

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)公開番号
特開2023-123701
(P2023-123701A)

(43)公開日 令和5年9月5日(2023.9.5)

(51)国際特許分類		F I		
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	Z N A
C 1 2 N	15/53 (2006.01)	C 1 2 N	15/53	
C 1 2 N	15/54 (2006.01)	C 1 2 N	15/54	
C 1 2 N	15/60 (2006.01)	C 1 2 N	15/60	
C 1 2 N	15/31 (2006.01)	C 1 2 N	15/31	
審査請求 有 請求項の数 20 O L 外国語出願 (全49頁) 最終頁に続く				
(21)出願番号	特願2023-105168(P2023-105168)	(71)出願人	518403425	
(22)出願日	令和5年6月27日(2023.6.27)		ランザテク、インコーポレイテッド	
(62)分割の表示	特願2020-532013(P2020-532013)		アメリカ合衆国 イリノイ州 6 0 0 7 7	
	)の分割		, スコーキー, ラモン アベニュー 8	
原出願日	平成30年12月19日(2018.12.19)		0 4 5, スイート 4 0 0	
(31)優先権主張番号	62/607,446	(74)代理人	100092783	
(32)優先日	平成29年12月19日(2017.12.19)		弁理士 小林 浩	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100120134	
			弁理士 大森 規雄	
(31)優先権主張番号	62/683,454	(74)代理人	100196966	
(32)優先日	平成30年6月11日(2018.6.11)		弁理士 植田 渉	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(72)発明者	ケブケ, マイケル	
			アメリカ合衆国 イリノイ州 6 0 0 7 7	
			, スコーキー, ラモン アベニュー 8	
			0 4 5, スイート 4 0 0	
			最終頁に続く	

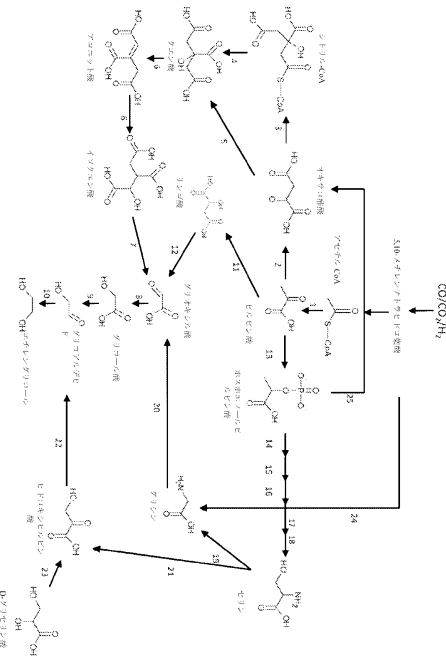
(54)【発明の名称】 エチレングリコールの生物生産のための微生物および方法

(57)【要約】 (修正有)

【課題】ガス状基質から高収量のエチレングリコールおよびエチレングリコール前駆体を生成することができる、遺伝子操作された微生物、ならびに前記前駆体の生成方法を提供する。

【解決手段】ガス状基質からエチレングリコールまたはエチレングリコールの前駆体を生成できる遺伝子操作されたC 1固定微生物であって、グリコールアルデヒドデヒドロゲナーゼ、ラクタルデヒドデヒドロゲナーゼ、コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、2, 5-ジオキソ吉草酸デヒドロゲナーゼ、ベタイン-アルデヒドデヒドロゲナーゼ、またはアルデヒドフェレドキシンオキシドレダクターゼから選択される異種酵素をコードする核酸を含む、微生物を提供する。

【選択図】図 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ガス状基質からエチレングリコールまたはエチレングリコールの前駆体を生成できる遺伝子操作された微生物。

【請求項 2】

前記微生物が、5, 10-メチレンテトラヒドロ葉酸、オキサロ酢酸、クエン酸、リンゴ酸、およびグリシンからなる群から選択される1つ以上の中間体を介してエチレングリコールまたはエチレングリコールの前駆体を生成する、請求項 1 に記載の微生物。

【請求項 3】

前記微生物が、

- a. オキサロ酢酸をクエン酸に変換できる異種酵素、
- b. グリシンをグリオキシル酸に変換できる異種酵素、
- c. イソクエン酸をグリオキシル酸に変換できる異種酵素、および
- d. グリコール酸をグリコアルデヒドに変換できる異種酵素、のうちの1つ以上を含む、請求項 1 に記載の微生物。

10

【請求項 4】

a. オキサロ酢酸をクエン酸に変換できる前記異種酵素が、クエン酸 [S i] -シンターゼ [2. 3. 3. 1]、ATPクエン酸シンターゼ [2. 3. 3. 8] またはクエン酸 (R e) -シンターゼ [2. 3. 3. 3] であり、

b. グリシンをグリオキシル酸に変換できる前記異種酵素が、アラニン-グリオキシル酸トランスアミナーゼ [2. 6. 1. 44]、セリン-グリオキシル酸トランスアミナーゼ [2. 6. 1. 45]、セリン-ピルビン酸トランスアミナーゼ [2. 6. 1. 51]、グリシン-オキサロ酢酸トランスアミナーゼ [2. 6. 1. 35]、グリシントランスアミナーゼ [2. 6. 1. 4]、グリシンデヒドロゲナーゼ [1. 4. 1. 10]、アラニンデヒドロゲナーゼ [1. 4. 1. 1]、またはグリシンデヒドロゲナーゼ [1. 4. 2. 1] であり、

20

c. イソクエン酸をグリオキシル酸に変換できる前記異種酵素が、イソクエン酸リアーゼ [4. 1. 3. 1] であり、かつ／または

d. グリコール酸をグリコアルデヒドに変換できる前記異種酵素が、グリコアルデヒドデヒドロゲナーゼ [1. 2. 1. 21]、ラクトアルデヒドデヒドロゲナーゼ [1. 2. 1. 22]、コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ [1. 2. 1. 24]、2, 5-ジオキソ吉草酸デヒドロゲナーゼ [1. 2. 1. 26]、アルデヒドデヒドロゲナーゼ [1. 2. 1. 3 / 4 / 5]、ベタイン-アルデヒドデヒドロゲナーゼ [1. 2. 1. 8]、またはアルデヒドフェレドキシンオキシドレダクターゼ [1. 2. 7. 5] である、請求項 3 に記載の微生物。

30

【請求項 5】

前記異種酵素のうちの1つ以上が、Bacillus、Clostridium、Escherichia、Glucanobacter、Hyphomicrobium、Lysinibacillus、Paenibacillus、Pseudomonas、Sedimenticola、Sporosarcina、Streptomyces、Thermithiobacillus、Thermotoga、およびZeaからなる群から選択される属に由来する、請求項 3 に記載の微生物。

40

【請求項 6】

前記異種酵素のうちの1つ以上が、前記微生物における発現のためにコドン最適化されている、請求項 3 に記載の微生物。

【請求項 7】

前記微生物は、アセチル-CoAをピルビン酸に変換できる酵素、ピルビン酸をオキサロ酢酸に変換できる酵素、ピルビン酸をリンゴ酸に変換できる酵素、ピルビン酸をホスフェノールピルビン酸に変換できる酵素、オキサロ酢酸をシトリル-CoAに変換できる酵素、シトリル-CoAをクエン酸に変換できる酵素、クエン酸をアコニット酸に、および

