発明の別の態様において、メチル化構築物プロモーターは、恒常性プロモーターである。30

【0129】

一つの態様において、発現構築物プロモーターは、恒常性プロモーターであり、これは、好ましくは適當な発酵条件下で高度に活性である。然しながら、誘導性プロモーターを使用することができる。好ましい態様において、発現構築物プロモーターは、ホスホトランスクレオニン / 酢酸キナーゼオペロンプロモーター、ピルビン酸 : フェレドキシン酸化還元酵素（配列番号 48 ）、Wood-Ljungdahl 遺伝子クラスター（配列番号 47 ）、Rnf オペロン（配列番号 49 ）又は ATP シンターゼオペロン（配列番号 50 ）を含んでなる群から選択される。好ましくは、ホスホトランスクレオニン / 酢酸キナーゼオペロンプロモーターは、配列番号 7 又は機能的に等価なその変種に対応する。図 8 は、これらのプロモーターに操作可能に連結した遺伝子の発現が、標準的条件下で高いレベルの *Clostridium autoethanogenum* 中の発現を有することを示す。40

【0130】

特別な態様において、メチル化構築物は、シャトル微生物の確認のために特異的な複製開始点を有し、従ってメチル化構築物上に存在するいずれもの遺伝子は、シャトル微生物中に発現される。好ましくは、発現構築物は、目的微生物の確認のために特異的な複製開始点を有し、従って発現構築物上に存在するいずれもの遺伝子は、目的微生物中に発現される。50

【0131】

メチルトランスフェラーゼ酵素の発現は、発現構築物上に存在する遺伝子のメチル化をもたらす。次いで発現構築物は、多くの既知の方法のいずれか一つによってシャトル微生物から単離されることができる。例のみとして、本明細書中で以下に記載される実施例のセクション中に記載される方法は、発現構築物を単離するために使用することができる。

【0132】

一つの特別な態様において、両方の構築物は同時に単離される。発現構築物は、多くの既知の方法を使用して目的微生物中に導入することができる。然しながら、例として、本明細書中の以下の実施例のセクションに記載される方法を使用することができる。発現構築物がメチル化されるため、発現構築物上に存在する核酸配列は、目的微生物中に組込まれ、そして好結果で発現されることが可能である。

10

【0133】

更なる態様において、本発明は：

a . 好ましくは配列番号 28 又は機能的に等価なその変種によるメチルトランスフェラーゼによる、 *in vitro* の発現構築物のメチル化；及び

b . 好ましくは第 5 の側面による発現構築物の目的微生物への導入；

を含んでなる組換え微生物を產生する方法を提供し、ここにおいて、発現構築物は、目的微生物中で発現されるべき酵素をコードする一つ又はそれより多い遺伝子を含んでなる。

【0134】

好ましくは配列番号 27 又は機能的に等価なその変種による本発明のメチルトランスフェラーゼ遺伝子が、シャトル微生物中に導入され、そして過剰発現されることがあることは意図されている。得られたメチルトランスフェラーゼ酵素は、既知の方法を使用して収集し、そして発現構築物をメチル化するために *in vitro* で使用することができる、好ましくは、発現構築物は、第 5 の側面において定義したとおりである。次いで発現高徳物は、発現のために目的微生物中に導入することができる。好ましくは、組換え微生物は、1 - ブタノール及び / 又はその前駆体を主要な発酵産物として產生する。

20

【0135】

更なる態様において、本発明は：

a . 好ましくは配列番号 27 又は機能的に等価なその変種によるメチルトランスフェラーゼ遺伝子のシャトル微生物のゲノムへの導入；

30

b . シャトル微生物への発現構築物の導入；

c . シャトル微生物からの一つ又はそれより多い構築物の単離；及び、

d . 目的微生物への少なくとも発現構築物の導入；

を含んでなる組換え微生物を產生する方法を提供し、ここにおいて、発現構築物は、目的微生物中で発現されるべき酵素をコードする一つ又はそれより多い遺伝子を含んでなる。

【0136】

好ましくは、配列番号 27 によるメチルトランスフェラーゼ遺伝子のシャトル微生物のゲノムへの導入のために、標準的な方法が使用される。メチルトランスフェラーゼは、微生物により恒常的に発現されることができ、そして好ましくは、配列番号 27 又は機能的に等価なその変種によるメチルトランスフェラーゼ酵素の產生をもたらす。発現構築物はメチル化され、単離され、そして目的微生物中に導入され、これは、好ましくは、1 - ブタノール及び / 又はその前駆体を主要な発酵産物として產生する。

40

【0137】

本発明は、更に本明細書中に記載したような組換えメチルトランスフェラーゼ遺伝子又はメチル化構築物を含んでなる微生物を含む。

本発明は、更に *C. autoethanogenum*、*C. jungdahlii*、及び *C. ragsdalei* からのメチルトランスフェラーゼ核酸配列及び制限障害系の分析後に開発された、ハイブリッドメチルトランスフェラーゼ遺伝子（配列番号 28）を提供する。

【0138】

50

メチルトランスフェラーゼ遺伝子は、シャトル微生物中で発現され、これは、発現構築物の配列をメチル化するメチルトランスフェラーゼ酵素の産生をもたらす。メチルトランスフェラーゼ遺伝子は、シャトル微生物の構築物上に存在するか、又はそのゲノム中に組込むことができる。ハイブリッドメチルトランスフェラーゼ遺伝子は、*E. coli*に対して最適化されたコドンであり、そしてメチル化構築物中に組込むことができる(図5)。メチルトランスフェラーゼ遺伝子は、もう一つの種の微生物、例えば*Bacillus subtilis* 中で適宜に使用するために最適化されたコドンであることができる。コドンの最適化のための方法は標準的であり、そして当業者にとって既知であるものである(Carbonne et al., 2003)。更に本発明の範囲内に組込まれるものは、配列番号28に対する、少なくとも70%、好ましくは75%、好ましくは80%、好ましくは85%、好ましくは90%、好ましくは95%又はそれより大きい核酸配列同一性を有するメチルトランスフェラーゼ遺伝子であり、そしてDNAをメチル化することが可能であるポリペプチドを発現する。

【0139】

メチル化の方法及びメチルトランスフェラーゼ遺伝子は、ある範囲の微生物にわたって有用性を有することとは当業者によって認識されるものである。一つの態様において、目的微生物は、*Clostridium autoethanogenum*、*Clostridium ljungdahlii*、*Clostridium ragsdalei*、*Clostridium carboxidivorans*、*Clostridium drakei*、*Clostridium scatologenes*、*Butyribacterium limosum*、*Butyribacterium methylotrophicum*、*Acetobacterium woodii*、*Alkalibaculum bacchii*、*Blaautia producta*、*Eubacterium limosum*、*Moorella thermoacetica*、*Moorella thermautotrophica*、*Oxobacter pfennigii*、及び*Thermoanaerobacter kiuvi*を含んでなる群から選択される。一つの特別な態様において、目的微生物は、*Clostridium autoethanogenum*、*Clostridium ljungdahlii*及び*Clostridium ragsdalei*からなる群から選択される。一つの特別な態様において、目的微生物は、*Clostridium autoethanogenum* DSM 23693である。

【0140】

本発明は、更に本明細書中に先に記載した本発明の側面4、5、14、15、16、18、19及び21中で概略記載したとおりの各種の核酸又は核酸構築物を提供する。

本発明のもう一つの態様において、チオラーゼ、3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ、クロトナーゼ、ブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ及び電子伝達タンパク質又は機能的に等価なこれらの変種から選択される一つ又はそれより多い酵素をコードする一つ又はそれより多い核酸を含んでなる発現構築物が存在する。好ましくは、電子伝達タンパク質は、電子伝達フラビンタンパク質A又は電子伝達フラビンタンパク質Bである。特別な態様において、電子伝達フラビンタンパク質A及び電子伝達フラビンタンパク質Bの両方は、発現構築物上に含まれる。

【0141】

それぞれの遺伝子及び等価な酵素に対する例示的な配列の情報は、本明細書中の以下の表1中に詳細に記載されるように遺伝子銀行で提供される。当業者は、使用することができる別の遺伝子及び酵素を容易に認識するものである。一つの態様において、酵素は、構築物上にいすれもの順序で、又は図2に示す順序で存在することができる配列番号1から6の核酸によってコードされる。配列番号8から13及び配列番号16から23は、直前の段落で言及された遺伝子をクローンし、そして配列決定するために使用された新規な配列である。

【0142】

10

20

30

40

50

前駆体から 1 - ブタノールを得るために、一つ又はそれより多い、ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ (EC 1.2.1.10)、アルコールデヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.1)、ホスホトランスブチリラーゼ (EC 2.3.1.19)、酪酸キナーゼ (EC 2.7.2.7)、アルデヒド：フェレドキシン酸化還元酵素 (EC 1.2.7.5) 及びアルコールデヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.1) の活性を必要とすることができる。本発明のアルコールデヒドロゲナーゼは、ブタノールデヒドロゲナーゼである。ある態様において、ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ (EC 1.2.1.10) 及びアルコールデヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.1)、又はホスホトランスブチリラーゼ (EC 2.3.1.19)、酪酸キナーゼ (EC 2.7.2.7)、アルデヒド：フェレドキシン酸化還元酵素 (EC 1.2.7.5) 及びアルコールデヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.1)、或いは酵素の両方の組の組合せが必要である。一つの態様において、ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ及びブタノールデヒドロゲナーゼ活性は、二機能性ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ / ブタノールデヒドロゲナーゼによって供給される。これらの各種の酵素は、図 1 に示したブタノール生合成経路中に示される。幾つかの微生物において、ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ、ブタノールデヒドロゲナーゼ、ホスホトランスブチリラーゼ、酪酸キナーゼ、及び / 又はアルデヒド：フェレドキシン酸化還元酵素は、微生物によって天然に発現され、そして従ってブチリル - CoA の 1 - ブタノルへの転換を触媒する。

【 0143 】

従って、一つの態様において、発現構築物は、一つ又はそれより多いチオラーゼ、3 - ヒドロキシブチリル - CoA デヒドロゲナーゼ、クロトナーゼ、ブチリル - CoA デヒドロゲナーゼ及び電子伝達タンパク質に加えて、或いはその代替として、一つ又はそれより多いホスホトランスブチリラーゼ、酪酸キナーゼ、フェレドキシン依存性アルデヒド酸化還元酵素、ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ、ブタノールデヒドロゲナーゼ、及び二機能性ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ / ブタノールデヒドロゲナーゼをコードする核酸を含んでなる。

【 0144 】

適当な酵素及びアミノ酸の例並びに核酸配列の情報は、制約されるものではないが : C . beijerinckii (ABR 35947, GI : 149905114)、C . saccharobutylicum (CAQ57983, GI : 189310620)、又は Clostridium saccharoperbutylaceum (AAP42563, GI : 31075383) からの Ald のようなブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ ; C . acetobutylicum (NP_349891, GI : 15896542) からの BdhB のようなブタノールデヒドロゲナーゼ ; C . acetobutylicum (NP_149325, GI : 15004865) からの AdhE1 又は C . acetobutylicum (NP_149199, GI : 15004739)、C . beijerinckii . YP_001307449, GI : 150015195) からの AdhE2 のような二機能性ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ / ブタノールデヒドロゲナーゼ酵素 ; C . acetobutylicum (NP_348368) からの Ptb のようなホスホトランスブチリラーゼ ; C . acetobutylicum (AAK81015.1) からの Buk のような酪酸キナーゼ ; C . acetobutylicum (NP_348637) からのアルデヒド：フェレドキシン酸化還元酵素 AOR を含む。本発明に関連する当業者は、本発明において使用する適当な酵素の別の例を容易に認識することができる。本発明人等は、更に本発明において使用することができる多くの新規な酵素及び遺伝子を確認しており、その詳細は、本明細書中の以下の実施例のセクション中に提供される（特に表 7 から 10 を参照されたい）。本発明は、更にこれらの酵素及び遺伝子の機能的に等価な変種、並びに本発明の方法におけるこれらの使用を包含する。

【 0145 】

一つ又はそれより多いこれらの遺伝子の包含は、酪酸の同時產生を完全に回避すること

を援助し、1-ブタノール産生の効率を増加することができる。本発明は、更に一つ又はそれより多いこれらの酵素を発現し、或いは発現を増加するために適合された一つ又はそれより多い核酸を含んでなる組換え微生物を提供する。

【0146】

一つの態様において、核酸(類)は、本明細書中の以下の表7から10に記載される酵素の群から選択される酵素及び一つ又はそれより多いいずれものこれらの機能的等価物をコードする。特別な態様において、核酸は、本明細書中の以下の表7から10に記載される核酸の群及び一つ又はそれより多いいずれものこれらの機能的等価物から選択される。

【0147】

一つの態様において、発現構築物は、ブタノール合成経路中の少なくとも2種の酵素、少なくとも3種、少なくとも4種、少なくとも5種、少なくとも6種、少なくとも7種、少なくとも8種、少なくとも9種、少なくとも10種、少なくとも11種又は少なくとも12種の酵素をコードする。

【0148】

好ましくは、発現構築物は、本明細書中で先に記載したような適したプロモーターを更に含んでなる。一つの態様において、プロモーターは、ホスホトランスマセチラーゼ/酢酸キナーゼプロモーターである。好ましくは、プロモーターは、配列番号7又は機能的に等価なこれらの変種に対応する。

【0149】

好ましい態様において、発現構築物は、前記酵素の全てをコードする核酸を含んでなる。発現構築物が、別の電子伝達タンパク質をコードする核酸を含んでなることができるることは当業者によって認識されるものである。

【0150】

組換え微生物中で発現されるべき遺伝子は、発現構築物中にいずれもの適当なプロモーターの制御下で構築される。特別な態様において、プロモーターは、その制御下の遺伝子の実質的に恒常的な発現を可能にする。特別な態様において、プロモーターは、ホスホトランスマセチラーゼ/酢酸キナーゼ(配列番号7)プロモーターである。本発明中で用途を見出すことができる他のプロモーターは、C. autoethanogenum(又はC. ljungdahlii)からのものを含む。本発明人等は、更にClostridium autoethanogenum(図8)中の典型的な発酵条件下で高度に発現される遺伝子に操作的に連結された多くの他のプロモーターを確認した。リアルタイムPCRを使用する典型的な発酵条件中の200種を超える遺伝子の発現の分析は、多くの適当なプロモーターを確認した。これらは、ピルビン酸:フェレドキシン酸化還元酵素(配列番号48)、Wood-Ljungdahli遺伝子クラスター(配列番号47)、Rnfオペロン(配列番号49)及びATPシンターゼオペロン(配列番号50)を含む。発現、好ましくは適当な発酵条件下の高いレベルの発現を指示することができる他のプロモーターが、本発明の好ましい態様に対する代替物として有効なものであることは当業者によって認識されるものである。

【0151】

一つの態様において、本発明は、図2に示した順序で配列番号1から6の核酸を含んでなる構築物、組換え微生物又は核酸配列を含んでなる。然しながら、本発明が、核酸配列がいずれもの順序で与えられ、そして一つ又はそれより多い配列が非存在である場合、所望の有用性をなお有することは当業者によって認識されるものである。

【0152】

もう一つの態様において、本発明は、配列番号7、又は機能的に等価なその変種によって表されるプロモーター配列、前記プロモーターを含んでなる構築物、及び同一物を含んでなる組換え微生物を含んでなる核酸を含んでなる。

【0153】

本発明の発現構築物が、プロモーターに加えていずれもの数の制御要素、並びに所望する場合、更なるタンパク質の発現のために適した更なる遺伝子を含有することができるこ

10

20

30

40

50

とは認識されるものである。一つの態様において、構築物は、一つのプロモーターを含む。もう一つの態様において、構築物は、二つ又はそれより多いプロモーターを含む。一つの特別な態様において、構築物は、発現されるべきそれぞれの遺伝子のために一つのプロモーターを含む。一つの態様において、構築物は、一つ又はそれより多いリボソーム結合部位、好ましくは発現されるべきそれぞれの遺伝子のためのリボソーム結合部位を含む。

【0154】

本明細書中で定義される核酸配列及び構築物配列が、リボソーム結合部位及び／又は制限部位のために必要なもののような標準的なリンカーヌクレオチドを含有することができるることは当業者によって認識されるものである。このようなリンカー配列は、定義される配列に対して必要であり、そして制約を提供しないと解釈されるべきではない。

10

【0155】

本発明の発現構築物が、酢酸産生性微生物中で発現される場合、微生物は、1-ブタノール又はその前駆体を主要な発酵産物として产生する。Wood-Ljungdahl又はブタノール生合成経路の異なった工程を触媒する酵素をコードする他の遺伝子も、更に1-ブタノールを主要な発酵産物として产生するための発現構築物中に組込むことができるることは意図されている。

【0156】

先に定義したとおりの発現構築物及びメチル化構築物が組み合わされて、物質の組成物を提供することは意図されている。このような組成物は、幅広い種類の微生物中の制限障害機構を回避することに特別な有用性を有するが、しかし好ましい態様において、組成物の使用によって產生される組換え微生物は、1-ブタノール又はその前駆体を主要な発酵産物として产生する。

20

【0157】

本発明の発現構築物を含む核酸及び核酸構築物は、当技術において標準的ないずれもの数の技術を使用して構築することができる。例えば、化学的合成又は組換え技術を使用することができる。このような技術は、例えば、Sambrook et al (1989)中に記載されている。更なる例示的な技術は、本明細書中の以下の実施例のセクション中に記載されている。本質的に、個々の遺伝子及び制御要素は、遺伝子が所望のタンパク質を形成するために発現されることができるように互いに操作可能に連結されるものである。本発明に使用するために適したベクターは、当業者によって認識されるものである。然しながら、例として、次のベクター：pMTL80000シャトルベクター、pIMP1、pJIR750及び本明細書中の以下の実施例のセクション中に例示されるプラスミドが適していることができる。

30

【0158】

本発明が、新規な核酸及び核酸ベクターを提供する範囲において、これは、更に本明細書中に記載される核酸の少なくとも一部にハイブリッド形成することができる核酸、そのいずれか一つに相補的である核酸、又は機能的に等価なこれらのいずれか一つの変種を提供する。このような核酸は、好ましくはこのような核酸、これらのいずれか一つに相補的である核酸、又はこれらのいずれか一つの機能的に等価な変種に、ストリンジエントなハイブリッド形成条件下でハイブリッド形成するものである。“ストリンジエントなハイブリッド形成”は、核酸が、Sambrook等(1989)中に記載されているもののような標準的なハイブリッド形成条件下で標的テンプレートにハイブリッド形成することができることを意味する。このような核酸の最小の大きさが、与えられた核酸及びそれにハイブリッドするように設計された相補配列間で、安定したハイブリッドを形成することが可能な大きさであることは認識されるものである。従って、大きさは、核酸組成物並びに核酸及びその相補性配列間の相同性のパーセント、並びに使用されるハイブリッド形成条件(例えば、温度及び塩濃度)に依存する。一つの態様において、核酸は、少なくとも10個のヌクレオチドの長さ、少なくとも15個のヌクレオチドの長さ、少なくとも、20個のヌクレオチドの長さ、少なくとも25個のヌクレオチドの長さ、又は少なくとも30個のヌクレオチドの長さである。

40

50

【0159】

本発明の核酸が、二本鎖及び一本鎖核酸を含むRNA、DNA、又はcDNAを含むいずれもの適当な形態であることができることは認識されるべきである。

本発明は、更に宿主生命体、そして特に、本明細書中に記載されるいづれか一つ又はそれより多い核酸を含んでなる、ウイルス、細菌、及び酵母を含む微生物を提供する。

【0160】

本発明は、組換え微生物を使用する、COを含んでなるガス状基質を発酵することを含んでなる、微生物発酵による1-ブタノール及び/又はその前駆体の產生の方法を提供する。ある態様において、1-ブタノール又はその前駆体は、もう一つの発酵産物（例えは、エタノール）と共に同時產生される。一つの態様において、1-ブタノール又はその前駆体は、主要な発酵産物である。一つの、態様において、組換え微生物は、本明細書中で先に記載されたとおりである。10

【0161】

一つの態様において、1-ブタノール及び/又はその前駆体は、発酵プロセスのリットル当たり概略0.075グラム(g/1)から概略20g/1までの収率で產生される。一つの態様において、収率は、概略0.15g/1から概略1.54g/1までである。他の態様において、収率は、概略10g/1、概略5g/1、又は概略2g/1である。好ましくは、1-ブタノールの収率は、ブタノールが、細菌に対して毒性となる限度までである。20

【0162】

好ましくは、発酵は、本明細書中に記載されるとおりの組換え微生物を使用して1-ブタノール及び/又はその前駆体を產生するために、バイオ反応器中の基質を嫌気的に発酵する工程を含んでなる。20

【0163】

本明細書中で1-ブタノールの前駆体が言及された場合、これが、ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ、ブタノールデヒドロゲナーゼ、二機能性ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ/ブタノールデヒドロゲナーゼ、ホスホトランスプチリラーゼ、酪酸キナーゼ、及び/又はフェレドキシン依存性アルデヒド酸化還元酵素の存在中で、1-ブタノールに所望により転換されてもよいことは意図されている。好ましくは、微生物は、組換え核酸の導入の前及び後の両方で一つ又はそれより多いこれらの酵素を產生する。30

【0164】

本発明の一つの態様において、微生物によって発酵されるガス状基質は、COを含有するガス状基質である。ガス状基質は、工業過程の副産物として得られるCOを含有する廃棄ガス、又は自動車の排気ガスからのような幾つかの他の供給源からであることができる。ある態様において、工業過程は、製鋼所のような鉄金属製品製造、非鉄製品製造、石油精製過程、石炭のガス化、電力製造、カーボンブラック製造、アンモニア製造、メタノール製造及びコークス製造からなる群から選択される。これらの態様において、COを含有するガスは、いずれもの慣用的な方法を使用して、これが大気中に放出される前に工業過程から捕捉することができる。COは、合成ガス（一酸化炭素及び水素を含んでなるガス）の成分であることができる。工業過程から產生されるCOは、通常フレアで燃焼され、CO₂を產生し、そして従って本発明は、CO₂温室ガスの放出を減少し、そしてバイオ燃料として使用するためのブタノールを產生することにおいて特別な有用性を有する。ガス状のCOを含有する基質の組成にもよるが、これを粉塵の粒子のようないずれもの好ましくない不純物を除去するために、これを発酵に導入する前に処理することも更に好ましいことであることができる。例えば、ガス状基質は、既知の方法を使用して濾過又は洗浄することができる。40

【0165】

細菌の増殖及びCOから1-ブタノールへの発酵が起こるために、COを含有する基質ガスに加えて、適した液体栄養培地をバイオ反応器に供給する必要があるものであることは認識されるものである。栄養培地は、使用する微生物の増殖を可能にするために十分な50

ビタミン及びミネラルを含有するものである。COを使用してブタノールを產生するための発酵のために適した嫌気性培地は、当技術において既知である。例えば、適した培地は、Biebel(2001)に記載されている。本発明の一つの態様において、培地は、本明細書中の以下の実施例のセクションに記載されるとおりである。

【0166】

発酵は、好ましくはCOからブタノールへの発酵が起こるために適當な条件下で行われなければならない。考慮すべき反応条件は、圧力、温度、ガス流量、液体流量、培地pH、培地レドックス電位、攪拌速度（連続式攪拌タンク反応器を使用する場合）、接種レベル、液相中のCOが限度にならないことを確実にするための最大ガス基質濃度、及び産物の阻害を回避するための最大産物濃度を含む。

10

【0167】

更に、基質流のCO濃度（又はガス状基質中のCO分圧）を増加し、そして従って発酵反応の効率を増加することが、COが基質である場合しばしば好ましい。増加した圧力で操作することは、ガス相から、ブタノール產生のための炭素源として微生物によってこれが取込まれることができるもの相への、COの移動の速度の有意な増加を可能にする。これは、同様にバイオ反応器が常圧ではなく高圧に維持される場合、滞留時間（供給ガス流量によって割られたバイオ反応器中の液体体積として定義される）を減少することができるこ意味する。最適な反応条件は、使用される本発明の特定の微生物に一部依存する。然しながら、一般的に、発酵が周囲圧力より高い圧力で行われることが好ましい。更に、与えられるCOからブタノールへの転換速度が部分的に基質の滞留時間の関数であり、そして所望の滞留時間を達成することは、同様にバイオ反応器の必要な体積を指示するために、加圧系の使用は、必要なバイオ反応器の体積を、そして従って、発酵機器の資本コストを大幅に減少することができる。米国特許第5,593,886号に与えられた実施例によれば、反応器の体積は、反応器の操作圧力の増加に直線的に比例して減少することができ、即ち、10気圧の圧力で操作される反応器は、1気圧の圧力で操作されるものの僅か10分の1の体積を必要とする。

20

【0168】

高圧においてガスからエタノールへの発酵を行う利点は、他で記載されている。例えば、WO02/08438は、約2.1kg/cm²(30psig)及び約5.3kg/cm²(75psig)の圧力下で行われるガスからエタノールへの発酵を記載し、それぞれ150g/l/日及び369g/l/日のエタノール生産性を得ている。然しながら、類似の培地及び挿入ガス組成を使用して常圧で行われた発酵の例は、一日当たりリットル当たり10及び20倍間の少ないエタノールを產生することが見いだされた。

30

【0169】

発酵反応に供給するために使用されるガス流の組成は、この反応の効率及び/又は費用に有意な影響を有することができる。例えば、O₂は、嫌気性発酵法の効率を減少することができる。発酵法の発酵の前又は後の段階における好ましくない又は不必要的ガスの加工は、このような段階の負荷を増加することができる（例えば、ガス流がバイオ反応器に入る前に圧縮される場合、発酵において必要なガスを圧縮するために不必要的エネルギーを使用することができ）。従って、基質流、特に工業的供給源から誘導される基質流を、好ましくない成分を除去するために処理し、そして所望の成分の濃度を増加することが好ましいことであり得る。

40

【0170】

ある態様において、本発明の細菌の培養物は、水性培養培地中で維持される。好ましくは水性培養培地は、最小嫌気性微生物増殖培地である。適した培地は、当技術において既知であり、そして例えば、米国特許第5,173,429号及び5,593,886号並びにWO02/08438中に記載され、そして本明細書中の以下の実施例のセクションに記載されるとおりである。

【0171】

ブタノール、或いはブタノール及び一つ又はそれより多い他のアルコールを含有する混

50

合されたアルコール流は、分別蒸留又は蒸発、浸透気化法、及び例えば液体 - 液体抽出を含む抽出発酵のような当技術において既知の方法によって発酵プロスから回収することができる。酪酸を含む酸のような副産物も、更に当技術において既知の方法を使用して発酵プロスから回収することができる。例えば、活性炭フィルター又は電気透析を含む吸収系を使用することができる。別 の方法として、連続式ガスストリッピングも、更に使用することができる。

【0172】

本発明のある好ましい態様において、ブタノール及び副産物は、バイオ反応器からプロスの一部を連続的に除去することによって発酵プロスから回収され、プロスから微生物細胞を分離し（好都合には濾過によって）、そしてプロスからブタノール及び所望により酸を回収する。アルコールは、好都合には、例えば蒸留によって回収することができ、そして酸は、例えば活性炭上の吸着によって回収することができる。分離された微生物細胞は、好ましくは発酵バイオ反応器に戻される。アルコール（類）及び酸（類）が除去された後に残った細胞を含まない透過物も、更に、好ましくは発酵バイオ反応器に戻される。これがバイオ反応器に戻される前に、栄養物培地を補充するために更なる栄養分（ビタミンBのような）を細胞を含まない透過物に加えることができる。10

【0173】

更に、活性炭への酢酸の吸着を向上するために先に記載したようにプロスのpHが調節された場合、バイオ反応器に戻される前に、発酵バイオ反応器中のプロスのそれと同様なpHに、pHを再調節しなければならない。20

【0174】

本発明の一つの態様において、ブタノールは、抽出発酵法を使用して発酵反応物から回収され、ここにおいて、ブタノールは、反応器中の油相中に回収される。当業者は、これを達成するための技術を容易に認識するものである

【実施例】

【0175】

本発明は、ここに以下の非制約的実施例を参照して更に詳細に記載されるものである。遺伝子組換えは、*C. acetobutylicum*からのチオラーゼ、3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ、クロトナーゼ、ブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ、及び2種の電子伝達フラビンタンパク質遺伝子を制御する、強力な天然の*C. autoethanogenum*プロモーターからなる合成オペロンを含有するプラスミドを使用して行った（図1-2）。このプラスミドを、新規なメチルトランスフェラーゼを使用してin vivoでメチル化し、そして次いで*C. autoethanogenum DSM 23693*に形質移入した。主要な発酵産物としての1-ブタノールの產生を、異なった工業ガス流（製鋼所廃棄ガス、合成ガス）に対して示した。30

【0176】

発現プラスミドの構築

標準的な組換えDNA及び分子クローニング技術を、本発明において使用し、そしてこれらは、*Sambrook et al., 1989*及び*Ausubel et al., 1987*によって記載されている。使用された*Clostridium acetobutylicum ATCC 824*のブタノール生合成遺伝子のDNA配列は、NCBIから得られた（表1）。*C. autoethanogenum DSM 10061*のホストトランスクレオチダーゼ/酢酸キナーゼオペロンプロモーターを配列決定し、そして標的遺伝子の発現のために使用した（表1）。RT-PCR実験は、このプロモーターが、高いレベルで恒常に発現することを示した（図8）。

【0177】

【表1】

表1:1-ブタノール経路遺伝子の供給源

遺伝子/プロモーター	GenBank 引用	配列番号
チオラーゼ (<i>thiA</i>)	NC_003030 <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824, 完全なゲノム; GI:15896127; GeneID:1119056	1
3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ (<i>hbd</i>)	NC_003030 <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824, 完全なゲノム; GI:15895965; GeneID:1118891	2
クロトナーゼ (<i>crt</i>)	NC_003030 <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824, 完全なゲノム; GI:15895969; GeneID:1118895	3
ブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ (<i>bcd</i>)	NC_003030 <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824, 完全なゲノム; GI:15895968; GeneID:1118894	4
電子伝達フラビンタンパク質A(<i>etfA</i>)	NC_003030 <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824, 完全なゲノム; GI:15895966; GeneID:1118892	5
電子伝達フラビンタンパク質B (<i>etfB</i>)	NC_003030 <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824, 完全なゲノム; GI:15895967; GeneID:1118893	6
ホスホトランスアセチラーゼ／酢酸キナーゼプロモーター ($P_{pta-sck}$)	<i>Clostridium autoethanogenum</i> DSM10061	7

【0178】

Clostridium acetobutylicum ATCC 824 及び *Clostridium autoethanogenum* DSM10061からのゲノムDNAを、Bertram及びDurre (1989)による改良された方法を使用して単離した。100mlの一晩の培養物を回収し(6,000×g、15分、4)、リン酸カルシウム緩衝液(10mM、pH 7.5)で洗浄し、そして1.9mlのSTE緩衝液(50mMのTris-HCl、1mMのEDTA、200mMのスクロース；pH 8.0)中に懸濁した。300μlのリゾチーム(約100,000U)を加え、そして混合物を37で30分間インキュベートし、続いて280μlの10%(重量/容量)のSDS溶液を加え、そして更に10分間インキュベートした。RNAを、室温で240μlのEDTA溶液(0.5M、pH 8)、20μlのTris-HCl(1M、pH 7.5)、及び10μlのRNアーゼA(Fermentas)の添加によって消化した。次いで、100μlのプロテイナーゼK(0.5U)を加え、そしてタンパク質分解を1-3時間37で行った。最後に、600μlの過塩素酸ナトリウム(5M)を加え、続いてフェノール-クロロホルム抽出及びイソプロパノール沈殿を行った。DNAの量及び品質を分光光学的に検査した。

【0179】

ブタノール生合成遺伝子及びホスホトランスアセチラーゼ／酢酸キナーゼプロモーターを、iproofの高忠実度DNAポリメラーゼ(Bio-Rad Laboratory)並びに次のプログラム：98で30秒間の最初の変性、続いて32サイクルの変性(98で10秒間)、アニーリング(50-62で30-120秒間)及び伸長(72で45秒間)、それから最後の伸展工程(72で10分間)を使用して、表2中のオリゴヌクレオチドと共にPCRによって増幅した。

【0180】

【表2】

表2:クローニングのためのオリゴヌクレオチド

標的 名称	オリゴヌクレオチド 名称	DNA配列(5'から3'へ)	配列 番号
Ppta-ack	Ppta-ack-NotI-F	GAG <u>CGGCCGCAATATGATATTATG</u> TCC	8
Ppta-ack	Ppta-ack-NdeI-R	TT <u>CCATATGTTCATGTTCATTCCT</u> CC	9
ThIA	ThIA-Cac-NdeI-F	GT <u>TCATATGAAAGAAGTTGTAATAG</u> C	10
ThIA	ThIA-Cac-EcoRI-R	CAAG <u>AATTCCCTAGCACTTCTAGC</u>	11
crt-bcd-etcB-etcA -hbd オペロン	Crt-Cac-KpnI-F	AAG <u>GTACCTTAGGAGGATTAGTCAT</u> GG	12
crt-bcd-etcB-etcA -hbd オペロン	Crt-hbd-Cac-Bam HI-R	GAG <u>GGATCCGGATTCTTGAAACTTA</u> TTTG	13

