

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成22年6月17日(2010.6.17)

【公表番号】特表2009-535064(P2009-535064A)

【公表日】平成21年10月1日(2009.10.1)

【年通号数】公開・登録公報2009-039

【出願番号】特願2009-509717(P2009-509717)

【国際特許分類】

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 P 7/16 (2006.01)

C 1 2 P 7/26 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 1/21 Z N A

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/15

C 1 2 P 7/16

C 1 2 P 7/26

C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成22年4月23日(2010.4.23)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

- i) ピルビン酸から - アセト乳酸へ、
- ii) - アセト乳酸からアセトインへ、
- iii) アセトインから2, 3 - ブタンジオールへ、
- iv) 2, 3 - ブタンジオールから2 - ブタノンへ、および
- v) 2 - ブタノンから2 - ブタノールへ

からなる群から選択される生成物変換に対して基質を触媒するポリペプチドをコードする少なくとも1個のDNA分子を含む組換え微生物の宿主細胞であって、ここで少なくとも1個のDNA分子が該微生物の宿主細胞に対して異種であり、かつ該微生物の宿主細胞が2 - ブタノールを生産する、組換え微生物の宿主細胞。

【請求項2】

- i) ピルビン酸塩から - アセト乳酸へ、
- ii) - アセト乳酸からアセトインへ、
- iii) アセトインから2, 3 - ブタンジオールへ、および
- iv) 2, 3 - ブタンジオールから2 - ブタノンへ、

からなる群から選択される生成物変換に対して基質を触媒するポリペプチドをコードする少なくとも1個のDNA分子を含む組換え微生物の宿主細胞であって、ここで少なくとも1個のDNA分子が該微生物の宿主細胞に対して異種であり、かつ該微生物の宿主細胞が2 - ブタノールを生産する、組換え微生物の宿主細胞。

【請求項 3】

2 - ブタノールを生産するための方法であって、

- 1) i) ピルビン酸から - アセト乳酸へ、
 - ii) - アセト乳酸からアセトインへ、
 - iii) アセトインから 2, 3 - ブタンジオールへ、
 - iv) 2, 3 - ブタンジオールから 2 - ブタノンへ、および
 - v) 2 - ブタノンから 2 - ブタノールへ、

からなる群から選択される生成物変換に対して基質を触媒するポリペプチドをコードする少なくとも 1 個の DNA 分子を含む組換え微生物の宿主細胞を提供し、ここで少なくとも 1 個の DNA 分子が該微生物の宿主細胞に対して異種であり、そして

2) (1) の宿主細胞を 2 - ブタノールが生産される条件下の発酵培地内で発酵可能な炭素基質と接触させる、
ことを含む、上記方法。

【請求項 4】

2 - ブタノールを生産するための方法であって、

- 1) i) ピルビン酸から - アセト乳酸へ、
 - ii) - アセト乳酸からアセトインへ、
 - iii) アセトインから 2, 3 - ブタンジオールへ、および
 - iv) 2, 3 - ブタンジオールから 2 - ブタノンへ、

からなる群から選択される生成物変換に対して基質を触媒するポリペプチドをコードする少なくとも 1 個の DNA 分子を含む組換え微生物の宿主細胞を提供し、ここで少なくとも 1 個の DNA 分子が該微生物の宿主細胞に対して異種であり、そして

2) (1) の宿主細胞を 2 - ブタノールが生産される条件下の発酵培地内で発酵可能な炭素基質と接触させる、
ことを含む、上記方法。

【請求項 5】

請求項 3 に記載の方法により生産される、2 - ブタノールを含有する発酵生産物培地。

【請求項 6】

請求項 4 に記載の方法により生産される、2 - ブタノールを含有する発酵生産物培地。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0192

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0192】

以上、本発明を要約すると下記のとおりです。

1. i) ピルビン酸から - アセト乳酸へ、
 - ii) - アセト乳酸からアセトインへ、
 - iii) アセトインから 2, 3 - ブタンジオールへ、
 - iv) 2, 3 - ブタンジオールから 2 - ブタノンへ、および
 - v) 2 - ブタノンから 2 - ブタノールへ

からなる群から選択される生成物変換に対して基質を触媒するポリペプチドをコードする少なくとも 1 個の DNA 分子を含む組換え微生物の宿主細胞であって、ここで少なくとも 1 個の DNA 分子が該微生物の宿主細胞に対して異種であり、かつ該微生物の宿主細胞が 2 - ブタノールを生産する、組換え微生物の宿主細胞。