50

アコニット酸をイソクエン酸に変換できる酵素、ホスホエノールピルビン酸をオキサロ酢酸に変換する酵素、ホスホエノールピルビン酸を2-ホスホ-D-グリセリン酸に変換できる酵素、2-ホスホ-D-グリセリン酸を3-ホスホ-D-グリセリン酸に変換できる酵素、3-ホスホ-D-グリセリン酸を3-ホスホノオキシピルビン酸に変換できる酵素、3-ホスホノオキシピルビン酸を3-ホスホ-L-セリンに変換できる酵素、3-ホスホ-L-セリンをセリンに変換できる酵素、セリンをグリシンに変換できる酵素、5, 10-メチレンテトラヒドロ葉酸をグリシンに変換できる酵素、セリンをヒドロキシピルビン酸に変換できる酵素、D-グリセリン酸をヒドロキシピルビン酸に変換できる酵素、リンゴ酸をグリオキシル酸に変換できる酵素、グリオキシル酸をグリコール酸に変換できる酵素、ヒドロキシピルビン酸をグリコアルデヒドに変換できる酵素、およびグリコアルデヒドをエチレングリコールに変換できる酵素、のうちの1つ以上をさらに含む、請求項3に記載の微生物。

10

【請求項8】

前記微生物が、

- a. 前記オキサロ酢酸をクエン酸に変換できる異種酵素、
- b. 前記グリシンをグリオキシル酸に変換できる異種酵素および／または
- c. 前記グリコール酸をグリコアルデヒドに変換できる異種酵素、を過剰発現する、請求項3に記載の微生物。

【請求項9】

前記微生物が、

- a. 前記ピルビン酸をオキサロ酢酸に変換できる酵素、
- b. 前記クエン酸をアコニット酸に、およびアコニット酸をイソクエン酸に変換できる酵素、
- c. 前記ホスホエノールピルビン酸をオキサロ酢酸に変換できる酵素、
- d. 前記セリンをグリシンに変換できる酵素、
- e. 前記5, 10-メチレンテトラヒドロ葉酸をグリシンに変換できる酵素、
- f. 前記グリオキシル酸をグリコール酸に変換できる酵素、および／または
- g. 前記グリコアルデヒドをエチレングリコールに変換できる酵素、を過剰発現する、請求項7に記載の微生物。

20

【請求項10】

前記微生物が、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ、グリセリン酸デヒドロゲナーゼ、グリコール酸デヒドロゲナーゼ、グリセリン酸デヒドロゲナーゼ、グリコール酸デヒドロゲナーゼ、アルデヒドフェレドキシンオキシドレダクターゼ、およびアルデヒドデヒドロゲナーゼのうちの1つ以上に破壊的変異を含む、請求項1に記載の微生物。

30

【請求項11】

前記微生物が、*Acetobacterium*、*Alkalibaculum*、*Blautia*、*Butyribacterium*、*Clostridium*、*Eubacterium*、*Moorella*、*Oxobacter*、*Sporomusa*、および*Thermoanaerobacter*からなる群から選択される属のメンバーである、請求項1に記載の微生物。

40

【請求項12】

前記微生物が、*Acetobacterium woodii*、*Alkalibaculum bacchii*、*Blautia producta*、*Butyribacterium methylophilum*、*Clostridium aceticum*、*Clostridium autoethanogenum*、*Clostridium carboxidivorans*、*Clostridium coskatii*、*Clostridium drakei*、*Clostridium formicoaceticum*、*Clostridium ljungdahlii*、*Clostridium magnum*、*Clostridium ragsdalei*、*Clostridium scatologenes*、*Eubacterium limosum*、*Moo*

50

rella thermautotrophica、*Moorella thermoacetica*、*Oxobacter pfennigii*、*Sporomusa ovata*、*Sporomusa silvacetica*、*Sporomusa sphaeroides*、および *Thermoanaerobacter kiuvi* からなる群から選択される親微生物に由来する、請求項 1 に記載の微生物。

【請求項 13】

前記微生物が、*Clostridium autoethanogenum*、*Clostridium ljungdahlii*、および *Clostridium ragsdalei* からなる群から選択される親細菌に由来する、請求項 12 に記載の微生物。

【請求項 14】

前記微生物が、天然または異種の *Wood-Ljungdahl* 経路を含む、請求項 1 に記載の微生物。

【請求項 15】

前記エチレングリコールの前駆体がグリオキシル酸またはグリコール酸である、請求項 1 に記載の微生物。

【請求項 16】

前記ガス状基質の存在下、栄養培地中で請求項 1 に記載の微生物を培養し、それによって前記微生物がエチレングリコールまたはエチレングリコールの前駆体を生成することを含む、エチレングリコールまたはエチレングリコールの前駆体の生成方法。

【請求項 17】

前記ガス状基質が、 CO 、 CO_2 、および H_2 のうちの 1 つ以上を含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記エチレングリコールの前駆体がグリオキシル酸またはグリコール酸である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 19】

前記栄養培地からエチレングリコールまたはエチレングリコールの前駆体を分離することをさらに含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 20】

前記微生物がエタノール、2, 3-ブタンジオール、およびコハク酸うちの 1 つ以上をさらに生成する、請求項 16 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

背景

本発明は、遺伝子操作された微生物と、微生物発酵による、具体的には、ガス状基質の微生物発酵によるエチレングリコールおよびエチレングリコール前駆体の生産のための方法とに関する。

【背景技術】

【0002】

モノエチレングリコール (MEG) としても知られるエチレングリコールの現在の市場価値は 330 億ドルを超え、多種多様な産業、医療、消費者製品の重要な構成要素である。エチレングリコールは現在、大量のエネルギーと水を必要とし、多くの望ましくない副産物を生成し、石油化学原料に依存する化学触媒プロセスを使用して生産されている。持続可能な材料の需要は、サトウキビ由来のエタノールからのエチレングリコールの触媒的な生産など、いくつかの技術進歩をもたらしている。

【0003】

エチレングリコール前駆体も商業的に価値がある。例えば、グリコール酸はスキンケア、パーソナルケア、染色、日焼け、および洗浄剤として使用される。グリオキシル酸は、バニリン、農薬、抗生物質、アラントイン、および錯化剤の中間体である。

【0004】

しかしながら、エチレングリコールを生物学的に生産できる微生物は知られておらず、エチレングリコールの生産への完全な生物学的経路は十分に確立されていない。糖からのエチレングリコールへのいくつかの生物学的経路が文献に記載されている。例えば、Alkim et al., Microb Cell Fact, 14:127, 2015は、E. coliでの(D)ーキシロースからのエチレングリコールの生成を実証したが、高収量を達成するには好気性条件が必要であることに着目した。同様に、Pereira et al., Metab Eng, 34:80-87, 2016では、E. coliでのペントースからのエチレングリコール生成を達成した。S. cerevisiaeでのペントースからのエチレングリコール生成に関するいくつかの研究も行われているが、一貫性のない結果が示されている。例えば、Uranukul et al., Metab Eng, 51:20-31, 2018を参照されたい。

10

【0005】

ガス発酵は、産業廃棄ガス、合成ガス、化学薬品や燃料に改質されたメタンなど、すぐに入手できる低コストのC1原料を幅広く使用するための経路を提供する。ガス発酵代謝は糖発酵代謝とは大きく異なるので、上記の経路の使用は、これらの経路がエネルギーネガティブプロセスである糖新生を介してガスから糖前駆体を生成する必要があるため、実用的ではない。今日まで、ガス状基質からエチレングリコールを製造する方法は得られていない。