10

20

30

40

【0181】

ホスホトランスマセチラーゼ / 酢酸キナーゼオペロン (P_pt_a-a_ck) の増幅された 498 bp のプロモーター領域を、E. coli - Clostridium のシャトルベクター pMTL85141 (配列番号 14 ; FJ797651.1 ; Nigel Minton, University of Nottingham; Heap et al., 2009) に、NotI 及び NdeI 制限部位並びに DH5⁻ T1^R 種 (Invitrogen) を使用してクローニングした。作成したプラスミド pMTL85145 及びチオラーゼ遺伝子の 1,194 bp の PCR 産物を、両方とも NdeI 及び EcoRI で切断した。核酸連結を E. coli XL1-Blue MRF' Kan (Stratagene) に形質移入し、プラスミド pMTL85145-th1Aを得た。その後、C. acetobutylicum ATCC824 からの crt-bcd-etcB-etcA-hbd オペロンの増殖された 4,764 bp の PCR 断片を、KpnI 及び BamHI 並びに E. coli ABLE K (Stratagene) を使用してこのベクター中にクローニングし、プラスミド pMTL85145-th1A-crt-hbdを作成した。最後に、抗生物質耐性カセットを、クロラムフェニコールからクラリスロマイシンに交換した。従って、ermB カセットを、ベクター pMTL82254 (配列番号 15 ; FJ797646.1 ; Nigel Minton, University of Nottingham; Heap et al., 2009) から、制限酵素 PmeI 及び FseI を使用して開放し、そしてプラスミド pMTL85145-th1A-crt-hbd の catP カセットと交換した。得られた発現プラスミド pMTL85245-th1A-crt-hbd (配列番号 31 の挿入は、表 3 に与えられたオリゴヌクレオチドを使用して完全に配列決定され、そして結果は、ブタノール生合成遺伝子が変異を含まないことが確認された (図 3)。

【0182】

【表3】

Table 3: 配列決定のためのオリゴヌクレオチド

オリゴヌクレオチド名称	DNA配列(5`から3`へ)	配列番号
配列-ThIA-hbd-3562-4162	CAGAGGATGTTAATGAAGTC	16
配列-ThIA-hbd-4163-4763	GCATCAGGATTAAATGACTG	17
配列-ThIA-hbd-4764-5364	ATAGCGAAGTACTTG	18
配列-ThIA-hbd-5365-5965	GATGCAATGACAGCTTC	19
配列-ThIA-hbd-5966-6566	GGAACAAAAGGTATATCAGC	20
配列-ThIA-hbd-7168-7768	CGGAGCATTGATAAAGAA	21
配列-ThIA-hbd-7769-8369	GCTGATTGTACATCACTTGA	22
配列-ThIA-hbd-8370-8870	CCAGAATTAATAGCTCAAGT	23

【0183】

DNAのメチル化

誘導性 lac プロモーターに融合されたハイブリッドメチルトランスフェラーゼ遺伝子(配列番号28)を、*C. autoethanogenum*(配列番号24)、*C. jungdahlii*(配列番号25)、及び*C. ragsdalei*(配列番号26)(図4a、4b及び4c)からのメチルトランスフェラーゼ遺伝子の整列によって設計した。メチルトランスフェラーゼ遺伝子の発現は、配列番号28によるメチルトランスフェラーゼ酵素の産生をもたらした。メチルトランスフェラーゼのアミノ酸配列の整列データを図4dに示す。

【0184】

ハイブリッドメチルトランスフェラーゼ遺伝子(配列番号27)を化学的に合成し、そしてベクター pGS20(配列番号29; ATG: biosynthetics GmbH, Merzhausen, Germany)中に、EcoRIを使用してクローニングした(図5)。得られたメチル化プラスミド pGS20-メチルトランスフェラーゼを、発現プラスミド pMTL85245-th1A-crt-hbdと共に制限陰性 E. coli XL1-Blue MRF' Kan (Stratagene)中に二重形質移入した。In vivo のメチル化を、1 mMのIPTGの添加によって誘導し、そしてメチル化されたプラスミドを PureLink™ HiPure Plasmid Maxi prep Kit (Invitrogen)を使用して単離した。得られたメチル化されたプラスミド組成物を、*C. autoethanogenum* DSM23693の形質転換のために使用した。

【0185】

トランスフォーメーション

完全なトランスフォーメーション実験中に、*C. autoethanogenum* DSM23693及び*C. jungdahlii*(DSM13528)を、10 g/lのフルクトース及び炭素源としての37%の約2.1 kg/cm²(30 psi)の製鋼所廃棄ガス(Glenbrook, NZのNew Zealand Steelの現場から収集;組成: 44% CO、32% N₂、22% CO₂、2% H₂)を伴うPETC培地(表4)中で、Hungate(1969)及びWolfe(1971)によって記載された標準的な嫌気性技術を使用して増殖した。

【0186】

【表 4 a】

表4PETC 培地(ATCC 培地 1754; <http://www.atcc.org/Attachments/2940.pdf>)

培地成分	培地 1.0L 当たり濃度
NH ₄ Cl	1 g
KCl	0.1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
NaCl	0.8 g
KH ₂ PO ₄	0.1 g
CaCl ₂	0.02 g
微量金属溶液	10 ml
Wolfe ビタミン溶液	10 ml
酵母抽出物	1 g
レサズリン (2 g/L 原液)	0.5 ml
NaHCO ₃	2 g
還元剤	0.006–0.008 % (容量/容量)
蒸留水	1 L まで, pH 5.5 (HCl で調節)

10

20

【0187】

【表 4 b】

Wolfe ビタミン溶液	原液の L 当たり
ビオチン	2 mg
葉酸	2 mg
塩酸ピリドキシン	10 mg
チアミン・HCl	5 mg
リボフラビン	5 mg
ニコチニ酸	5 mg
D-(+)-パントテン酸カルシウム	5 mg
ビタミン B ₁₂	0.1 mg
p-アミノ安息香酸	5 mg
チオクト酸	5 mg
蒸留水	1 L まで

30

40

【0188】

【表 4 c】

微量元素溶液	原液の L 当たり
ニトリロ三酢酸	2 g
MnSO ₄ .H ₂ O	1 g
Fe (SO ₄) ₂ (NH ₄) ₂ .6H ₂ O	0.8 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.2 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.2 mg
CuCl ₂ .2H ₂ O	0.02 g
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.02 g
Na ₂ SeO ₃	0.02 g
NiCl ₂ .6H ₂ O	0.02 g
Na ₂ WO ₄ .2H ₂ O	0.02 g
蒸留水	1 L まで

10

【0189】

20

【表 4 d】

還元剤原液	原液の 100 mL 当たり
NaOH	0.9 g
システイン・HCl	4 g
Na ₂ S	4 g
蒸留水	100 mL まで

30

【0190】

コンピテント細胞を製造するために、C. autoethanogenum DSM 23693 の 50 mL の培養物及び C. ljundahlii DSM 13528 の 50 mL の培養物を、連続 3 日間新しい培地で継代培養した。40 mM の DL - トレオニンを含有する 50 mL の PETC 培地に、0.05 の OD_{600 nm} で接種するために、これらの細胞を使用した。培養物が 0.4 の OD_{600 nm} に達した時点で、細胞を嫌気チャンバーに移し、そして 4,700 × g 及び 4°で回収した。培養物を氷冷の電気穿孔緩衝液 (270 mM のスクロース、1 mM の MgCl₂、7 mM のリン酸ナトリウム、pH 7.4) で 2 回洗浄し、そして最後に、600 μL の体積の新しい電気穿孔緩衝液中に懸濁した。この混合物を、1 μg のメチル化されたプラスミド混合物 (及び C. ljundahlii の場合、1 μL のタイプ 1 制限阻害剤 (Epicentre Biotechnologies)) を含有する 0.4 cm の電極ギャップを持つ予備冷却された電気穿孔キュベットに移し、そして次の設定値：2.5 kV、600°、及び 25 μF を持つ Gene pulser Xcel 1 電気穿孔装置 (Bio-Rad) を使用して直ちにパルスを加えた。3.7 - 4.0 ms の時定数を達成した。培養物を 5 mL の新しい培地に移した。細胞の再生を、試験管保持器を備えた Spectronic Helios Epsilon Spectrophotometer (Thermo) を使用して、600 nm の波長でモニターした。バイオマスの最初の 1 滴後、細胞は再び増殖を開始した。バイオマスがこの時点から倍になった時点で、細胞を回収し、200 μL の新しい培地に懸濁し、そして選択的 PETC プレート (1.2% の Bacto™ 寒天 (BD) を含有) 上 40

50

に $4 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ のクラリスロマイシンと共に置いた。約 $2.1 \text{kg} / \text{cm}^2$ (30psi) の 37 の製鋼所ガスとの 4 - 5 日の接種の後、プレート当たり 15 - 80 のコロニーが明確に見られた。

【0191】

このコロニーを、 $4 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ のクラリスロマイシンを含有する 2ml の PETC 培地を接種するために使用した。増殖が起こった時点で、培養を $4 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ のクラリスロマイシン及び唯一の炭素源としての約 $2.1 \text{kg} / \text{cm}^2$ (30psi) の製鋼所ガスを含有する 5ml の PETC 培地に、そしてその後 50ml にスケールアップした。

【0192】

好結果なトランスフォーメーションの確認

10

C. autoethanogenum: DNA の移動を確認するために、プラスミドのミニプレップを、 10ml の培養体積から QIAprep Spin Miniprep

Kit (Qiagen) を使用して行った。クロストリジウムのエキソヌクレアーゼ活性のために (Burchhardt and Durre, 1990)、4 種の分析されたクローニーから単離されたプラスミド DNA は、部分的に分解され、そしてアガロースゲル上にスマアのみをもたらし、一方、本来の *C. autoethanogenum* DSM 23693 種からのプラスミドの単離は、全くシグナルをもたらさなかった (図 6)。然しながら、単離されたプラスミド DNA の品質は、プラスミドの全ての関連する異なった領域を包含する 4 組のプライマーを使用する対照 PCR を行うために十分であった (表 5)。PCR は、*illumstra* の PureTaq Ready-To-GoTM PCR Beads (GE Healthcare) で、標準的な条件 (95 で 5 分間; 95 で 30 秒間、50 で 30 秒間、そして 72 で 1 分間の 32 サイクル; 72 で 10 分間) を使用して行った。全ての 4 種の分析された形質転換体の PCR は、テンプレートとしての本来のメチル化されたプラスミド混合物と同じシグナルをもたらした (図 6)。更なる対照として、それぞれ $1 \mu\text{l}$ の部分的に分解された単離されたプラスミドを、*E. coli* XL1-Blue MRF' Kan (Stratagene) 中に再度形質転換し、これからプラスミドが明確に単離され、そして制限消化によって確認することができた。

20

【0193】

4 種のクローニーの同一性を確認するために、 40ml のそれぞれの培養物からゲノム DNA を単離し (上記参照)、そして 16s rRNA 遺伝子に対して、*illumstra* の PureTaq Ready-To-GoTM PCR Beads (GE Healthcare) 及び標準的な条件 (95 で 5 分間; 95 で 30 秒間、50 で 30 秒間、そして 72 で 1 分間の 32 サイクル; 72 で 10 分間) を使用して PCR を行った (表 5; Weisberg et al., 1991)。それぞれの PCR 産物を精製し、そして配列決定した。全てのクローニーの配列は、*C. autoethanogenum* の 16S rRNA 遺伝子 (配列番号 30; Y18178, GI: 7271109) に対して少なくとも 99.9% の同一性を示した。

30

【0194】

それぞれの株は、2010 年 10 月 26 日に寄託番号 DSM 24138 下で、DSMZ (Deutsche Sammlung fur Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany) に寄託された。

40

【0195】

C. ljungdahlii: Clostridium ljungdahlii の形質転換体は、同じ方法及びプライマーの組を使用して確認された。 16S rRNA 遺伝子の配列決定は、*Clostridium ljungdahlii* (配列番号 119; CP001666, GI: 300433347) の 16S 遺伝子との 100% の一致をもたらした。

【0196】

50

【表5】

表5: プラスミド及び種のPCR確認のためのオリゴヌクレオチド

標的領域	オリゴヌクレオチド 名称	DNA配列(5'から3'へ)	配列 番号.
16s rRNA 遺伝子	fD1	CCGAATTCTCGACAAACAGAGTTGATC CTGGCTCAG	135
16s rRNA 遺伝子	rP2	CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTACCTTG TTACGACTT	32
抗生素質耐性カセット (<i>ermB</i>)	ermB-F	TTTGTAAATTAAAGAAGGAG	33
抗生素質耐性カセット (<i>ermB</i>)	ermB-R	GTAGAACCTTCTTC AAC	34
挿入断片1(<i>thIA</i>)	ThIA-Cac-NdeI-F	GTT <u>CATATGAAAGAAGTTGTAATA</u> GC	10
挿入断片1(<i>thIA</i>)	ThIA-Cac-EcoRI-R	CAAG <u>AATTCTAGCACTTTCTAGC</u>	11
挿入断片2 (<i>crt-bcd-etcAB-hbd</i>)	Crt-保存-F	GCTGGAGCAGATAT	35
挿入断片2 (<i>crt-bcd-etcAB-hbd</i>)	Crt-保存-R	GCTGTCATTCTTC	36
複製開始点(CoIE1)	CoIE1-F	CGTCAGACCCCGTAGAAA	37
複製開始点(CoIE1)	CoIE1-R	CTCTCCTGTTCCGACCCCT	38

【0197】

1 - ブタノールの产生

唯一のエネルギー及び炭素源としてのCOからの1 - ブタノールの产生を示すために、酵母抽出物及びフルクトースを含まないP R T C 培地を调製し、そして新規なブタノールプラスミド p M T L 8 5 2 4 5 - t h I A - c r t - h b d を内部に持つC . a u t o e t h a n o g e n u m 及びC . l j u n g d a h l i i 系と共にインキュベートした。ボトルを、二つの工业的供給源、製鋼所廃棄ガス(G l e n b r o o k , N Z のN e w Z e a l a n d S t e e l の现场から収集；組成：4 4 % C O 、 3 2 % N ₂ 、 2 2 % C O ₂ 、 2 % H ₂) 及び合成ガス(R a n g e F u e l s I n c . , B r o o m f i e l d , C O ; 組成：2 9 % C O 、 4 5 % H ₂ 、 1 3 % C H ₄ 、 1 2 % C O ₂ 、 1 % N ₂) からの、約2 . 1 k g / c m ² (3 0 p s i) のCOを含有するガス流で加压した。1 - ブタノールの产生は、数代の继代培養期間にわたる両方の系及び両方のガス混合物で証明することができた。酪酸の同时形成が同様に観察された。1 - ブタノール又は酪酸のいずれもは、C . a u t o e t h a n o g e n u m D S M 2 3 6 9 3 及びC . l j u n g d a h l i i D S M 1 3 5 2 8 の組換えされていない系の試料中では同一の条件下で検出されなかった。

【0198】

代謝産物の分析を、3 5 で操作されるR I D (屈折率検出器)を備えたA g i l e n t 1 1 0 0 S e r i e s のH P L C 装置を使用するH P L C 、及び6 0 に保たれたA l l t e c h I O A - 2 0 0 0 有機酸カラム(1 5 0 × 6 . 5 m m 、粒子の大きさ5 μ m) によって行った。僅かに酸性化された水(0 . 0 0 5 M のH ₂ S O ₄) を移動相として、0 . 7 m l / 分の流速で使用した。タンパク質及び他の細胞残留物を除去するため

10

20

30

40

50

に、 $400\mu\text{l}$ の試料を $100\mu\text{l}$ の2%（重量／容量）の5-スルホサリチル酸と混合し、そして $14,000\times g$ で3分間遠心して、沈殿した残留物を分離した。次いで $10\mu\text{l}$ の上清を分析のためにHPLCに注入した。

【0199】

血清ボトル実験において、最高の1-ブタノール産生は、ブタノールプラスミドpMTL85245-thlA-crt-hbdを内部に持つ*C. autoethanogenum* DSMの二つの静置培養物において観察された。これらの培養物において、1-ブタノールは、 1.54 g/l (25.66 mM)と観察された主要な発酵最終産物であった（表6、図7）。他の代謝産物の産生は、エタノール、酢酸、及び2,3-ブタンジオールのみを産生する本来の*C. autoethanogenum* DSM23693系と比較して減少した。炭素の流束は、1-ブタノール産生に向かって移動したが、代謝最終産物中に組込まれた全炭素の量は、ほとんど同じままである（表6）。20%の僅かな増加は、エタノール及び酢酸とそれぞれ比較して、1-ブタノール及び酪酸を産生することによって余分な減少した当量をオフロードした結果である可能性がある。通常電子の吸込み系として作用する2,3-ブタンジオールの産生は、完全に減少した。

【0200】

【表6】

表6:ブタノールプラスミド pMTL85245-thlA-crt-hbd を宿す *C. autoethanogenum* の本来の *C. autoethanogenum* DSM23693 と比較した代謝産物の産生及び炭素バランス

産物	M [g/mol]	P [g/cm³]	炭 素 原 子	本来の <i>C. autoethanogenum</i> DSM23693			<i>C. autoethanogenum</i> DSM23693 + pMTL85245-thlA-crt-bcd		
				産物 [g/l]	産物 [mmol/l]	炭素 [mmol/l]	産物 [g/l]	産物 [mmol/l]	炭素 [mmol/l]
エタノール	46.08	0.789	2	1.02	28.06	56.11	0.37	10.18	20.35
酢酸	60.05	1.049	2	1.87	29.69	59.37	0.30	4.76	9.52
2,3-ブタン ジオール	90.12	0.987	4	0.18	2.02	8.09	0	0	0
1-ブタノー ³⁰ ル	74.12	0.810	4	0	0	0	1.54	25.66	102.63
酪酸	88.11	0.960	4	0	0	0	0.31	3.67	14.67
合計					123.58				147.17

【0201】

1-ブタノールの産生は、更にブタノールプラスミドpMTL85245-thlA-crt-hbdを内部に持つ*C. jungdahlii* DSM13528の培養物中で、同じプラスミドを保有する*C. autoethanogenum* DSM23693と比較して低いが、 0.36 g/L (6 mM)までの有意な量で観察された。これは、*C. autoethanogenum* DSM23693が、改良されたアルコール産生を持つ系であり、そして同様に、*C. autoethanogenum* DSM23693の組換えされない系が、*C. jungdahlii* DSM13528の組換えされない系より多いエタノールを産生し、そしてより少ない酢酸を産生する（両方の系は、ブタノールも酢酸も産生しない）として説明することができる。

【0202】

ブタノールプラスミドpMTL85245-thlA-crt-hbdを内部に持つ*C.*

10

20

30

40

50

. *l jungdahlii*は、*C. autoethanogenum*より低い1 - ブタノール：酪酸比を有していた。然しながら、1 - ブタノールと酪酸の比は、過程条件によって変更することができる。これは、主要な発酵産物としての1 - ブタノールの產生を、しかし更に主要な発酵産物としての酪酸の產生も、*C. autoethanogenum*及び*C. l jungdahlii*の両方の系において可能にする。血清ボトル実験において、50 : 1から1 : 30間の1 - ブタノール：酪酸のモル比が*C. autoethanogenum*で、そして20 : 1から1 : 30間が*C. l jungdahlii*で観察された。振盪下でインキュベートされた培養物は、一般的に、静置培養と比較してより高い酪酸及びより低いレベルの1 - ブタノールを產生した。上部空間中のCO(及びH₂)の濃度は、同様に1 - ブタノール：酪酸比に影響を有することが見いだされた。上部空間により少ないCOを伴う培養物において、酪酸の產生がより好ましく、そして主要な発酵産物として產生されることができる。同様に、血清ボトル実験において行われたCOの薄い合成ガス(29%CO)より高い1 - ブタノールの力価が、COに富んだ製鋼所ガス(44%CO)において観察された。最大1.08g/l(12.8mM)の酪酸が、プラスミドpMTL85245-th1A-crt-hbdを内部に持つ*Clostridium autoethanogenum*で、そして1.03g/L(12.5mM)のレベルが、同じプラスミドを保有する*C. l jungdahlii*で観察された。この効果は、系に入る余分な炭素、そして更に一酸化炭素デヒドロゲナーゼ(CODH)によるCO酸化から發生される更なる還元力によって説明することができる。

【0203】

10

ブチリル-CoAの酪酸及びブタノールへの転換

発現プラスミドは、アセチル-CoAからのブチリル-CoAの產生のために必要な遺伝子のみを含有する。次いでブチリル-CoAは、ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ及びブタノールデヒドロゲナーゼの作用によってブタノールに直接転換することができる(図1)。第2の可能性は、ブチリル-CoAが、ホスホトランスアセチラーゼ及び酢酸キナーゼにより酪酸に転換されることであり(図1)、この場合、ATPは、基質レベルのリン酸化(SLP)により得られる。Wood-Ljungdahl経路の操作は、ATPを必要とするために、酢酸產生性細胞は、SLPからのATPに依存し、これは、更に既知のことごとくの酢酸產生性細菌が酢酸を產生するという事実を反映する(Drake et al., 2006)。然しながら、組換え細胞は、今やSLPにより、更に酪酸を產生することによってATPを発生することができる。次いで酪酸は、アルデヒド：フェレドキシン酸化還元酵素(AOR)により、ブチルアルデヒドに更に還元することができる(図1)。この反応は、Wood-Ljungdahl経路の初期の工程の一酸化炭素デヒドロゲナーゼによるCOの酸化によって提供される還元されたフェレドキシンによって促進することができる(CO + Fd_{red} → CO₂ + Fd_x)。次いでブチルアルデヒドは、ブタノールデヒドロゲナーゼによりブタノールに転換することができる(図1)。外部的に加えられた酪酸の、*C. autoethanogenum*の培養によるブタノールへの転換は、証明されている(WO2009/113878)。

20

【0204】

30

ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ、ブタノールデヒドロゲナーゼ、ホスホトランスブチリラーゼ、酪酸キナーゼ、及びアルデヒド：フェレドキシン酸化還元酵素活性を伴うそれぞれの遺伝子/酵素は、*C. autoethanogenum*、*C. l jungdahlii*、及び*C. ragsdalei*において本発明人等によって確認されている(表7-10)。潜在的な遺伝子及び酵素は、BLAST(Altschul et al., 1990)、COG(Tatusov et al., 2003)、及びTIGRFAM(Haft et al., 2002)データベースを使用する特徴づけられた遺伝子及び酵素との比較によって予測された。モチーフのスキャンは、PROSITE(Hulo et al., 2008) Pfam(Finn et al., 2010)データベースに対して行われた。*C. autoethanogenum*、*C. l jungdahlii*、及び*C. ragsdalei*のゲノムは、アルコール及びアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性

40

50

を持つ酵素をコードする幾つかの遺伝子を含有する。表7から10に示すように、これらの幾つかは、*C. acetobutylicum*、*C. beijerinckii*、又は*C. saccharobyticum*からの特徴付けられたブチルアルデヒド及びブタノールデヒドロゲナーゼと70%を超える高い相同意を有し、一方、他は、これらの酵素に対して少なくとも概略40%の同一性を有することが見いだされた。全ての三つのゲノムは、正確に一つのリン酸アセチル／ブチリルトランスフェラーゼ活性を持つ酵素を、そして酢酸／酪酸キナーゼ活性を持つものをコードする。*C. autoethanogenum*、*C. jungdahlii*、及び*C. ragsdalei*は、それぞれ2種のアルデヒド：フェレドキシン酸化還元酵素遺伝子を保有する。

【0205】

10

【表7】

表7:潜在的にブチルアルデヒド及びブタノールデヒドロゲナーゼ活性を与える*C. autoethanogenum*の遺伝子

配列	種類	特徴付けられた酵素に対する同一性(タンパク質)
配列番号 39-40	二機能性ブタノール／ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ	<ul style="list-style-type: none"> <i>C. beijerinckii</i> NCIMB 8052 からの二機能性アルデヒド／アルコールデヒドロゲナーゼ AdhE2 (同一性= 644/861 (75%), 確実性= 748/861 (87%), e-値= 0.0) <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 からの二機能性アルデヒド／アルコールデヒドロゲナーゼ AdhE2 (同一性= 594/858 (70%), 確実性= 730/858 (86%), e-値= 0.0)
配列番号 41-42	ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ	<ul style="list-style-type: none"> <i>C. beijerinckii</i> NCIMB 8052 からの二機能性アルデヒド／アルコールデヒドロゲナーゼ AdhE2 (同一性= 367/504 (73%), 確実性= 437/504 (87%), e-値= 0.0) <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 からの二機能性アルデヒド／アルコールデヒドロゲナーゼ AdhE2 (354/504 (71%), 確実性= 440/504 (88%), e-値= 0.0)
配列番号 43-44	ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ	<ul style="list-style-type: none"> <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 からの二機能性アルデヒド／アルコールデヒドロゲナーゼ AdhE2 (同一性= 173/352 (50%), 確実性= 236/352 (68%), e-値= 1e-91) <i>C. beijerinckii</i> NCIMB 8052 からの二機能性アルデヒド／アルコールデヒドロゲナーゼ AdhE2 (同一性= 160/374 (43%), 確実性= 234/374 (63%), e-値= 5e-87) <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 からの二機能性アルデヒド／アルコールデヒドロゲナーゼ AdhE1 (同一性= 158/366 (44%), 確実性= 235/366 (65%), e-値= 5e-82) <i>C. beijerinckii</i> NCIMB8052 からのブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ Ald (同一性= 110/354 (32%), 確実性= 184/354 (52%), e-値= 9e-44) <i>C. saccharoperbutylacetonicum</i> からのブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ (111/354 (32%), 確実性= 182/354 (52%), e-値= 2e-44)
配列番号 45-46	ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ	<ul style="list-style-type: none"> <i>C. beijerinckii</i> NCIMB 8052 からの二機能性アルデヒド／アルコールデヒドロゲナーゼ AdhE2 (同一性= 188/477 (40%), 確実性= 270/477 (57%), e-値= 9e-84) <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 からの二機能性アルデヒド／アルコールデヒドロゲナーゼ AdhE2 (同一性= 164/428 (39%), 確実性= 256/428 (60%), e-値= 1e-79)
配列番号 119-120	ブタノールデヒドロゲナーゼ	<ul style="list-style-type: none"> <i>C. saccharobyticum</i> からの NADPH-依存性ブタノールデヒドロゲナーゼ (同一性= 285/388 (7%), 確実性= 334/388 (87%), e-値= 7e-177) <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 からの二機能性アルデヒド／アルコールデヒドロゲナーゼ AdhE2 (同一性= 163/396 (42%), 確実性= 237/396 (60%), e-値= 4e-80)
配列番号 121-122	ブタノールデヒドロゲナーゼ	<ul style="list-style-type: none"> <i>C. saccharobyticum</i> からの NADPH-依存性ブタノールデヒドロゲナーゼ (同一性= 271/388 (70%), 確実性= 328/388 (85%), e-値= 3e-188) <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 からの二機能性アルデヒド／アルコールデヒドロゲナーゼ AdhE2 (同一性= 169/403 (42%), 確実性= 240/403 (60%), e-値= 3e-83)
配列番号 51-52	ブタノールデヒドロゲナーゼ	<ul style="list-style-type: none"> <i>C. beijerinckii</i> NCIMB 8052 からの二機能性アルデヒド／アルコールデヒドロゲナーゼ AdhE2 (246/315 (79%), 確実性= 287/315 (92%), e-値= 1e-153) <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 からの二機能性アルデヒド／アルコールデヒドロゲナーゼ AdhE2 (208/312 (67%), 確実性= 260/312 (84%), e-値= 4e-128)
配列番号 53-54	ブタノールデヒドロゲナーゼ	<ul style="list-style-type: none"> <i>C. saccharobyticum</i> からの NADPH-依存性ブタノールデヒドロゲナーゼ (同一性= 264/388 (69%), 確実性= 326/388 (85%), e-値= 5e-163) <i>C. beijerinckii</i> NCIMB8052 からの二機能性アルデヒド／アルコールデヒドロゲナーゼ AdhE2 (同一性= 169/410 (42%), 確実性= 246/410 (60%), e-値= 5e-82) <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 からの二機能性アルデヒド／アルコールデヒドロゲナーゼ AdhE2 (同一性= 162/402 (41%), 確実性= 240/402 (60%), e-値= 2e-78)
配列番号 55-56	ブタノールデヒドロゲナーゼ	<ul style="list-style-type: none"> <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 からの NADPH-依存性ブタノールデヒドロゲナーゼ BdhA from (同一性= 161/388 (42%), 確実性= 243/388 (63%), e-値= 7e-92) <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 からの NADPH-依存性ブタノールデヒドロゲナーゼ BdhB from 同一性= 155/389 (40%), 確実性= 242/389 (63%), e-値= 4e-85)
配列番号 57-58	ブタノールデヒドロゲナーゼ	<ul style="list-style-type: none"> <i>C. saccharobyticum</i> からの NADPH-依存性ブタノールデヒドロゲナーゼ AdhE2 (同一性= 156/385 (41%), 確実性= 236/385 (62%), e-値= 1e-72) <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 からの二機能性アルデヒド／アルコールデヒドロゲナーゼ AdhE2 (同一性= 154/412 (38%), 確実性= 233/412 (57%), e-値= 8e-70)
配列番号 59-60	リン酸アセチル／ブチリルトランスフェラーゼ	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 からのリン酸ブチリルトランスフェラーゼ (同一性= 85/338 (26%), 確実性= 146/338 (44%), e-値= 2e-12)
配列番号 61-62	酢酸／酪酸キナーゼ	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 からの酪酸キナーゼ (同一性= 49/175 (28%), 確実性= 78/175 (45%), e-値= 5e-08)
配列番号 63-64	アルデヒド：フェレドキシン酸化還元酵素	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 からのアルデヒド：フェレドキシン酸化還元酵素 (同一性= 183/618 (30%), 確実性= 311/618 (51%), e-値= 6e-72)
配列番号 65-66	アルデヒド：フェレドキシン酸化還元酵素	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 からのアルデヒド：フェレドキシン酸化還元酵素 (同一性= 191/633 (31%), 確実性= 308/633 (49%), e-値= 2e-70)