2. i) ピルビン酸塩から - アセト乳酸へ、
 - ii) - アセト乳酸からアセトインへ、
 - iii) アセトインから 2, 3 - ブタンジオールへ、および
 - iv) 2, 3 - ブタンジオールから 2 - ブタノンへ、

からなる群から選択される生成物変換に対して基質を触媒するポリペプチドをコードする

少なくとも1個のDNA分子を含む組換え微生物の宿主細胞であって、ここで少なくとも1個のDNA分子が該微生物の宿主細胞に対して異種であり、かつ該微生物の宿主細胞が2-ブタノンを生産する、組換え微生物の宿主細胞。

3. ピルビン酸から2-アセト乳酸への生成物変換に対して基質を触媒するポリペプチドがアセト乳酸シンターゼである、上記1または2に記載の宿主細胞。

4. 2-アセト乳酸からアセトインへの生成物変換に対して基質を触媒するポリペプチドがアセト乳酸デカルボキシラーゼである、上記1または2に記載の宿主細胞。

5. アセトインから2,3-ブタンジオールへの生成物変換に対して基質を触媒するポリペプチドがブタンジオール脱水素酵素である、上記1または2に記載の宿主細胞。

6. 2,3-ブタンジオールから2-ブタノンへの生成物変換に対して基質を触媒するポリペプチドがジオールデヒドラターゼまたはグリセロールデヒドラターゼである、上記1または2に記載の宿主細胞。

7. 2-ブタノンから2-ブタノールへの生成物変換に対して基質を触媒するポリペプチドがブタノール脱水素酵素である、上記1に記載の宿主細胞。

8. 細胞が、細菌、シアノバクテリア、糸状菌および酵母からなる群から選択される、上記1または2に記載の宿主細胞。

9. 細胞が、クロストリジウム属、ザイモナス属、エシェリキア属、サルモネラ属、ロドコッカス属、シュドモナス属、バチルス属、ラクトバチルス属、腸球菌属、ペディオコッカス属、アルカリゲネス属、クレブシエラ属、バエニバチルス属、アースロバクター属、コリネバクテリウム属、プレバクテリウム属、ピキア属、カンジダ属、ハンセンラ属およびサッカロミセス属からなる群から選択される属のメンバーである、上記8に記載の宿主細胞。

10. アセト乳酸シンターゼが、ギャップペナルティ = 10、ギャップ長ペナルティ = 0.1、およびGonnet 250シリーズのタンパク質重み行列のデフォルトパラメータを用いるClustal Wのアラインメント法に基づき、配列番号4、配列番号77、および配列番号79からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、上記3に記載の宿主細胞。

11. アセト乳酸デカルボキシラーゼが、ギャップペナルティ = 10、ギャップ長ペナルティ = 0.1、およびGonnet 250シリーズのタンパク質重み行列のデフォルトパラメータを用いるClustal Wのアラインメント法に基づき、配列番号2、配列番号81、および配列番号83からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、上記4に記載の宿主細胞。

12. ブタンジオール脱水素酵素が、ギャップペナルティ = 10、ギャップ長ペナルティ = 0.1、およびGonnet 250シリーズのタンパク質重み行列のデフォルトパラメータを用いるClustal Wのアラインメント法に基づき、配列番号6、配列番号85、配列番号87、および配列番号89からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、上記5に記載の宿主細胞。

13. ジオールデヒドラターゼまたはグリセロールデヒドラターゼが、配列番号8、99、105、135、138、141、146、および164の大型サブユニット、配列番号10、101、107、136、139、142、148、および165の中型サブユニット、ならびに配列番号12、103、109、137、140、143、150、および166の小型サブユニットを用いて作成されたプロファイル隠れマルコフモデルを用いてクエリーが実行される場合に、0.01以下のE値パラメータを各々与える全長の大型、中型および小型サブユニットを含み、各クエリーがhmmsearchアルゴリズムを用いて実行され、ここで、Zパラメータが10億に設定される、上記6に記載の宿主細胞。