【0006】

Islam et al., Metab Eng, 41:173-181, 2017は、探索的演習で、ケモインフォマティクスツールを使用してM. thermoacetiaで合成ガスからエチレングリコールを生成するための数百の仮説的な経路を予測した。しかしながら、経路の多くは熱力学的または他の制約のために実行不可能であるため、当業者でさえこれらの経路をガス発酵生物に組み込むことは不可能である。例えば、Islam et al.には、ほぼ2,000の酸素または酸素ラジカルに依存する反応が含まれており、厳密な嫌気性システムでは実行できない。既知の反応を有するIslam et al.による唯一確認された仮説の経路は、中間体として糖新生またはエタノールを必要とする。したがって、ガス状基質から高収量のエチレングリコールおよびエチレングリコール前駆体を生成することができる、有効な、エネルギー的に好ましい組換え生成システムが依然として必要とされている。

20

30

【発明の概要】

【0007】

本発明が従来技術に勝る特定の利点および進歩を提供するのは、上記の背景においてである。

【0008】

本明細書に開示される本発明は、特定の利点または機能に限定されないが、本発明は、ガス状基質からエチレングリコールまたはエチレングリコールの前駆体を生成できる遺伝子操作された微生物を提供する。

【0009】

本明細書に開示される微生物のいくつかの態様において、微生物は、5,10-メチレントトラヒドロ葉酸、オキサロ酢酸、クエン酸、リンゴ酸、およびグリシンからなる群から選択される1つ以上の中間体を介してエチレングリコールまたはエチレングリコールの前駆体を生成する。

40

【0010】

本明細書に開示される微生物のいくつかの態様では、微生物は、オキサロ酢酸をクエン酸に変換できる異種酵素、グリシンをグリオキシル酸に変換できる異種酵素、イソクエン酸をグリオキシル酸に変換できる異種酵素、およびグリコール酸をグリコアルデヒドに変換できる異種酵素のうちの1つ以上を含む。

【0011】

50

本明細書に開示される微生物のいくつかの態様において、オキサロ酢酸をクエン酸に変換できる前記異種酵素が、クエン酸 [S i]ーシンターゼ [2. 3. 3. 1]、A T P クエン酸シンターゼ [2. 3. 3. 8] またはクエン酸 (R e)ーシンターゼ [2. 3. 3. 3] であり、グリシンをグリオキシル酸に変換できる前記異種酵素が、アラニンーグリオキシル酸トランスアミナーゼ [2. 6. 1. 44]、セリンーグリオキシル酸トランスアミナーゼ [2. 6. 1. 45]、セリンーピルビン酸トランスアミナーゼ [2. 6. 1. 51]、グリシンーオキサロ酢酸トランスアミナーゼ [2. 6. 1. 35]、グリシントランスアミナーゼ [2. 6. 1. 4]、グリシンデヒドロゲナーゼ [1. 4. 1. 10]、アラニンデヒドロゲナーゼ [1. 4. 1. 1]、またはグリシンデヒドロゲナーゼ [1. 4. 2. 1] であり、イソクエン酸をグリオキシル酸に変換できる前記異種酵素が、イソクエン酸リアーゼ [4. 1. 3. 1] であり、かつ／またはグリコール酸をグリコアルデヒドに変換できる前記異種酵素が、グリコアルデヒドデヒドロゲナーゼ [1. 2. 1. 21]、ラクトアルデヒドデヒドロゲナーゼ [1. 2. 1. 22]、コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ [1. 2. 1. 24]、2, 5-ジオキソ吉草酸デヒドロゲナーゼ [1. 2. 1. 26]、アルデヒドデヒドロゲナーゼ [1. 2. 1. 3 / 4 / 5]、ベタインーアルデヒドデヒドロゲナーゼ [1. 2. 1. 8]、またはアルデヒドフェレドキシンオキシドレダクターゼ [1. 2. 7. 5] である。

10

【0012】

本明細書に開示される微生物のいくつかの態様では、異種酵素は、B a c i l l u s、C l o s t r i d i u m、E s c h e r i c h i a、G l u c o n o b a c t e r、H y p h o m i c r o b i u m、L y s i n i b a c i l l u s、P a e n i b a c i l l u s、P s e u d o m o n a s、S e d i m e n t i c o l a、S p o r o s a r c i n a、S t r e p t o m y c e s、T h e r m i t h i o b a c i l l u s、T h e r m o t o g a、および Z e a からなる群から選択される属に由来する。

20

【0013】

本明細書に開示される微生物のいくつかの態様では、異種酵素のうちの1つ以上は、微生物における発現のためにコドン最適化されている。

【0014】

本明細書に開示される微生物のいくつかの態様では、微生物は、アセチルーC o A をピルビン酸に変換できる酵素、ピルビン酸をオキサロ酢酸に変換できる酵素、ピルビン酸をリンゴ酸に変換できる酵素、ピルビン酸をホスフェノールピルビン酸に変換できる酵素、オキサロ酢酸をシトリルーC o A に変換できる酵素、シトリルーC o A をクエン酸に変換できる酵素、クエン酸をアコニット酸に、およびアコニット酸をイソクエン酸に変換できる酵素、ホスホエノールピルビン酸をオキサロ酢酸に変換できる酵素、ホスホエノールピルビン酸を2-ホスホ-D-グリセリン酸に変換できる酵素、2-ホスホ-D-グリセリン酸を3-ホスホ-D-グリセリン酸に変換できる酵素、3-ホスホ-D-グリセリン酸を3-ホスホノオキシピルビン酸に変換できる酵素、3-ホスホノオキシピルビン酸を3-ホスホ-L-セリンに変換できる酵素、3-ホスホ-L-セリンをセリンに変換できる酵素、セリンをグリシンに変換できる酵素、5, 10-メチレントラヒドロ葉酸をグリシンに変換できる酵素、セリンをヒドロキシピルビン酸に変換できる酵素、D-グリセリン酸をヒドロキシピルビン酸に変換できる酵素、リンゴ酸をグリオキシル酸に変換できる酵素、グリオキシル酸をグリコール酸に変換できる酵素、ヒドロキシピルビン酸をグリコアルデヒドに変換できる酵素、かつ／またはグリコアルデヒドをエチレングリコールに変換できる酵素、のうちの1つ以上をさらに含む。

30

40

【0015】

本明細書に開示される微生物のいくつかの態様では、微生物は、オキサロ酢酸をクエン酸に変換できる異種酵素、グリシンをグリオキシル酸に変換できる異種酵素、および／またはグリコール酸をグリコアルデヒドに変換できる異種酵素を過剰発現する。

【0016】

本明細書に開示される微生物のいくつかの態様において、微生物は、ピルビン酸をオキ

50

サロ酢酸に変換できる酵素、クエン酸をアコニット酸に、アコニット酸をイソクエン酸に変換できる酵素、ホスホエノールピルビン酸をオキサロ酢酸に変換できる酵素、セリンをグリシンに変換できる酵素、5, 10-メチレンテトラヒドロ葉酸をグリシンに変換できる酵素、グリオキシル酸をグリコール酸に変換できる酵素および／またはグリコアルデヒドをエチレングリコールに変換できる酵素、を過剰発現する。

【0017】

本明細書に開示される微生物のいくつかの態様では、微生物は、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ、グリセリン酸デヒドロゲナーゼ、グリコール酸デヒドロゲナーゼ、グリセリン酸デヒドロゲナーゼ、グリコール酸デヒドロゲナーゼ、アルデヒドフェレドキシンオキシドレダクターゼ、およびアルデヒドデヒドロゲナーゼからなる群から選択される1つ以上の酵素の破壊的変異を含む。

10

【0018】

本明細書に開示される微生物のいくつかの態様では、微生物が、*Acetobacterium*、*Alkalibaculum*、*Blautia*、*Butyribacterium*、*Clostridium*、*Eubacterium*、*Moorella*、*Oxobacter*、*Sporomusa*、および*Thermoanaerobacter*からなる群から選択される属のメンバーである。