【0206】

40

【表 8】

表8:潜在的にブチルアルデヒド及びブタノールデヒドロゲナーゼ活性を与える *C. ljungdahlii* の遺伝子

配列	種類	特徴付けられた酵素に対する同一性
配列番号 67-68	二機能性ブタノール／ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ	<ul style="list-style-type: none"> • <i>C. beijerinckii</i> NCIMB 8052 からの二機能性アルデヒド／アルコールデヒドロゲナーゼ AdhE2(同一性= 644/882 (75%), 確実性= 751/882 (88%), e-値= 0.0) • <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 からの二機能性アルデヒド／アルコールデヒドロゲナーゼ AdhE2(同一性= 592/858 (69%), 確実性= 729/858 (85%), e-value = 0.0)
配列番号 69-70	二機能性ブタノール／ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ	<ul style="list-style-type: none"> • <i>C. beijerinckii</i> NCIMB 8052 からの二機能性アルデヒド／アルコールデヒドロゲナーゼ AdhE2(同一性= 636/860 (74%), 確実性= 752/860 (88%), e-値= 0.0) • <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 からの二機能性アルデヒド／アルコールデヒドロゲナーゼ AdhE2(同一性= 585/858 (69%), 確実性= 733/858 (86%), e-値= 0.0)
配列番号 71-72	ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ	<ul style="list-style-type: none"> • <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 からの二機能性アルデヒド／アルコールデヒドロゲナーゼ AdhE2(同一性= 209/429 (49%), 確実性= 286/429 (67%), e-値= 4e-111) • <i>C. beijerinckii</i> NCIMB 8052 からの二機能性アルデヒド／アルコールデヒドロゲナーゼ AdhE2(同一性= 196/487 (42%), 確実性= 286/487 (62%), e-値= 1e-102) • <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 からの二機能性アルデヒド／アルコールデヒドロゲナーゼ AdhE1(同一性= 193/443 (44%), 確実性= 283/443 (64%), e-値= 7e-100) • <i>C. beijerinckii</i> NCIMB8052 からのブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ Ald (同一性= 125/409 (31%), 確実性= 206/409 (51%), e-値= 3e-49) • <i>C. saccharoperbutylicum</i> からのブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ (124/409 (31%), 確実性= 204/409 (50%), e-値= 2e-49)
配列番号 73-74	ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ	<ul style="list-style-type: none"> • <i>C. beijerinckii</i> NCIMB 8052 からの二機能性アルデヒド／アルコールデヒドロゲナーゼ AdhE2(同一性= 188/477 (40%), 確実性= 270/477 (57%), e-値= 9e-84) • <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 からの二機能性アルデヒド／アルコールデヒドロゲナーゼ AdhE2 同一性= 164/428 (39%) 確実性= 256/428 (60%), e-値= 1e-79)
配列番号 75-76	ブタノールデヒドロゲナーゼ	<ul style="list-style-type: none"> • <i>C. saccharobyticum</i> からの NADPH-依存性ブタノールデヒドロゲナーゼ (同一性= 285/388 (74%), 確実性= 335/388 (87%), e-値= 9e-177) • <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 からの二機能性アルデヒド／アルコールデヒドロゲナーゼ AdhE2 (同一性= 164/398 (42%), 確実性= 238/398 (61%), e-値= 1e-80)
配列番号 77-78	ブタノールデヒドロゲナーゼ	<ul style="list-style-type: none"> • <i>C. saccharobyticum</i> からの NADPH-依存性ブタノールデヒドロゲナーゼ (同一性= 281/388 (73%), 確実性= 327/388 (85%), e-値= 2e-173) • <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 からの二機能性アルデヒド／アルコールデヒドロゲナーゼ AdhE2(同一性= 169/403 (42%), 確実性= 240/403 (60%), e-値= 3e-83)
配列番号 79-80	ブタノールデヒドロゲナーゼ	<ul style="list-style-type: none"> • <i>C. saccharobyticum</i> からの NADPH-依存性ブタノールデヒドロゲナーゼ (同一性= 264/388 (69%), 確実性= 326/388 (85%), e-値= 5e-163) • <i>C. beijerinckii</i> NCIMB8052 からの二機能性アルデヒド／アルコールデヒドロゲナーゼ AdhE2(同一性= 169/410 (42%), 確実性= 246/410 (60%), e-値= 4e-82) • <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 からの二機能性アルデヒド／アルコールデヒドロゲナーゼ AdhE2(同一性= 162/402 (41%), 確実性= 240/402 (60%), e-値= 2e-78)
配列番号 81-82	ブタノールデヒドロゲナーゼ	<ul style="list-style-type: none"> • <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 からの NADPH-依存性ブタノールデヒドロゲナーゼ BdhA(同一性= 161/388 (42%), 確実性= 243/388 (63%), e-値= 7e-92) • <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 からの NADPH-依存性ブタノールデヒドロゲナーゼ BdhB(同一性= 155/388 (40%), 確実性= 242/389 (63%), e-値= 4e-85)
配列番号 83-84	ブタノールデヒドロゲナーゼ	<ul style="list-style-type: none"> • <i>C. saccharobyticum</i> からの NADPH-依存性ブタノールデヒドロゲナーゼ (同一性= 150/389 (39%), 確実性= 233/389 (60%), e-値= 7e-73) • <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 からの二機能性アルデヒド／アルコールデヒドロゲナーゼ AdhE2(同一性= 154/412 (38%), 確実性= 233/412 (57%), e-値= 8e-70)
配列番号 85-86	リン酸アセチル／ブチリルトランスフェラーゼ	• <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 からのリン酸ブチリルトランスフェラーゼ (91/340 (27%), 確実性= 158/340 (48%), e-値= 1e-18)
配列番号 87-88	酢酸／酪酸キナーゼ	• <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 からのブチリルトランスフェラーゼ (49/162 (31%), 確実性= 77/162 (48%), e-値= 5e-08)
配列番号 89-90	アルデヒド：フェレドキシン酸化還元酵素	• <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 からのアルデヒド：フェレドキシン酸化還元酵素 (188/631 (30%), 確実性= 318/631 (51%), e-値= 3e-11)
配列番号 91-92	アルデヒド：フェレドキシン酸化還元酵素	• <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 からのアルデヒド：フェレドキシン酸化還元酵素(同一性= 191/633 (31%), 確実性= 308/633 (49%), e-値= 2e-70)

【 0 2 0 7 】

【表 9】

表10:潜在的にブチルアルデヒド及びブタノールデヒドロゲナーゼ活性を与える *C. ragsdalei* の遺伝子

配列	種類	特徴付けられた酵素に対する同一性
配列番号 93-94	二機能性ブタノール／ブチル アルデヒドデヒドロゲナーゼ	<ul style="list-style-type: none"> <i>C. beijerinckii</i> NCIMB 8052 からの二機能性アルデヒド／アルコールデヒドロゲナーゼ AdhE2(同一性= 845/861 (75%), 確実性= 751/861 (88%), e-値= 0.0) <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 からの二機能性アルデヒド／アルコールデヒドロゲナーゼ AdhE2 (同一性= 591/858 (69%), 確実性= 731/858 (86%), e-値= 0.0)
配列番号 95-96	二機能性ブタノール／ブチル アルデヒドデヒドロゲナーゼ	<ul style="list-style-type: none"> <i>C. beijerinckii</i> NCIMB 8052 からの二機能性アルデヒド／アルコールデヒドロゲナーゼ AdhE2(同一性= 639/860 (75%), 確実性= 752/860 (88%), e-値= 0.0) <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 からの二機能性アルデヒド／アルコールデヒドロゲナーゼ AdhE2(同一性= 591/858 (69%), 確実性= 735/858 (86%), e-値= 0.0)
配列番号 97-98	ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ	<ul style="list-style-type: none"> <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 からの二機能性アルデヒド／アルコールデヒドロゲナーゼ AdhE2 同一性= 214/457 (47%), 確実性= 294/457 (65%), e-値= 5e-111) <i>C. beijerinckii</i> NCIMB 8052 からの二機能性アルデヒド／アルコールデヒドロゲナーゼ AdhE2(同一性= 200/457 (44%), 確実性= 283/457 (62%), e-値= 1e-103) <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 からの二機能性アルデヒド／アルコールデヒドロゲナーゼ AdhE1(同一性= 198/457 (44%), 確実性= 289/457 (64%), e-値= 4e-101) <i>C. beijerinckii</i> NCIMB8052 からのブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ Ald (同一性= 125/409 (31%), 確実性= 206/409 (51%), e-値= 3e-49) <i>C. saccharoperbutylacetonicum</i> からのブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ (同一性= 123/409 (31%), 確実性= 205/409 (51%), e-値= 1e-48)
配列番号 99-100	ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ	<ul style="list-style-type: none"> <i>C. beijerinckii</i> NCIMB 8052 からの二機能性アルデヒド／アルコールデヒドロゲナーゼ AdhE2(同一性= 188/477 (40%), 確実性= 270/477 (57%), e-値= 9e-84) <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 からの二機能性アルデヒド／アルコールデヒドロゲナーゼ AdhE2(同一性= 164/428 (39%), 確実性= 256/428 (60%), e-値= 1e-79)
配列番号 101-102	ブタノールデヒドロゲナーゼ	<ul style="list-style-type: none"> NADPH-dependet butanol dehydrogenase from <i>C. saccharobutylicum</i> (同一性= 285/388 (74%), 確実性= 335/388 (87%), e-値= 9e-177) <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 からの二機能性アルデヒド／アルコールデヒドロゲナーゼ AdhE2(同一性= 164/398 (42%), 確実性= 238/398 (61%), e-値= 1e-80)
配列番号 103-104	ブタノールデヒドロゲナーゼ	<ul style="list-style-type: none"> NADPH-dependet butanol dehydrogenase from <i>C. saccharobutylicum</i> (同一性= 281/388 (73%), 確実性= 327/388 (85%), e-値= 2e-173) <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 からの二機能性アルデヒド／アルコールデヒドロゲナーゼ AdhE2(同一性= 169/403 (42%), 確実性= 240/403 (60%), e-値= 3e-83)
配列番号 105-106	ブタノールデヒドロゲナーゼ	<ul style="list-style-type: none"> <i>C. saccharobutylicum</i> からの NADPH-依存性ブタノールデヒドロゲナーゼ (同一性= 264/388 (69%), 確実性= 326/388 (85%), e-値= 5e-163) <i>C. beijerinckii</i> NCIMB8052 からの二機能性アルデヒド／アルコールデヒドロゲナーゼ AdhE2(同一性= 169/410 (42%), 確実性= 246/410 (60%), e-値= 4e-82) <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 からの二機能性アルデヒド／アルコールデヒドロゲナーゼ AdhE2(同一性= 162/402 (41%), 確実性= 240/402 (60%), e-値= 2e-78)
配列番号 107-108	ブタノールデヒドロゲナーゼ	<ul style="list-style-type: none"> <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 からの NADPH-依存性ブタノールデヒドロゲナーゼ BdH A(同一性= 102/388 (42%), 確実性= 243/388 (63%), e-値= 3e-92) <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 からの NADPH-依存性ブタノールデヒドロゲナーゼ BdH B(同一性= 155/389 (40%), 確実性= 242/389 (63%), e-値= 6e-85)
配列番号 109-110	ブタノールデヒドロゲナーゼ	<ul style="list-style-type: none"> <i>C. saccharobutylicum</i> からの NADPH-依存性ブタノールデヒドロゲナーゼ (同一性= 147/389 (38%), 確実性= 227/389 (59%), e-値= 3e-71) <i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 からの二機能性アルデヒド／アルコールデヒドロゲナーゼ AdhE2(同一性= 155/412 (38%), 確実性= 233/412 (57%), e-値= 2e-70)
配列番号 111-112	リン酸アセチル／ブチリルトランスフェラーゼ	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 87/325 からのリン酸ブチリルトランスフェラーゼ(27%), 確実性= 148/325 (48%), e-値= 2e-16)
配列番号 113-114	酢酸／酪酸キナーゼ	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 からの酪酸キナーゼ (同一性= 49/162 (31%), 確実性= 77/162 (48%), e-値= 4e-11)
配列番号 115-116	アルデヒド：フェレドキシン酸化還元酵素	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 からのアルデヒド：フェレドキシン酸化還元酵素(同一性= 187/633 (30%), 確実性= 319/633 (51%), e-値= 3e-74)
配列番号 117-118	アルデヒド：フェレドキシン酸化還元酵素	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 からのアルデヒド：フェレドキシン酸化還元酵素(同一性= 187/633 (30%), 確実性= 302/633 (48%), e-値= 1e-69)

【0208】

遺伝子発現研究

遺伝子発現研究を、ブタノールプラスミド p M T L 8 5 2 4 5 - t h 1 A - c r t - h b d を内部に持つ *C. autoethanogenum* 中の導入されたチオラーゼ、3-ヒドロキシブチリル-CoA デヒドロゲナーゼ、クロトナーゼ、ブチリル-CoA デヒドロゲナーゼ、電子伝達フラビンタンパク質 A 及び電子伝達フラビンタンパク質 B 遺伝子の好結果な発現を確認するために行った。更に、*C. autoethanogenum* (表 7) のゲノム中で確認された推定上のブチルアルデヒド (butaraldehyde)、ブタノールデヒドロゲナーゼ、リン酸アセチル／ブチリルトランスフェラーゼ 酢酸／酪酸キナーゼ、アルデヒド；フェレドキシン酸化還元酵素遺伝子の選択されたものは、更に標準的な発酵条件下で発現することが見いだされた (図 60)。

【0209】

試料を、遠心 (6,000 × g、5 分、4) によって回収した。RNA を、細胞ペレットを、100 μL のリゾチーム溶液 (50,000 U のリゾチーム、0.5 μL の 10 % SDS、10 mM の Tris-HCl、0.1 mM の EDTA; pH 8) 中に懸濁することによって単離した。5 分後、350 μL の溶菌緩衝液 (10 μL の 2-メルカプトエ

10

20

30

40

50

タノールを含有)を加えた。細胞懸濁液を、18-21ゲージの針を5回通すことによって機械的に破壊した。次いでRNAを、PureLinkTM RNA Mini Kit (Invitrogen)を使用して単離し、そして100μLのRNアーゼを含まない水で溶出した。RNAを、PCR及びゲル電気泳動により点検し、そして分光光学的に定量し、そして必要な場合DNアーゼI (Roche)で処理した。RNAの品質及び整合性を、BioAnalyzer (Agilent Technologies)を使用して点検した。逆転写工程を、SuperScript III Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen)を使用して行った。RT-PCR反応を、MyiQ Single Colour Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories)で、25 ngのcDNAテンプレート、67nMのそれぞれのプライマー(表11)、及び1×iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA 94547, USA)を伴う15μLの反応体積で行った。¹⁰ グアニル酸キナーゼ及びギ酸テトラヒドロ葉酸リガーゼを、ハウスキーピング遺伝子として使用し、そして非テンプレート対照を含めた。反応条件は、95で3分間、続いて40サイクルの95で15秒間、55で15秒間及び72で30秒間であった。溶融曲線分析を、RT PCR (38サイクルの1/秒で58から95へ)の完了の直後に、プライマーの二量体化又は増幅の他の人工産物の検出のために行った。

【0210】

全ての異種遺伝子のmRNAは、成功裏に検出することができ、遺伝子が発現されることを示した。全ての遺伝子のシグナルは、同様なレベルであった。²⁰

【0211】

【表10】

表11: qRT-PCR のためのオリゴヌクレオチド

標的	オリゴヌクレオチド名称	DNA配列(5`から3`へ)	配列番号
グアニル酸キナーゼ	GnK-F	TCAGGACCTTCTGGAACTGG	131
	GnK-R	ACCTCCCCTTTCTTGGAGA	132
キ酸テトラヒドロ葉酸リガーゼ	FoT4L-F	CAGGTTTCGGTGCTGACCTA	133
	FoT4L-R	AACTCCGCCGTTGTATTC	134
チオラーゼ	thIA-RT-F	TTGATGAAATGATCACTGACGGAT	123
	thIA-RT-R	GAAATGTTCCATCTCAGCTATG	124
3-ヒドロキシブチリル-CoA デヒドロゲナーゼ	hdb-RT-F	CATCACTTCAATAACAGAAGTGG	125
	hdb-RT-R	TACCTCTACAAGCTTCATAACAGG	126
ブチリル-CoA デヒドロゲナーゼ	bcd-RT-F	AAAATGGGTCAGTATGGTATGATG	127
	bcd-RT-R	TGTAGTACCGCAAACCTTGATAA	128
電子伝達フラビンタンパク質A	etfA-RT-F	CAAGTTTACTTGGTGGAACAAATAG	129
	etfA-RT-R	GAGTTGGTCTTACAGTTTACCAAG	130
二機能性ブタノール／ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ(配列番号 39)	adhE-RT-F	CGGCTGCTAAAAGAAATTTCATA	137
	adhE-RT-R	CCAGAACTCCGCAGGTCTTTCAC	138
ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ(配列番号 41)	Bld1-RT-F	GGCAGTAGAAGAAAGCGGAATGG	139
	Bld1-RT-R	AAAGCCTGCATCTCTCTCTAAAC	140
ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ(配列番号 45)	Bld2-RT-F	TAATGATTTGCTCTCCATCCAAGA	141
	Bld2-RT-R	TCCGATTTCTCCGCCATACG	142
ブタノールデヒドロゲナーゼ(配列番号 53)	BDH1-RT-F	AGCTGTAGTAGTTGGAGGAGG	143
	BDH1-RT-R	CACAGACGGATCTGGTTAACACC	144
ブタノールデヒドロゲナーゼ(配列番号 57)	BDH2-RT-F	GAATCTATTCAACTTTAGAGCAA	145
	BDH2-RT-R	CAACGGAACTTATTCCAGCTTGC	146
リン酸アセチル／ブチリルトランスフェラーゼ(配列番号 59)	Pta-RT-F	GATGCTTTTATGAATTGAGAAAG	147
	Pta-RT-R	TGAAACCAATCCATCTGCATCTCC	148
酢酸／酪酸キナーゼ(配列番号 61)	Ack-RT-F	TGCAAGATGAAAGTGTAGCAA	149
	Ack-RT-R	AGTTTGTTGGTCTTCCATTGGTTGC	150
アルデヒド：フェレドキシン酸化還元酵素(配列番号 63)	AOR1-RT-F	CTTCAACAGGAAACAGATTGAGA	151
	AOR1-RT-R	GC	
アルデヒド：フェレドキシン酸化還元酵素(配列番号 65)	AOR2-RT-F	CCAACACCACCGTCCTGC	152
	AOR2-RT-R	GGTTGGGATATGATAATAGTAGAG	153
		GATAAGGC	
		GTAACCTTCCCCAAAGCTGTGAC	154
		G	

【0212】

本発明は、読者が過度の実験を行わずに本発明を実行することを可能にするために、あ

10

20

30

40

50

る種の好ましい態様を参照して、本明細書中に記載されてきた。然しながら、当業者は、多くの構成要素及びパラメータを、ある程度変更または改変するか、又は本発明の範囲から逸脱することなく既知の等価物と置き換えることができるることを容易に認識するものである。このような改変及び等価物が、個別に記載されているかのように本明細書中に組込まれることは認識されるべきである。表題、見出し、等は、読者のこの文書の理解を高めるために提供され、そして本発明の範囲を制約するものとして解釈されるべきではない。

【0213】

上記に又はもしあれば以下に引用される全ての特許出願、特許及び刊行物の全ての開示は、本明細書中に参考文献として援用される。然しながら、本明細書中のいずれもの特許出願、特許及び刊行物に対する言及は、これらが、有効な従来の技術を構成するか、又は世界中のいずれかの国の普通の一般的知識の一部を形成することの承認若しくはいずれもの形態の示唆として理解されるものではなく或いはそのように理解されるべきではない。
10

【0214】

本明細書及びいずれもの以下の特許請求の範囲を通して、文脈が他に要求しない限り、用語“含んでなる”、“含んでなり”等は、排他的な意味に対抗する包括的な意味で、即ち、“制約されるものではないが、…を含む”の意味で解釈されるべきである。

【0215】

参考文献

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-410. 20
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1987) Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Ltd., Hoboken, NJ.
- Bertram J, Durre P (1989) Conjugal transfer and expression of streptococcal transposons in *Clostridium acetobutylicum*. *Arch Microbiol* 151:551-557.
- Biebel (2001). *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 27, 18-26. 30
- Burchhardt G and Durre P (1990) Isolation and characterization of DNase-deficient mutants of *Clostridium acetobutylicum*. *Curr Microbiol* 21:307-311.
- Carbone A, Zinov'yev A and Kepes F (2003) Codon adaptation index as measure of dominating codon bias. *Bioinformatics* 19:2005-2015.
- Drake HL, Kusel K, Matthies C, Acetogenic prokaryotes. In: Dworkin M, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E The Prokaryotes, 3rd edition, vol. 2 (Ecophysiology and Biochemistry). Springer, NY: 354-420. 40
- Finn RD, Mistry J, Tate J, Coggill P, Heger A, Pollington JE, Gavin OL, Gunasekaran P, Ceric G, Forslund K, Holm L, Sonnhammer EL, Eddy SR, Bateman A (2010) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* 38:D211-222. 50

Haft DH, Selengut DH, White O (2003) The TIGRFAMs database of protein families. *Nucleic Acids Res* 31:371-373.

Heap JT, Pennington OJ, Cartman ST, and Minton NP (2009) A modular system for Clostridium shuttle plasmids. *J Microbiol Methods* 78:79-85.

Hulo N, Bairoch A, Bulliard V, Cerutti L, Cuche BA, de Castro E, Lachaize C, Langendijk - Genevaux PS, Sigrist CJ (2008) The 20 years of PROSITE. *Nucleic Acids Res* 36:D245-D249.

Hungate RE (1969) A roll tube method for cultivation of strict anaerobes, in Norris JR and Ribbons DW (eds.), *Methods in Microbiology*, vol. 3B. Academic Press, New York, NY:117-132.

Inui, et al. *Appl Microbiol Biotechnol* (2008) 77:1305-1316.

Kopke M, Durre P (2010) Biochemical production of biobutanol, in Luque R, Campelo J, Clark JH (Eds.): *Handbook of biofuel production- Processes and technologies*, Woodhead Publishing, Cambridge, UK:221-257.

Liou JS, Balkwill DL, Drake GR, Tanner RS (2010) *Clostridium carboxidivorans* sp. nov., a solvent-producing clostridium isolated from an agricultural settling lagoon, and reclassification of the acetogen *Clostridium scatologenes* strain SL1 as *Clostridium drakei* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 55:2085-2091.

Mermelstein LD, Papoutsakis ET (1993) In vivo methylation in *Escherichia coli* by the *Bacillus subtilis* phage 3TI to protect plasmids from restriction upon transformation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl Environ Microbiol* 59:1077-1081.

Noack S, Kopke M, Durre P (2009) Microbial 40
ly produced fuels and other biofuels, in Wright JH, Evans DA (Eds.): *New research on Biofuels*, Nova Publishers, Haupage, NY:17-30.

Heiskanen H, Virkajarvi I, Viikari L (2007) The effect of syngas composition on the growth and product formation of *Butyrivibacterium methylotrophicum*. *Enz Microbial Technol* 41:362-367.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) M 50

o l e c u l a r C l o n i n g : A l a b o r a t o r y M a n u a l , C o l d S p r i n g H a r b o u r L a b r o t a r y P r e s s , C o l d S p r i n g H a r b o u r , N Y .

Tatusov RL, Fedorova ND, Jackson JD, Jacobs AR, Kiryutin B, Koonin EV, Krylov DM, Mander R, Mekhedov SL, Nikolskaya AN, Rao BS, Smirnov S, Sverdlov AV, Vasudevan S, Wolf Y I, Yin JJ, Natale DA (2003) The COG database: an updated version includes eukaryotes. BMC Bioinformatics 4:41.

Tsai MH and Saier Jr. MH (1995) Phylogenetic characterization of the ubiquitous electron transfer flavoprotein families ET F- and ETF-. Res. Microbiol. 146:397-404

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991). J Bacteriol. 173:697-703.

Weissermel K, Arpe HJ (2003) Industrial organic chemistry, 4th edition, Wiley - VCH Verlag, GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.

Wolfe RS (1971) Microbial formation of methane. Adv Microb Physiol 6:107-146.

【図2】

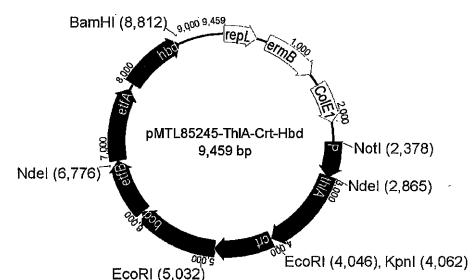


Figure 2

【図3】

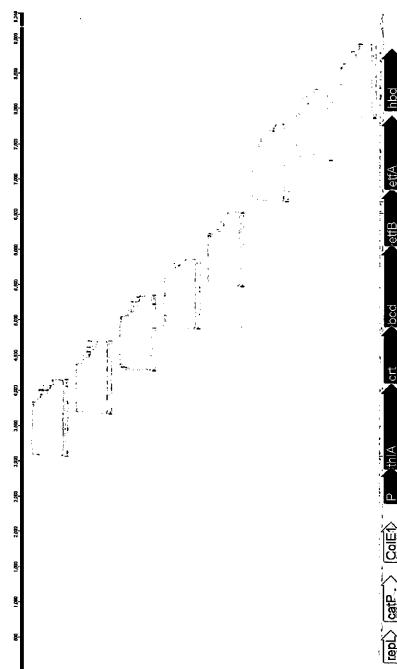


Figure 3

【 図 4 - 1 】

Figure 4a

【図4-3】

Figure 4a (cont.)

【図4-2】

Figure 4a (cont.)

【 図 4 - 4 】

Figure 4a (cont.)

【 図 4 - 5 】

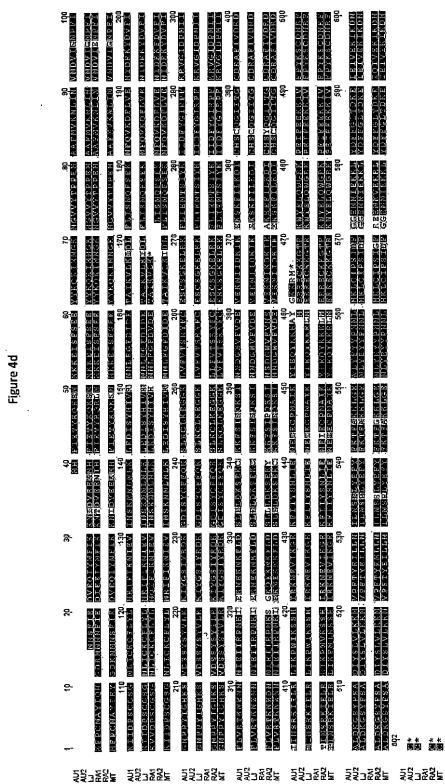
Figure 4b

【 义 4 - 6 】

Figure 4b (cont.)

〔 図 4 - 7 〕

【 义 4 - 9 】



【 6 】



Figure 6

〔 四 9 〕

配列番号1: *Clostridium acetobutylicum* ATCC 2524 チオラーゼ遺伝子 (thiA):
ATGAAAGAAGTGTAACTGGCTAACAGCGATTGAGTCCTTCAAGGATCTCTTAAAGGTGATGCCAGCA
GGATTTAGTGACCTACGCTATAAGGAAGCAGTTTAAAGGAGGAAACAGGAGATGTTAAGAACGTAT
TTTGAAGGAAATGTCTTCAAGCAGGTTTAAAGGAGAATCAGCAAGCAGGATCTTAAAGCAGGATTACAGGTT
AAATTCGCTACGATGACTTAATTAAGGTTTGTGGTCAAGCAGCTTAAGCAGGTAGCTTAGCACAAAATTAGA
CAGGAGATGCTGACGTAATAAGCAGGTGGTATGGAAAATATGCTAGACGCTCTTACTTACGGAATAAGCCTAGAT
GGGGATATAGATGGAAAAGCTTAAATTGTAAGGATATGCTACGAGGTTGGTGTAGCTTAAATGATTAC
ATCAGGAAATAACAGCAGAAAATCATGCTGAGAGATGCAACATTCTCCTTCCTCTCCT
ATCACAAAAAAAGCTGAGAAGACTATAAACCTAGGCTCAATTAAAGTGAATAAGTCTCTGTAATTAAAGGCAG
AGGGAGGAAATCTGAGTGTAGCATGACGACCCATTAGTGGTCAACTATAGAGGACTCTTAAAGAAC
CTGCTTCAAAAAGTAGGAACTGAGCACGCTTGTGATAGCTCATGAAATTAAAGTCTGCGCAGACTTGTGTA
TGAGTCTGAGAAAAGCTAAAGGACTTGGTAAACAAACCTTGCAAGTATGTTCTTATGGTTCAGCAGGAGTGTAC
CGACGAAATTTGGGATATGAGGACCTTCTTCTGCAAAAGCTATTTAGGAAAGCCTTGGAGCTTGGTGTGATTAA
GTTTAAATGATACCATAAAGCTTCTTCAAGCTTAAAGGCTTGTGAGCTTGGTGTGATTAA
TAAATGTAATGGGGAGGAGCTTGTGCTTGTGATCCTAATGAGCTTGGGAGCTTGGTGTGATTAA
ACGCTGACGAAAAGTAGTCAAAAGGCTTGTAGCAACTTATGTTAGGTTGGCCGACAAGGACAGCAATTG
CTGAAAAAGTCTGATG

酵母番号 2: *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 3-ヒドロキシブチラーゼ-CoAヒドロゲナーゼ遺伝子
(hbd):
ATGAAAGGATGTTAGGGTCAGGTACTATGGGTTCAAGGAACTGCTCAGGCATTGCGACTAAAGGATTGA
AGTAGTTAACAGAGATTAAGAGTAAATTGTTGATAGAGGATTAGATTTTCAATAAAAATCCTTCAAATAGTTAA
ATGAAAAGGAGATAAGGAAAGCTACTAAAGTTGAAATTCTAACAGATTGTTCCGGAACATGTTGAAATATGGCAG
CTGATTGGCAGATTGTTAGAACAGCTGTTAGAAGAGTAAATTGATAAAGGACATTTTGCTGACTACGATACAT
ATGCAAGGCCAGAAAACATTCTGCATCAAATACATCATCATTCAATAACAGAACGGCTACGCAACTAAAGACC
TGATAGGTTGATGAGTGCATCTTCTTACAGCTCTGGTGTAGAGGTTATAAGGAAATATGCTACAT
CACAAAGAACATTGTTGCTGAGTAAAGAGACATTATAGCAATAGGAAAAAGTCTGAGAAGTGGCAAGAACGAG
GGATTGTTGATAATAGAATTAATACCATGATTAAATGAGCAGTTGTTGATATAGCAGAAGGAAATCTGAGTACAG
AAGACATGAGATAAGGCTAGAACATTGCTGAACTTCAACCATGGCCATTAGAATGTTGATTTTATAGGTCTGAG
TAGTTGCTGTTATAGGATGTTTACTACAGAAGCTGGAGATCTAGATAGACACCATACTTAAAGAAGTA
TGTAAAGGAGCAGGATGGCTTGGAGAAAATCATGGAAAAGGTTCTACAGATTAACTTAAAGAATAA

配列番号 3 *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 クロトナーゼ(crt):
ATGGCAACTAACAGCTTCTGTTGAAAGGAGGAAGGAAAGTGTGAGTAGCTTACCATTAACAGACCTAACAGCTTAAAT
GGCTTAACTGATGATCACTAAAAGAATGATTGATGTTAGTGGATAAATGAAATGATAGCGAAGTCTTGCGATGAA
TTTAACTGAGCAGGAGAAAAATCTTGTAGCAGGAGCAGATTTCTGAGATGAGAAGGAAATGAATACCATGAA
GGTAGAAATTCTGGGACTCTGGAAATGAGTGTGAGAATGAACTTCTGAAAGGCTCTGAGTCCTGTTGAGCTTGT
ATGTTGGCTTCTTGGAGGGCGCTGGCAAACTGATCTGCTTGTGATAAATGAGCTTCAGCAACCGCAAGATTG
GGTCAACCGAAAGTGTCTGGAAATACACCTGGTTTGTGAGTCACAAAGAGCTTCAGAGTATTGGAAATGGG
CATGGCAACAGCTTATATTACTGCACAAATATAAGGCAGTAGAAGCATTGAAAGCTGAGCTTAAATAAGGT
ATGAACTTCTGAGTAAATGAGCAGGAAAGAATGCAACAAATTTGAGCAATGCTGAGCTTCTGAGCTTGTGAA
GTTAAAGCAGGCTTAAATGAGGAAATGAGTGTGATATGATCTGCTTGAAGCAGCTTGTGAAATCAGAAAGCTTGG
AGAATGCTTCTTACAGAGGATCAGACAGCTTGTGAAATGAGAAGGAAATTTGAGGCTTCAAA
ATATAGATG

Figure 9

【 四 10 】

配子導管 4: *Clostridium acetobutylicum* ATCC2524 プリマー-CeA テドロガーネー (bcd):
ATGGGTTTAACTTAAACAGAGAACAGAAGATTAGTAAGACAGATGGTTAGAGAATTCAGGGTAACTTAAACCT
ATCAGCAGCAAATTGTAGAACAGAACAGATTCTTCAATGGAAAATGAGAACAAATGGCTAGATGTGTTAGG
AATTCCATTTCACAAAGAGTAGTTGGTGGCGCAGGTGGGAATGTATTCTTATAATCCCGGTGAGGAATTCAAAAG
GTTTGGGCTACTCACAGGTATTCTTCAGCACATCATCATTCTTGCTCCATAATGAGGACTGATCAGAACAG
AACAAAACAAAAAAATTATTAGCTTCTTACAGGAATTAAGGGAAAAAATGGCTTCTGATTGATGACTGAGCAAAATG
GAACAGATTCTGAGCACACAAACAGTCTGACTGAGGAGATCATTGTAAATTGTTCAAAATTATTCAT
AACTAATGGAGGAGGAGCATCTTCTTGTATTCAGTGCAGTGCAGAACAGAACAAACAAAGGATGATTCAG
ATTATACTGAAAGAACGGCTTCAGAACGGTTCTTCTTGGAAATGTTGCAAAACAGCTTGGAAATAGGCTTCAAC
AACTGAACTTGTATTGAGATATGAGTACCGTAGAAAAACATGATTGGTAAAGAGGAAAAGGCTTCCCTATAGC
ATTGAAAGAACCTTGTGGAGGAAAGATTGTATGAGCTCAAGCTTGAAGGTGATCTAACAGGCTTCTTACAGG
CAAGAGCTTCACTGAGAACGGAGAACAACTTGTGGAGAACGGCTTCAGAACATTCTTCAAGGTCTTCTGATGGATGAGG
AGATATGGATGAGCTTATAGAATCAGCTGATATTAGTATATAAACAGCAGCATATCTTAAACAGCAGGCTTCCATACA
CTGGTTAGCTGCCAGAACGGCTTCAAGCTTCTGCTGAACTTGTACATGGATGTAACACTAACGGCTGACATTATTG
GTGTTAGGACATATAACAAAGATTCTTCAAGGAGATGAGGAGCTAAGGAACTGAAATATGTGAGGAA
CTTCAGAAGTCTAGAAATTAGTATTCTCAGGAAAAATTTTAGTATAA