14. ジオールデヒドラターゼまたはグリセロールデヒドラターゼが、

a) ジオールおよびグリセロールデヒドラターゼ酵素の大型、中型および小型サブユニットに対応するアミノ酸配列のアラインメントからプロファイル隠れマルコフモデルを生成させ、ここで、

i) 大型サブユニットが配列番号 8、99、105、135、138、141、146、および 164 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、

ii) 中型サブユニットが配列番号 10、101、107、136、139、142、148、および 165 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつ

iii) 小型サブユニットが配列番号 12、103、109、137、140、143、150、および 166 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、

b) hmms search アルゴリズムを用いて、(a) のプロファイル隠れマルコフモデルを用いてジオールおよびグリセロールデヒドラターゼの配列を有するタンパク質配列における少なくとも 1 つの公的データベースにクエリーを実行し、ジオールおよびグリセロールデヒドラターゼのアミノ酸配列の第 1 のデータセットを同定し、ここで、Z パラメータが 10 億に設定されかつ E 値パラメータが 0.01 に設定され、そして

c) (b) の第 1 のデータセットから任意の部分配列を取り出し、ジオールおよびグリセロールデヒドラターゼのアミノ酸配列の第 2 のデータセットを生成させ、ここでジオールデヒドラターゼおよびグリセロールデヒドラターゼ酵素が同定される、ステップを含むプロセスによって同定される、上記 6 に記載の宿主細胞。

15. ジオールデヒドラターゼまたはグリセロールデヒドラターゼが、ギャップペナルティ = 10、ギャップ長ペナルティ = 0.1、および Gonnet 250 シリーズのタンパク質重み行列のデフォルトパラメータを用いる Clustal W のアラインメント法に基づき、配列番号 8、93、99、105、135、138、141、146、164、167、170、173、176、179、182、185、188、191、194、197、200、203、206、209、212、215、218、221、224、227、130、243、254、255、256、257、258 および 259 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 95% の同一性を有するアミノ酸配列を含む大型サブユニットを含む、上記 6 に記載の宿主細胞。

16. ジオールデヒドラターゼまたはグリセロールデヒドラターゼが、ギャップペナルティ = 10、ギャップ長ペナルティ = 0.1、および Gonnet 250 シリーズのタンパク質重み行列のデフォルトパラメータを用いる Clustal W のアラインメント法に基づき、配列番号 10、95、101、107、136、139、142、148、165、168、171、174、177、180、183、186、189、192、195、198、201、204、207、210、213、216、219、222、225、228、231、244、250、252、260、261、262、263、364、265、266、および 167 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 95% の同一性を有するアミノ酸配列を含む中型サブユニットを含む、上記 6 に記載の宿主細胞。

17. ジオールデヒドラターゼまたはグリセロールデヒドラターゼが、ギャップペナルティ = 10、ギャップ長ペナルティ = 0.1、および Gonnet 250 シリーズのタンパク質重み行列のデフォルトパラメータを用いる Clustal W のアラインメント法に基づき、配列番号 12、97、103、109、137、140、143、150、166、169、172、175、178、181、184、187、190、193、196、199、202、205、208、211、214、217、220、223、226、229、232、234、236、238、240、242、245、248、249、251、253、268、270、271、272、273、および 274 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 95% の同一性を有するアミノ酸配列を含む小型サブユニットを含む、上記 6 に記載の宿主細胞。

18. ジオールデヒドラターゼまたはグリセロールデヒドラターゼが、ギャップペナルティ = 10、ギャップ長ペナルティ = 0.1、および Gonnet 250 シリーズのタンパク質重み行列のデフォルトパラメータを用いる Clustal W のアラインメント法に基づき、配列番号 233、235、237、239、241、246、および 247 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 95% の同一性を有するアミノ酸配列を含む融合された大型、中型および小型サブユニットを含む、上記 6 に記載の宿主

細胞。

19. ジオールデヒドラターゼまたはグリセロールデヒドラターゼが、融合された大型、中型および小型サブユニットを含み、かつ、ギャップペナルティ = 10、ギャップ長ペナルティ = 0.1、および Gonnet 250 シリーズのタンパク質重み行列のデフォルトパラメータを用いる Clustal W のアラインメント法に基づき、

- a) 配列番号 8、配列番号 10、および配列番号 12、
- b) 配列番号 93、配列番号 95、および配列番号 97、
- c) 配列番号 99、配列番号 101、および配列番号 103、
- d) 配列番号 105、配列番号 107、および配列番号 109、
- e) 配列番号 135、配列番号 136、および配列番号 137、
- f) 配列番号 138、配列番号 139、および配列番号 140、
- g) 配列番号 146、配列番号 148、および配列番号 150、
- h) 配列番号 141、配列番号 142、および配列番号 143、および
- i) 配列番号 164、配列番号 165、および配列番号 166、

からなる群から選択される大型、中型および小型サブユニットをコードするアミノ酸配列の 3 つ全てを含むアミノ酸配列に対して少なくとも 95% の同一性を有する、上記 6 に記載の宿主細胞。