【0019】

本明細書に開示される微生物のいくつかの態様では、微生物が、*Acetobacterium woodii*、*Alkalibaculum bacchii*、*Blautia producta*、*Butyribacterium methylotrophicum*、*Clostridium aceticum*、*Clostridium autoethanogenum*、*Clostridium carboxidivorans*、*Clostridium coskatii*、*Clostridium drakei*、*Clostridium formicoaceticum*、*Clostridium ljungdahlii*、*Clostridium magnum*、*Clostridium ragsdalei*、*Clostridium scatologenes*、*Eubacterium limosum*、*Moorella thermautotrophica*、*Moorella thermoacetica*、*Oxobacter pfennigii*、*Sporomusa ovata*、*Sporomusa silvacetica*、*Sporomusa sphaeroides*、および*Thermoanaerobacter kiuvi*からなる群から選択される親微生物に由来する。

20

30

【0020】

本明細書に開示される微生物のいくつかの態様では、微生物が、*Clostridium autoethanogenum*、*Clostridium ljungdahlii*、および*Clostridium ragsdalei*からなる群から選択される親細菌に由来する。

【0021】

本明細書に開示されている微生物のいくつかの態様では、微生物は、天然または異種のWood-Ljungdahl経路を含む。

40

【0022】

本明細書に開示される微生物のいくつかの態様では、微生物は、エチレングリコールの前駆体としてグリオキシル酸またはグリコール酸を生成する。

【0023】

本発明はさらに、本明細書に開示される微生物を栄養培地中および基質の存在下で培養することを含み、それにより微生物はエチレングリコールまたはエチレングリコールの前駆体を生成する、エチレングリコールまたはエチレングリコールの前駆体を生成する方法を提供する。

【0024】

本明細書に開示される方法のいくつかの態様では、基質は、CO、CO₂およびH₂の

50

うちの1つ以上を含む。

【0025】

本明細書に開示される方法のいくつかの態様では、基質の少なくとも一部は、産業廃棄ガス、産業オフガス、または合成ガスである。

【0026】

本明細書に開示される方法のいくつかの態様では、微生物は、エチレングリコールの前駆体としてグリオキシル酸またはグリコール酸を生成する。

【0027】

本明細書に開示される方法のいくつかの態様では、方法は、栄養培地からエチレングリコールまたはエチレングリコール前駆体を分離することをさらに含む。

10

【0028】

本明細書に開示される方法のいくつかの態様では、微生物は、エタノール、2, 3-タンジオール、およびコハク酸のうちの1つ以上をさらに生成する。

【0029】

本発明はさらに、本明細書に記載されている方法によって生成されたエチレングリコールを含む組成物を提供する。いくつかの態様では、組成物は、不凍液、防腐剤、脱水剤、または掘削流体である。

【0030】

本発明はさらに、本明細書に記載されている方法により生成されたエチレングリコールを含むポリマーを提供する。いくつかの態様では、ポリマーはホモポリマーまたはコポリマーである。いくつかの態様では、ポリマーは、ポリエチレングリコールまたはポリエチレンテレフタレートである。

20

【0031】

本発明はさらに、本明細書に記載されるポリマーを含む組成物を提供する。一部の態様では、組成物は、繊維、樹脂、フィルム、またはプラスチックである。

【0032】

本発明のこれらおよび他の特徴および利点は、添付の特許請求の範囲とともに以下の詳細な説明からより完全に理解されるであろう。特許請求の範囲の範囲が、その中の記述によって定義され、本明細書に記載された特徴および利点の具体的な議論によって定義されないことに留意されたい。

30

【0033】

本発明の実施形態の以下の詳細な説明は、同様の構造が同様の参照番号で示されている以下の図面と併せて読むと最もよく理解することができる。

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図1】CO、CO₂、および／またはH₂を含むガス状基質からのエチレングリコール、グリコール酸、グリオキシル酸の生成の経路を示す模式図である。

【図2A】実施例1～4で使用したプラスミドのマップである。図2Aは、実施例1に記載される発現シャトルベクター、pIPL12のマップである。

【図2B】実施例1～4で使用したプラスミドのマップである。図2Bは、実施例1に記載される、B. subtilis クエン酸シンターゼ、E. coli イソクエン酸リアーゼ、およびG. oxydans グリコールアルデヒドデヒドロゲナーゼを含むプラスミド pMEG042 のマップである。

40

【図2C】実施例1～4で使用したプラスミドのマップである。図2Cは、実施例2に記載される、S. thiotaurini アラニン-グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼおよびP. fluorescens アルデヒドデヒドロゲナーゼを含むプラスミド pMEG058 のマップである。

【図2D】実施例1～4で使用したプラスミドのマップである。図2Dは、実施例3に記載される、S. thiotaurini アラニン-グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼおよびG. oxydans アルデヒドデヒドロゲナーゼを含むプラスミド pMEG0

50

59のマップである。

【図2E】実施例1～4で使用したプラスミドのマップである。図2Eは、実施例4に記載される、*C. acidurici class V*アミノトランスフェラーゼおよび*P. fluorescens*アルデヒドデヒドロゲナーゼを含むプラスミドpMEG061のマップである。

【図3A】pMEG042を発現する*C. autoethanogenum*（クローン1～3）または空のベクターを含む*C. autoethanogenum*（陰性対照）のバイオマスレベル（g乾燥細胞重量／L）を示す。

【図3B】陰性対照（空ベクター）と比較する、独立栄養的に増殖し、発現ベクターpMEG042を保有する*C. autoethanogenum*で経時的に生成される、エチレングリコールを示す。

【図3C】独立栄養的に成長し、発現ベクターpMEG042を保有する*C. autoethanogenum*で経時的に生成される、グリコール酸を示す。実施例1を参照されたい。

【図4A】pMEG058を発現する*C. autoethanogenum*（クローン1～2）または空のベクターを含む*C. autoethanogenum*（陰性対照）のバイオマスレベル（g乾燥細胞重量／L）を示す。

【図4B】陰性対照（空ベクター）と比較する、独立栄養的に増殖し、発現ベクターpMEG058を保有する*C. autoethanogenum*で経時的に生成される、エチレングリコールを示す。実施例2を参照されたい。

【図5A】pMEG059を発現する*C. autoethanogenum*（クローン1～3）または空のベクターを含む*C. autoethanogenum*（陰性対照）のバイオマスレベル（g乾燥細胞重量／L）を示す。

【図5B】陰性対照（空ベクター）と比較する、独立栄養的に増殖し、発現ベクターpMEG059を保有する*C. autoethanogenum*で経時的に生成される、エチレングリコールを示す。実施例3を参照されたい。

【図6A】pMEG061を発現する*C. autoethanogenum*（クローン1）または空のベクターを含む*C. autoethanogenum*（陰性対照）のバイオマスレベル（g乾燥細胞重量／L）を示す。

【図6B】陰性対照（空ベクター）と比較する、独立栄養的に増殖し、発現ベクターpMEG061を保有する*C. autoethanogenum*で経時的に生成される、エチレングリコールを示す。実施例4を参照されたい。

【発明を実施するための形態】

【0035】

本発明は、エチレングリコールの生物学的生産のための微生物を提供する。「微生物」は、微小な生物、特に細菌、古細菌、ウイルス、または真菌である。好ましい実施形態では、本発明の微生物は細菌である。

【0036】

微生物に関して使用される場合の「非自然発生型」という用語は、参照種の野生型株を含む参照種の自然発生型の株には見られない少なくとも1つの遺伝子改変を微生物が有することを意味するように意図される。非自然発生型の微生物は、典型的には、実験室または研究施設で開発される。本発明の微生物は、非自然発生型である。