配列番号 5: *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 電子伝達ラビンタン/パク質(etfA):
ATGAATAAAGCAGGATACAAAGGGCGTATTGGTTGTCTGAAAGAACAGGCGAGATAATCAAAAAGGTATCATTGGA
ATTATTAGTAAGGCTGAAAGGAAATTGGCTGTTGAAAGCAGGTTGTAATTCAGCTTTACTTGACATTAAGCTA
AAAAATGCTAAAGGATTATTATCTCATGGACAGATAAGGTTTACAGCAGATAATGACTTATAGCACATTITTC
ACAGATGAGGATATGCTAAAGTATGTTAGGTTAATGAAAGAACGGAATAATITATCAGGACTTAC
AGAGGAGATTAGGAGCAAAGTAGACCGAACAGACTTACTGTTAACTGCTGATTACTCATCAGTACATAG
TGAGAAAATAGAGATTATTGCTCAAGACCAGCTTGTGAAATTGATAGCTAACATAGTTGTTCAAGCCA
CAGACCAACAACTGGCTACAGAACGGCTGTGTTGAAAATACCTGGTTAATGAGCAAAATGTTCTGATGAT
ATAAGAAAAGATTGCTCAATTAAATAACAGCTACAGACATAAACAAAAGATTGCTAAAGTGTGCTAAAGA
TATTGCGAGATATGGAGAACGCTAAGGTTATTGTTGCTGGTGTAGAGGAGTTGGAAGCAAGAAAATTCTGAAA
CTTGAAGGAGTTGAGCAAGTGTACTGGTGGAAACATGGCCGCTAAAGGCAGCAGATAAGAAAAGGTTGTTG
GGACCTTCAAGTGGCTAACCTGGTAAACCTGGTAAAGGCAACATTCTATTATGCTGGTAGTACAGGCTATCAG
CATTAGCAGGTATGCAAGATTICAGATTACATAATITGCTATAAATAAAAGTGTAGAAAGCCCATAATGAAGGTAGCAG
ATTGGCTATAGTTGTTGTAATAAAAGGTTGACCGAAATTATGCTCAAGGTTAAAGCTGCTAATAAATTA

配列番号 6: *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 電子伝達ラビンタン/パク質(etfB):
ATGAATAGTTGTTGTTAAACAAGCTTCCAGATACAGCGGAAGTGAATAGTACCTGCAAGTAAAGGGAAACACTTAA
AGAAAGAACGGTTCCATTAATAATCAGCTGATATAAAAGGCCACTTGTAGGAGGCTTGTAGTTAAAGATAATTAT
GGTCACATGTAACGTTATAAGTATGGACGCCCTCAAGCTAAATGCTTGTAGAAGCTTGGCTATGGGTGCT
GATGAGCTGCTATTAAACAGATAGGACATTGGAGGAGCAGATACACTGGCCTACATACATTCAGCAG
ATAAAGGACGCTTAAATGATAGTATTGTTCTGGAAAGCAGCTTGTAGTACAGTACATGCTCAGGTGAGGACCA
ATAAGCTGAGCATCTTGGAAATCCTCAAGTAACTTGTGAGAAGTGTGAGTGGAGATACTTAAAGGATTAG
AAAGACGCTTGGAGGATGTTGAGAAGTGTGAGAAGCAGCTTGTGAGAAGTGTGAGTGGAGATACTTAAAGGATTAG
TCTTCAAGATAGTGTAGTAAAGAAAATATTGCGCAGATTGTAAAGAAGTAAAGTGTGAGCTGGCATGATATAAG
GTGAGATAAGGCTTAAAGGTTCAACCTGGCAGATTGTAAAGAAGTAAAGTGTGAGCTGGCATGATATAAG
GGAGGAAGTTATTGATAAGCCTGTTAAGGAAAGCAGCTGCAATGTGCTCAGTAAATTAAAGAAGAACACTTATTAA
A

Figure 10

【 四 1 2 】

配列番号 14: *E. coli*-*Clostridium* シャトルベクター pMTL 85141:
CTCGCAAGGATAAAAATTAGTATATAATTATAAATGGTTCTACATAAATTITTCAGGAAACAGCTATGACC
GCGGCCGCTGTATCCATGACCATGATCAGAATGGCTGGAGCTGGTACCGGGGATCTCTAGTCGCTGCAGCAG
TCTTCAAGATTCGCGGCTCAGACATGAGCACTTGGCGACTGCGCTGCTGTTAACAGCTGTGACTGGAAA
CCCTGGCTTACCCAACCTTAATCGCTTGAGCACATCCCCCTTGCGCAGCTGGCTTAATGCGAAGAGGCCGCA
CGGATCGCCCTTCCCACAGTGGCAGCTGAATGGCGAATGGCCCTGACATAAAATAAGAACGCTGATTTGCA
GGCTCTTATTTATGGCGCCGCGCTACTCTTCTTATATAATGGCGAAGGCTGAATAGCGTGGAAAAGC
AGAAAAGATTCTTCTTCTCTGGTACAGGGGGTGCAGGGGGTGCAGTCTGAGCTGAATGGCGAGCGAAA
GCGAGCGGAAGGGTAGCATTCTGGTATAGAACCCCCCTGATATGCTCCAGCTTATAGATAAAGAAGATTCAAC
AGGTTAAATCTTATAGTTGAGGTAGATAAAGGTTATAAGGAATTGTTGTCTAATTTCACATTTGCTCAA
TTTCTTACAAAGATGCTTTTTTTTAAAGCAGTGTATGATAGTAAAGTGTATAAAGGAGTGGAGAAAAG
ATGAAAGAAGGAGTATGGAAAGCTCTATAAGGCTCTAGAGGCTCATAGCGAAGGAAAGTGGAGAATCTAGAGG
TAGACAAGTTACCGGAAACAACTCTGGTAACTCTGGTAAAGGCTATAGTCGTTAATAGTGTATAGTAT
ATTCGGCAGAAAAACTTAAATCTGGTAACTATCTCTAGATAATGCTCCTAAGTAAACATACAATGATGCTAAC
AGAGAACAACTGAGGAAACAGGAGCAAGAACAGTCACTAACAAAGCTTAAACACAACATGATGCTAAC
TTAAAAAGAAAAAAACTGGAGTATTAATGTTAACCTCTGACTCTAGAGGGCGCAGCAGAAAACAAAATAC
TCTTACTCGAATTGGGAAACTTGTGCAAGAGGGCAATAGGAAATAGTGTACCTCCCTAACACCAAGCTGTATTGG
GAGGTCAATCTGAAATGGCTTAAGGGGGGGCAGTGGGCAAGTGTGAAAATTACACAAAATGTTGTTAATATCT
TTGTTCTTATAGGCGATAAACCTTGTGAAAGGGGAACTTGTGATTTGTTAATGAAAATAGTGTGAA
CAGAAAAGAGTATTTGACCAACTACTTGTGAACTTGTGCAAGTGTACCTTCTACAGCATGACCGTTAAGTGGATACACA
ATAAAGGAGAAAAGGGAGAACATAACTTCTGCAATGTTTATATGCAATGTTGAAACGGCCTATGAGGT
AGGACGCGCAATCAACTAAGATGGTAATTGGGATATGATGAGATGATACCAAGCTATAACATTTTACAAATGATA
CTGAAACATTTCGACGCCCTTGGACTGTGTAAGTCTGACTTTAAATCTTCTTACAGGATATGAAAGTGTACCGA
ACGGTATGGAAACATCATAGATGGAAAGGAAAGGCAACATTCTGGCAGAAACATTTCATGTTACTGATACCGCT
TGCAACCTTGTGATGCCCTTATCTGAAATTGGAGAAAGGATGATTGTTGTTCTTATTTGCAAGGAAATTTA
TAAGAAGGATACAAAATACTTACCTTCTTGGCAATTCTGAACTTGTGCAAGGATCTGTTGACGGATTTCACATTGGCTT
TTGTAACAGAATTCTGAGGAATTGTATAATGTTAACCTTGTGTTCTGTAACCTAAACAAAGTATTAAAGCAAAA
CATGCTGAAACATTGGCTGTGTTCTGACTCTTGTGTTCTGTAACCTTCTGATACGACCAAATCTCTTAAAGT
GAGTTTCTGTTCTTACGGCTGTCAGGGCTGACGGCTGAGAAAAGATCAAAGGATCTTGTGATGCTTCTGCGTGA
ATCTGCTGCTGCAACAAAAAAACCCGGTACCAAGGGCTGGTTTGTGTTCCGGATCAAAGAGCTTACCAACTT
CCGAAGGGTAACGGCTTACAGAGCGCAGATAACAAACTCTGTTCTGATGTTGAGCCGTAGTTAGGCCACACTTC
AAGAACCTCTGATGACCGCCCTACATCTGGCTCTGCTAATCTGCTGTTCTGCTGACGGCTGCTGGCGATAAGTCG
TGTCTTACCGGGGTTGGACTACAGACGATAGTACCGGGTAAAGGCCGAGCGGCTGGCTGAACGGGGGGTTCTGCTGCA
CACAGGGCTGGTACGGCAAGGCAACCTACCAAGGCTAAGTACACTAAGCTGGCTGAGCTGTATGAGAACGGCAGCG
TCCCGAAGGGAGAAAAGGGCGACAGGTATCCGGTAAAGCGCAGGGTGCAGAAGCAGGAGAGCGCAGGGGGACT
CAAGGGGGGGAAACGGCTGTTATTTGTTAGTGTGCTGTTGGGTTTGTGCAACCTCTGACTTGTGAGCTGATTTGTGATGC
TGTGTCAGGGGGGGCGACGGCTTATTTGAAAGAACGGCAACGGCGCTTCTGCTGACGGCTGCTGGCGATAAGTCG
TGTCTTACCTGGTCTTCTGGTCTTACCTCTGGTAACTGCTGTTATACCGGGCTTCTGCTGAGCTGATACCGCT
CGCCGCGAGCGCAACGACCGCAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTAACAGCAGGGCC

Figure 11

【 図 1 3 】

配列番号 15: *E. coli*-*Clostridium* シャトルベクターpMTL 82254:

配列番号 25: C. *ragdalei* のメチルトランスフェラー遺伝子クラスター:

ATGTTTCCCTGTAATCATATAATTCAAGCAGGGAGATAGGAATATGAAATAATTGTAAAGATATTGAAAGAAAATTATAAT
TTTAAATTTAAAAAATACAGATGAGAAGAGAATATTCTTTATAGAACCTTATAGGCAAAGACTTAATATGAAAGAAG
AAATTAGCTTTTCAAGAAATACTAAACAGAAAATTATGAAATGGGAAAAAAACGGAGTAGTGTTATCTCCCGGA
TGGCAGCATTATGGTTAAAAACTTGTATAATGTCATGTGTTAATGAAATCCATTATAAAAGTAGTAGATCTTCC
TGTGGATCTGGAAATTAAATTGTAAGTGTCTTCTATCTTAAATCAATATTCTTAAATATTGAAAGTTAAATAGT
AAAATAATTAAATTGAAACTAAAGATATAAGTGTACCATATAGTACATAACAATCTATTGGATTGTGATAGTAA
ACTGCAAAATAAAGTTAAATAGACTATTCTTGTATTGCAACATGTTGTGAAAAAAATTCTTCAAGTAAAGGATT
TCTAGTGGAAAATATAGATAAAAATTGTGTTTATGGAAAATCTCCCATATTAGGACATAAATCTGTAGATTCA
GTTTACATATTTAAGGAAAATATGGAAAGTATAGAGATAAGGGAGATACCTTGTCTTCTTCAAA
CTTAAAGTCGTTAAAGAGGGGGAAAATCTTGTGTTACCTCCGAGATATTCTTGTGCACTTCTGAGCGGGAAAAG
AACTTAGAAAGTTTAAATGAAATACCTTCTTAAATATAAATATAGATTTTGTGTTAGAACGCTTTAAAGACTAG
GTATAGCTCAATGATAATTTTGTAGAAGAACAAAAATTGGGACAATATAGAAATCATAAGGCCAATAAAAGT
GGAAAAAGATGAAAAAAATAATTCTTGTCTTGTGTTAGATAATCTGAAAAATACAAAAAATTCTTCTTCTCA
AAAGCTATAAACTGTGATGGTTATTGTTAATGAAGTGGAAAAAAATATAAGGATAAAATAGAACGAAAAGT
GAATTATTAAAGGAGATCTGCATAGTTCTACGGGTTATAACGGGGTGTGATAGCTTCTTATGTGTTAGAGA
CACAACTAATAGTAGAAAAATTGAAATAGGTTAAACCCCTGGTGAAGAACGGCATTAAAGAACGAGT
ATTAAAGGTGAAAAAATTATTATACCAAAATTAAAGGAAATAGAGATAGAATGTCCTAATGCTATAAAGTATAGA
GCAGTACAAAAAAAGCTTATGGAAAAGAGAGAATGTAAGGAAAGGAGAACGAGAACGGTGTGATGCTTCAATGGG
GAGAAAAACCGGAAATTTCGAAGAAAAGAAAATTGTATTCCCATACAAATCGTGTGATAATAGATTGCTTGTATA
GGGAAGCTATTITAGTGAGATATATCTTGTGTTAAATGACCTTCTTACCTGATGAAATGCTTAAAT
ATTAAAGTCTTGTGTTAGAATTTCTTAAACCTTCTGGGAAAATTGTGAGAAAATCTGTTAGGAAATCTATAGTATTCTCA
TAATCTGCTGAAATTGTGTTATTCTTCTTGTGTTCTGGGAGAAAATCTGTTAGGAAAATCTGTTAGGAAATCTGTTAGT
GGCTGACAGATAAGAAGAAAATTCTGAGATTGTGAGAAAATCTGTTAGGAAAATCTGTTAGGAAAATCTGTTAGT

Figure 1E

【図14】

Figure 14

【図16】

配列番号 27: 誘導性 lac プロモーターと融合した新規なメチルトランスフェラーゼ遺伝子のスクレオチド配列: GCGGCCGCAACGCAATTATGTGAGTTAGCTCACTATTAGGCCACCCAGGCTTACACTTATGCTTCGGCTCG
TATGTTGTGGAATTGTGAGCGATAACAAATTTCACACAGAACACATATGTTTCTGGTCAATGCTATATGAAATA
TGGTCAAAAAAATTAACGACTTATGAGGAGATGGCAGAACAGTCAACATTAAAGACATTAAAGAACATGATGTTGG
AGAAAAGATGCACTTATGCAACGAACTTAAAGCAAAAAGAACATAGAAAGAAGAGATAGCTTATGGAAAGAATACT
ATAACAGAACAGATTATGACGGCAAAATTGGCTTGTGATCATCCGGCAGGAAATTGGCGCTTATGTTAAAAAT
CTGATCAACGTTAACGATGTTTATGGCAACCTGGTTTAAATACGACCCGAGCTGGGTAGCGGCACTTGCTATT
GCAAATGTTTCTGATCTGAATGCATCTTAAAGAACATTGGAGGTATTAACGCAAAAAAACTCTGAACTG
ACTGGAGAACATCAGCTACCATCTGGCAACAACTGTGGCTCTGATATTGACGAAACCGCAGTCAAGTGT
GAAAATTGATCTTCTGATCAGCAACCAAAATTAGCGAGAAAAATTTCAGGTTAAAGACTTCTGGTGAAGAAATA
TGTGCAACATATGAGCTGTTGATTGGTAACTCCGGCTATCGCCGCAACAAAGCTGGCAAGCAGCTGAGCTG
GCTGGCAAAACTTCAGCGCAGCTACCCGGCAACAAAGGGCATATCGATCTGTTCTTCAGAGGCGCTTAAAG
TCTGAAGGAAAGTGGCAACACTGGTTGTGACCGCCGCTACTTCGCGAGAGCTGGCGAGGAACTGGT
AAATTCTGTACGAAAACAGGACATTAAAGATCATGATTITTCAGCGCATCCGGCTGCAACAGCTGGTAC
GATCCGATGATTITTCCTGGTCTGAGAAGACTGGAAACAATACATTGAAATTTCGCGGAAACAAGATTGAAA
AGAACGAAAGAACAAATTCTCTGATGAGCTTCTGGACAAACCGAAAAGTGTAAAGAATTGTTGATAGCCA
GAAAAGCAATTAAAGCATGGCTGGGTTCTGGAGCAGAAGTGGAAAAAAACATTATGCAACAAATCAAGAGAAA
AGCAAGTCTATTGCAAGAGATTGGCAGATCTGCAAGCATTATCAGGGCTTGTGATCGCCGCTTATGTTGGACC
GTTGATACATCAAGTGGAGCATGGCTGAGTCTGGTCAATTAAAGCTGGTAAATTAGCAGCATTATCGCTTAAAGT
AGTATTAAAGGGGAAAAAATTCTACATCTATGCAACCTGATTGAGAATGAAACCGAGTGTGGCAATGGGATAAATAT
ATCGAACAGTCAAGAACACGCTGTGAGGAGCCGGAATGCAAAAGGGCACCGTAAAGTGTGATGAACTGCAAT
GGGGCCCTAAACGGAAATTCTGCAAGAAAAGAAAATTGTTTCCGATATAAGCTGTGACAACTCGTTTGTGACTG
GATAAGGGAGTCTATTAGCGAGACATTATGAGCTTGTCTGGAGAAAATTGAGCTGGCTTACCTGATGAGATCTG
CTGAAATCTGTAATGAGCCGCTGAGCAGTAACTTCTGAGGAAACTTCTGGAGAAAAGTGTGGTCAAGAAT
TATCTGGCAACAACTGATGAGCTGGTCTGATCCTGGAGCATGATTCTGGGTGAGAATGAGCTTAACTGAGAAGAAGT
GTGATGATTCTTCTGGCTGAGCGATGAAAGAATTGAGATGTTGAGAGATGAGCTGGAGAATGAGCTGAGAAGAATTC

Figure 10

【 四 17 】

配列番号 28: 新規なメチルトランスフェラーゼのタンパク質配列:
MFPCNAIYEYGDKNMNSFIEDVEQYNNFIKKIDVEEKMHFIEITYKQKSNSMKKEISFSEYYQKQIMNGKNGVVTYPPEM
AAFMVKNLINLWVNDGVPFIKIDPSCGSGNLICKFCFLNURIFKIVIEWNSKNNLNLKLEDISYHIVRNLNGFDIIDEATAIKV
LKIDFLIISNQFSEKNNFKVQFKDVLFWENIDRKYDVFIGNPPYIGHKSVDSSSYVLRKLYIGSYYIRDKGDIISCFQQKSLKCLKEGGH
LFVFTSRVYCECSGCKELRKFLIENTSIVKIIDFYGIRPKRVRGIDPMIIFLVRLTKWNWNNNIEIRPNKIECKNEKNKFLDLSFLDK
SEKKCKFSISQKSINNDGWVFDEVEKNIIDKIKEKSFKLIDCHSQCGIIYTGCDRAFIVFDRDIIINSRKIELRLIKPIWKSSHIR
SYFSADISYVLLKNNPVTYIEILLNLSNPPLYEFYFKTFPAKLGENLEYYEPVNNMLKLCIPISDFGGENNIEKKLYDFFGLTDKEI
EIVEKIKDNC*

Figure 17

【 四 1 8 】

Figure 18

【 四 19 】

配列番号 30: *C. autoethanogenum* (Y18178, GI:7271109)の 16s rRNA 遺伝子:
GGCTCAGGACGAA CGCTGGCGGTGCTTAACACATGCAGTCGAGGATGAAGCTCTTCCGGAGTTAG
CGCGGGACGGGTTGAGTAAACGTTGGTAACCTTCAAAAGGAGGGATAGCGGCCAAGGGAGATA
CGCATATAATCATGTTTACATGGAGACTGATTTAAAGGAGTAACCTGCTTGGAGATGGCCGCGCATTAC
CTAGTTGGTAGGGCTAACGGCCATCAACGGGAGCTGGTGACGGACTGAGGGTTAGTGGCCCAACTTGG
CTGAGAGACGGTCTCACAGGAGGAGCAGTGGGAATATTGCAACATGGGGAAAGGCTGTAGCAG
AACGGCCGGTGTAGTGAAGAAGTTTCCGATTGAAAGCTCTGTTTGGGGAGATAATACGGCTACCAAGG
GGAAGGACCGCTTAACATCGTCCAGCAGCGCCGTAATACGTAGGGCGAGCGTGTCCGGAAATTACTGG
GTAAGAGTGTGCTAGGGATATTAACTGGAGATGTGAAATACCCGGCTTAACCCGGACTGTATTCAACT
GGATATCTAGAGTGGGGAGAGGAATGGAATTCTAGTGTAGCGGTAAATCGCTAGGATTTAGGAAGAAC
ACCAGGGCGCAAGGGCGTATCTGGCGCTTAACCTGGCGTGAAGCGCAGAAAGGCTGGTGTAAACAGGATTAG
ATACCTCTGTAGTCCACCGCTTAAACGATGTAGACTGGTGTAGGGTATCGGCCCTCTGTGGCGCATTA
CACAAATAAGTACTCGCTGGAAAGTAGCTGCAAGATAAACTTCAAGGAATTGGGGGGCGCAGAAC
CAGCGGAGCTGTGTTTAACTGGAAGCAACGGAGAACCTTACCTGGCATACCTGGCAATATTCTAGA
ATAAGAGAAGCCCTGGGGCAGGGATAACAGGTTGTCATGGTGTCTGAGCTGTGAGATGTAGGTT
AAGTCCTGCAACAGCGCAACCCCTGTTAGTGTCAACATTAGTGTGAGCCTCTGCAAGACTGCGCGCTT
AACCGCGAGGAGGTGGGATGAGCTAACATCATGCCCCCTATGTCAGGGCAACACAGTGTCAACATTG
GCAGTACAGAGGAGAACAGCCCAAGGTTGGAGAACCTTACAAACTGCCCCCTAGTGGGTATGCGGTG
AACTCTGGCTACATGAGTGTGGAGTTGCTAAGTGGCTAACCGGAACTTACAAACTGCCCCCTAGTGGGT
ACACACCCGGCTCACACCATGGTGGCTAACCCGGAACACGGGAACTGAGCTGTCAAACTTAGGAGGAC
GTGGGGTTAGTATTGGGGTGAAGTGTCAACAAAGGTAGCGT

Figure 19

【图20】

Figure 20 (配列は図 21 に続く)

【 図 2 1 】

Figure 21

【 図 2 2 】

配列番号 39: *C. autoethanogenum* の二機能性ペルオノ/ブチルアルデヒドグローザンクレオチド酶:
ATGAGAAGAAATTGGTTTATAACAGCATAAAAAAATAAGAAGGAGGTGTCATAATGAAGGTAACATAAGGTAACTAACGG
TTGAAAGATTAATGAGAAAATGGTAGATGAAAGTCAGCGCTGCCTAAAGGAAAATTTCTGATCATCTAACAGAACAGTG
ATGAAATTTCAAGGCAGGGCAGCTATGGCCAGCCAATAGTGCTAGAATAGACTTAGCTAAATGGCAGTGGAAAGAACG
GGAAATGGGAAATTTAGTAAGAACAGGTCATAAAAATCTTGGTCAGAGATAATATATAACAAATAAGGTGAAA
AGACCTGCGGAGGTCTGGAAACAGATGAAGGCTTGGTGTAGATTGCGAACACCTGTAGGAGTT
AGATGTCCTACACAATTCACCAATCTACAGCAATTTAAACTCATATAGCTTAAACAGTAAAGTGTATA
TTTCACACATCCAGGCGAAAATACATCTAGTCAGCAGCTAAGATAGTACTGTGATCAGCAGTAAAGCTGG
GCCCTGAAGGAAATTAGGCTGTAGATGAAACCTTCTTGTAGAACAGGTCAGTGAATAGAACAGGACGACTA
ATTCTGCAACTGGTCGACCGGGTATGGTGTAGGCTGCTCATCTTCAGGAAAGGCTGCTATAGGAGTTGGCTCAG
AATAACACCTGCTGAAATTGATGAAAGTGCCTGACATAATGGCAGTAAATCTAATACTCTTAAAACCTTTGATAA
TGGTATGATTGGTCTGGCAGCAGCTAGTAAATGTTGCGAAGCTCAATATACGTGAAAGTCAGAAAGAGGTGAG
TAGAGGAGCATATATAAGTAAAGGTAGAACAGGAAACAGTAAAGGGTGGAAAACATCTAGTAAATGGCTTAA
TGGTATTGAGCCCCAAATGCTGCTTAAAGGTCAGATGGCGGGAGCTGACTTCAGGAAAGGCTGATA
AGGAGAGTAAATCGTAGAACCTGTAAGAACAGGCCCCTGCTCATGAAAGGCTGTCCTAGGTT
TGTGAAAGGAAATTTGATGAGAACGACTTAAAGGCTTGGAGAATTTAGTTGAGAACGGTGTAGGGTACATCTGTA
TGTGATGAAATTGCGGAAAGAAGTAAAGTAAAGGAGTTGAGAACAGGAACTGAGGCTGATGAACTTGA
AAATACTGCTTCAAGCGGAAGGGCTATAGGAGATATATAACTTAACTAGCTCTCTTGCACATAGGCTTGTGTT
CTGGGGGGAGGAAACTCTGATCAGAAAAGTGTGTTGACCTAACATTGTTAACAATAAAGGTTGCTGIGAGGAGA
GAAAATATGCTTGGTTAGTACCTGGAAAAGGTTTATTCATGAAAGGCTGCGGTTGAGTCCTAAAGAACAGT
AGAATTTGAGGAGAAAAGGGCTGTTAGTACGGCAAAATGCTTCAATGTTACATAGGTTAGTAACTTACA
AGAACCTGCTGATGAAATAAGAGTTCTATATAAATTTACAGATGTTAGAACAGGATCTACCAACCTTGTCTAGC
AGGGTCGAGCAGAAACTCTGCTTCTAGAACAGCATTAATTTAGCTGGTGTGTTGGCAGATGATGCTGCA
AGATCTGTTGGTATGATGAGCTCAGGAAGTAAAGGCTGATGTTAGCTAGCAGAACATCCGGCAGAACGGCTG
GAGTATGATTTCTCTAAGTGGGAGAAAAGGCAATGATGTTAGCTAGCAGAACATCCGGCAGAACGGCTG
GTTACTCTTGGCTGAGTAACTGGCAGGAAAGAACAGGAGCTAAATCTCTGGCTGATGATGAAATACTCCAA
TGGCTGATGTTGAGCAGAATTTAGCTGGGAGATGGCAACAGGCTGAACTGAGCTGCTGAGTATGCTG
CTGACTGCTGGGGCTGTTGCTGAGTAACTGGCTGAGTAAAGGCTGAGTATGCTGAGTATGCTG
TTCAATATTGCGCAATAGCTTATAGCAAGGGTACAAATTATGTAAGGCAAGGAAAAAAATGGCTCATCTG
TTGCGGGTATGGCTTGGCTGCAATGTTAGGGGTAGTGCCTACTTGTGACCATATAATTGGGAGCACAGC
TACACATGGAAATTGCGCAATGCTACTTGTAGATGAGTAAGTATAAAATTCAATGCTGAGGAGCTC
GCCGTTTCTTCAACATAATTCAGGAAAGTATGCTGAGTAACTGCTGAGTACCTTGTAAATTGGTGA
ACAGATGATGAAAAGTACATTTGCTATAATGCTATAGTGTACTAAAGTAAAGTAAATTCTCAA
AGAGGCAAGGAGTTGGCTGAGAATTAATCTGACTTGTGAGGAAAGTAAACATGCTGAGTAACTG
GGCTGCTTCAACAGGTTGCTTCAACATAATGAGAAAGTAAACATGCTGAGTAACTGCTGAGTAACTG
TGGAGAAGAAAAGAAGAAAAGTAA

Figure 22

【 図 2 3 】

配列番号40: C. autoethanogenum の二機能性ブローカー/ブチアルデヒドヒドロゲナーゼのAA配列
MRNRLFINSKINKEVSLMKVTVKTNVEELMMLKLDTEVAAQCKKFSSYTQEQQDFRQAAAMAANSARIDLAK
MAVEESGMGIVEDEKVHNKFVAEYIYNGKVEGTCVLEQDEGFGMVRIAEPVGIVAAVAVPPTNTPTSTAIKFCS
MAVEESGMGIVEDEKVHNKFVAEYIYNGKVEGTCVLEQDEGFGMVRIAEPVGIVAAVAVPPTNTPTSTAIKFCS
MAVEESGMGIVEDEKVHNKFVAEYIYNGKVEGTCVLEQDEGFGMVRIAEPVGIVAAVAVPPTNTPTSTAIKFCS
MAVEESGMGIVEDEKVHNKFVAEYIYNGKVEGTCVLEQDEGFGMVRIAEPVGIVAAVAVPPTNTPTSTAIKFCS
AYASGKPAIVGVGPGRNPVADISADIKMAVNSILLSFTFDNGMCASEQSVIVASSDEVKEFKDRAGVYL
KDETDKVGKTTIMINGALNAGIVGQSFKIAQMGAVSVSPEDAKILIGEVKSVEPEEEFAHEKLSPVLAGYKAK
DFDEALLKAGRVLVERGGGIGHTSLSVLYNSMITEKVKEFRETMTKTRTLINMPMSAQGAIDYINFKLPLSITLG
CGSGWGNNSVSENVGPKHLLNIKSVAERRENMLWFRVPEVKYFGSLVALKERLIMEKKKAIFTDKVLYQ
LGVDKTKNLDELRSVSKIFTDVEPDPLATAKKGAAELLSYPEDTIAVGGGSAMDAAKIMWVMMYHEPVEV
FEDLAMRFMDRIRKVVYFPKMGKEAMMISVATSAAGTGTSEVTPFAVITDERTGAKYPLADYELTPNMAIVDA
ELMMGMPKGTLTAASGIDLTHALEAVYSIMASEYETNGLALEATRLVFKLYPIAYTGTINIVKAREKMAHASCIA
DMMGPKNLFGVCHSMALHKQAHQHHPGIANALMIDEVIKFNAAEPRKQAAFPQYKPNVVKRRYARIADY
LNLLGGSTDDEKQVQLINAIDDLKTKLNPKTIKEAGVSEDKFTYPLTDMSELAFDDQCTGANPRYPLIGEIKQM
YINAFTDPKATVEKKTRKKK*