20. ブタノール脱水素酵素が、ギャップペナルティ = 10、ギャップ長ペナルティ = 0.1、および Gonnet 250 シリーズのタンパク質重み行列のデフォルトパラメータを用いる Clustal W のアラインメント法に基づき、配列番号 14、配列番号 72、配列番号 75、および配列番号 91 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 95% の同一性を有するアミノ酸配列を有する、上記 8 に記載の宿主細胞。

21. 2 - ブタノールを生産するための方法であって、

- 1) i) ピルビン酸から - アセト乳酸へ、
- ii) - アセト乳酸からアセトインへ、
- iii) アセトインから 2, 3 - ブタンジオールへ、
- iv) 2, 3 - ブタンジオールから 2 - ブタノンへ、および
- v) 2 - ブタノンから 2 - ブタノールへ、

からなる群から選択される生成物変換に対して基質を触媒するポリペプチドをコードする少なくとも 1 個の DNA 分子を含む組換え微生物の宿主細胞を提供し、ここで少なくとも 1 個の DNA 分子が該微生物の宿主細胞に対して異種であり、そして

2) (1) の宿主細胞を 2 - ブタノールが生産される条件下の発酵培地内で発酵可能な炭素基質と接触させる、
ことを含む、上記方法。

22. 2 - ブタノールを生産するための方法であって、

- 1) i) ピルビン酸から - アセト乳酸へ、
- ii) - アセト乳酸からアセトインへ、
- iii) アセトインから 2, 3 - ブタンジオールへ、および
- iv) 2, 3 - ブタンジオールから 2 - ブタノンへ、

からなる群から選択される生成物変換に対して基質を触媒するポリペプチドをコードする少なくとも 1 個の DNA 分子を含む組換え微生物の宿主細胞を提供し、ここで少なくとも 1 個の DNA 分子が該微生物の宿主細胞に対して異種であり、そして

2) (1) の宿主細胞を 2 - ブタノンが生産される条件下の発酵培地内で発酵可能な炭素基質と接触させる、
ことを含む、上記方法。

23. 発酵可能な炭素基質が単糖、オリゴ糖、および多糖からなる群から選択される、上記 21 または 22 に記載の方法。

24. ピルビン酸から - アセト乳酸への生成物変換に対して基質を触媒するポリペプチドがアセト乳酸シンターゼである、上記 21 または 22 に記載の方法。

25. - アセト乳酸からアセトインへの生成物変換に対して基質を触媒するポリペプチ

ドがアセト乳酸デカルボキシラーゼである、上記 2 1 または 2 2 に記載の方法。

2 6 . アセトインから 2 , 3 - ブタンジオールへの生成物変換に対して基質を触媒するポリペプチドがブタンジオール脱水素酵素である、上記 2 1 または 2 2 に記載の方法。

2 7 . 2 , 3 - ブタンジオールから 2 - ブタノンへの生成物変換に対して基質を触媒するポリペプチドがジオールデヒドラターゼまたはグリセロールデヒドラターゼである、上記 2 1 または 2 2 に記載の方法。

2 8 . 2 - ブタノンから 2 - ブタノールへの生成物変換に対して基質を触媒するポリペプチドがブタノール脱水素酵素である、上記 2 1 に記載の方法。

2 9 . 細胞が細菌、シアノバクテリア、糸状菌、および酵母からなる群から選択される、上記 2 1 または 2 2 に記載の方法。

3 0 . 細胞が、クロストリジウム属、ザイモモナス属、エシェリキア属、サルモネラ属、ロドコッカス属、シュードモナス属、パチルス属、ラクトパチルス属、腸球菌属、ペディオコッカス属、アルカリゲネス属、クレブシエラ属、パエニパチルス属、アースロバクター属、コリネバクテリウム属、プレバクテリウム属、ピキア属、カンジダ属、ハンセンラ属およびサッカロミセス属からなる群から選択される属のメンバーである、上記 2 9 に記載の方法。

3 1 . アセト乳酸シンターゼが、ギャップペナルティ = 1 0 、ギャップ長ペナルティ = 0 . 1 、および G o n n e t 2 5 0 シリーズのタンパク質重み行列のデフォルトパラメータを用いる C l u s t a l W のアラインメント法に基づき、配列番号 4 、配列番号 7 7 、および配列番号 7 9 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の同一性を有するアミノ酸配列を有する、上記 2 4 に記載の方法。