【0037】

「遺伝子改変」、「遺伝子変化」、または「遺伝子操作」という用語は、広範には、人間の手による微生物のゲノムまたは核酸の操作を指す。同様に、「遺伝子修飾された」、「遺伝子改変された」、または「遺伝子操作された」という用語は、そのような遺伝子修飾、遺伝子改変、または遺伝子操作を含む微生物を指す。これらの用語は、実験室で生成された微生物と自然発生の微生物を区別するために使用され得る。遺伝子改変の方法は、例えば、異種遺伝子発現、遺伝子またはプロモータの挿入または欠失、核酸変異、改変遺伝子発現または不活性化、酵素操作、指向性進化、知識ベース設計、ランダム変異導入法

10

20

30

40

50

、遺伝子シャフリング、およびコドン最適化を含む。本発明の微生物は、遺伝子操作されている。

【0038】

「組換え」は、核酸、タンパク質、または微生物が、遺伝子改変、操作、または組換えの生成物であることを示す。一般に、「組換え」という用語は、微生物の2つ以上の異なる株または種など、複数の源から誘導される遺伝物質を含有するか、またはそれによってコードされる核酸、タンパク質、または微生物を指す。本発明の微生物は一般に組換えである。

【0039】

「野生型」は、変異体または変異形とは区別されるように天然に存在する、生物、株、遺伝子、または特性の典型的な形態を指す。

【0040】

「内在性」は、本発明の微生物が誘導される野生型または親微生物に存在または発現する核酸またはタンパク質を指す。例えば、内在性遺伝子は、本発明の微生物が誘導される野生型または親微生物に天然に存在する遺伝子である。一実施形態では、内在性遺伝子の発現は、外因性プロモータ等の外因性調節エレメントによって制御され得る。

【0041】

「外因性」は、本発明の微生物の外側から生じる核酸またはタンパク質を指す。例えば、外因性遺伝子または酵素は、本発明の微生物に人工的または組換え的に作成され、導入または発現され得る。外因性遺伝子または酵素は、異種微生物から単離され、本発明の微生物に導入または発現され得る。外因性核酸は、本発明の微生物のゲノムに組み込まれるように、または本発明の微生物、例えばプラスミド中で染色体外の状態にとどまるように適合され得る。

【0042】

「異種」は、本発明の微生物が由来する野生型または親微生物に存在しない核酸またはタンパク質を指す。例えば、異種遺伝子または酵素は、異なる株または種に由来し、本発明の微生物に導入または発現され得る。異種遺伝子または酵素は、それが異なる株または種で発生する形態で本発明の微生物で導入または発現させることができる。あるいは、異種遺伝子または酵素は、例えば、本発明の微生物における発現のためにコドン最適化することによって、または酵素活性の方向を逆転させるため、または基質特異性を変更するためなど、機能を変更するように操作することによって、何らかの方法で修飾することができる。

【0043】

特に、本明細書に記載される微生物で発現される異種核酸またはタンパク質は、Bacillus、Clostridium、Escherichia、Gluconobacter、Hyphomicrobium、Lysinibacillus、Paenibacillus、Pseudomonas、Sedimenticola、Sporosarcina、Streptomyces、Thermithiobacillus、Thermotoga、Zea、Klebsiella、Mycobacterium、Salmonella、Mycobacteroides、Staphylococcus、Burkholderia、Listeria、Acinetobacter、Shigella、Neisseria、Bordetella、Streptococcus、Enterobacter、Vibrio、Legionella、Xanthomonas、Serratia、Cronobacter、Cupriavidus、Helicobacter、Yersinia、Cutibacterium、Francisella、Pectobacterium、Arcobacter、Lactobacillus、Shewanella、Erwinia、Sulfurospirillum、Peptococcaceae、Thermococcus、Saccharomyces、Pyrococcus、Glycine、Homo、Ralstonia、Brevibacterium、Methylobacterium、Geobacillus

10

20

30

40

50

、*bos*、*gallus*、*Anaerococcus*、*Xenopus*、*Amblyrhynchus*、*rattus*、*mus*、*sus*、*Rhodococcus*、*Rhizobium*、*Megasphaera*、*Mesorhizobium*、*Peptococcus*、*Agrobacterium*、*Campylobacter*、*Acetobacterium*、*Alkalibaculum*、*Blautia*、*Butyrivacterium*、*Eubacterium*、*Moorella*、*Oxobacter*、*Sporomusa*、*Thermoanaerobacter*、*Schizosaccharomyces*、*Paenibacillus*、*Fictibacillus*、*Lysinibacillus*、*Ornithinibacillus*、*Halobacillus*、*Kurthia*、*Lentibacillus*、*Anoxybacillus*、*Solibacillus*、*Virgibacillus*、*Alicyclobacillus*、*Sporosarcina*、*Salimicrobium*、*Sporosarcina*、*Planococcus*、*Corynebacterium*、*Thermaerobacter*、*Sulfobacillus*、または*Symbiobacterium*属由来であつてよい。

10

【0044】

「ポリヌクレオチド」、「ヌクレオチド」、「ヌクレオチド配列」、「核酸」、および「オリゴヌクレオチド」という用語は、互換的に使用される。それらは、任意の長さのポリマー形態のヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチドのいずれか、またはそれらの類似体を指す。ポリヌクレオチドは、任意の3次元構造を有し得て、既知または未知の任意の機能を果たし得る。以下は、ポリヌクレオチドの非限定的な例である：遺伝子または遺伝子断片のコード領域または非コード領域、連鎖解析から定義される遺伝子座（複数可）、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA（mRNA）、トランスファーRNA、リボソームRNA、短干渉RNA（siRNA）、短ヘアピンRNA（shRNA）、マイクロRNA（miRNA）、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分枝鎖ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離されたDNA、任意の配列の単離されたRNA、核酸プローブ、およびプライマー。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体などの1つ以上の修飾されたヌクレオチドを含み得る。存在する場合、ヌクレオチド構造の修飾は、ポリマーの組織化の前または後に付与され得る。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド構成要素によって割り込まれ得る。ポリヌクレオチドは、重合の後、例えば標識構成要素との接合により、さらに修飾され得る。

20

30

【0045】

本明細書で使用する場合、「発現」は、ポリヌクレオチドがDNA鋳型から（例えば、mRNAまたは他のRNA転写物へ）転写される過程、および／または転写されたmRNAが、続いて、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質へ翻訳される過程を指す。転写物およびコードされたポリペプチドは、集合的に「遺伝子産物」と呼ばれ得る。

【0046】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語は、任意の長さのアミノ酸のポリマーを指すために本明細書で互換的に使用される。ポリマーは、直鎖であっても分枝鎖であってもよく、修飾アミノ酸を含んでいてもよく、非アミノ酸によって割り込まれていてもよい。これらの用語は、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、または標識構成要素との接合などの任意の他の操作により、修飾されたアミノ酸ポリマーも包含する。本明細書で 사용되는場合、「アミノ酸」という用語は、グリシン、DまたはL光学異性体の両方、ならびにアミノ酸類似体およびペプチド模倣体を含む天然および／または非天然もしくはは合成アミノ酸を含む。

40

【0047】

「酵素活性」または単に「活性」は、広範には、酵素の活性、酵素の量、または反応に触媒作用を及ぼすための酵素の可用性を含むがこれらに限定されない、酵素的活性を指す。したがって、酵素活性を「増加させること」は、酵素の活性を増大させること、酵素の