FIGURE 23

【図24】

配列番号41: *C. autoethanogenum* のナルバティヒドロキナーゼのヌクレオチド酸配列:
ATCAAGATCACAACGATGAGAAGAACATACTGAAAGAACAGTAAAGGAGAAATAACGGATGCTCAAAGAACAAAATTGTCACATAT
ACTCAAGAACAACTGGATGAAATTCTTGAAGCACGAGCTATGGCGCACTTAATGCTGAGATAAGTACAGCTTAACTGCTTAA
GGCATGAGAAGAAAACGGGAATTGGAGTTAGAACAGCAAGGTTTAAATAACCTACTTGTCTTCAGAATAATATATAAC
AAATAATAGGTAGAAAAACCTTGTGGATTITAGAGGAGAGATGCCGGCTTGTGATGAGATGAGGCTTAACTGCGAATAATATATAAC
AGGAGTTATGTCAGCAGTAGTCACCAACTAACTCCACATTCAGCAGCAATTATAACATTCAGTTCCTTAAACAA
AGAAATGTTGATAATTTTTCACCCATCAAGGGCAAGAAAATCAATTGTAGCAGCAGTAAATAAGTACTTGTGGCT
GGCACTTAAAGCTGGTCTCTGAGAAATTAATAGGATGAGTACAGGAACTTCCTGATGAGCTTACAGGTTGAGGTTATG
GGGAAGGCAAATTAACTCTTCACACTGTTGGTCGGGTATGTTAAAGGCTCTTCTTCTTCAGGCAACCTTCG
GGGGATTTGTCGAATGAAACACCTGGCTTAATGAGTCAAGGCGCAATAAAAGTCAGGAAATACTTAACT
ATCAAAAATTTGAGTATGAGTATGTTGCTCAGAGCTGAGTAGTAACTGTTAGACTAATATGAGGA
AAAAAAAGAATTGCTTATAGGGGTGCTTATATAATTAAGTAAAGGATGAAACAGATAAGGTTGGAAATAATTTAAA
ATTTGGGGCTTAACTGGAGTTAGGACAACTCTTAAAGTACAGCAGCTGGAGGAGTGTAGTACAG
AAAAAGCTTAAAGACTTATAGGAGGAGTAACTGGTAACTGGAAGAACCTTCTTCTGAAAGAATTCTTCAG
TTTGCTGTAGCAGGCAAGAAAATTGGAGTGCCTTGTGCAAAACTTGATAAACTCTGGTTAGGCGAGGTTGATTG
GACATCATCTTCATTTATAACATCAAGCAGAAAAGGAAAGAATGAGGAAATTATGACTATGATAAACT
AAGAACTTAAATAACACACCTTCATCCAAAGGGTTGATGTTAGTATATACTTAACTTACAGCTTCTTCTTGTGAC
AGGCTGGCTTCTGGGGGAAATTCTGTATCGGAAATGTGTTGGCCCTAAACATTATAAACATAAAAGTGTG
TGAGGAGGAGAGAAAATGTTCTGGTGTAGAGTACTGGTAACTGGGAAATTGTTAAATAGTACTGTTGGAGT
AAAAAGTTTAAAGCTTGTAGATAAGAAGAAAGGTTTATGAGTAACTGAGTAACTGGTTTCTTATAGGTT
GACAGTCAAGATCTGGTGTAGTGTAGCATGCAAGAACTTAAAGGTTAGGAGTAACTGAGTAACTGGTT
TAAGAAGAGAGATGTTATGTTCTTCAAGTGGGAGAAAAGGCAATGTGTTAGCTGCAACATCCGGAGAAC
GGTCTGGAGTAACTCTTGTAGTAACTGAGTAAAGAACAGGACTTAAATCTCATGCTTGTGAGTATGA
ACTCAGAACATGCTCATGTTGAGCAGAACTTATGGAGGAACTCAGGAGGACTTACAGCAGCTTGGCTTGTAGAT
GCTTAAACCATCTGACTGGCTATGTCATTAATGCTGACGAACTTAACTGTTGGGCTTGTGAGCT
AAGTTGATATTGAGTAACTTCAAGAACCTTACAGAAGGTACAATTAATGAGTAACTGAGGAAAGAATGGTCT
GCTTCACTTGTAGTGGCTTGTGCTTCAAGTCTGGTAACTGTTAGGAGTATGCACTTGTAGCAACATAATGGGAC
AGCATACATACACATGAGTAACTGGCTTGTGCTTCAAGTCTGGTAACTGTTAGGAGTATGCACTTGTAGTATGCA
AAACAGCTTGTCTTCAAGTCTGGTAACTGAGTAACTGAGTAACTGAGTAACTTAAACATGCTGTTGAGT
GAGGAAATCAGAAGGAGAAAAGGTTACACTTAAATTAAGTCTGATAGTAACTGAGTAACTGAGTAACT
AAACATTAAGAAGGAGCAGGAGTTGCAAGAATAATTCTGCTACTTGTAGTAACTGAGTAACT
TGTAGTCAAGGAGCTTAACTGAGTACACTGAGTAACTGAGTAACTAACAAATGTTGATA
GAACCAATTGTAAGAGTGAAGAAAAGTAA

FIGURE 34

【図25】

配列番号 43: *C. autoethanogenum* のブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼのスクレオチド酸配列

TTGGAAAATTGTGATAAGAACCTTACGTCATACAAAGAAGCAAGAGATCTTGACGCTTGAAGAAAATTCAGCAGA
CCAAATTGCTGTATTAATCTGAAAGAACAAATTGATAAAAATCTCTATGTTATATGGTTAGGGTAGCAGAAGGAAAATCGATT
CTCTGGTAAATGGCTGCAAAGAAGAACATTGGTTGGAAAAGCTGAGAAGATAAGCTTATAGAACCTATGGCTG
TACTACAGTATATAATCATACAGGATAGATAGACTGGTTATGGTTATAAGAACAGGAAATAGGGTGAATTGAA
TTGGAGAACCGATTGGTTTATTAATGGGTTATGTACCATCTAACATTCAACATCTACTGTTATTTATAATCAATT
GCAATTAAATCAAGAACATGCAATTGTATTCACCAACCCCCAGCTGCATTAAAATGTTCAACAAAAGCAATGAACTTA
TGCCTGATGCGAGCTAGCAGCAGGAGCTCTGCATAATGTTGTTATGTTACACCATCTATAACAGCTACAA
ATGAACTTATGAAAGCTAAGAAGTGTCTATGATAATTGCAACTGGAGGCCCTGGAATGTTAAAGGCTGCTATAGTT
CAGGGAGAACCTCTCAAGTGGCGTTGGTCTGTAACCTCTCCATTATGAAAGAACACTCTGATGTTCTCATACAG
TTAAAGGATATIACTGAGTAAAGTGTITGGTACTATGTTGTTCTCGAGCTTAATGCGAGAACAGT
CAACATCTGATGAAATAGTGTGTTAATTAAGAACAGGCGGATATTTCAGACGCTGAGAACAGCTGAAAGCTT
GCAGCTGCTTAACTGGCTTACACACATGAGCGCTAAAGTTGAGGAGACCTCTCAGGTATAGCAGA
GCTGCGAGTTTCAGTTCAGAAGGAAACAAAGTATAATAGGAGAACAGGCGGAGTTGGTATAGTTCTCAG
ATCTTATGAGAAACTTACAACAGTACTTGTCTTATACAGTTAAAGGATGGCTAGAAGCTGAGTGGAGCTTGT
TACCTTCAAAATGGCTTGGACATACATGAACTTACACAAATGAGATAGAGACTTGTAAATGAGTTGGCTAAAAAC
CAGCAGTCCCGTATCTTGTGTTAATCTGGTGAAGGCCAGGGAGCTGCTGTCAGAACAGCAGGATTAGCACCTGCTT
ACATTAGTTGTTGGTACATGGGGAGGAAGCTGCTGTTCTGAAAGATACTTACTCATACATTAATGAGAG
TACATGATGTTCTAAAGGTTGACTACATGCTGCTGTTCTGAGAACGATACAACCTTACATCTCAGTGGCGGAAGAAC
AAATGACTTGGATTGACTTGTCTGACACGGCTCGAAAGAATTTCAGCAGAAAGGAGATTGTGACTGACTCTGCGATGAC
TACTGATAATGATAACTGCTGAGACTCTGAACTGTTGCAAGGAGCTACTAA

配列番号 44: *C. autoethanogenum* のブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列

MENFDKDLRSQI

FIGURE 25

【図26】

配列番号 45: *C. autoethanogenum* のブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼのスクレオチド酸配列:

GTGTTGGAAAGATGCTGACGGAGCACAAAATGTTGACCAACCTTCCAAAGAAAAGCTAGATGAGATGTTGAAACGAT
GGCGGAAAGAATTCGGAAAACATACCCGAGACCTGTTGATTAATGTCACAGGTTGAACTGGTTATGGAAAATGGCAG
GATAAAATGTCATCAAAAACCGATTGTCGTTGAGTTCGCGACTAACGAGGAATGGCAGATGTTGAGTATTATA
ATGAAAATGGTCAGGAACGACTGGATGAGTGTGAGTCATGGTGTAAATTGTCATGTTGCTGCAACTAGTCG
GGTTTCTACTACCATATAAAGCATTGTTGCAAATTAAGCTGTGATTCATGCAATTATCTTTTCCACATTCAGAGCAA
AGGAGACAACTTGTAAAGGCGCTTGACATCATGATTGCGCAGCTGAAGGATATGGCTTCCAGAAAGGAGCTTGC
TACTTACACACTGTGAGCCCTAGTGGAAACATCGAAATTGATGACCAATTATGGCAGCTTCTTGTGATTAGAACAGGTG
TTCCGGGGATGCTTAAAGCAGCTATAATTCTGGGAAACCTGTTATATATGGAGGAACCTGTAATGGCAGCAGATTAT
TGAACGACAGCTACAGCATACAAACAGGCCAAAGAACTTATGTTGAGTAAAGCAGCTTGTAACTGCAACGGTAATGACTTAC
ACGCTAAACAATTTGTTGAGTACCTGTTGCACTGTAACTGTTGAGTCTTGCAGGAAATTAAGTGTCAATTATTC
ATGACAGACAGGAGGAAGCACAAGAAAATCTGGCTTCTCTTCTTCTGTTGAGTGGATTCTGAGGAAATTTGGTCAATT
CAAATCCGCACAAAAGATTGCTTAAAGCAGGTTTCACTTCTGAACTGAGCAGACTTCTGAACTTCAAGGAGCAGA
AATATGTTCTCAAGATACTCTTCTTCAAGGAGAAACTTGTGCGGTACTAGCTTCAACTATGGAAGATGATTTGATG
CTGCGATGAAAAGTGTTGAACTGCTGTTGAGAGACATGGTCACTACCTCTGTTATACATTCAAAGGACGAA
GATGTAATTGGCCAGTTGCTTAAAGAAAACCTGTTAGGTAGATGTTAATACCGCTGCTTCTTGGTGTAGTGG
GTGCTCAAGATACTTATTCTGCTGCTTAACTTGTGAGTGGATGCCGAGTGAAGGTTACCTCCGATAATGTTCA
CCGAATGTTCTTATTCTGCTGCCAAAGTCGATGAGTGGCTGAGTGAAGAGATTGTCATAACTAATGGATGT
TTACAGAGAAAAAAAGTAGTTGGAATGGAAGCACAAGGAGCTAGTCAACTATCCAGAGGATATAACAAATGTTACAGC
ATATTTAAAAAAAGCTAGTGGAAAAAAATTAATAG

FIGURE 26

【 図 27 】

配列番号 46: *C. autoethanogenum* のブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列

MENAARAQKMLATPQEKLDEIVERMAEIGKHTRELAVMSQDTGKYQWDQKCIKNRFACEYLPALKRGMRVCVGII
ENGQDKTMDVPGVPMVGIALLCPATPSVPTSTTAKIAIKSGNAIFSPHRAKETICKALDIDMRAAEYGFLPEGALAYLHTV
TPSGTILMHNIAHTSINTMGTVPGMLKAANNSGPKVIYGGTGNGPAFERTIDAKQVADISAKTFDNGVPSAESQSVIIE
CSAVDVKRLERLQNNQGYAFMTEEQAQKLGSLQKQDSEMVGMGSAQRLKAGKFSPESVLSIQLSYKVQVSQDNPQD
KEKLPVPLAYIEDWWHMAHECEKKILLSERHGTLIWHSKDEDVIRQFLAKLPKVGRLVNTPTSFGMSGMATNLSPALTG
SGSAGKGITSDNVSPMNLYIVRKVGYGVNREEVNTNGLTEEKSDLNGMTKSDSYNDPEIDIQMLQHILKKAMAKIEK*

配列番号 119: *C. autoethanogenum* のブタノールデヒドロゲナーゼのスクレオチド酸配列

ATGGCAAGATTCTTACCAAGAGACATTATTGGAGAAAATTCTAGAACCTTGAAAGACCTAGATGGAAAA
AAAGCTGTATTGTCAGGTGTTGATCCGAAACGATTGGATCTTGTATAAGGTAGAAACTTAAAGAA
GCAGGTATTGAACTAAATTAGAGAAGGTGGACCCAGATCCTCTGTAGAACCTGTATGAACTGGGCTAACTA
ATGAGAGAATGAGAACCGATTATTAGTCTAACTAGGTGGAGCTTACCAAGTACGCGAACAAAGCTATGGTGA
TCTCATGAACTCTCTGGATTCTTTAAAGGCTGGTGTGTTCTTGGCTCTCTAAATTAGAGAAAAGCACAC
TATAGCTGATACCTCTTAACTAGGTGCAACAGAATGAGCTTGTGTTCTTAAACAGACTATAAGCTTAA
AAATACCTTCTGGTACTCTTAACTACCCAGATAGCTTAACTGATCTGGCAGCTTGTGAACTAACAGCCTTAA
ATTAACTGCACACTGGAAATGGATGCACTTACCCAGTCTTGAAGCATATGTGAGGACTCTTACAGTCTTCA
GATCCTCTGGTACTTAACTAGGTGTTATGTTAGTAACTGAGTATTAACTTAACTGAAGATAAGAAGCTAGAAA
CCAATGCATTAGCTCAATGTTAGCTGGAAATGGCATTTCACAATGCCTTCTGGATAACTCAGCTTGTACAT
AAAACAGGTGCACTATTCTCTCATGGATGTGCCCAGTCAATATACTTCTCTTGTGTTATGATTCTAAATAAAA
GCTTGTACACCAAGATAGTGTGATAGTCTAGGACTCTTAAACTCAGGAAATCTAGTGTGAAATTGAGTATTCT
AAACTACATGATTAAAGATGATGAAAGAGTGTGATGTTCTTGTGACCTTAAAGGATTCGGGAGTAGTGAAGAAA
TTAAAGATAATGAAAGATTATTAAGCTCATATGCCGTATTAGCTGCTTCTGGACTTCAAACTTCAAGATTAAGA
TGTCTGAAATGAAAATTTAGTGTAGAATCATCTTATTGTGAAAGGGTGTGATTTTAA

FIGURE 27

【図28】

配列番号 120: *C. autoethanogenum* のブタノールデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列:

MARFLTPRDIYFGENSELTKLKDGGKAVIVGGGSMKRGFLDKVNVLYKEAGIESKLIEGVEPDPSVTVMNGAKLM
REYEYPDLVISIGGGSPIDAAKAMWIFYVEPFTEKAEVPGFLPKLROKATFIAPISTSGTATEVTAFSVITDHYAKIKYPLAD
FNLTNPDAI1DPAQALACTMPKQTLAHTGMDALTHAIYEAVGLHHSVDPLAQIAVMVNQYLIKSNEDEKARNQMHHLAQ
CLAGMAFGMTHGSLSLAHKTGAVFPHPGCANAIYLVPIVDNKKACTPRYADIARSLSKLPGNTDDELDVSITNMKID
MNKSMDDIPITIKNYGDFEKFYDNEAHLNAYUACTSISBPNEDAEKMKYIYVXKNCID*

配列番号 121: *C. guttanthemum* のゴケルテビンゴットー様のゴケルテビンゴットー

FIGURE 28

【 図 29 】

番号略語表 122: C. autotheanogenum のブランノードリゴナーゼのアミノ酸配列:
MGRFLPRTDIFYGENEVALNLKNDLGKNAVWVGGGMSKMRGFPLAKVEKYLKGTMVEKLVINGVEPDPSVDT
VMNGAKIMDRFPNDWIVSISGGSPDIAAKAMW/FIYEYPDITFKEVAV/PFGPKLRLRQKAQFV/AIPSTSGTATE
VTFSFSVITYDIAKAKYKPLADNFNLTPIIDDLPSAETMPLKTTAHTGMDALTAHSEYASLWSHDFSLPMLAHMT
VHLLKLYSSEEDEKARIGHMHQAICLQAGMAFSNALGITHHSIAHTKGAVFHPIHCANAIYLPVIFDNFKKA
RASTEEMAKLHLKGSNSEDELDLSTEMIRTMNKMDIPLTKDYGISENDENFLDIAHNAMEMDACTGNSP
RAITEEAKLHLKQMVYMQNGKVN*

FIGURE 29

【 囮 3 1 】

配列番号 54: *C. autoethanogenum* のファノールデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列:
MEIKLGGIIMERTFLPDRDIFYFGEGLAKTLKGKAVVWVGGSMSKRFGLDKVEEYLKEANIEVKLIEGVEPDPSVETV
MKGAKIMTEFGPVWIAVGGPSIDPAKAWLFLFYEPPDFTKQALVAPFPGPLERLQRQAKAFVIASTGTATEVTTSFSVITDV
KAKIKYPLADFNLTPIAIVDPALAQTMPPLTAHTGMGDLALTHAYASVARSIDSPLAHSIIMTRDNLLKSYGKGDAA
SISVCKMVSCLAGMFAVNLSSGHLAHTGAWVHPHGCANAYIPVYFLDNKKAKSDRVAIAKLQLGKGTTEDELUDV
SIVKVMVODMKFIPUPTKDGVSQDNEVDEIAKMAIATCTCAGTNPBDPDEAKVIIKUOIVKQKTT*

配列番号 55: *C. autoethanogenum* のブタノールデヒドロゲナーゼのスクレオチド酸配列:
 GTGAGGGATGTATTATGGAAAACCTTATTTAAAAATGTCAGAACAAATTATTTGGTAAGGATACCGAAAATCTGTG
 AGGAAGAAAGGAAAGGACTATTCAACTGCAGATAAAACTCTTGTCTATGGGGGAGGAAAGCATAAAAAGATCTG
 GTCTATATGATGAGATATAAGCTTAAAGGAAAGGATTAATTTGAACTCCAGGAATTAACCTTCA
 AGTAGGAGCTCTTGAAGAAGGATTAAGGATCTATGAGAAAATATAAATTTGATCTATCTGAGGAGGA
 AGTTCAGCAGATAGCGCTAAAGGATCTATGCTGAGGACTACCTTAAAGGAGACGTATGGGATTTTACGGGAAA
 GCTGAAGTGAAGAGGCTCTCTGTAGGAGTTGAATACATTCTGCTACAGGTACAGAATCTGATTAAGTCT
 GTTATATGATGAAGATGTTGGTTTAAAGGATTAATACAGTACTTATAAGACCTGTTTCAATTATGATACCC
 TGAAGCATTTCTTCAACTACAGGATTAACAACTGCTTGTGGCTTGTGAGCATATTGGGCCATATAAAGGAA
 TTCAACATTGTGAAACCTGATAGATAACTGATAGCGCTTCTGGCAAGGCTCACTTGAAGATTTAATGGCCCAAAT
 GTTTTAAAGATCCTTAAACACTGATGCTGGCAGAAATTATGGACCGCTTACATGCTCATATGATGTCCTA
 GTGCCGGTGTAGAATGGTGTGGCTTCTCACAAAATGAAACATGATTTGAGTGGGGAAACAGCACCTGGCCAT
 AGCAGGACTCTGCAATTGTATTCCTGCTAGGATGAAATATGTTATATAAACACGATATCAATGATTGTCATA
 TAAGGGTTGGGATGAGTATTCTTATGTTCTGCGAGAATGATTTGTCAGGAGCATAAAGGAGATGACAGCATT
 TTCAAGGACGATGGGGTACCTGTAACTTAAAGAAGGAAAGTATAGGAGAAGATAAAAATTGAAAGAATGCTATA
 ATGTCAGCGGAATATGGAACAAACTGTTGAGCAATTGTTGAAATTAATAGGATGATATTGTAAGGAA
 GCTTAAATTA

FIGURE 31

【図30】

配列番号 52: *C. autoethanogenum* のブタノールデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列:
MDAAKIMWVVMYEIPEVKDFEMLARMRDILKRVYVFPPKMGEKAMMISATSAGTGSEVTFAVITDEKTGAKYPLAD
YELPTDMVDAVLELMGMPGRGLTAASGIDLALTHALEVYVSMATEFTNLGAEALIVEALKLPIKAYTEGTTNVKAREKMA
HASICAGMAFANALVPHVCHSMAHLGLAQAHIPHIGIANALMIDEVKFNADVDPDCKQAAFPQEYEPNARYRYAQJID
NLNGNTTEEKVQLLNAIDDLKAQNIPETIKEAGVSDFKDFTYLDDKMSLAFDDQCTGANPRYPLUSEKIQMYINVFDKTE
PIVEEDEK*

配列番号 53: C. autoethanogenum のブタノールデヒドロゲナーゼのスクレオチド配列:

```

ATGGAATAAATTAAGGGGAAATAATGAGGAGATTACGGTTCCAAGAGAACATTCTTGGAGAAGATGCTT
GGGTGAAAGGAAACGAGCTTAAAGGTAAGGAAACGGCTAGTAGTTGGGAGGAGGATCAGATGAGGATTCGTT
CTTGACAGGAGTAGAAACTTAAAGAAGAACATAGAAAGTAACTATAGAAGGTGGTGAACAGTCGTT
TGTGAAACCGCTTATGAAAGGTGCCAAAATATGACGAACTTGGCCGAGTTGGATAGTGTCAATTGGAGGAGTT
CACCAATAGATGCTGCAAAGGCTATGGCTTATTTATGAAATATCCAGATTCTTAAACAAGCAATTGGCCGTT
GGTATTACAGAACTTAAAGCAAAAGCTAAATTGTTAGCTATAGCTTCTACTGTGAAACGCTAGAAGTTACTCTAT
TTTCAGGAACTTAAAGCTTAAAGCTTAAAGCTTACATGCTTGGTACTCTTCAATTGGACCCGGATATACTGATAGT
GATCCAGCATGGCCGAACTTGGCCACTTAAATTCAGCACATCTGGTATGATGCTTAACTCTGGTCAACTGCACTGAAG
CTTATGACTCAGCTAGATCATGATTTACGTCATCCTGGCAATATTGACAAAGGGATACTTCAATT
AATCTTAAAGGTGATAAAGATCTGAAATAAGATCATAATACAACTATGTTAGCAGGTATGCGATTTCTTAACTGCA
CTCTTGGTAACTCTAGTTAGCAGCATAAACAGGGCTGCTAGATAGATGCTTAAATAGCTAAATATTAGGACTTAAAG
CTTCCATATGTTTAAAGCTTAAAGGAACTTGGCTTAACTGCTAGATAGATGCTTAAATAGCTAAATATTAGGACTTAAAG
AACTCTGGAGATGTTGGTAGTTCTGTTAAATGCTTAAAGGAACTTGGCTTAACTGCTTAAATATTAGGACTTAAAG
TAAAGATATTGGTATAAAGGAAAGATGTTCTAAATCTTAAAGGTGTTTATGCAAAAGATGGCCCTTATGATGCATG
CTACAGGCTTAATCCAAAGGCTTATAGTTGATCATGAAAGGAACTTCAATCTTAAATGATGTTGGAAAAAGGTAA
ACTTTTAA

```

FIGURE 30

【図32】

配列番号 56: *C. autoethanogenum* のブタノールデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列:

```

VRDVIMENIFFKNTAEIIFGKDTEENLVGSKVEKEYSDKSDKLIFCYGGGSIKRSGLYDVRVLSKKGIEFIELPGLKPKNPRLGPVK
EGIRLCRENNIKFVLSSVGGGSAADTAKAIAGVPGVKGDVWDFYGTGKAEVKELPVGVVITLPATGTESNSNNSVMMEDGW
FKKGKLNTVLJRPASNNIMPELTFLPEQYTAGCADCIMAHIMERYFTNVKHVDITDRLCEALRNVNPNAVILPKDPKNYD
ARAIEWMVTAJHNDWLSLAGRIGDWASHKHLHESGETDHAJAGAHLFPWAAMVYKVKHIDINRFVQFAVPRVWDVLS
YSSCEDIVLEGIRRMATFFKSMGLPVTIKEGSIIFGDJKIIFMANKCTTNGTGTGCVKVIKNDKVVIIILAK*

```

配列番号 57: C. autoethanogenum のタノールデヒドロゲナーゼのスクレオチド配列:
ATGGAAGACAACTTGTAAAATTATAAATTTGAAATCCAAGATTATTTAATAGGGATCTTCAACTTGTAGAACAG
TCATCTGGTTCTGCAGCATTGTTGTCAGATGCTATTGAGGAAACCTTGGATCTTCAGAAAAGTAATGATTAACCTA
AGCAAAGCTGGATAAAGTTCTGGTGTGGGGGACACCCGTATCCAGACGCTCAAGTAAATTGCGATGCAATG
AAATTGTCACAAAAGGGCCGCAAGATGTTCTGAGCACTGTGGGAGATTCAGCTATTGATACCGCTAAAGGGAA
ATATGTTTGTGATGTTAGGAAAGCAATGGGGCAAGAATGAAAAAACTCTTATTTGCACTTCCAAACA
ATGGTCAAGGGCTGAGTAAACAACATTCTGTTATTACTCTCAGAAGAAAAGGTGATTTAGATGATTIT
TTGCACCATGATGTTCAATCTTGACTCAAGTTGATGTTATGATGTTCTGCTCAGCTATTGACAGATCTGGTATAGA
TTGTTCTAGTTCTTCAAGGCTATGTTCCAAAAGCACTGACTTCAAGCAGCTGGTCTGGATTT
AAATAATTGAGAATCTCCAAAATTATAAGCTAGTAAGGATTCCGAAGCTGAGATCTGTTCAAAACGCTT
CCCTGATAGCAGGAATAGCATTACAAATGCTGGTCTGGATTAATCACAGCTGGCTCATGCTATGGGGATCTT
CCACATTCTCAGGGCGCTGCCAATGCACTTCTACTAATGCGATAATGGAAATCACAGCTGCTCTGGTGGAAATGCA
AGCGAACATGCTATGGAAAATACGAAACAGCATCAATTCTACCCCTGGAGCTGCAGAACATCCTGGCAAGGGC
TGTAACTTATGAAAGCTGATATAAAATTAAAATCTCTGGTGTGAGAATATAATTGCGATCTTGGGATAAAG
AAGATGAGTCTGGCAAGCTCTAAATCATGTCAGGAAACAGCAAGTCAAGATGCTGACTCCAAACTTCTAGAA
AACCTCTCAAGAAGAACATTATACTTATTCAGAAATGTTAA

FIGURE 32

【 図 3 3 】

配列番号 58: *C. autoethanogenum* のブタノールデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列:

MEDKFVNLFNLKSKYIYNRESIQLEQVTGSRFAVDAIMGKLGYLKVIDYLSKAGISVVFTGVHPDPDVNVIADAMKL
YKKSDADLVALGGGSIDTAKIMFYGMLNGLKAMGEMKPKLPIAIPSTSTGTGEVNTFTVITSQKEKVCIIDDFIAFDPVA
IDLSSCDGLPQRATVDGTIDVLVHSIEAVSKKATDFTDLAKEAKLPIKINYDSKDEARSDHVQNASCIAFGIAFTN
ALGLINHLSHAMGGFSHPHGRSNALLNAVMENYASLVGNASEHAMEKYAKLASICHLPARTTREGAVSFIEADVKLI
KSLGVNDENRSLGIKEDEEFQSALNHMAMETAMQDRCTTPNPKPSKEHLHYIQCY*

配列番号 59: *C. autoethanogenum* からのリン酸アセチル／ブチリルトランスフェラーゼのヌクレオチド

ATGGAAAAAAATTGGAGTAAGGCAAGGAAGACAAAAAAAAGATTGCTTACGCTGAAGGAGAAGAAGAAAAGACT
CTTCAGCTTGTAAAAAAATAATTAAAGGGTTTGCATTAACTCTTGAGGAATGAAAGGTAATAAAAGAA
AAAGCGCTAAATTATAGGTGAAAGTTAAATGGAGCAGAAATAGTATGCCAGGAGATTCAAGATAAACCTAACGGCAT
GCGATGCTTGTAAATTGAAAGGAGAAGGGAAATACGCCAGAAAGCGGATAAAATGAGATCTAAC
ATACCTTGCTACATGTTAAACTTGGAGATCGAGGTTGGTTTCAAGTCCGGTTCTACATACAGGCCATT
TTTGAGCACAGGCTTCAATAGTAAAGCAGCTCCAGGTACATCAGTAGTTTCACTTAAATGGAAGTAC
AAATTGTTGAGTAGGTGACAACTGGTTACTCTTATTTCGATGTTGCTGTAATCCATGCCAGATGTTCTAAC
GCTTCATTGCAATAAGTACAGCAGAAACTGCAAAGAACCTTGTGGAATGGATCAAAAGTAGCAATGCTTCAATT
TCTACTAAGGGAAAGTGCAAAACACGAAATTAGTACAGAACCTTGTAGGAAATGCTGTAGAGATTGCAAAAAGCTAAC
AGATTAAATTTAGCGGAAATTACAAATTAGTCGCTTATCGTAGAAAAGGTTGCAAGTTAAAGGCTCTGGAAAG
TGAAGTACAGCAGGAAAAGCAGAAATGTTTACGAGCTATCCAAAGCAGGAAATATGCGCTTAAACCTCGTCAAAAG
ATTGCAAGAACAGCAGTCTAGGACCTGTATGCCAGGATTGCAACAAACCTTAAATGATGTTGCAAGGAGGTGAA
TCTCTGATGATATGTTAAATGTTAGTAGCTGTCAGCAGCTTCAAGCAGGCTTAAAGGTTAA

配列番号 60: *C. autoethanogenum* からのリン酸アセチル/ブチリルトランスフェラーゼのアミノ酸配列

参考文献 33: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1257449/> (アラタのウツ病)セラフマテリアルズブランクセラーゼの氨基酸配列:
MEIWKASAKEDKKVLLAEGEEERTLQACKEKIGEIANLUVNGNEKVEKAKSLGNGLVAEINGDEPDIEKLKAYADAFYEL
RKKKGITPEKADKIVDRPIYFATMMVKLGDADGLVSGAVHTTGDLRLPQLQVKTAPGTSVSSTFIMPEVQEYGDNGV
LLFDACAVNPCCPDSQDLSIAISTAETAKNLCLGMDPKVAMLSFSTKGSKAHLVDKRNRNAVIEAKKAPDKPLSDLGELQLD
ASIVEKPKSALKAGPSVEAGKANVLWFPDIQAGNIGYKUVRFAKADAIPVPCQQGFKPKINDLSRGNCSRDIVNVVAVTAV
QAOAQ**

FIGURE 33.