3 2 . アセト乳酸デカルボキシラーゼが、ギャップペナルティ = 1 0 、ギャップ長ペナルティ = 0 . 1 、および G o n n e t 2 5 0 シリーズのタンパク質重み行列のデフォルトパラメータを用いる C l u s t a l W のアラインメント法に基づき、配列番号 2 、配列番号 8 1 、および配列番号 8 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の同一性を有するアミノ酸配列を有する、上記 2 5 に記載の方法。

3 3 . ブタンジオール脱水素酵素が、ギャップペナルティ = 1 0 、ギャップ長ペナルティ = 0 . 1 、および G o n n e t 2 5 0 シリーズのタンパク質重み行列のデフォルトパラメータを用いる C l u s t a l W のアラインメント法に基づき、配列番号 6 、配列番号 8 5 、配列番号 8 7 、および配列番号 8 9 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の同一性を有するアミノ酸配列を有する、上記 2 6 に記載の方法。

3 4 . ジオールデヒドラターゼまたはグリセロールデヒドラターゼが、配列番号 8 、9 9 、1 0 5 、1 3 5 、1 3 8 、1 4 1 、1 4 6 、および 1 6 4 の大型サブユニット、配列番号 1 0 、1 0 1 、1 0 7 、1 3 6 、1 3 9 、1 4 2 、1 4 8 、および 1 6 5 の中型サブユニット、ならびに配列番号 1 2 、1 0 3 、1 0 9 、1 3 7 、1 4 0 、1 4 3 、1 5 0 、および 1 6 6 の小型サブユニットを用いて作成されたプロファイル隠れマルコフモデルを用いてクエリーが実行される場合に、0 . 0 1 以下の E 値パラメータを各々与える全長の大型、中型および小型サブユニットを含み、各クエリーが h m m s e a r c h アルゴリズムを用いて実行され、ここで、Z パラメータが 1 0 億に設定される、上記 2 7 に記載の方法。

3 5 . ジオールデヒドラターゼまたはグリセロールデヒドラターゼが、

a) ジオールおよびグリセロールデヒドラターゼ酵素の大型、中型および小型サブユニットに対応するアミノ酸配列のアラインメントからプロファイル隠れマルコフモデルを生成させ、ここで、

i) 大型サブユニットが配列番号 8 、9 9 、1 0 5 、1 3 5 、1 3 8 、1 4 1 、1 4 6 、および 1 6 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、

i i) 中型サブユニットが配列番号 1 0 、1 0 1 、1 0 7 、1 3 6 、1 3 9 、1 4 2 、1 4 8 、および 1 6 5 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつ

i i i) 小型サブユニットが配列番号 1 2 、1 0 3 、1 0 9 、1 3 7 、1 4 0 、1 4 3 、1 5 0 、および 1 6 6 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、

b) hmmsrchアルゴリズムを用いて、(a)のプロファイル隠れマルコフモデルを用いてジオールおよびグリセロールデヒドラターゼの配列を有するタンパク質配列における少なくとも1つの公的データベースにクエリーを実行し、ジオールおよびグリセロールデヒドラターゼのアミノ酸配列の第1のデータセットを同定し、ここでZパラメータが10億に設定されかつE値パラメータが0.01に設定され、そして

c) (b)の第1のデータセットから任意の部分配列を取り出し、ジオールおよびグリセロールデヒドラターゼのアミノ酸配列の第2のデータセットを生成させ、ここでジオールデヒドラターゼおよびグリセロールデヒドラターゼ酵素が同定される、ステップを含むプロセスによって同定される、上記27に記載の方法。

36. ジオールデヒドラターゼまたはグリセロールデヒドラターゼが、ギャップペナルティ=10、ギャップ長ペナルティ=0.1、およびGonnet 250シリーズのタンパク質重み行列のデフォルトパラメータを用いるClustal Wのアラインメント法に基づき、配列番号8、93、99、105、135、138、141、146、164、167、170、173、176、179、182、185、188、191、194、197、200、203、206、209、212、215、218、221、224、227、130、243、254、255、256、257、258および259からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含む大型サブユニットを含む、上記27に記載の方法。

37. ジオールデヒドラターゼまたはグリセロールデヒドラターゼが、ギャップペナルティ=10、ギャップ長ペナルティ=0.1、およびGonnet 250シリーズのタンパク質重み行列のデフォルトパラメータを用いるClustal Wのアラインメント法に基づき、配列番号10、95、101、107、136、139、142、148、165、168、171、174、177、180、183、186、189、192、195、198、201、204、207、210、213、216、219、222、225、228、231、244、250、252、260、261、262、263、364、265、266、および167からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含む中型サブユニットを含む、上記27に記載の方法。