50

量を増加させること、または反応に触媒作用を及ぼすための酵素の可用性を増加させることを含む。同様に、酵素活性を「減少させること」は、酵素の活性を減少させること、酵素の量を減少させること、または反応に触媒作用を及ぼすための酵素の可用性を減少させることを含む。

【0048】

「変異した」は、本発明の微生物が誘導される野生型または親微生物と比較して、本発明の微生物において修飾されている核酸またはタンパク質を指す。一実施形態において、変異は、酵素をコードする遺伝子中の欠失、挿入、または置換であってもよい。別の実施形態では、変異は、酵素中の1つ以上のアミノ酸の欠失、挿入、または置換であってもよい。

10

【0049】

「親微生物」は、本発明の微生物を生成するために使用される微生物である。親微生物は、天然に存在する微生物（即ち、野生型微生物）または以前に修飾されたことのある微生物（即ち、変異体または組換え微生物）であり得る。本発明の微生物は、親微生物において発現または過剰発現されていなかった1つ以上の酵素を発現または過剰発現させるように修飾され得る。同様に、本発明の微生物は、親微生物が含有しなかった1つ以上の遺伝子を含むように修飾され得る。本発明の微生物は、また、親微生物において発現した1つ以上の酵素を発現しないか、またはより少ない量を発現するように修飾され得る。

【0050】

本発明の微生物は、本質的に任意の親微生物に由来し得る。一実施形態では、本発明の微生物は、*Clostridium acetobutylicum*、*Clostridium beijerinckii*、*Escherichia coli*、および*Saccharomyces cerevisiae*からなる群から選択される親微生物に由来し得る。他の実施形態では、微生物は、*Acetobacterium woodii*、*Alkalibaculum bacchii*、*Blautia product*、*Butyribacterium methylotrophicum*、*Clostridium aceticum*、*Clostridium autoethanogenum*、*Clostridium carboxidivorans*、*Clostridium coskatii*、*Clostridium drakei*、*Clostridium formicoaceticum*、*Clostridium ljungdahlii*、*Clostridium magnum*、*Clostridium ragsdalei*、*Clostridium scatologenes*、*Eubacterium limosum*、*Moorella thermautotrophica*、*Moorella thermoacetica*、*Oxobacter pfennigii*、*Sporomusa ovata*、*Sporomusa silvacetica*、*Sporomusa sphaeroides*、および*Thermoanaerobacter kiuvii*からなる群から選択される親微生物に由来する。好ましい実施形態において、親細菌は、*Clostridium autoethanogenum*、*Clostridium ljungdahlii*、または*Clostridium ragsdalei*である。好ましい実施形態において、親微生物は、2010年6月7日にドイツ、D-38124 Braunschweig、Inhoffenstraße 7Bに位置するDeutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) に、ブダペスト条約の条項下で2010年6月7日に寄託され、受託番号DSMZ 23693を付与された*Clostridium autoethanogenum* LZ1561である。この株については、国際特許出願第PCT/NZ2011/000144号に記載されており、WO2012/015317として公開されている。

20

30

40

【0051】

「～由来する」という用語は、核酸、タンパク質、または微生物が異なる（例えば、親または野生型）核酸、タンパク質、または微生物から修飾または適合されて、新しい核酸

50

、タンパク質、または微生物を生成することを示す。そのような修飾または適合は、典型的には、核酸または遺伝子の挿入、欠失、変異、または置換を含む。一般に、本発明の微生物は、親微生物に由来する。一実施形態では、本発明の親微生物は、クロストリジウムオートエタノゲナム（*Clostridium autoethanogenum*）、クロストリジウムユングダーリー（*Clostridium ljungdahlii*）、またはクロストリジウムラグズダレイ（*Clostridium ragsdalei*）に由来する。好ましい実施形態において、本発明の微生物は、DSMZ受託番号DSMZ 3693の下で寄託される、クロストリジウムオートエタノゲナム（*Clostridium autoethanogenum*）LZ1561に由来する。

【0052】

本発明の微生物は、機能特徴に基づいてさらに分類され得る。例えば、本発明の微生物は、C1固定微生物、嫌気性細菌、アセトゲン、エタノロゲン、カルボキシド栄養生物、および／もしくはメタン資化性菌であり得るか、またはそれらから誘導され得る。

【0053】

【表1】

表1は、微生物の代表的なリストを提供し、微生物の機能特徴を同定する。

表1

	Wood-Ljungdahl	C1固定	嫌気性菌	アセトゲン	エタノロゲン	独立栄養生物	カルボキシド栄養生物
<i>Acetobacterium woodii</i>	+	+	+	+	+/- ¹	+	-
<i>Alkalibaculum bacchii</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Blautia producta</i>	+	+	+	+	-	+	+
<i>Butyrivibrio methylophilus</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Clostridium acetium</i>	+	+	+	+	-	+	+
<i>Clostridium autoethanogenum</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Clostridium carboxidivorans</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Clostridium coskatii</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Clostridium drakei</i>	+	+	+	+	-	+	+
<i>Clostridium formicoaceticum</i>	+	+	+	+	-	+	+
<i>Clostridium ljungdahlii</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Clostridium magnum</i>	+	+	+	+	-	+	+/- ²
<i>Clostridium ragsdalei</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Clostridium scatologenes</i>	+	+	+	+	-	+	+
<i>Eubacterium limosum</i>	+	+	+	+	-	+	+
<i>Moorella thermoautotrophica</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Moorella thermoacetica</i> (以前は <i>Clostridium thermoacetum</i>)	+	+	+	+	- ³	+	+
<i>Oxobacter pfennigii</i>	+	+	+	+	-	+	+
<i>Sporomusa ovata</i>	+	+	+	+	-	+	+/- ⁴
<i>Sporomusa silvatica</i>	+	+	+	+	-	+	+/- ⁵
<i>Sporomusa sphaeroides</i>	+	+	+	+	-	+	+/- ⁶
<i>Thermoanaerobacter kiui</i>	+	+	+	+	-	+	-

¹ *Acetobacterium woodii* は、ガスからではなく、フルクトースからエタノールを生成し得る。

² *Clostridium magnum* がCOで増殖し得るか否かは調査されていない。

³ *Moorella thermoacetica*, *Moorella* 属 HCC22-1 のうちの1つの株は、ガスからエタノールを生成することが報告されている。

⁴ *Sporomusa ovata* がCOで増殖し得るか否かは調査されていない。

⁵ *Sporomusa silvatica* がCOで増殖し得るか否かは調査されていない。

⁶ *Sporomusa sphaeroides* がCOで増殖し得るか否かは調査されていない。

【0054】

「Wood-Ljungdahl」は、例えば、Ragsdale, Biochim Biophys Acta, 1784:1873-1898, 2008に記載されている炭素固定のWood-Ljungdahl経路を指す。「Wood-Ljungdahl微生物」は、予想通り、Wood-Ljungdahl経路を含む微生物を指す。多くの

場合、本発明の微生物は天然のWood-Ljungdahl経路を含有する。本明細書では、Wood-Ljungdahl経路は、天然の未修飾のWood-Ljungdahl経路であってもよく、またはCO、CO₂、および／もしくはH₂をアセチル-CoAに変換するように依然として機能する限り、ある程度の遺伝子修飾（例えば、過剰発現、異種発現、遺伝子欠損など）を有するWood-Ljungdahl経路であってもよい。