【図34】

配列番号 61: *C. autoethanogenum* からの酢酸／酪酸キナーゼのヌクレオチド配列:

ATGAAAATTTAGTAGAAACCTGGAAAGTCACTTAAAATATCAACTTATGATGATGCAAGATGAAAGTGTGTAAGC
AAAGGGCTTGTAGAAAAGAATAGGAACGGCTTAATTAAACACAAAAGTAAATGGAGAAAAGTGTGTAACAG
AGCAACCAATGGAGACCCAAAAGTGTATACATAATTAGTAAATAGCTTGTAGATAAAAACATGGTGTAAATAAA
AGACATGTAGAATATCCTCGTAGGACATAGATGTTGACGGTGGAAAAGAATAGCAGCATCTTCATTTATGTA
CGAAAATGTAATGAAACCAATGAAAAGTATGTTCTTACAGGACACTACATACTAACGATTAATAGGAAATGAT
GCTTGTAAAGAAAATTAATGCCAAATCTCACTAGTGCACTATTITGATACAGCTTATCATGACAATGGCAGATTG
CTTAACTATGCAATCTTATGATATACTGAAAGTATGATCATGAGAAAATATGGTTCTTCAGGAACTTCATGAG
CGTTCAATTGAAAGCAGCTAAATTTAAAGAAAAGATCCAAAGATCTTAAAGTAAATACCTGTCTTGGAAATGG
GCTGACATATGTGCACTAACCAAGGAAAAGCAGTAGATACAACTATGGACTTACTCTCTTGAGGACTGTAAAG
GGAACATGATGCGGTATAGATGCCAGTATGACCTTGTGATAGAAAAGAACGGCATGTGTGATAGTAAGTG
GATACCTTAAATGAAATAAAAGTCAGGAAATCTTGGAGTATCAGGAGTAAGCAGTGATTTAGAGATGTAGAAAAGCT
GCAAAATCAGGAAATGATGAGCAAAATGCTTAAATGATATCACAAGGTTAAATCTTCACTAGGAGCTTATG
TGTGAGCTTAAATGGAGCAGATCTATAATTTACGGCAGGACTTGGAGAAAATTCAGCAAATGAGCATCTGCTA
TATGTTAATGTAAGTAACTTTGGAAATAAATGATGAAAGAAAAGATAAGGGGAGGGCATAGAAAATA
AGCACACTGGATCAACAGATAAAAGTATTAGTAACTTCTACAAATGAGAAAGACTTATGATGACTAGGGATACAAAAGA
ATAGTTGAAAATAAATAA

配列番号 62: *C. autoethanogenum* からの酢酸／酪酸キナーゼのアミノ酸配列:

MKILVNCVGSSSKYQLIDMQESVVAQKLVERIGMDGSILTHKVNGEKFVTESPMDIEHVIAQLVLNLDIKHGVIK
DMSEISAVGHRVLHGGKKYAAISLIDENVMKAIECIPGLPGLHNPNAMIGDACKLMPNTPMVAVFDTAFHQTMPDFYA
YTVAIYDISEKDYRKGFGHTHSRFVIAECAKLKDKPKDLKLTKLHGNGASICAQNCGKAVDITTMGLTLAGLUMGTR
CGDIDPAVIFPVFMKRTGMSVEDTLMNKSGILGVLGVSSDFRDVEEAANNSGRDAKLNMYYHVKFSGIVAYAW
LNGADAIATFLGELENSTARSICAIYNGEFGDFKNKFRGFLFSTPSKUWVITNEFMIARPDYTFEN*

FIGURE 34

【 囮 3 5 】

配列番号 63: *C. autoethanogenum* からのアルデヒド:フェレドキシン酸化還元酵素のヌクレオチド配列:

GGTGAAGAATTGAAAATGACAAAGCTAAAAAATTITAGGTGCAAGGGGGTTAGCGCTAAACCTTATTGAGA
AGTAGATCCAAAGGTAGATCCTATTACCTGTAAACAAATTITATAGCAGCGGGACCATTACAGGTGACCTGTT
CCAACAAGCGGAAGATTCTAGGTAGTTACTAACCTTAAACCGGAACTATTGCTATTGCAAATTCTAGGTGAAA
TGGGGAGCAGAAATTCTAACAGCGCTGGTAGATGTGATACTCTGGTTGAAGGTAATCTGTTAGA
ATAGTAGATGATAAGTAGAAATTCTAGGTAGCTTCTGTTCTGTTGGGGAAAACCTAACAGGAAGAACATAAAAGTCT
CAACAGGAAACAGATCTAGCGCTAGGTGTTATCTAGGACCTGGGGAAAAGTTACTATTGCGCACAG
TTGATGATGTTGATAACAGACGGAGCTGGTGTGTTGGGTTAAAGCTTAAAGGACTTAAAGGCTATT
GTAGTAAAGGAAAGCGGAAAAGTAAATTITAGTAAACAAAAGTGAAGGAAAGTAGCATTGAGAAAACAAA
TTTAAGGAAAGATCCAGTAGCTGGTGGGAGCTTCAACATACCGGAACAGCTGTACTTGTAAATTATAAAGAAA
ATGGTGTCATCCTAGAAAGAATTCTAAACATTCAGATCAAGCAGATAAGATCAGTGGAGAAACTTAACTAA
AGATGGCTTAGGAAAAAAATCTTGTCTAGGTGTTCTTGCCTGTTGGAGATGGTAAACCTTGTATGGAAAC
TGAATGTGAGGAGGACAGAATATGAAACATTAGTCATTGGATCTGTTGAGTATAGCTATAAACTGCTGTAATA
CAGCAAAATATGTTGTAGTAAATGGACTAGATACCATACAGGAGGTACTATTGCGAGCAGTGTAAAGG
CTAAAGGGATTTATAGGATGAAAGAATACAGCAGCTGGTACTTGTCAATTGGGGAGATGCTAAGTCCTAGGT
TGAATGGGTTAAAGAAATGGGACTTAGAGAAGGATTCTGGAGACAAAGTGGCAGATGTGTTCTACAGATTGTCAC
TCATACGGGTGACTCTGAGTATCACTGACTTAAACAACTAGGGGGAGATGTCACATTAGGGATATGTTAGTCTCTGAA
ACATGGCATTACTTGTGTTAACATAGGGGGAGATGTCACATTAGGGATATGTTAGTCTCTGAAATACTTGG
TATCCAGAAAACCTTGTAGACTGCTGGAGGAAAAGCAGGATATGTCAGTATTCTGTTAACAGCTGTT
ATAGATTCTGGTATTGTTTACACATTGGTCTGGCAGACGGATTGTGTTGATATGTTAGTCA
GGTGGAGAATTCTAGTGTAAATTCTTAACTGTTAGCTGGAGATAGAATATGGACTTGTAGAAAATTTAACCTAA
AAGCGCAGTATGTTACGAGCTTCCAAAGAGATCTGGTGTGAGAACAATTCCAGAAGGACCTCAAA
GGAGAAGCTTAAAGGATGAGTACTACCTGTTAACATAGTCA
AGGAAACGTTAAAGAAATTAGGATTAGTAACTGAGTGTAGGTT
AGGAGGTTAAAGGTTAGTAACTGAGTGTAGGTT

配列番号 64: *C. autoethanogenum* からのアルデヒド:フェレドキシン酸化還元酵素のアミノ酸配列:

MEELKIDKAKFKFIGARGLGVTKLFDDEVDPVKPDPLSPDNKFHIAAGPLGAPVPTSRGFMVVTKSPLTJIAIANGGKGWGA
EFLKAAGYDMIIEVEGSKDKEVVNVINDDKVEFRDASHVWGKLTEETTKMLQEQTSRALKVCLGPGAKLSLMAAVMND
VRDTAGRRGGVAVMGSKNLKAIVKGSKGVLKDQECKVKEALEKTNLRKDPVAGGGLPTYTAVLVIINENGVHPV
KNFKQSYTDQADISGETLTKDCLVRNKPNCYPCRACGRWVKLDGDTCCEGPYEYLWLSFGSDCDVYDINAVNTANML
CNEYGLDTTIACTAAAMELYQRGYIKDEBIAADGLSLNWGDAKSMVEVWKKMGLREFGDKMDGSGYRLCDSGV
PEYSMTWKVQLPDLPRGIQHGYITYAVNRRGGCHGKGYMSPEI.GPEYKLDRLAVEKGKAGYARVFHDLTAVDSLGLC
FTFLGGLQDGVDVMYNAVGGLHEVDNSLMLADGRIRWLEKIFNLKAGIDSSQDTLPKLRLLEQIPEGPSKGEVHKLDV
LLPEYSVRGWDKNGKPIETTELTKLKLGDVEYVGLK*

FIGURE 35

【 図 3 6 】

配列番号 65: *C. autoethanogenum* からのアルデヒド: フェレドキシン酸化還元酵素のヌクレオチド配列:

ATGTTATGGTTATGGTGAAGGATAATTAAAGGAAAGAACCTGCAATCAGAAAATTAGT
TTAGAAGTCATAAAAGGTTATGGTGTAGGGACTAGGTAAACCTTTATGTAAGATAGCTT
AAAGATGCTATTACCGAAAAATAATTATAATGTCAGTCAGCTTCCTACTGGACTCCGTTTA
ACTAGTGGAAAGGTTATGTTAGTGTAAAGCACCGCTAACAGGAACTAGGAACTTCAATTGGTG
GAAAATGGGAGTAGCTTAAAGGAACTGGTGGGATAGATAATAGGAGATAAGGCTGTCAAC
AGTTACATGTAAGAATAGTGTAGTAAAGGATTAAGACGGCTGCACTGGGGAAAGGATTCAT
CAGAACTACAAGAGTTAGAAAAGATAACTGAGAAATAATCAAAAGGTATATGTTAGGACCTGCTGGT
GACAGTGTCTTATGGCAGCTATGTTAGTGTAGTAAAGCAGGACAGGGCCGGCTGTGGT
CATGTTGGCTTAAACAACTTAAAGGTTATTACAGTTAAAGGAACCTGGAAAATAGCTTGTGATAAA
GAAAAGTAAAGGTTGTCGTTAGAAAATACCAATTAAAGATGTCAGTGTGTCAGGGAA
TGGCACTTATGGTACGCTACTATGGTTATAATAAAGGAAATGGAGTTCATCTTGTAAGGATTITCA
AGACTTCTTATACAAAGCAGATAAAATAGTGGAGGACTCTTACGTTCAACCATGTAAGGAA
ATTCCTTGTACGCTGTCTTATGGTTGGAAGATGGTGTGACTAAAGAATGGCAGACTGGGAG
GCCAGAAATGAAACACTGTTGGTTTGTGATCTGACTGTGTTCTATGATTAGTGTCTATAAAG
CTATAGTTATGTAATGTTAGTGTACTATTACTTGTGTCGAACAACTGTGCTGCGATCTGATT
TTTCAAAAGGAGATAATAAAAGCAGGAAGAAATCTGGAGATTAACCTCTTCATGTTGAGGTTGATACGG
AATCTGATGGCTGGATAAGAGAATGGTATAGTGTGAAAGCTTGGAGCAAAGATGACAAATGGTCA
TATAGGCTTGTGAAAGGTTATGGACCCGGAGTCTTATGACGATTTAAAGGAGCAGGAAATTCCAGATA
TGTACCAAGGGGATAACAGGGCACCGGTTACCTATGCGTAATAATTAGGAGGCTGTCTATAAAG
GATACATGATTAAACCTGAAATTATGGTTATCTGAAACACTGATGTTGCTTGTGATTTAGGAAAGC
CTTATGCCCATAATTCTTACGATTTAATGCTGTAAATTGATTCTTGGATGTGCTATTTACTACATTGGG
CTTGGAAACACAGGATTATGTTAGTGTATAAGCAGTAGTGGAGAAACTCTAATGATGCGATCTTACAT
TAGAGGCGAGGAGATACTGCTTGTGAAAGATAATTATTTCTTCAGCTGGAGAACAGCAGGGCA
GGGATACTCTACAAAGAGATTGAGAAGACCTATTCCAGATGCCATCAAGGGAGAAGTCTATGG
CTAGATGTTCTTCAGGAAACTATTACTGAGTAGGAGGAGTAAAGGGTACCTACAGAAGGAAAC
ATTTAAAAGAAATTAGGATTAGTGTATAATTGAGTGGATTCTG

配列番号 66: *C. autoethanogenum* からのアルデヒド:フェレドキシン酸化還元酵素のアミノ酸配列

まつゆは 65. リバーフロントのアーチ橋を渡るトランクルームのアノ配列で、
MYGDVKLIRNLKERTCKSENLDLDAKKFKCIGRLVKGTLFEDPDKDALSPEHNTVGTPLGAVPVTSG
WFTTVPKALTFITGNSGGKHWGVLBLLKAGWDIMIVEKDADPSVYIEV1DDKVEIKDASQLWGKVKTSEETK
ELEKINTENKSVCILVGAGERLSLMAVMNDVDTRAARTARGVGAIVMGSKLNKAITVKGTLKADALKEVKVV
SVEKITLNDKPNVAGQGMPTYGTAIILNIIENNGVHPVKNFCESYTNQADKISGETTANLQRVKNCPSCY
GCRGVWRLDKTCGEGPYETWLCHKMSWYSCFGDYLDAINANMLCNEGYIDTGTGATIAAMELYRQGYIKD
FEIAGDNLWKDGTEMSWIGWIKRMVYSCFGAKMTNGSYRZCECGYGAPEYSMTVKKQEIPAYDPRQIGQH
GITYAVVNMRGGCHIKGYMPINPELGYPEKLDRFALDGKAAYAKLFHDITAVIDSLGLCFTFLGQDHYDMVNN
AVGVESTLSDLEAGDRWTLEKLFNLAAGIDSSQDTLPKRLEEPIDPGSKGEVHRLDVLPEYSVRGW
SEKGSTEPTETTLKLGLDFTYIGK*

FIGURE 36

【図37】

FIGURE 37

【図39】

配列番号 69: C. *lunghadillii* の二機能性プロモーター/プロモーターディレクターゲーネーのスクレオチド配列: ATCTAAAGGATTCACCAACTAGGAAACTAGAATGAAAAGCAGGAAATAAAGGTCTGCCAAAGAACATTGGTCAATAT
ACTCAAAGAACATGGTGTGATTAATTAGGAAACAGCAGTCTGGCAGCTAATAGTGTAGAACTAGGAACTGTTAATG
GCAGTAGAAGAAAAGCGGAATGGGAAATTGAGAACAGGTCATAAAACATCTTGGCTCAAGATAATATAATATA
AAATAATAGGATGAAAAAAACCTGTGGAGTTAGGAGAGATGGCAGGATTGTTAGTGTAGAAATTGCGGAACCTGT
AGGAGTATCGCAGCAGTCTGCAAACAACTAACATTCAGCAGATAATTAACTACATACTTAACTTAAAC
AAAGATGTTATAATTATTTCCACCCATTCAGGCGCAAAACATTCATGGCAGCAGATAATTAGTCAGCTGG
GCAGTAAAGCTGTGCTCTGAGGAAATTAGGATGGATAGTGAACCTTCATTGTAACCTTCAGGTTAG
GGAGAGAACAAATTAACTTCAGCTGAGCTGGCCGGGTAGTGGTAAAGGCTGCTTCAAGGCAACACCCTGT
GGAGGTGTCAGGAAACACCTCTGTAATITGAGAAATGCGCAGATAATTAGGCGATATAATTCAT
ATCAAAGACTTGTATAATGGTATGTTGGCTCAGAGCAGTCAGATAATGTTAGACATAATATGAGGAATG
AAAAGGAAATTGTCCTATAGGGGTTGCTATATAATTAGGATGAAACAGATAAGGTTGAAAATAATTAAAAA
ATGGCCTTAACTAGCAGGTATGTAGGACAACTCTGTTAAATAGCAGCTGGCAGGAGGTGAGTGGAGCA
AAAAGCTTAAGTACTAGGAGGAGTAGTACCTGGAAACCTGGAACTTCTCATGAAAGATTCTTCAGCT
TTAGCTGTAGCTGGCAAGAAAATTGGAGGTGCCATTGCAAAACTGTATAACTGGTAGCTGGTAGGATTG
GACATACCTTCATATAGGAACTTCAGACAGAGAAACAGGAAATTAGGAAATTATTAGTACTAGTGTAAACATC
AGAACATAATTAAACACCTTCATCCAAAGCTGTGTAGTGTATAATATAATTAACTTAACTGCTCTTCTTCAAG
AGGCTGGCTTCTGGGAGGAAATTCTGTATCGGAAATGTGTTGGCTCAACATTATAACATAAAAGGTGTTG
TGAGAGGAGAGAAAATTCTGTTGGTAAAGTACCTGGAAACCTGGTTAAATCTCATGTTAGTGTCTGGAGTGTGATT
AAAAGAATTAAAGGTTAGATAAGAAGAAATTGTAGTACAGATAAACTGTTCTTCAATTAGGTTATGAGTGTGTTG
AAAAGTACCAAAAGTTCTGGAGGAACTAAATTCTCATGAACTTGTAGCTGAGACAGGACATCCCTGCA
CAGCTAAAAAGGTGCGAGCAGAACTGCTTCTGTAGACCGGATAACATTATAGCTGGTGGTGGCTCAGCAATG
GATGCGCTAAGATCTGAGCTGGTAAAGTGTAGCAGCTAACAGGAAATTGGAATTGAGTGTAGTGTAGATTGTGATA
TAAGAAGAGAGTATGTGTTCTTCAAGTAGGGAGGAGGCAAAAGCTGTAGTGTCTGGCAGACATCCGGAGAAC
GGTCTGGAGGACTTACTCTTCTGGAGTAACTGATGAAACAAAGCAGCTAACTTCAATGCTGTTAGTACAGA
ACTCTGGAGCAGATGCTAGTGTAGCAGCAATTGTGGAACTGCCAAGAGGACTCTAGCAGCTGCTTGGGTATGAG
GCTTAAACCTGAGCTGGCAGGAGCATGTGTCATAATGCTGCAATTGATGGTACATTGTTACCTGGTAAAGCAGA
AAGTTGATGTTGATGATAATTACCAAAAGCTTACAGAACAGGTCACATAATGTTAGGAAAGGAAAGAAGGTT
GCTTCAGTGTGAGCTGGTGTGAGTGTAGCAGCTAACAGGAAATTGGAATTGAGTGTAGTGTAGTGTAG
GGTCTGGAGGACTTACTCTTCTGGAGTAACTGATGAAACAAAGCAGCTAACTTCAATGCTGTTAGTACAGA
AAACAGCTGGCTTCTTCCAAACTAGGATGTTAGGAACTTGTAGTGTAGTGTAGCTGCTAGATGCTGTTAGTGT
GAGGAAATCAGAGAGGAGAAAAGGTACACTATTAATAGTACAGTGTAGTGTAGTGTAGTGTAGTGTAG
AAACATTAAGAAGCAGGAGGTTCTGAGAAGATAATTCTGTTAGTGTAGTGTAGTGTAGTGTAGTGTAG
CTGAGTGTAGGAGGACTTACCAAGATGTTACCAAGATGTTACCTGAGTGTAGTGTAGTGTAGTGTAG
GAAACATTGAGTGAAGGAGAAAGTAA

FIGURE 39

【図38】

配列番号 68: C. *jungdahlii* の二機能性ペタノール/チルアルデヒドヒドログレナーのアミノ酸配列:

MKVTKNTVNEELMKKDEVAQAKKKFSYTYQECDVEIRFRQAAAMANSRDLAKMAVEESGMIVVEDVKVIKHNVAEYIYNKYKGKECTGVQLEQDGFGMVRAEPVGYIAAVTPNTPTFKSLSIALKTRNGIVFSPHPRAKSTIAAKVHLDAAVKAGAPEGIVWIDESPLSLSQMEKAUDLITGGPVMVKAAYSSGKAIVGVPGNPVAIVEDASIKMVAWSNLLSKTFDNGMICASEQSWSVASSVYDVKMVEKFADRGAVYLSDETEVRGKTIJNGLANIGVQFSQAFKIAQMGAVSVPEADPKVLAKYVKSVEPEEEPAHEKLSPVLAAMYKAKDFDEALLKAGRILVERGGIGHSTSVLVNVNAMTEKVKEVFRETMKTGTRLINMPSAQGAIDGNYFNKLAPSLTLCGSGWGGNSVSNEVGPKHLLNKSVAERRENMLWRVPRVEKFVYKGSLGVALKERLIMEKKKAIFVTOKVLYQLQGKWDITKLNDELRVSYKJFTDVEPDPTLATATKKGAELLAYPEPTDIAVGGSMSADAAKIMWVMYEHPRVFERDLMARFRMDIURKRVYFPPKGMKECAMMISVATSAGTGTPTFAVDTGKAYPLADEYLTNPMAIVDAELMMPGMLGITAASGIDLATHALAEVYSIMASEYTCNLATEALRVTQKFLPVTEGETTNVKAEREMAHASCIAGMAMANAFLGVCHSMMAHKGQAQHPIHPGIANALMIDEVVKNAVEAPRKQAAFPQCKYQVNPKRRYARIAIDLWNLGGSTDDEKQVFQFLINADDLTKLNPPTKIEAGVSDEDKFYATLDMSELAFDDQCTGANPRYPLIGEIQKQYMINAFADEPTPKATVEKTRKK*

FIGURE 38

【図40】

配列番号 70: C. *lunghadillii* の二機能性ペタノールノブチアルデヒドヒドログラナーゼのアミノ酸配列:
MKVTNVVEELMKRLEKKAQKFATPTTQEQLVDEIRFQAAAMAANSARIELAKMAVEESGMGIVEDVKV/KHNH
ASEYVNYKVDKTCGVLDLARDGFGIVRRAEWPVIAAVVTPPTNTFKTSKLIALTRNGI/FSPHPRKACKSTIA
AAKVILDAVAKAGAPGIGWIDPEIPLSVPQVMGEANILATLGPGMVKAAYSSGGPKAVVGPGNTPAVIDE
SAKIKMAVNSILLSKTFDNGMICASEQSQV/LVLDISIEEVKKEFAYGAILSKDTEDVKVKGILKNGLNALAGIV
QPAFKIAQLAGQVDPVPEKAKVLIGEVESVELEPFSEHEKLSPLVAMYRARNFEDAIAKTDKLVRSGGFHTSSL
VNPMTEKEAKVFESTMMKTSRTINPTSSQGLGDIYDNFLPALSITLGCQGSWVGNSVSNEVGPKHLLNKS
AERRENMLWFRPVPEKVFYKQGSLGVALKELVKMNNKKVFITDKVLYQLGYVDKTVKLELISYKVFTDVE
DPTLATAKGKAEELEYPDITVSGGDSAMADKAIMVMWVYHEPEVKFDLARMFMDIRKXVWVPPFKMG
EKAMMISVATSAGTGSEVTPEVITDETKGAKYPLADYEITPDMAIVDAELMMGMPRLGTAASGIDLALTHA
EAV/SIMATEFTNGLALAEKFLIEYLPEKAYTGTTPVNVKARECVMHASCIAQGMAFANAFLGVCHSMAHLGA
QHHPHGIANALMIDEVKFNAAVDPPKQAFQAYPVEPYNARAYQIAQCDLNLGNTTEEKQVQLINAADDLK
AKLNPKEITKEAGVSDCFYKTLKMSLAEFDOTCAGANPRLYPIELOKMYVNFDETDPEVIFDFEK*

配列番号71: C. *ljungdahlii* のチルアルデヒドヒドロゲナーゼのスクレオチド配列:
TTGGAAATTGTGATAAAGACTTACGTCATACAAAGAACAGAGATCTTGCACTTGTAGAAAATTGC
AGCAGACCAAAATTGCTGATAATGAGAAAGAACAAATTGATAAACCTGTAGATAATGGTTAGGGTACAG
AAGAAAATCGAGTTCTGCTTGTGAAAGAACAGAAATCTGGTGTAGCAAAGAACAGATGGTTGGAAAG
CTTATAAGAACCATATGGCTGCTACAGTTATAATTACATCAAGGATATGAAGACTATGGTTGTTAAA
AAGAAGATAAAAGTGAAGGTGTAATTGTAATTGCAAGAACAGTTGGTTTAAATGGTTATGACCATCTA
CAATTCACACATCTAGTTTAAATAATCACTATGCAATTAAATCAAGAACAGTCATTGTTCTTCC
CACCGACCTGCTTAAAGTCAAAACAGAACATTAAGTCACTTGTGCTGATCAGCAGTAGCAGCAGGG
CTCTGCAAATGTAATTGGTGTATTGTACACCATCTACAAAGCTACAATGAACTTGTAAAGCTTAAAG
AAGTTGCTATGATAITGCAACTGGGCCCTGGTAATGTTAAAGGCTGCTGATATAAGTTCAGAACACCTGC
ATATGGCCCTGGTCTGTTAACTCTCCATCTTATGAAAGAACACTGGCTAGTTCTACATCACTAGTTAAAGA
TTAATAGCTAGAAGATTTGACTGTTACTTGTGCACTTGTGCGACAGCTGTTAATGCAAGAACAGT
CAACCATGATGAAATAGTAGCTGAAATTAGAACAAACAGGGCGATATTCTAGCAGCTGAGCTGAAAGAAC
AAAGTTGTCAGCGCTACTTTTAAACCTGGTACACACAGCATGAGCGCTAAGTTGTTAGGGAGACCTCTC
AGGTITAGCAGAACAGCTGCAGGTTCTACAGCTTCAAGAGAACAAAGAACAAAGTATTAGAGAACAAAGGG
AGGTGTTAGCTAGGTTACCTCTTATCTTATGAAAGAACACTGTTCTTACATCAGTTAAAGAT
GGCATGAAGCATGAGCTTGTAGTATAAGATTACTCTAAATGGTCTGGACATACATGAACATTCTACAA
ATGAGAACAGACTTAAAGTGGCTTAAAGAACACCGCATCCGGTATCTTGTAAATGCACTGGAGC
CAGGGAGGTACTGGTCAAGAACAGGATTGACCTGCTTACATAGGTGTTGGTACAGGGGGAG
AGCTGTTCTGTTGAAAGAACAAATGTTACTCTTACATTTAACTATTAAGAACAGGATCAGTATGGTTCAAAAGT
GTACTACATTAGCTGCAGACGATACAACATTCACATCTGAACTTGGCGAACAAAAATGACTTAGGA
TTGATGTTACATCTGTTAGCTGAGTAACTTGTGCAAGAACAGGACATTTGATGAGCTGCTGCGAGATCTAGGA
TCTGTTCTGTTGCAAGAACAGGACATTTGAGCTGAGCTGAGCTGCTGCGAGATCTAGGA

FIGURE 40

【 図 4-1 】

配列番号 72: *C. ljungdahlii* のブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列:

MENFDKLRSIQEARDLRLGKIAADQADYTEEQDILKLNRMVRVAEEAANVCLGKMAAEETFGKAEDKAW
KNHMAATTVNYKNDMKTIGVIKEKDSEGVIEFAVGPPVGLMMVGIPSTNTSTVIYKSIIAKSRSNAFVSPHPAA
KCTKIAELMRDAAVAAAGAPVIGVIGVTPQSATNEMLKAMEVAAITGPMVKAAVSSTGAVGAG
NSPSIERTADHVHSCKDIAKSFSDFYVPAVSIACNEECHDNEAEVFKKQGQGYMLTAEAKTVCVSLVFLRK
THSMSKVFGRAQPVIAEAAGFTPEGTKLVJLQEQQGVNGVNPYLSKLTLVAFYTVHDWHEACLESFLRK
NGLHTMNIHTNDRDLVMFKFAKKPASRILNTGGSGGGTGASTGLAPALTFGCGTWGSSVSENVTPLHLI
NIRKVAAGLKDCTLAADDTFNHPELGCSKNDLGFCATSPAEEAKSNCDSTAADDTTNDKLARLVLSELVA
MKGAN

配列番号 73: *C. ljunghdahlii* のブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼのヌクレオチド配列

ATGAAATATTGTAAATGATTGCTCTCCATCCAAGAATCCGAATCTTGAAAATGCTCAGCGACA
CAAAATAATTGTCGACCACTTCTTCCACAGAAAAGCTAGATGGATTTGAACTGCTGGCAAAGAACATG
GAAAACATCCGGAGCTTGTCTATGTCAGACGATGAAACTGGTATGAAATGGCAGGAAATATG
CATCAACAAACCGATTGCTCTGAGTATTGCGAGCTAAGCTAGAGGAATGCGATGTGAGGTATTAA
TGTAAAATGGTCGAGTAAGGACCATGAGTGGATGAGTCTACCTGGGTATTAATTTGATTCTGCTCAG
TAGTCGGCTTCTACTACCATATTAAGCGATTGATGTTGAACTTGTGAAATGCAATTATCTTCTTCCAA
ATCTCAGAGCGAAAGGAGCAAAATTGTAAGGGCTTGACATCATGATTCTGCAGCTGAAAGGATAATGGCT
TCCAGAAGGAGCTCTGCTACATACCTAGTCGAGCCTGTTGAAACATGAACTGTGAAATG
GCACCTTCTTGTATTGATGAACTGAGTCTGGCTTCCCCTGGGATCTTAAAGCAGCATATACTTGTGAAACCTGTAA
TATATGGAGGAACCTGTAATGGACAGCATTATTGAACTGCAAGCTGACATCAACAGGGGGATAAGA
TATTATGCTGAGTACCTGTTGATGAACTGAGTACCATCTGCAAGCTGAACTCATTTGTGAGTATGCTG
TGTGCTCATGTTGATGAACTGAGTTCGAAATAATGCTGATATTGATCATGTCAGAGGAGGAAACAAA
AACTAGTCTTCTTCTTCTGAGTGGCAGATGTTGAACTGAGGAACTTGTGCAACATCGGAACTGG
TTGGCTTAAAGACAGGGTCTTCTGAGTGGCTTCTGAGTGGCTTCTGAGTGGCTTCTGAGTGGCTTCTGAGTGG
TCAGAATATCTTCTTCTGAGGAAACATTGCTGAGTGGCTTCTGAGTGGCTTCTGAGTGGCTTCTGAGTGGCTTCTGAGTGG
TCAGTGTGTTGAGTGGCTTCTGAGTGGCTTCTGAGTGGCTTCTGAGTGGCTTCTGAGTGGCTTCTGAGTGGCTTCTGAGTGG
ACAGGAAGTGTAAATGTTGATGCTGGAGAGACATGGTCACTCTGTGTTTACATTGCTGAGTGGCTTCTGAGTGGCTTCTGAGTGG
TTGGTAGTGTGGTCTACAAGTAATTATTCTCTGTTTACATTGAGTGGCTTCTGAGTGGCTTCTGAGTGGCTTCTGAGTGGCTTCTGAGTGG
TCTACCTCTGAGTGGCTTACAAGTAATTGTTGAGTGGCTTCTGAGTGGCTTCTGAGTGGCTTCTGAGTGGCTTCTGAGTGGCTTCTGAGTGG
AGAGAGTGTGCTTACAAGTAATTGTTGAGTGGCTTCTGAGTGGCTTCTGAGTGGCTTCTGAGTGGCTTCTGAGTGGCTTCTGAGTGGCTTCTGAGTGG
AGACATATAATCCAGAGGATATAACATGTTACAGCTGAGTGGCTTCTGAGTGGCTTCTGAGTGGCTTCTGAGTGGCTTCTGAGTGGCTTCTGAGTGG

配列番号 74: *C. ljunghdahlii* のブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列

MNIIDNLISQESRILVERAARAQKMLATPQEQLDEVERMAEIGKHTRELAVMSQDETGYGKWQDKC1
KNFRCPYELPKLRGMRCVQINENGNDKTMVDWPGVPMGVIAALCPATPSVTITLYKAISNGNFISSPHRA
KETICKALDIMIRAEAGVYPLGEGALAYLHTVPTSGTIELMHNLIHSATLMTVGPGLKMAANSGKPVYGGTG
NGPAFIERTADIKOQAVDIAASKTFDNGVPSAEQSVIVDSCVASDVKRERLQNNGAYFMTEEEAKQLGSLFRRS
DGSMDSMEVMGKSQARLAKGAFSPEVISLJEQVYKQSVDNSPYSKEKLCPVLAYIEDWDHMACECIECELL
SERHGHTVWHSQEDVIRQALFKPVGRLVNTPASFSGMGATSNLPAUTLGSGSAGCKTSDNVSPMNLIJY
VRVKVGYVRNVEEVNTNGLFTEEKSJLNGMTKSDYNDPEDIOMLOHLHKAMAKEK*

FIGURE 41

【図43】

配列番号 78: *C. ljungdahlii* のブタノールデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列:

MGRFTLPRDIYFGENALENLKNDGKAVVVGGGSMKRGFLAKVEKYLKETGMVEKLIENGVPDPVDT
VMNGAKIMRDFNPWDIVISGGGSPLAAKAMWIFIYEYPDFTFEKAFFVPPGFLPKLRQKAQFVAIPSTSGTATE
VTFSFVTDYKAKYKLADNLTPTDIAIDPPLSAETMPKKLTAHTGMDALTHAIEAYVASLHSDFSDPLAMHAI
MHIKYKKSYEEDKEARGHMHQIACQLAGMAFSNALLGITHSIAJKTGFWPHIPHGCHCANAYLPVYIDFNKAC
SERYAKIAKLLHLGSNEDELDSLTLEMIRTMNKMKDPIPLTKDYGISENFENDNLFIAHNAMMDACTGSNP
RAITEEEWMKKLLQYMYNGQKVNF*

配列番号 79: *C. ljunghdahlii* のブタノールデヒドロゲナーゼのヌクレオチド酸配列:

ATGGAGGAGATTACCTGGTCCAAAGAGACATTACTTTGGAGAAGATGCTTGGGTCTTGAACAGTTAA
AAGGTAAGAACAGCTGTAGTTGTTGGAGGAGGATCATGAGAGATTCGTTCTTGACAAGGTAG
AAGAATCTTAAAGAACAACTAGAAAGTTAACTAATAGAAGGTTGACAGGACCTGGCTCTGGAA
AACGGTTATGAAAGGGTCCAAATAATGAGCAGAATTGGGCCAGATGGTATGTTCTATGGAGGAGGT
TCAACATAGATGCTGCAAAGGCTATGGCTTATTTAGAATCTTACAGATTCTTAAACGAACTTGG
TTCCGTTGGATACCGAAATAAGACAAAAAGCTAAATTGTAGCTATAGCTTCTACTAGTGGAAACAGCTA
CTGAAGGACTTCTATCTTGTGAACTGATTATAAGCTTAAATAAAAGTCTTCTTGTGACTCTTCATT
GACACGGGATATAGCTATGTTGATCCTGGCAGACATGCCACCTAAATAACTGCACATACTGG
TATGGTACTTAATCATGACTAGAAGCTTATGTCAGTCATGCTAGATAGATCTTACAGATCTTAC
AATAACATCCATAATTGACAAGGGATAACTTAACTCTATAAGGGTATAAGATGCTAGAAATAA
GATGCTATATCATCAATGTTAGCAGGTATGGCATTTCTATGCACTTCTTGTGTTAACTATGTTGCA
CATAAAACAGGAGCTGTGACATACCATACATGGCTGCGGATAGCTTCTTGTGTTAACTATGTTGATT
TTAATAAAAGGACTTCTGCTAGATAGATGCTTAACTAATAGCTAAATAATTGAGCTTAAAGGAACTTAC
ATGAAATTGGTAGATCTCTAGTTAAATGGTACAAGATGATAAGGAATGTAATACCTTGTGACCTAA
AAGGATTGTGATGAACTGAAAGATGCTTAACTAATGTTGATTTTATGCAAAAGAATGGCTCTTGA
CTGATGACAGGAGCTATCCAAGGCTTATAGATTGGTACAAATGAAAGAATCTTCAATGTTGAT
GAAAAAAAGGTAACCTTTAA

配列番号 80: *C. ljunghdahlii* のブタノールデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列:

MERFTLPRFLYDFGEDALGALKTGKKVVAWVGGSMMKRGFKEFLDKEVEYLKEANIEVLEGEWPDPVSETVM
KGAKIMTEFGPDWIVAGGGSPIDAAKAMWLFYEPDFTFKQAVPFGFLPELRQKAKFVIASTSGTATEVTS
FSVITDYKAKIKYPLADFLNTPDIAVDPALAAQTMPPLTAHTGMDALTHALEAYASARSIDSPDLAHSIIMTR
DNLLKSYKGDKDARNMKHISQCLAGMAFSALLGITHSLAHKTGAVWHIPHGCANAIYLPVLDFNKAC
DRYANIAKILGLKTTEDELDVSLDSKMIVQDMQDKELNIPLTLKDYGISKDDFNNSVNDFIAKNALLDACTGANPR
PFDIOPDMOKKUOCYDGGKVTE*

FIGURE 43

【図42】

配列番号 75: *C. ljunghdahlii* のブタノールデヒドロゲナーゼのヌクレオチド酸配列:
ATGCCAACAGTTTACCTTACCAAGAGAATTTCCTGGACAAATTGATTCAGA

ATGGCAAGATTCTTACCAAGAGAACATTATTGGAGAACAAATTCTAGAAAAGGACTGAA
TGAAAAGAACAGCTTTATGTGCTAGGTGGTGTACATGAAAGCATTGGATTCTTCATGAAAGTGATA
ACTACCTTAAAGAACAGCGTATTGAACTAACAAAATTAGAGAAAGGTGAAACCGATCCATCTGTAGAACCT
GTTATGATGCGCTAACTAATGAGAGAAATGAGACCATGTTAATAGGTTACATGAGTGTGGGAGGTTCAC
ATTAGGCGCAGAACGCTAATGTTGAACTATGAGAAATGAGACCATGTTAATAGGTTACATGAGTGTGGGAGGTTCAC
TTTGTGCTCTTCAAGAACAGAACAACTTATGAGCTACCTTACCTGGTACTTAAAGGAGCTGTTGTTCC
AGTAAAGCGATTCTTGTAAATAGAACAGAACAACTTATGAGCTACCTTACCTGGTACTTACAGAACAG
CCAGATAGATCTAATTTGATCCAGTAGCTGCAACATGCACTTAAATTAACTGCACATCTGGAAATG
GATGCACTTACCCATGCTATTGAGCATGATGTTGGCAGGACTTCACTGGTCTTCAGGATCTTCCTGCTATC
AGTCACTGATGTTAACATGCTATTAACTTCACTGAATGAGATAAAGGAGCTGAAACAAAGCT
ATTAGCTGATGTTAGCTGAAATGGCATTTCAGTAACTGCTTCTGGAAATCTACAGCTTGGACACATA
AAAGCTGTCAGATTCTTCCATCTGGATGTCGAACTGATTCATGAACTATTCCTGTATGTTAGATGCTTCAAT
AAAAAGCTGTCGAAACAGATATGCTTAAAGATGGCTAGGAGCTTAAACTTCGGGAAATACAGCTTGGACATG
ATTAGCTGATCTAACCAAACATGATTAAAGATAGGATAAAGGAGCTGATGTTATCTTCACTTAAGAAGT
TAGGAGCTAGATGAAAAGAATTTAAAGAGTAGTGAAGGATTTTATGCTCTAACATCGGTTTATGAGCTG
CACTGGGATCAACTCTTGAAGTATAAAATGACTCTGAAATGAAAAGTTTATGAGAACATCTTATTGTTGAAA
AAGTTGTTTAA

配列番号 76: *C. ljunghdahlii* のブタノールデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列:

MARFTLPRDIFYGENSELTLDKLDLGKKAVIVGGGSMKRGFLKDVKVNYLKAEIESKIEGVPEPDPSVTVM
NGAKLMRREYEPDGGPSIDAUKAMWIFYEPPEFTKFVGFLPLRQKATIAPSTGSTATEVATF
VTDYKTYKQVPLADFLNTPDIAIIPLALACTPMLKTAITGMDTALHAEIVAGLVHSFLPLAICAVMVN
QYLIKSNEDEKARNQMHLAOCQLAGMAFSNALLGITHSLAHKTGAVFHIPHGANCANAIYLPVIDFNKKACAP
RYEAIARSLLKPGNDLTDDELNSNMIDMNKSMDPILTLDKYGVDKEFEKFDSEDFIAHNVLACTGSNPR
NDTEMTELYIYYKGKDV*

配列番号 77: *C. ljunghdahlii* のブタノールデヒドロゲナーゼのヌクレオチド酸配列:

ATGGGAAGATTACTTGTGCTAAGGATAATTACTTTGGTAAAGTCCTTGAAGAAAATTAAAGGAAATTAAAGGAAATTAGATGGAAATAAACGAGCTAGTTGTAGGGGGATCTATGAGAACAGGATTTGGGATCTTGACCAAGGATTTGAA
AATCTATAAGAAAAGCTGTGATGGAAATTAAATAGAACGGTTGATGCTGGAGCTTC
GTATGATGTGGCTAAAGAACATTAGAGACCTTAAACCCAGATTGGATGATGATCATAGATGGAGGATCTCC
TTTGGATCTGCTAAAGCATTGGTGGATTTTGATACCTTGGACCTTATTGAAAGCGTAGCTGG
TTTGGAAATTCTTAAATAAGCGAACAGGCAATTGTTGATCATCTTCAAGTGGACAGCACACTG
AAGTAACATCTTGTGATAACAGACATAAAGCTTAAATATCTCTTGGCATGATTAAACCTTGC
CTTGTGATGATATAAGTATGCTCTGCGAACAAATCTGGCAAAAGGCTTACAGCACACACTGGAA
GGTGCACCTACTCACGCAATAGAACATATGAGCAAGTTTACATTCTGAGATCTTCACTTGCAT
GCTGATCTAAAGCATTCATTAAATATTGATACCTCTGAGAACAGAAGAAAGCTAGGACAT
GCTATGACCCAACTGTGCTGGATGTCATTTCATAGCTCTTGGCATGAAACTACATGATAGTCACAT
AAAATCTGTGCTGATTCATACATCTGGTGTGCTAATGCCATACATACCTTACCTTGTATGATGATT
ACAAGAAGCTTGTGCTGGATGCTGGTGTGCTAATGCCATACATACCTTACCTTGTATGATGATT
TGCTGATCTGATTCATACCTGGATGCTGGTGTGCTAATGCCATACATACCTTACCTTGTATGATGATT
GATTGATGTTGATAACGGAAAAGCATTGATGAAACACCTGATTTATGCTCACAATGCCATGATGATGCG
TGACTCTGGATCCATCTGAGCAATACTGGAGGAAGAAATGAAAAGCTTGTGCTGAGTATGATGATT
GCAAAGGTTAATTCTG

FIGURE 42

【図44】

配列番号 81: *C. ljungdahlii* のブタノールデヒドロゲナーゼのヌクレオチド酸配列

ATGGGAAAACCTT TTTTAAAGTCAGAAAATTATTTTGTAAGGATACCGAAAATCTTGTAGGAAGT
AAAGATAAGGAGATCTAAAGTCAGATAAAGAACACTTCTTGTCTGGGGAGAACATAAAAAGATCTG
GCTCTATAGATAGAGTATATAAGCTTAAAGATAAAGGAAATGAAATTATAGAACCTTCAGGAAATAAAC
CTAACTCAAGGATTAAGGACTCTTAAAGGAACTTAAAGAACATGATGAGAAATAATAATAATAATAATAATA
TGTAGGAGGAGGAACTGAGCAGATAGCTTAAAGGACTTATGCTTAGGAGTACCTTAAAGGAGGACTG
TGGGAGGAGGAACTTACCGGGAAAGCAGATGTAAGGAGGCTCTCTGTAGGAGTGTAAATAACATTCAGC
TACAGGTACAGAATCTAGATAAGTCTGTCTTATGATAGAAGATGGTTAAAAAGGATAAA
AGTACTTAAAGACTCTGTTTCAATTAAGTAACTCTGAACTTCAACTACAGCATGATAAACAGCT
TGTGGTGTCTGGCATTTAGGCCATAATATGGAAAGATTTACAAAGATGAAACATGATAGATA
GATAGGCTTCTGGCAAGCTGCTTACAGTAAAGATTTAAATAATGCCCCAACTAGTTTAAAGATCCC
TATGATGCTAGGGCAGAAATTATGTGGACCGGTACTATGCTCTATAATGATGTCCTAGTGGGGGAGATA
GGTGTGGGCTTCTGGCATTAAGGATAGCATGATGTTGGGGAAAGCACAGATGCCCCCTAGGGAGCAG
CTGCAATTGTTATTCCTGCATGGATAGAATGATTTAAACAGATCATTAATGATGTTCAATTGGAGT
AAGGGATTTGGGGATGAGTATTCTATGTTCTGGCAAGATTTACTGCTTACAGGCAAGAGGAGATA
CAGCTTTCAGGAAAGCATGGTTCTTACCTTAAAGAAGGAGATAGTGGAGAAGATA
AGAAATGGCTATAAGTCAGGATAATGGAACTAAAGTCTGAGGACAATTGTAATAAAAGATG
ATATGTAATAAAATAATAATGCTAGATAAA

配列名号 82: C. Ijungdahlii のブタノールデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列:

MENIFKNTIEIFKGDTENLVSCKVSEYKSDKLFCYGGSJKRSLGVDVRVLSKLKEENGIEFIELPGKPNPRLG
VKEGIRLCRNNFIKFLSVLPGGGSSADATAKIAAVGVPGYKGDWVDFYTKVAEKFALPVGVVITLPATGTESSNS
VINMNDGWFWFKKGTLNLRIPASIMNPMLPTFLTPYQTCAGACDAMIHIMERYFTNVKHVDITDRLCEAAL
VNINAPIVHLKDPKNYDARAEIMWTGIAHNDLBSLAGRIGDWASHKIEHLELGETDIAHGALAINFPWAM
DVYKHHIDNRVFNQFQAVWRVDRVWVSSCSIEDIVLEGIRRMTFFKSMGLPVTLKEGSIGEDKIEEMANKCDT
GKTQVGFQVFLNKKDILVNLAK*

配列番号 83: C. *Jungdahlii* のブタノールデヒドロゲナーゼのスクレオチド強配列:

```
ATGGAAGACAGAATTGAAAATTATTAATTGAAATTCAAGGATTATTAAATAGGAATCTTCAACTTTA  
GAGCAAGCTACTTGTCTCGAGCATTTATGTCGAGATGCTATTAGGGAAAACCTTGATATCTCAAA  
AGTAATAGATTACCTAAGCAAAGCTGGATAAAGTTCGGTGTGTTTACGGGGGTACACCTGTACCCAGC  
TCATGATGTCAGATGCAATGATGTCACAAAAAAAGGCAGCAGCAGATGTTCTGAGCTACTGGTGG  
AGGATCTCAGATTAATGCCCTAAAGGAATAATGTTTCGATTAATGAAAGAACATGGCCCAAG
```

TTATTAATCTTCGAAAGAACAAAAGGTGATTATTATAGATGGTTTATTCGACCAAGATGTTGCAATCTACTTGACT
AAGTGTGTTATGTGTTCTGCCTACGCTTGTAGCAGATACTGGTATAGTGTTAGCTTCTATGTTGA
GCCATGTTCTTCCAAAAGAACAGTCTGTTACAGGCCCTTGCTGAAAGAACAGCTTAAATTATTTTGAA
GAATGCTTCTTCCAAAAGATTTAATCATGATGTAAGGGATTCCGAAAGCTCGAGATCATGTTCAAAAGCTTCTTGT
AGCAGGAATAGCTTACCATACAGTCTGGTAATTCATACAGCTTGGCTCATGCTATGGTGTCTT
TCCACATCTCTCACGGCGATCAATGCACTTCTTAATCTAGTCAATGGAAATACAAGCTGCTTGTGGTT
GAAATGCAAGGAAACATCTGTAAAGGAAAATACGCCCCAAATCTGCAATCTTACCTCTGGCTACGCAACA
ATCTGGCAAGGGCTTCTGAATGTTTATGAGCTGATATAAATTAATAATCTCTGGTGTGGATAGAT
ATTCTGATCTCTGGGATTAAGAAGATGAGTTCAAGGTGCTTAATCATATGGCAGAACAGCAATGCA
AGATAGATGCACTTCAACTAATCTGAAACCTTCTAAAGAAGAACCTTATCATATTTATCAAAAATGTT
TAA

FIGURE 44

【図45】

配列番号 84: C. *lunghaddha* のブラークードリガーナゼのアノ類別記:
MEDKFENKHNQFVNRQESILOEVTGRARFAVIDAUMGKLYQKVLDL5KAGISVVFTGVHPDDPVNV
IADAMKLYKKSDADVLVALGGGGSIDTAKGIMYFACNLGKAMGQEMKPKLFAIPSTSGTGESEVTNTFVTSQ.
KEVKCIVHDFPAAQDTSIDCLGPQRVADTGHSWHSIPEAHRSKXNATDFTALAEKAVLKHNDK
DSEARDHVQNCASIAIGLAFTNSDNLGHINSLAHDMAGGSFHSHPEGRSNNALMVNEASLVGNASE
KYAKLASILHLPARTTREGAVSFIEAVDKLKSGLVEDNIRSLGKEDEFQSALNHMATEAMQDRCTPTNPKR
PKVAKLASHIQLYKCY"

配列番号 85: C. *lunghadhlia* からのリン酸アセチル/ブチリルトランスクレオチド配列:
ATGAAATGAGGAAAGAAAATTGGAGTAAAGGCAAAAGGACACAAAAAATGGATCTTGAGCTGAAGGA
GAAAGAACGAAAGAACCTTCAGCTGGTAAAGAAAATTAAAGGAGGGTTCTGCAAATTAACTCTGTAG
GGAAATGAGGAAAGGATAAAGAAAAGCCTGAAAATTAGGTTGAAGTTAAAGGCAAGAACATAGTAGA
TCCAGACAGCTCAGATAAACTAACAGGATCATGCGATCTTGTGTTATGAGGAGAACAGGAA
ACGCCGAAAAGGCGGATAATGGTAAAGGACTCAATATTCTTGCATCAATGTTGGAACTTCCTGG
TCAGCATGGATTGGTTCTTCAAGGATTCAGGTTCTACATACAGGTGATCTTTCAGGACGACTTCAGAATGAA
AGACAGCTCCGACGATACATCAGTGGTCAAGTACATTATTTAGGAACTTAAAGGAACTTGTGAGATTTGGAC
ATTAGGTCATCTTCTTCTGGTGTGCTGAACTTACATGGCCAGAGTATGTCATCAATTGCTTCATTCGG
TAAGTCAGACGAAAGAATCTGGCAAAAGGATCTTGTGAAATGGCTCAAAAGTAGCAATGCTTCTTCT
AGGGAAAGTCGAAACAGCAGATTAGTGACAGAACTTACAGTGGATGAGATGCTTCAAAAGGCTAA
CCAGATTTAGTTAGCAGGGAGAACATTACAGTGGCTCTATCTGAGAAAAGGTTGCAAGTTCAG
TCCTGGAGATGAGTGGAGGAAAGAACATGACTCTGTTCTGGATCATCTGGCAAGCAGGAAATATAGG
TAAACATTCGTCAGAACAGATTCTGAAAAGCAGATGCTTACAGGCTTGTGCAAGGATTGTCAC
AATGGATCTGTCAGAACAGGATGTAATCTGTGATGATATGTTAATGAGTGTAGCTGTAA
CAGCAGTCAAGCACA
AGCTCAAGAATGA

配列番号 86: C. *jungdahlii* からのリン酸アセチル/ブチリルトランスフェラーゼのアミノ酸配列:
 MKLMEKIKWASCAEKKDKVLLAEGEEERTQLAKECIIKEIGENALILVGNEVKIKEKVLGSLVNGAEIVDPETSE
 KLLKAYADAEYLRRKKGTTPEKADKIVPRPYIFATMVMVNLKGDLGLVSVAHGHTTGDLLKLRQLVQVTPAGTSS
 SSTFTIMEVPNECYGNDVFLFADCVPNCPPDSQLASIAISTAETAKNLCGMDPKVAMLSF5TKGSKAKHELV
 KVRAVENIAKAKKPAPLDSLGEQLDASIVEKAVALSKAPGVSEAGKANVLVFPDLQAGNIGYKLVLQRFAKADAM
 PFGVCGQFCAPLNDRLRGNSCNDLIVNVATAVQAQK*

FIGURE 45

【図46】

配列番号 88 : C_ *jungdahlii* の転座、酵素キナーゼのアミノ酸配列:
MILKVVNGVQDNLQDMDQESVAKGKGMLDSILTHVKNGEKFQTCMDEHKVQIQLVLNALVD
KKHGVIKDMSIEASAVGRHLHGKKYAAISIDENVMKAIECIPGLPLHNPNAMGIDACKLKPNTPMVVA
VFDTAHDQTQMPGMLVATGPIYDSEKQDIDYRPAVGFVMMKRTGMVSVEADTMLPKNDKLCKTLCHNGCAACVNO
GKAVDTTMDGLPLAGLVMTGPIYDSEKQDIDYRPAVGFVMMKRTGMVSVEADTMLPKNDKLCKTLCHNGCAACVNO
ANSNGNDRAKLNAMYYHHKFSVIGAYVANLNGDAIIIFTAGLGENSATRSACNGLSVFGIKIDEEKNNKRGE
ALEPSTDKQKLVLPVTEELMARDTKEVEN*

配列番号 90: C_ "Jungdahli" からのおレドビ: フェリキシン酸-2-酰基スアミンの配列記述:
MYGGKVGVLRLNSLKTVIIEKLKKDIAKFKKFGARGLVTKLTFDVEPVKDPVLSNPKFIKAAGPLTGAPVPTSG
RFLMVTKSPLTGTIAANSGKGWGAEKAAGYDMIIVEGKSDKEVYNNIVDDKVFDRDASHVWGKLTEETTK
MLQQETDSRALKVCIPIAGEKLMSAAMVNVDTRAGGGVAVMGSKNSLKAIVGKSGKLFQDEK
KEVALEKTNLRKDPVAGGWLPTGYTAVLNINENGVPHVVKNFQNSQTQDAKIGSETGLDCKLVRKNCPRCYC
PIACGRGVVKLDGTECGGPETVLSWFSQFCDVUDINAVENTMLCNEYGLDTGATIAAAMELYRG
KEEADIAEGHDFGAKDWSKMEVVKMNGRFEDGKMDA5GRCYLCDSYFPEVSMYTMVKQEELPAPDRC
IQGHGTTIAVNMRGGCHIKGYMVSPELGPFKDLRAVEKGAGYARVHDLTAVIDSLGLCTFTGLQAQDY
VDVMYNAVGGEHLDVNSMLAGDRINWTEKLKFLNKGIDQSQDTLPKRLLEEQPEGPSKGVEHKLVLVLP
YTSVGRWKGKNGKIPTEITLKLGLDVEYVGL*

FIGURE 46

【 四 47 】

列記番号 91: C. *ljungdahlii* からのアルデヒド: フレドキシン酸化還元酵素のスクレオチド配列:
ATGATGGTTATGTTAAAGTATAAGAATTATTTAAAAGAACCTGCACATCAGAAAAATTAGAT
TTAGATAAACCTAAAAGTTATGTTAGGGACTAGTGTAAACCTTTATGGAATATGATCC
AAAATAGATGCTTACAGAACAAAATAATTATAATGTAACAGGCTTAACTGGAGCTCGGCC
ACTAGTGGAAAGGTTATGTTAGTACTAACAGCACCCTAACAGAACATTAGGAACTTAACTGGGT
GAAAATGGGAGTAGACTTAAAAAAAGCTGGTTGGGATATGATAATAGTAGAGGATAAGGCTGATTAC
CTGGTTACATTGAAATAGTATGATAAGGTTAGAAAATTAAGCAGCGCTAACAGCTTGGGGAAAAGTTCAT
CAGAAAATCACAAAAGGTTAGAAAAGATAACTGAGATAATCAACAGGTTATGTTAGTATGAGCTGCTGGT
GAACGATTGCTCTATGCGCAGTATGTAATGTTAGTATGAGATAACTGAGCAAGGGCCTGGTGTG
CAGTTGGGATCTAAAACCTTAAAGCTTACAGCTTAAAGGACTTGGGAAATAGCTTATGCTGATAA
GAAAAGTAAAAAAAGTGTCCGTAGAAAAAATTACAACATTTAAAGTATCAGTAGCTGTGCTAGGAA
TGCCAATTAAGGTACAGCTATACTGGTTAATATAAAAGTAAATGGAGTTCTCATCTGTAAGAAATTTC
ATACTCTTATCAGATAACAGCAGATAAAATAGTGGAGAGACTCTCTGTAACACTGTAAGGAAA
AATCTCTTACAGCTGCTTATAGTTGTGGAGATAGTGGGTTAGACTAAAGATGCGACAGCTGGGA
GACCAAGAATATGAAACACTGTGGTTGGATCTAGTGTGCTATGATTAGTGTCTATAATGAAAG
CTAATGTTATGTAATGAAATGGTTAGTATGATACTTACTTGTGTGCAACAAATTGCTGAGCTATGGAACT
CTAAGGAGGATATAAAAGCAGAACAGAAATAGCTGGAGATAACCTCTCTGTAAGGTTGGGTGATCGG
AATCTATGTTGGCTGATATAAAAGGATAGTATGTTAGTGTGGAGGAACTTGTGACAGATAATGGT
TATAGGCTTGTGAGGTTATGGAGCACCGAGTATTCTGACAGTTAAAAGCAGGAAATCTCAG
TGATCCAAGGGAAATCAGGGACACGGTATTACCTATGCGAGTTAAATAGAGGAGGTGTCATATAAGG
GATATGTTAACCTGAAATATGGTTAGTATGATACTTACTTGTGTGCAACAAATTGCTGAGCTATGGAACT
TTAGGCAAAATTATGTTAGTATTAAGCTGTGTTAATGTTAGGATCTGTCATATTCTACACTTCTGGC
TTGGAATACAGGTTAGTATGAGTATGATACTGAGTAACTGAGGAAATCTACTTATGAGCTGACAGT
AGAGGAGGAGATAGAATCTGGACTCTGAGAAATTTAACTCTGTCAGTGGAAATGACAGCAGCAG
GATATCTAACCAAAGGTTAGTGTGAAACCTTACCGAGTATGGGCTTAAAGGGAGAAGTCTATAGG
TAGATGTTCTCTGCGAGAATATGACTACAGTACGGAGATGGAGTAAAGAGGGTTATCCTACAGAAGAAC
TTAAGAAATAGGATTAGTATGAAATATAGTGTAACTGAG

配列番号 92: C. *Jungdahlii* からのアルデヒド: フェレドキシン酸化還元酵素のアミノ酸配列:
 MYGVGDVKRLIRNLIKERTCKSENLDDKAKFPGCRGLGVKTLEDFDEPKIDALSPENKFIIVTGTPLGAPVPTSG
 RFMVVTKAPLTFGTISGNSKGWVLLDKKAGWDMIIADKFADSPVYIEVDDKVEQVKSASLQWGVKTSETSE
 ELEKTEENKSVKLICVGPAQERLSLMAAMVNDVTRAARGVGVAGMSKLNKAIATVKGTKJIALDAEKVKVV
 SVEKITTLKDNPVAGQGMPTYGTALVNINENGVHPVKNFQESEYNQADKISGETLTANQLVRKNPQCYCPI
 CGGRVWRLDKTECGGPEYETLWCFGSDCGSYDLDAINEANMLCNGYIDTGTATIAAAMELYQRGYVKKD
 IEIAGDNLSLKWDGTESMVGWIKMRVYSEGFKAGMTNSRCEGYGAPEYSMTVKKQEYAPDPRGICQGH
 GITYAVNNRRGGCHGKYMNPINLEPEKYLDRFLADGKAAYALKHFDITAVDLSLGLCTFTFLGQIDVDMYV
 AVGEYESTDADSLLAEAGDRWTLKLFNLNAAGIDSSQDTLPKRLLEEPIDPGPSKGEVHRLDVLPEYYSVRGW
 SKEVQSTTETLWVQDLSLQHRS

FIGURE 4

【図48】

FIGURE 4B

【図49】

配列番号 94: C.ragdalei からこ 機能性ブタノール/チルアルデヒド/ビログナーゼのアミノ酸配列:
MPNRLIFINNSMKNNKEVSLMVKTVNVEELMLKKLDETAQKCFRQSSEQEIDFPRAAAMANSARDLAKMAVE
ESGMGIVEDVKWNVHFSVSEYIYKNDKETCGVLEEDQGFGVMRVAEPGVIAVVEPTTNTTSAFKSLLAKTRNGIVPS
PFRPKSTKIAAKAIVLDAAVAKGAGVWHDWDEPISELSPQSVVMKEDALILATGGPMVKAAYSSGKPAIGVGPNNTGIVPS
IDESADAMAVNNSLSSKTFDNGCMAEQSESVVSISIVEDKFEGARLKSDETDKGTGTMINGALNAGVQSA
FKIAQMAGVSVPEDAKVLIGEVKSVPEPEEEPAHEKLSPVLA MYKADKFDEALLKAGRVLVERGGIGHSTSLYNSMTEKV
KVEKFRMTMTGRTLNIMPMSAQGAIDYINFLKLAPSLLGCGSGWGGNSVSENVPKHLNIKSAERRENMLWFRVPEK
VFVKYGSGLVALKERLTLEKKAFITVDKVLQYGVDDKTNLDELRSVSKIFTDVEPDPTLATAKKGASESLLSEYPDPTIIVAVG
GGSAMDAAKIMMVAYMEHPEVRFEDLMARFMDFDRIRRVYFPKMGKEAMMISVATSGTSVETPVFAITDERTGAKY
PLADYELTPMMAIDAEALMMGMPKGLTAASGIDALTHALEAVSIMAESETNTGALAEATRLLFKYLPATIETGTTNVKARE
KMHASTIGMAGAFANAFLVGCHSMAHKLGAQHHIPHGIANALMIDEVFKFNAVEAPRKQZAAFPQKYKPNVKNRRYARIA
TPKATVEKTKTRKPIN

FIGURE 49

【図50】

FIGURE 50

【図51】

配列番号 96: C. ragsdalei からの二機能性ターナー／ブルアルデヒドピロゲナーゼのアミノ酸配列:
MKVTVNEELMRELLKEIDKQGKFATTCQEVDPRFQAAAMASANRIALKMAVEESEGSMGIVDEKDVKINHVA
ASEAIVNYYKDECTKGVRDLAGFVIRAEAVPVGIAAVWPTPNNTSTAFKLALKTRNGVPSHPRKRKSTAA
AAKIVLDAAVKAGAPEGIIGWIDEPSEIQLSQQVMGEANLILATGPGMVKAAYSSGKPAVGVPGNPNTAII
SDAKIMAVNSILLSFTDNGMCASEQSVLVIDSVEEKFKEPPRGARYLSEDETDKVGKUILKNGALNAGVII
SAFKIAQLAGVNPEVKAGLVIEVELEPVEFHPSKHELSPLVAMYRARDFEDAIKTDKVLRRAGFGHTLSSV
NPMTKEAKVFESTMMKTSRINTTPSSQGGIDYINFNKLAPSITLGCWSWGGSNSVENVGPKHLLNIKSVA
RERNLWFLPVERFYKVFQGSGLVALKEVLVMNKVVFIIVTFLVQVLGVDFKTVKLEELISKYVKTVDPE
PTTAKAGAEELSEPTDHSVGGSAMDAKIMKVMWYMEHPEVKFEDLMARMRDFRKRVVVFPMGKEM
AMMISVATSGTGSEVTPFAVITDEKTAGYPLADYEILTPNMAVIADELMGMGPRGLTAASGIDLTHALE
YVSIMMESTFLGDALEALKFYLKPALKETGTTNVKAREKHAMHSACIAGMFANAFALGVCHSMMAHLQAG
HHPIPHGALNIMDVFCKNAVADFDPKIQAPFQYEVPAKRYTAQJACDLNLLGNGTEDEKVQLINAADDLKA
KLNIPETIKEAGVSEEEKYTTLDKMSLAFDQDCGTANPGRYPLIEKQMYINVFDTKEPEVEDEEK*

配列番号 97: C. *ragsdalei* からのプチアルデヒドヒドロゲナーゼのスクレオチド配列:
ATGGGAGGAACCAATTGGAAAATTTGATAAGACTCTCATACAAAGGAAGAGATCTTGAC
TTGGTAAAGGAAATTGCGATCAGTGTAAATTGCTGATTAATCTGAAACAAACATTGATAA
TGTGTTAGGGTAGCAGAGGAAAATGCGAGTTGCTTGTGAAAATGGCTCAGAAGAACCTGGT
AAAGCTGAAAGATAAGGCCTTATAAGAACCATAGTCGCTCATAGTATAATTATAACGAGATA
CTATGGTAAAGGAAATTGAGGAAAGCTGAAAGGTGTAATTGATTCGAAACAGTGGTTTAAATG
GTATGTTACCATCTAACAACTCATCTGTATCTATAACATCTGAACTTAAATCAGAACATG
ATTGTTATCTCACCAACACCCAGCTGCTGATTAACCTGTTCAACAAAAGCAATAGAACCT
AGTAGCAGCAGGACCTCTCAGAATTGTTGGCTATTCACCATACATGAACTCAGAACATG
TTGAAAGCTGAAAGATAAGGTGTTAGTATAATTGCCATTGAGGCCCTGGTGAAGCTGTT
TCAGGAACACCTGCAATTAGGCGTTGGTCTGTAACCTCCATCTATATAGAAAGAACCTG
TCATACTGTTAAAGATAATAATTGCTGAAAGGTGTTGACTATGTTGACTATTGTCATG
ATTGTTGAGAATGCAACCATGTAGAAGTAAATGCTGAGTAAAGGAAACAGCGGATATTGAG
CTGAAGAAACCTGAAAGATTGCGATAGTCTTTAACGGCTGTCACACAGTATGCTGTT
GGAAAGACTCTCTCAGGTATAGCAGCAGCTGCGAGGTTCTCAGTTCAGAAGGAAACAAAG
GGGAAACAGGCGGAGGTGTTAGTGTACCTCTATCTATGAGAAACCTTACAAGACTGCT
TACAGTTAAAGATTGCGATAGCATGTTAGTAAATTGATCTTAAAGTCTTAAAGTGGCT
GAACATTCTACAAATGACAGAACGACTTGAATGAAAGTTGCTAAACAAACCCAGCAT
TACTGGTGAAGGCAACCGAAGGAGGACTCTGTCAGGACAGGAGATTGACCTCTGCTT
ACATGGGAGGAAGACTCTCTGGTCCAGGAAAGTCTCCATTACCTTAAATCAATAAGAG
GGCTTAAAGATTGCTTACATAGCTGAGCATGATAACACTTAACTCATCTGCTAC
ATAGACTTGGATGCTGCTACAAGCCCTCGAGAATTGCGAACATTGCAAGTAA
GGATACACTGATAATGATAACTCTGTAAGCTGTAAGTGAATTGCTGCAATGAA
AA

FIGURE 51

【図52】

配列番号98: C.ragsdalei FARDIのフルアルデヒドビロゲナーゼのアミノ酸配列:
EDKAYKNHMAATTVYNYIKDMKTIKGKDCDSQGVIEFAPGLWLMIGVPSTPNSTVVKIIAISRNAIVFSP
VGAALKCSTKIAELMRDAAVAGAPANVGGIVITVPSIQATNELMKAKEVAMIAITGGPGMVKAAYSSGTTPAIG
VGAGNNSPYSIERTADVHQVSKGDIASFGDTYICCASQSIIVEEVCNNHEDEIALELKKMNGMFTAEAKTGGT
KPGTHMSMASFKVRGPQVIAAGAASFVPEGTKLVEQGGVNGNPLSYKEVLTLLTFLAFYTVKDWHACDLSI
RLLQNGLGHTMNIHTNDRLVMKFAKKPASRILVNTGGSQGGTGASTGLAPATLICGCTWGSSVSENVT
LHLINHRIKRVAYGLKDCSTLAADDTTFNHPELGSKNDLGCATSPAEEAANSNCASTAADTTDNDKLARLSEL
VAAMKANG*