38. ジオールデヒドラターゼまたはグリセロールデヒドラターゼが、ギャップペナルティ=10、ギャップ長ペナルティ=0.1、およびGonnet 250シリーズのタンパク質重み行列のデフォルトパラメータを用いるClustal Wのアラインメント法に基づき、配列番号12、97、103、109、137、140、143、150、166、169、172、175、178、181、184、187、190、193、196、199、202、205、208、211、214、217、220、223、226、229、232、234、236、238、240、242、245、248、249、251、253、268、270、271、272、273、および274からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含む小型サブユニットを含む、上記27に記載の方法。

39. ジオールデヒドラターゼまたはグリセロールデヒドラターゼが、ギャップペナルティ=10、ギャップ長ペナルティ=0.1、およびGonnet 250シリーズのタンパク質重み行列のデフォルトパラメータを用いるClustal Wのアラインメント法に基づき、配列番号233、235、237、239、241、246、および247からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含む融合された大型、中型および小型サブユニットを含む、上記27に記載の方法。

40. ジオールデヒドラターゼまたはグリセロールデヒドラターゼが、融合された大型、中型および小型サブユニットを含み、かつ、ギャップペナルティ=10、ギャップ長ペナルティ=0.1、およびGonnet 250シリーズのタンパク質重み行列のデフォルトパラメータを用いるClustal Wのアラインメント法に基づき、

a) 配列番号8、配列番号10、および配列番号12、

- b) 配列番号 93、配列番号 95、および配列番号 97、
- c) 配列番号 99、配列番号 101、および配列番号 103、
- d) 配列番号 105、配列番号 107、および配列番号 109、
- e) 配列番号 135、配列番号 136、および配列番号 137、
- f) 配列番号 138、配列番号 139、および配列番号 140、
- g) 配列番号 146、配列番号 148、および配列番号 150、
- h) 配列番号 141、配列番号 142、および配列番号 143、および
- i) 配列番号 164、配列番号 165、および配列番号 166、

からなる群から選択される大型、中型および小型サブユニットをコードするアミノ酸配列の3つ全部を含みアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有する、上記27に記載の方法。

41. ブタノール脱水素酵素が、ギャップペナルティ = 10、ギャップ長ペナルティ = 0.1、および Gonnet 250 シリーズのタンパク質重み行列のデフォルトパラメータを用いる Clustal W のアラインメント法に基づき、配列番号 14、配列番号 72、配列番号 75、および配列番号 91 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、上記28に記載の方法。

42. 上記21に記載の方法により生産される、2-ブタノールを含有する発酵生産物培地。

43. 上記22に記載の方法により生産される、2-ブタノン含有する発酵生産物培地。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0193

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0193】

実施例1

アセト乳酸シンターゼのクローニングおよび発現

この実施例の目的は、大腸菌内でアセト乳酸シンターゼ酵素をコードする budB 遺伝子のクローニングおよび発現を行うことであった。PCR を用い、budB 遺伝子をクレブシエラ・ニューモニエ株 ATCC 25955 のゲノム DNA から増幅した。

アセト乳酸シンターゼをコードする budB 配列を、プライマー対の B1 (配列番号 15) および B2 (配列番号 16) を用いる PCR により、クレブシエラ・ニューモニエ (ATCC 25955) のゲノム DNA から増幅した。他の PCR 増幅試薬 (例えば Kod HiFi DNA ポリメラーゼ (ウイスコンシン州マディソン (Madison) のノヴァゲン (Novagen Inc.); カタログ番号 71805-3)) は製造業者のキットで供給されたものであり、それらを製造業者のプロトコルに準じて使用した。クレブシエラ・ニューモニエのゲノム DNA を Gentra Puregene Puregene キット (ミネソタ州ミネアポリス (Minneapolis) のジェントラ・システムズ (Gentra Systems, Inc.); カタログ番号 D-5000A) を用いて調製した。増幅を DNA Thermocycler GeneAmp 9700 (カリフォルニア州フォスターシティ (Foster City) の PE アプライド・バイオシステムズ (PE Applied Biosystems)) で行った。酵素のオープンリーディングフレーム (ORF) のヌクレオチド配列および予測されたアミノ酸配列は各々、配列番号 3 および配列番号 4 として示される。