【0055】

「C1」は、1炭素分子、例えば、CO、CO₂、CH₄、またはCH₃OHを指す。「C1酸素化物」は、少なくとも1つの酸素原子も含む1炭素分子、例えば、CO、CO₂、またはCH₃OHを指す。「C1炭素源」は、本発明の微生物のための部分的または唯一の炭素源として機能する1炭素分子を指す。例えば、C1炭素源は、CO、CO₂、CH₄、CH₃OH、またはCH₂O₂のうちの1つ以上を含み得る。好ましくは、C1炭素源は、COおよびCO₂のうちの1つまたは両方を含む。「C1固定微生物」は、C1炭素源から1つ以上の生成物を生成する能力を有する微生物である。多くの場合、本発明の微生物はC1固定細菌である。好ましい実施形態では、本発明の微生物は、表1で同定されるC1固定微生物に由来する。

【0056】

「嫌気性細菌」は、増殖のために酸素を必要としない微生物である。嫌気性細菌は、酸素が特定の閾値を超えて存在する場合、負の反応を示し得るか、または死滅し得る。しかし、一部の嫌気性菌は、「微小酸素(microoxic)状態」と呼ばれることもある低レベルの酸素（例えば、0.000001～5%の酸素）に耐えることができる。多くの場合、本発明の微生物は嫌気性菌である。好ましい実施形態では、本発明の微生物は、表1で同定される嫌気性菌に由来する。

【0057】

「アセトゲン」は、エネルギー節約のため、およびアセテート等のアセチル-CoAおよびアセチル-CoA由来生成物の合成のためのその主要機構としてWood-Ljungdahl経路を使用する、偏性嫌気性細菌である(Ragsdale, Biochim Biophys Acta, 1784:1873-1898, 2008)。特に、アセトゲンは、Wood-Ljungdahl経路を、(1)CO₂からのアセチル-CoAの還元合成のための機構、(2)最終電子を受容する、エネルギー節約プロセス、(3)細胞炭素の合成におけるCO₂の固定(同化)のための機構として使用する(Drake, Acetogenic Prokaryotes, In: The Prokaryotes, 3rd edition, p. 354, New York, NY, 2006)。天然に存在する全てのアセトゲンは、C1固定、嫌気性、独立栄養性、および非メタン資化性である。多くの場合、本発明の微生物はアセトゲンである。好ましい実施形態では、本発明の微生物は、表1で同定されるアセトゲンに由来する。

【0058】

「エタノロゲン」は、エタノールを生成する、または生成することができる微生物である。多くの場合、本発明の微生物はエタノロゲンである。好ましい実施形態では、本発明の微生物は、表1で同定されるエタノロゲンに由来する。

【0059】

「独立栄養生物」は、有機炭素の不在下で増殖することができる微生物である。代わりに、独立栄養生物は、COおよび／またはCO₂などの無機炭素源を使用する。多くの場合、本発明の微生物は独立栄養生物である。好ましい実施形態では、本発明の微生物は、表1で同定される独立栄養生物に由来する。

【0060】

「カルボキシド栄養生物」は、炭素およびエネルギーの唯一の供給源としてCOを利用することができる微生物である。多くの場合、本発明の微生物はカルボキシド栄養生物である。好ましい実施形態では、本発明の微生物は、表1で同定されるカルボキシド栄養生物に由来する。

10

20

30

40

50

【0061】

「メタン資化性菌」は、炭素とエネルギーの唯一の供給源としてメタンを利用することが可能な微生物である。特定の実施形態では、本発明の微生物は、メタン資化性菌であるか、またはメタン資化性菌から誘導される。他の実施形態では、本発明の微生物は、メタン資化性菌ではないか、メタン資化性菌から誘導されない。

【0062】

好ましい実施形態において、本発明の微生物は、*Clostridium autoethanogenum*種、*Clostridium ljungdahlii*種、および*Clostridium ragsdalei*種を含む*Clostridia*のクラスターから得られる。これらの種は、*Abrini*, *Arch Microbiol*, 161 : 345-351, 1994 (*Clostridium autoethanogenum*)、*Tanner, Int J System Bacteriol*, 43 : 232-236, 1993 (*Clostridium ljungdahlii*)、および *Huhnke, WO2008/028055 (Clostridium ragsdalei)* によって初めて報告され、かつ特徴付けられた。

【0063】

これらの3つの種は、多くの類似点を有する。特に、これらの種は全て、C1固定、嫌気性、アセトゲン系、エタノロゲン系、およびカルボキシド栄養性の*Clostridium*属メンバーである。これらの種は、同様の遺伝子型および表現型ならびにエネルギー節約および発酵代謝のモードを有する。さらに、これらの種は、99%を超えて同一である16S rRNA DNAを有するクロストリジウムrRNAホモロジー群I内に群生し、約22~30mol%の含有量でDNA G+Cを有し、グラム陽性であり、同様の形態およびサイズを有し(0.5~0.7×3~5μmの対数増殖細胞)、中温性であり(30~37℃で最適に増殖する)、約4~7.5の同様のpH範囲を有し(約5.5~6の最適pH)、シトクロムを欠いており、Rnf複合体を介してエネルギーを節約する。また、カルボン酸のそれらの対応するアルコールへの還元が、これらの種において示されている(*Perez, Biotechnol Bioeng*, 110 : 1066-1077, 2012)。重要なことに、これらの種はまた、全て、CO含有ガスで強い独立栄養性増殖を示し、主要な発酵生成物としてエタノールおよびアセテート(または酢酸)を生成し、特定の条件下で少量の2, 3-ブタンジオールおよび乳酸を生成する。

【0064】

しかしながら、これら3つの種は、いくつかの違いも有する。これらの種は、*Clostridium autoethanogenum*はウサギの腸から、*Clostridium ljungdahlii*は養鶏場の廃棄物から、および*Clostridium ragsdalei*は淡水堆積物からというように、異なる供給源から単離された。これらの種は、様々な糖(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)、および他の基質(例えば、ベタイン、ブタノール)の利用において異なる。さらに、これらの種は、特定のビタミン(例えば、チアミン、ピオチン)に対する栄養要求性において異なる。これらの種は、*Wood-Ljungdahl*経路遺伝子およびタンパク質の核酸およびアミノ酸配列において違いを有するが、これらの遺伝子およびタンパク質の一般的構成および数は、全ての種において同じであることが分かっている(*Kopke, Curr Opin Biotechnol*, 22 : 320-325, 2011)。

【0065】

したがって、要約すると、*Clostridium autoethanogenum*、*Clostridium ljungdahlii*、または*Clostridium ragsdalei*の特性の多くは、その種に特有なのではなく、むしろC1固定、嫌気性、アセトゲン系、エタノロゲン系、およびカルボキシド栄養性の*Clostridium*属メンバーのこのクラスターの一般的な特性である。しかしながら、これらの種は、実際は、全く異なるため、これらの種のうちの1つの遺伝子修飾または操作は、これらの種

10

20

30

40

50

のうちの別のものにおいては同一の効果を有しない場合がある。例えば、増殖、性能、または生成物生成における違いが観察され得る。

【0066】

本発明の微生物は、*Clostridium autoethanogenum*、*Clostridium ljungdahlii*、または*Clostridium ragsdalei*の分離株または変異体から得ることもできる。*Clostridium autoethanogenum*の単離物および突然変異体には、JA1-1 (DSM10061) (Abrini, Arch Microbiol, 161:345-351, 1994)、LBS1560 (DSM19630) (WO2009/064200)、およびLZ1561 (DSM23693) (WO2012/015317)が含まれる。*Clostridium ljungdahlii*の単離物および突然変異体には、ATCC 49587 (Tanner, Int J Syst Bacteriol, 43:232-236, 1993)、PETCT (DSM13528、ATCC 55383)、ERI-2 (ATCC55380) (US5, 593, 886)、C-01 (ATCC55988) (US6, 368, 819)、O-52 (ATCC55989) (US6, 368, 819)、およびOTA-1 (Tirado-Acevedo, Production of bioethanol from synthesis gas using *Clostridium ljungdahlii*, PhD thesis, North Carolina State University, 2010)が含まれる。*Clostridium ragsdalei*の単離物および突然変異体には、PI 1 (ATCC BAA-622、ATCC PTA-7826) (WO2008/028055)が含まれる。