配列番号 99: *C. ragsdalei* からのプチアルデヒドヒドロゲナーゼのスクレオチド配列:
GTGCGGAAATGCTGCAGCGACACAAAAAATGGTGAACACTTTCCGCAAGAAAAGTTAGTGAGATTGTT
AACCGTATGGCTGAGAAAATCGGAAAATCATCCGGAGAGCTGTCATAATGTCACAGGTAACTGGTT
TGGAAAATGGCAGGAAATAATCATCAAAACCGGTTGGCTGTAATGTTGCCAGTCAGTGGAGA
ATTCGGATGTGAGTATTAAATGAGGAAATGGCTGAGGATAACGACTGTGATGAGTTGCTTACATGGTGT
AATTATGCTGATATTGCTGCAACTAGTCGGTTTACTACCATATAAGGCATTAATGTCATAATGCTG
GTAATGCAATTATTTCTCACAATCTGGACAGAACAGGAGAACTTITGAAGGCCCTGACATCATGATT
GTGCGAGCTGAGGATATGGCTGCGAAAGAGGAGCTTCGACATCTACATGACGCCCTAGTGAAAC
AATCGCAATTGTGAAACCTGAGGCGAATTCCTTGTGATTAATGACATAGCGCTTCCGGAGCTTAAAGCGT
CATATAGATCTGGAAACCTGAGGCTATCTGGAGGAACTGTGATTAATGCCAGCATTTATGACAG
GACATCAAGGGCGGGTAAGAGATATTGCTGAGAAGCTTGTATAAGGCAAGTACCATCTGCA
ACAATCTATGGTAGATGCTGTCATCTGATGTTAAGCTGAGGTGCAAATAGTGGTCATAATT
CTGACAGGAGGAGAACACAAAAAATGGTTCTCTTCTCTTCTGTTGATGGTAGATGTTAGCA
ATGGTTGGCAAAATCGCACAGAGTTGCTAAAGAAGCAGGTTTCACTGTTCTGAAAGTAGCAGCTG
TTTCTTCAAGCAGAAATATGTTCTCCAAGATAATCTCTTCAAGGAAAGATTTGTCGGTACTAGCT
ACTACATTTGAGATGATTGGTAGCTGATCTGAGAAGATGTTAGCTGCTTAAATGAGGAGACATGGT
CACACTCTTGTTATCATTCAAAAGAGCAAGAGATGTTAATTCGCGAGTTGCTTAAATTT
GATACCTGTTAATACCTGGCTCTTCCTTGTGATGGTCAGAACATAATTCTTCGCTTAACTTCA
GTTAGTGGTAGCTGCCAGTAAAGGATTTACTCCGGATAATGTTCTACCAAGATAATTCTTACCTGGTAA
GTCCGGATATGGCTGAGGAATGTAGAGAGATTATAACTAATGTTGTTACAGAAGAAAAAAAGTG
GATCTGTTGAGTGGTAGACAAAGCAGTCAGACTATAATCCAGAGGATATACAAATGTTGAGCATAATT
AAGCTATGAAAAAAATTAAATAG

【図53】

配列番号: 101: C. ragsdalei からのペルオーデリオナヌのヌクレオトイド配列:

ATGGAAGATTTCATTCAGAACGACATTATTTGGAGAACAAATTCTAGAGACCTTGGAAAAACCTAGA
TGAAAAAAAGCTGTCTATGGCTAGGGAGGATCCATGAAGAACAGATTGGATCTTCGTATAAGGTAGTA
GACTACTTGGAACTGGAGGAGGATTCAGAACAAATTAAAGGACGGCTGGACAGTCATCCCGTAGAAC
CTCTTATGAAATGGTGCCTAACATTAAGGGAGGATATGGGCCGAGATTAAATATCATACATAGGGAGTTCA
CAATTGATGCGCACAAAGGATCTGTGGATATTCTATGAACTTCTCTGAGTTCATCTTTAAAGGAGCTGTG
CTTGGTCTCTCTAAATTAAGGAACTTAAAGGATCTTATGATCTTCCTTCTACAGTGTGATTCGAAAGG
AAGTAACCTGATTTCCTGTAATAACAGACATAAAGGCTAAATTAATCTTCTGCTGACTCAAATTTAA
ACCAGATATAGCTTAACTATGTCAGTCAAGTCTAGGCTCAAACTGCGCTTAAATTAACGCAACTACTGG
GAGTCACCTACTCAGCTTATGGCATGATCTGGCAGACTTCTAGTTCGGCACCCATTCTGCTTAA
CAAGCTATAGTCATGTAACTCATATTAAATCTTCAAGTAAAGCTGAGAAGACTAGGGATCAAATG
CATTAGCTCACTGGATTTGGCTGAATGCGATTTCCTAAAGTCACTTGTGAACTTACAGCTTGG
AAAACAGGCTGCACTGGATTTGGCTGAATGCGATTTCCTCAAGTGTGCTTAACTTACAGCTTGG
AATTTAGCTGATTCAACTAATGATTAAGAATGCAACAGGATTTGAGATTCTTCCTGATCAAAAGA
TTATGGAGTAGATGAAAAGAATTAAAGATGTTGAGAAGATTCTAGCTCATAACTGGCTTAAAGA
TACTGGCTACAACTCTGAGAACATTAAGTGTGAAATGAGTTCATACATGGCTTAAAGA
AAAGGTGATTTTAA

配列番号: C: ragsdalei からのパーターイレヒドロカゼアのアミノ酸配列: MARFLTRPLDVFSEESTLKLNNGGKAVVYGGGSMLKRGFLKDVKVYDLEKEAGIESKLIEVEPPPSVETVM NGAKLMLRREYGFLDLISIGGSPIDAAKAMWIFYEPFEFTKFEAVVPFLGLPKLRQKATFIAPIGSTSGTATEVTAFS VITDYKAIIKPYPLADFNLTIPDIAIDPVTQMAFSTPMTIATHGMALTHAIVYAGLHSVSDFLPAQIAVIMV QLYIKSYNSNEDEKARDQMHQLACLAGMSNALLGHTHSLMDAHTGAVFHIPHGCANAIYLPVDNFKKCACAP RYADIARSLKLPGNTDDELSDTLMIKDMKNSMDPILTLDYGVDEKEFKDSEDFAHNVLDACTGSNPSS INADEMKMELLEIYVKGKVD*

配列番号 103: *C. ragsdalei* からのブタールデヒドロゲナーゼのヌクレオチド酸配列:
ATGGGAAGATTCTTCTGGAGGATTCTTGTGGAAATGCTTCAAGAATTAAAAAATTAAAATTTAGA
GGAAAATAGCAGCTTGTGTTAGGGAGGATCTAGAAGAATTGGTTCTGGCAGAACAGTGGAA
ACTAATTCAGGAAAGACCGATTGAGGAAATTAAATAGAGAAGCTTGTGGCCTGATCCCTGTGATCT
GTGATAGTGTGCTGAGGAACTGAGGAAATTCTTGTGGATGAGCTTGTGATCTTCAAGATGGTGGAGCATCC
CATCGATGCTGCGAAACGCAATGTGGATTITGTGATTAACCTGCAGTCACTTACATTTGAAAAGCGGTAGTCCC
AAGTGGGATTCTTAAATAGGCAAAAGCACAATI GTGCTATACTTCTTCAGAATGGGAGAACAGCAACTG
AAAGTACACATCTTCTTGTAAATCAACAGACTTAAAGCTTAAATACATCTTCTGCGAATTGTTAATCCTTC
CCCTGTAGTATGCTATAATAGCTCGTCTTCTGGACAAAAGCTTAAAGCTTCAAGCAGCACACTGTTGGAA
GHTGATCAGTACTCTGCAAGAAGCTTGTGCAAGTGTGTTACATTCAGATTTCTAGATCTTCAGTCT
GCTATGCTATAACCATGTTCAATAATTATTATGTAAGAATCTTCTGAGAAGATAAAGAAGCTAGGGCCAT
GCACATGCGCCAATGCTGAGCTTGTGGATCCTTCAAACTGACCTCTTGTGAAGATACTTGTAGATGACCA
TAACAGCTGGCGATATTCTTCAACACTCTGATGGTGTCTGATCTGGCTATCATCTACTTACTCTTGTAGATT
ACAAAGGAAAGCTTGTGAGGAAATGCTTAAAGCTTAAAGCTTCACTTGTGCTATCTGAGGAATGTGAAAG
GAATTATAGATCTTCAACAGAAATGTTGTACTGATTAAGAAGCTTGTGATATCTTCTTGTACTTAAATA
ATTAGTGTATAAGCGAAAAGCATTTTAATGAAAGACCTGAGTTTATAGCTCAACAGTGTATGATGCTG
CACTGGCTATCTTGTAGCAATACTGAGGAAGAATGAAAAGCTTGTGAGGAAATGCTTGTGAGTGTG
AAAAGGTTAAATTTCTAG

FIGURE 53

【 図 5 5 】

配列番号 107: C. ragsdalei のカーネルディドロバーゼのヌクレオチド配列:
ATGGAAAACCTTATTTTAAAGCTAACAGAAATATTTCGAGGATACCGAAGAGTCTTGTAGGAAGT
AAAGTAAAGGAGTATTTCAAGGCATAGAAACTCTTTTGCTATGGGGGAGGAAGTATAAGAGATCG
GCCTCTTATGAGTATAAACTTAAAGCTTAAAGGAAAGTATGATTATTATAGAACCTTCCGAAAGTAA
CTATCCAAAGATTAGGACCTTAAAGGAGTATAAGCTACTTGTAGAGAAAATAATAAAATTGACTATC
TGTAGGAGGAGGAGAATGCGACAGATCACTGAAAGCTATTGCTGTAAGGACTCTTAAAGGAGATIGTA
TGGGATTTTATAGCGGCGAACAGCTGAAGAAAAGGCTCTCTCTGGAGGTTGTAAATACATTCTGC
TACAGGTCAAGCATGTTAAGTACTGTTTATGATGTAAGTGGTTTAAAGGAGTAA
GGCTTAAAGGAGCTTCTTCAATTGATGCTCACTTACTTACCATGAGAATTT
TGTGGCTTGTGACAATTGAGCATATAATGGAGAAGTATTTCAACATGGTAAAGT
GATAGGCTTGGCGAACGCTGCACTTAGAAATGTTATAAATAGGCCCAATAGTTTAAAGATCTAAAAT
TATGATGCTAGGGCAGAAATATTGAGCTGACTTACATGCTCATATAATGCTTGTAGGAGTAA
GGTGTATTGGCTTCTTCAACAAATTGACAGTAAATTGATGGGGAAACAGATTGTTCCCATGGAGCAG
TTGCAATTGTTCTGCTGATGAGGAAATATGCTAATGATGTTGCTTGTAGGAGTAA
GGGGATGTTGGGTATGATTCTTCTGAGATGTTGACTTGTACTGTAAGGCGATAAGGAGATGC
AGCAATTTTCAAGAGCTGGGTCACTTATAACTTAAAGAAGGAGTATAGGGAGAAGATAATTGAA
GTTGAAATGCTAATGCTGACGGTAAATGGAACCAAACAGTGTAGGACATTGTTAAACTAAATAAGATG
TATTGAAATAATTAACTGCTAGTATAA

【図 5-4】

配列番号 104: C.rgsdaggerからのペルメテドロゲナーゼのアミノ酸配列:
MGRFTPLRDYFVGENALENKLNDGNAKVVGGSGSMKRFGLAKVEEYLGEAVMEKVLI
EGVPEVDPSVDT
VMNGAKMIRDFNPWDIVSISGGSPIDAAKAMWVYFEEVYDPTFEKAVPPFGIPLRKQAFV
AIPSTSGTATE
VTFSFSVITDYKAKIKYPLADFNLTLPDIIDPSLAETMPKKLTAHTGMDALTHAI
EAIVASLHSDFSDPLAMHA
MIHYKKLVSSEYDEKARHGHMIAQCLAGMAFSNALLGITHSAIHKTAGVPHIGCANAYLPV
VIDFNKAC
SERYAKIAKHLHSNSDEDLSLTEMCTMNKKMDIPLTIDYGISENDENFLDIAHNAMMDACTGSNP
RAITEEEEKKLLQYMYNGQKVNF*

配列番号 105: C. ragsdalei からのブノールデビロゲナーゼのヌクレオチド配列:

ATGATTGGTTAAAACCTAACCTTGTGGGAAACTATTAGATAAATTAAGGAAGGTATTGGCAAAGTC
ATTAAGGAAGAAAATCGGGAGATGCTTGTGAACTCATAGCAAAAGTAGCAGGGAGAGTGTGAGCA
AAGGTTGGTTGTGAAATACTCTTGAAGGAATTAAAGGAATACTCTGTAGTCTTGTAGGAGGATGA
AGTAAGAAGAGATAACAAAGATGATGTTGATAAAGAACGCTATAAATAACAAAGCTATGAGCTGGCG
ATTAGAGAAATTATAAACTAACAGAAGGCGCATATAAAGGAATAAGAGTGGATAACTCTGAGA
TGATGAGCAGGTGTAACCTAGGTTGATAGTATGGCTTCTAAAGAAATAATGAGTTTA
TACTTGCATAACTACTATTGGTAAAGGGGACAGTCTCTTCAAGACTTCAGCCTAATCATGCAGCAGATA
GTATGAGATGGAAATTAGCTCTGTGATGGAAAGGAGATAAGCTATGTGTTAGTGTCTGTAATAGGTTTA
ACCTCTGATAGATACCATAGATAATATCATGAGATTGGAAAGGAGTTTACAGCTGTATGAGTTTA
ATATACTCACAAAAATTGTGACTCTGCTATACAAACGCCAATGGAGGCTTAAAGAAAGGAGTTCTA
TGGATCTGATGTTCCAGAGTTAGCTGGTACAAAAATCCTAAATAAGGCTTGGATAAAGTGTAGCT
ATGGATGAAGCTTGTAACTATGAGGAAAAAAAGGCTTAAAGGCTTAAAGGCTTAAATTTAGTGTGAAAC
AGGCCGGGGTTCTGAGCTTCTTCAAGGGCCATATGGAGCAGATCAGCTTACAATGGAGGCT
TTATGGTCTGTGCAAAAAAATATAATCCATTCTGTAAACTCTGTGGGGATTCATAGGACAGAATACTA
TATGAGTGGAAAAAAATTATAAGGAGCAGCTTGGAAAGATCATTTTGTGGAATTTAACGACTCTCAT
GGGGTTGGTGTGATGTGTATACAAACCATATGAAAGCAGATCAAAATTAGTGGAAATTTAGCATCTTCT
TGCAGCAGCTGACTCTACTTATTATGGTGTACCTGGAGGAGATGAGCTTAATGCTTATGATCAACATAC
CAGCTATCATGATGAGCTCTTATCAGGGACATTAGCTGAAATTCCTATAAAAGGAATTGAGAAGAAGAT
GGAGAGCTCTAGGAATAATGAAAATGGAAGGCTCACAGAAATAGCTGGTGATCCTATATAATTGATTAA
G

FIGURE 54

【図 5 6】

別番号 110: C. ragsdalei からのペルノーリデロガニアのアミノ酸配列:
MEDIFKENFNLLKSIYKFNRQISLQVTCGTRSRFIAVDAIMKGQLYGVDSLSKAGISSVFTGVHPPDPDVNV
IADAMKLKYNSKADVALVAGLGGSSIDTAKIGMFLNGLKAMGEOKMPFLKIAPISTSGTSEVTNFITVTSQ
KEKCIVDHFQAPDVAIQLGFLNGLRQINPRAVDTGHDVLAHMGGSFHIEYHGRSNALLDNFVAAKVLKFLENPKLYND
KDEARDHFVQNAIQLGFLNGLRQINPRAVDTGHDVLAHMGGSFHIEYHGRSNALLDNFVAAKVLKFLENPKLYND
KAYKMLASVLKFLNGLRQINPRAVDTGHDVLAHMGGSFHIEYHGRSNALLDNFVAAKVLKFLENPKLYND
PRICKEKFLHIVQCYE

配列番号 112: C. *ragdalei* からのリン酸アセチルノブテリルトランスクレオマーのアミノ酸配列:
 MEKIWNNAKEDKKVILAEGEERLTQACEKIGANLIVGNGNEKVIKEEKSKLGVLSNGLAEVNPDETSKDLK
 KYAFAYDRLRKKGKTFPEAKDVRDPYIATMMVKLGADVLGIVVAVHGTDDGLRPLQIVKTPAGTSVVSST
 FIMEVPNCYEYGDNGVLLFLADCAPVNCPDSDQLASIASTAETAKNLCKMDPGLVAMSLFSTGSKAHLKVDR
 RNAMEIAAKKAPDLSLGEQLDLQSIAEVKASLKAPESEVAGKCANLVFPDLQAGNQYKVLQRFAKADAIGPV
 CGQFKAPNDLRSQNSDDINVVAVTAQAOA*
 (112)

配列番号 113: *C. ragsdalei* からの酵酇／核酸キナーゼのスクレオド配列:

```

ATGAGAAATTATGATGAACTGGATTCCTTAAACATTAATCCTTATGAAAGATGAAAGC
TGTTGGCAAAAAGGGACTTGTAGAAAGATAGGCGAACAGGGTCATGTTAACATAAAGGTTAAGG
GAAAAGTTGTACAGACGCCAATGGAGCATATGCAAAATGTCATACATAATGTTAATTAAGCTGCTTGA
GATAAAACATACTGTTGAAAGATAATGATGCAAAATGTTCTGAGGATCATAGGTTTCTGATGGT
AAAAAAATATGGCGCATCCATTCTTATGATGCAAGATGTAAAGGCAATAGAAGAATGTTTCACTTAAAG
ACCATTACAATCTGCGCTTAAATGAGGTTGCTTGTGAAACAAATTCATGCGCTTAACTTCACTGAGT
GCGATTTGATGCAAGCATTTCTGACGAACTGCGAGATTGCTTACTATGCAACATCTTATGATATTC
TTGAAAAGTATGATCATGAAAGATATGGTTTCTGACGACTTATGCTTCAATTGAGCAGGCAA
GTTGTTAAAGGAAAGCTTCAAAAGATCTTGTACCTAATGTTCTGAGGAACTTGTATGTTGTC
AGTAAAGGAAACCGGAAAAGCAGTAGATCAACATGTCAGGACTTCCTTCTGAGGACTCTGTTAATGGGACT
AGATGTTGATGATGATGCACTTATACATTCTTATGAAAGAACAGCTGTTGAGTGTAGAAAT
GATGACTTATGAGCAACAAAAGTCAGGAACTTCTGGAGATCTAGGAGGAACAGGCTTTAGAGGTAG
AACAGGCTCCTAAATGCGAAATGACTGAGCAAAATCTGCAATTAAATGATGTTATCACAAAGGTTAACTT
CTGAGCTTACAGGACTCTGCTTGTAGGAGCATGCTTAAATGATCTTACAGGACTCTGGAGAAAT
AAGGAAAGGGGAGGAACTGAGCTTAAATGAGCAACTGAGCTTAACTGAGGAAATGAGGAAAT
ATGAGAACTTATGAGCTTGTAGGAACTTAAAGGAAAGGAAATGAGCTTAACTGAGGAAAT

```

FIGURE FF

【図 5 7】

配列番号 114: C. ragasdalei からの新酵素、アルギニキナーゼのアミノ酸配列:
MKIILVNGCSSLSSQQLMDKMEAVAGV1ERIGAEGSVLTHVKNGEKFVTEQPMEDHKVAJQLVNLNAIVDK
KGHVIKDMSEISAVGHRVLHGGKYAASILIDNNVMKAIECIPGLPHNPNAMIGDACKLMLPNTPMVAV
FDFTAHQHTMPDQDAYTAIPIPDYSEKDYIARPFHGTSRHSVDEIAKLLKDPDKLCHLGNSACIVCNQG
KAVDTMMTGLPLAGVLMGTRGDRDIPAIKPFYVMMKRTGMSDEMDLTMKNGSILGIVGSVDFRVEEA
NSGNDRAKILANMYYHHVKSFIGAVLNGLDAAIFTAGLENSATSRSAICAKGSLYFGIKIDEENKKRGEAL
E1STDPSRQKAKLWVLPITNEELMIARDTKEVENK*

FIGURE 57

【図58】

配列番号 117: C. *rogsdalei* からのアルペビド: フレドキン酸化還元酵素のヌクレオチド配列:
ATGTAATGGTTATAAGTGAATTATGAAATTAACTTAAAAGAACGACTTCGCAATCAGAAAATTGATTAGTAAAT
AGCTAAGAAAATTGTTATAGGCTGTGGGGACTAGGTGTTAAACCTTATTGTGATAGATCTAAAATGATGCTTAA
TCACCGAAAATAATTATAATTGTAACCGCTGTTAACTGGACCTCGAGTCCAACTGTGGAAGATTGTTAGTGGTAA
GTTACTAAAGCACCGCTTACAGGAACATAGGAATTTCACATTGGGTGAAATGGGAGTAGTGAACCTTGA
TGGCTGGGATATGATAATAGTAGAGGATAAGCTGATTCACCATGTTACATTGAAATAGTAGATGATAAGTGAAT
AAAGATGCGCTCACAGCTTGGGGAAAGGTACATCGAAAGAACATCAAAGAGTTAGAAAAGATAACTGAGAAATG
AAAGGTTATGTTAGGCTGCTGGAAAGATGTCCTTATGGCAGCTGTAGTGAATGATGAGTAGATAAGTGC
GCAAGAGGGCGCTTGGTGCAGTTGGGATCTAAACCTTAAAGCTTACATGTTAAAGGCTGGAAACTG
TTAGCTGATAAGAAAAGAAGTAAAGGTTAGCTGGTAAAGAAAATCATACATTAAAGATCTGAGTCCTGGTAA
GGGAATGCCACATTGTTGACGCTACTGTAAATATAAATGAAAATGAGGTCTATCTGTTAAATATTTCAG
AATCTTACGCGATCAAGCAGATAAAATAAGTGGAGGAGCTCTTACTGCTAACCAACTGTAAGGAAAATCTTGTAA
CAGCTGCTTATAGGTTGGAGATGGTAGACTAAAGATGTCAGAGTGGGAGGACCGGAGTATGAAACA
CTGGTTGTTTGGCTCTGACTGTGGTCATATGATTAGTCATATAATGAGCTAATATTGTTAGTGAATATTGTT
ATTGACTATTTACTCTGGTGCACAACTGTCAGCTATGGTAAATATAAATGAAAATGAGGTCTATCTGTTAAATATTTCAG
TAGCCGGAGATAACCTATCTCTCAAGTGGGGAGATCAGGGACTATGTTGCTGGTAAAGAAAATGTTGATATG
AAGCTTGGGACCAAGATGAGATACTGGTCTATAGGCTTGTGAAAGTTGAGACTCTGAGTATCTGAGC
TTAAAAAGCAAGAAATTCTCAGCATATGTCACCGGGAAATCAGGGACATGGTATTACCTATGCGTAAATAGA
GAGGATGTCATATAAGGGATATGATTAACTCTGAAATATTAGGTTATCCGAAAAACTGTTAGATGATTGTCATTAGAT
GGTAAAGCAGCCATGCCAAAATGTCATGTTAACTGCTGTTAACTGTTAGGATGTCATATTCACACTAATT
TGGGCTTGGTAAACAGGATTATGAGTAGATGTTAACTGAGTGGAAATCTACTTGTGATTCTGAGATTCTACTATTG
AGGCGAGGAGATAGGATGAGCTTGGGAAATTTATCTGAGTGGGAGACAGCAGCAGGAGATCTAC
CTAAAGAGATTGTTAGGAAACGCTTACAGGCTGTCATAAAGGGACACGCTTACAGGCTAGATGTTCTGCGAG
AATATTACTGAGTGGAGGATGAGTAAAGGGGTATACTCAGAACGAAACATTAAAGAAATTAGGATTAGTGAAT
ATATAGGTTAGTCTCTAG

配列番号 118: C. *ragdalei* からのアルデヒド: フェロデキシン酸化還元酵素のアミノ酸配列:
 MYGYNGKYLRLNLRKTCSENLDLAKKKFICRGLGVKTLFDEIDPKIDALSPENKFIVTGPLTGA
 VPTSGRFMVVT
 APITGTIGSNSGGKGVWLKLKAGWDMMIWEVDKAQDPSVYIEVWDDVKEIKDASLGWKGKVTS
 SETTEKELEKTTENRSRKLVICG
 PAGERLSLMAAVMNDVDTAAARGGVGMGSKNLKIAITVKTGKJALADKEVKVSVETKLTKL
 PDVGAGQMGPMY
 GTAIWLNVIINENGHVPHVNNFQESYTQDAKNSGETITANQLVRKNPYCSCIPGGRRWVRLKD
 GTECCGPYETWLWCFGSD
 QGSSYLDLDAAMNLCENEYDTITCGATIAAQMRYGVYKVEEIAQGDNLWLGWDTEMSIGW
 MIGVYSEFGFAK
 MTNGRSRCLCYYGVPMESVTMVKYI(PAYDPRGIQHGHIYAVNNRGGCHKGYMINPEIY
 GYKEPLDRFALDGKAAYAK
 MMHDLTAVIDSGLCLIFTFFGLQKDYDVMDYNAWVGESTCDDSLLEAGDRWVHTLEKLFNL
 AAGIDDSQDTPLRKLLPEI
 PDGPSKHVGHLRDLVLPPEVSYRGWSKEGIPTEETLKKLGLDEYIGK*

FIGURE 58

【図59】

配列番号 136: Clostridium ljungdahli (CP001666.1, Gi:30043347) の 16S rRNA 遺伝子
TTAAATTAAAGAGTTTGATCTTCGGCTCAAGGACGAACGGCTGGCGGGCTTAAACACATGCCAAGTGCAGGATGAACT
CTCTGGGGAGTGTAGGGATTAGCCGGCGGAGGGTGTAAACGCTGGTAACTCCCTAAACGCTTAAAGGGGGATAGCTCC
GAAAAGGGAGATAATTACCTGCAATAATCCTGAGGACTGTTAACAGGAGATACTCGCTTGTAGAGT
CCCCGGGGCATTAAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCCCTAACCAAGGGAGCATGGCTAGCCGACCTGAGAGGGTGTATC
GGCCACATTGGACTGAGAGACGGCTCAAGCTTACCGGGAGGCGACAGTGGGGAAATTGCAACATGGGGAAA
GCCTGTAGTCAGCAACGCCGCGTAGTGAAGAAGGTTTCCGGATTGAAAGCTCTGTCTTGGGAGCATAATGACG
GTACCCAAGGGAGAACGGCACCGCTAACTAGTGGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGTTGGCAGCGCTTGTCCGGAA
TTACCTGGCGTAAAGAGTGGCTAGGGGATATTAAAGTGAGATGAAATACCCGGCTTAAACCCGGCAGCTGATT
TCAAACTGGATATCTAGAGTGGGGAGAGGAGAATGGAACTTCTAGTGTAGCGTGAATAGCGTAGAGATTGGAA
GAACACAGTGGGGAGGGGGAGCTTCTGGCCGCTAACTGCGTAGGGCAACGGGGCTGGGGTAGCAAACAGGAT
TAGATACCTCTGGTAGTCAACGGCTAAAGCGTAGTACTAGGTGTAGGGAGTAGCTGACCCCCTCTGGCCGAGTAA
ACAATAAGTACTCCCTGGGAAGTACGGATCCGAAGTAAAACCAAAAGGATTGAGGGGGGGCCCGCAACAGA
GGGGAGCATGGTTAAITCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCTGGACTGACATACCTGTAATCTAGAGATA
GAGAAGGCCCTCGGGGAGGGGATACAGGGTGTGATGGTGTCTGCTGAGCTGTGAGATGTTAGGTAAAGTC
CTGCAACGAGCGAACCCCTGTGTTAGTGTCTAACATTAGTGTAGCAGTACTGCAAGACTGCCGGGTTAAAGGG
GAGGAGAGTGGGATGAGCTAACATCTGCCCCCTTATGTCAGGGCAACACAGCTGTACAAATGGGAGTACA
GAGAGAGCAAGGCCAGGGATGGAGCAACCTTACAAACCTGGCCCTAGTGGCGAGCTGGCAACACTGGCCT
ACATGAAGTGGGATGTCAGTAACTCGGAATCGAGTGTGGCTGAAATCGCTTCCGGGCTTGTACACCCGGC
CGTCACACATGAGCTGGCAACACCCGGAGTCTGCTAGTCTAACATTAGGGGGAGCGGGCGCAAGGTGGGTTAGT
AATTGGGGTGA

FIGURE 59

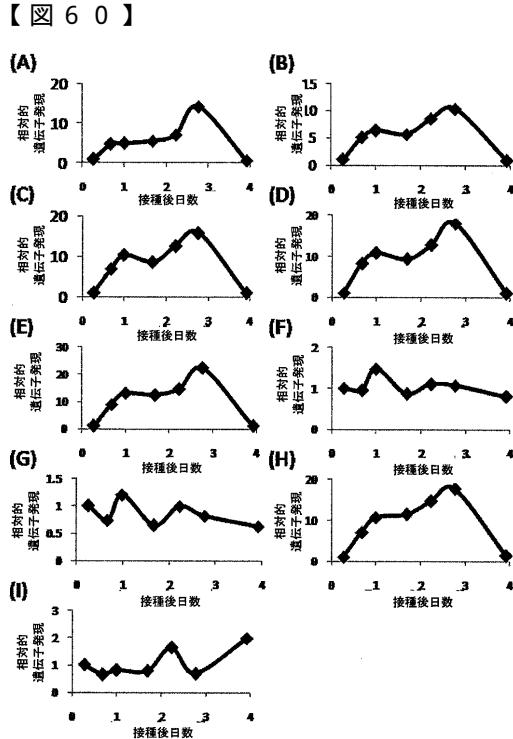


FIGURE 6C

【図1】

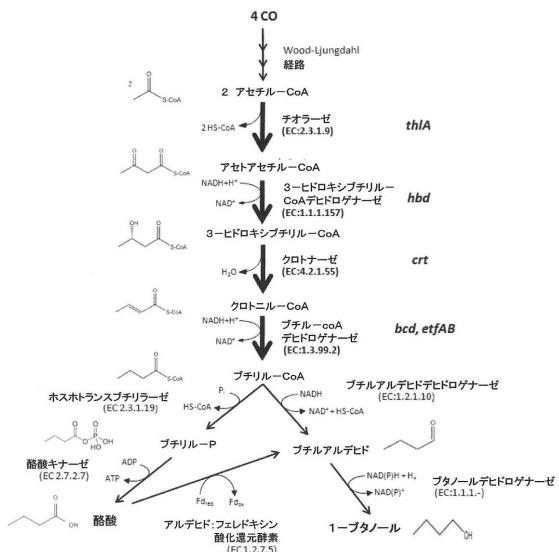
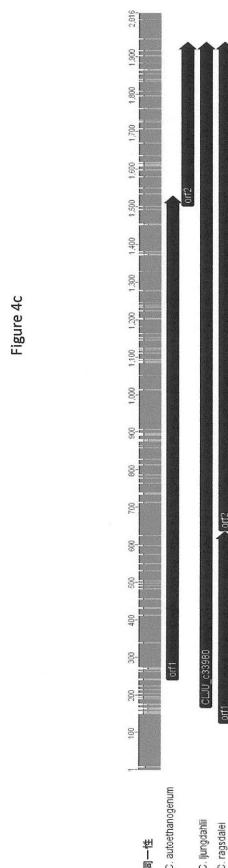


Figure 1

【図4-8】



【図8】

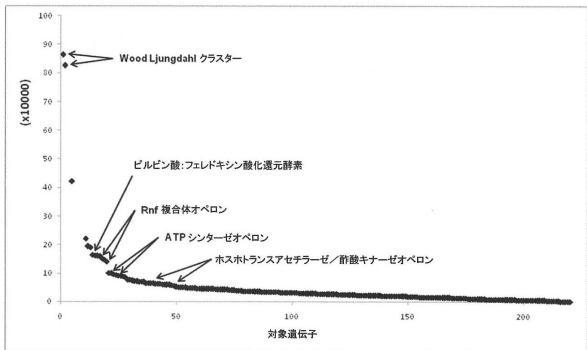


Figure 8

【配列表】

0006014042000001.xml

フロントページの続き

前置審査

(72)発明者 ケプケ , ミハエル

ニュージーランド国 1052 オークランド , パーネル , バルフォー・ロード 24 , ケア オ
ブ ランザテク・ニュージーランド・リミテッド

(72)発明者 リュウ , フアンミン

ニュージーランド国 1052 オークランド , パーネル , バルフォー・ロード 24 , ケア オ
ブ ランザテク・ニュージーランド・リミテッド

(72)発明者 シンプソン , ショーン

ニュージーランド国 1052 オークランド , パーネル , バルフォー・ロード 24 , ケア オ
ブ ランザテク・ニュージーランド・リミテッド

審査官 福澤 洋光

(56)参考文献 米国特許出願公開第2010/0151543(US,A1)

国際公開第2009/113878(WO,A1)

米国特許出願公開第2009/0111154(US,A1)

国際公開第2010/093262(WO,A1)

国際公開第2009/122192(WO,A1)

Biotechnology Advances , 2010年 5月 , Vol.28 , p.651-657

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12N 1/00 - 15/90

C12P 1/00 - 41/00

CA / MEDLINE / BIOSIS / WPIDS (STN)

PubMed

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)