10

20

【0067】

しかしながら、上記のように、本発明の微生物はまた、本質的に任意の親微生物、例えば、*Clostridium acetobutylicum*、*Clostridium beijerinckii*、*Escherichia coli*、および*Saccharomyces cerevisiae*からなる群から選択される親微生物に由来し得る。

【0068】

本発明は、エチレングリコール、グリオキシル酸、およびグリコール酸を生成できる微生物、ならびに本発明の微生物を基質の存在下で培養し、それによって微生物がエチレングリコールを生成することを含む、エチレングリコール、グリオキシル酸、およびグリコール酸を生成する方法を提供する。

30

【0069】

本発明の微生物はアセチル-CoA、例えば、Wood-Ljungdahl経路によって生成されるアセチル-CoAをピルビン酸に変換する(図1の反応1)酵素を含むことができる。この酵素は、ピルビン酸シンターゼ(PFOR) [1.2.7.1]またはATP:ピルビン酸、オルトリン酸ホスホトランスフェラーゼ [1.2.7.1]であり得る。いくつかの実施形態では、アセチル-CoAをピルビン酸に変換する酵素は、内在性酵素である。

40

【0070】

本発明の微生物は、ピルビン酸をオキサロ酢酸に変換する(図1の反応2)酵素を含むことができる。この酵素はピルビン酸:二酸化炭素リガーゼ[ADP形成] [6.4.1.1]であり得る。いくつかの実施形態では、ピルビン酸をオキサロ酢酸に変換する酵素は、内在性酵素である。いくつかの実施形態では、ピルビン酸をオキサロ酢酸に変換する酵素が過剰発現される。

【0071】

本発明の微生物は、オキサロ酢酸をシトリル-CoAに変換する(図1の反応3)酵素を含むことができる。この酵素はシトリル-CoAリアーゼ [4.1.3.34]であり得る。いくつかの実施形態では、オキサロ酢酸をシトリル-CoAに変換する酵素は、内

50

在性酵素である。

【0072】

本発明の微生物は、シトリル-C o Aをクエン酸に変換する（図1の反応4）酵素を含むことができる。この酵素は、クエン酸-C o Aトランスフェラーゼ [2. 8. 3. 10] であり得る。いくつかの実施形態では、シトリル-C o Aをクエン酸に変換する酵素は、内在性酵素である。

【0073】

本発明の微生物は、オキサロ酢酸をクエン酸に変換する（図1の反応5）酵素を含むことができる。この酵素は、クエン酸 [S i] -シンターゼ [2. 3. 3. 1]、A T Pクエン酸シンターゼ [2. 3. 3. 8]、またはクエン酸 (R e) -シンターゼ [2. 3. 3. 3] であってよい。いくつかの実施形態では、オキサロ酢酸をクエン酸に変換する酵素は、内在性酵素である。他の実施形態では、オキサロ酢酸をクエン酸に変換する酵素は、異種酵素である。例えば、いくつかの実施形態では、本発明の微生物は、微生物が配列番号2に示されるアミノ酸配列をコードする配列番号1に示されるヌクレオチド配列を含むように、*B. s u b t i l i s*由来のクエン酸シンターゼ1 [E C 2. 3. 3. 16]を含む。いくつかの実施形態では、本発明の微生物は、微生物が配列番号4に示されるアミノ酸配列をコードする配列番号3に示されるヌクレオチド配列を含むように、*C. k l u y v e r i*由来のクエン酸 (R e) -シンターゼを含む。いくつかの実施形態では、本発明の微生物は、微生物が配列番号6に示されるアミノ酸配列をコードする配列番号5に示されるヌクレオチド配列を含むように、*C l o s t r i d i u m*種属由来のクエン酸 (S i) -シンターゼを含む。いくつかの実施形態では、本発明の微生物は、微生物が配列番号8に示されるアミノ酸配列をコードする配列番号7に示されるヌクレオチド配列を含むように、*B. s u b t i l i s*由来のクエン酸シンターゼ2を含む。いくつかの実施形態では、オキサロ酢酸をクエン酸に変換する酵素が過剰発現される。

【0074】

本発明の微生物は、クエン酸をアコニット酸に、およびアコニット酸をイソクエン酸に変換する（図1の反応6）酵素を含むことができる。この酵素は、アコニット酸ヒドラーゼ [4. 2. 1. 3] であり得る。いくつかの実施形態では、クエン酸をアコニット酸に、アコニット酸をイソクエン酸に変換する酵素は、内在性酵素である。いくつかの実施形態では、クエン酸をアコニット酸に、およびアコニット酸をイソクエン酸に変換する酵素が過剰発現される。

【0075】

本発明の微生物は、イソクエン酸をグリオキシル酸に変換する（図1の反応7）酵素を含むことができる。この酵素はイソクエン酸リアーゼ [4. 1. 3. 1] であり得る。いくつかの実施形態では、本発明の微生物は、微生物が配列番号10に示されるアミノ酸配列をコードする配列番号9に示されるヌクレオチド配列を含むように、*Z. m a y s*由来のイソクエン酸リアーゼを含む。いくつかの実施形態では、本発明の微生物は、微生物が配列番号12に示されるアミノ酸配列をコードする配列番号11に示されるヌクレオチド配列を含むように、*E. c o l i*由来のイソクエン酸リアーゼを含む。いくつかの実施形態では、

【0076】

本発明の微生物は、グリオキシル酸をグリコール酸に変換する（図1の反応8）酵素を含むことができる。この酵素は、グリセリン酸デヒドロゲナーゼ [1. 1. 1. 29]、グリオキシル酸レダクターゼ [1. 1. 1. 26 / 79]、またはグリコール酸デヒドロゲナーゼ [1. 1. 99. 14] であり得る。いくつかの実施形態では、グリオキシル酸をグリコール酸に変換する酵素は、内在性酵素である。いくつかの実施形態では、グリオキシル酸をグリコール酸に変換する酵素が過剰発現される。

【0077】

本発明の微生物は、グリコール酸をグリコアルデヒドに変換する（図1の反応9）酵素を含むことができる。この酵素は、グリコアルデヒドデヒドロゲナーゼ [1. 2. 1

10

20

30

40

50

． 2 1] 、ラクトアルデヒドデヒドロゲナーゼ [1 . 2 . 1 . 2 2] 、コハク酸セミアル
デヒドデヒドロゲナーゼ [1 . 2 . 1 . 2 4] 、 2 , 5 - ジオキソ吉草酸デヒドロゲナー
ゼ [1 . 2 . 1 . 2 6] 、アルデヒドデヒドロゲナーゼ [1 . 2 . 1 . 3 / 4 / 5] 、ベ
タイン-アルデヒドデヒドロゲナーゼ [1 . 2 . 1 . 8] 、またはアルデヒドフェレドキ
シンオキシドレダクターゼ [1 . 2 . 7 . 5] であり得る。いくつかの実施形態では、グ
リコール酸をグリコアルデヒドに変換する酵素は、内在性酵素である。他の実施形態では
、グリコール酸をグリコアルデヒドに変換する酵素は、異種酵素である。例えば、いくつ
かの実施形態では、本発明の微生物は、微生物が配列番号 5 0 に示されるアミノ酸配列を
コードする配列番号 4 9 に示されるヌクレオチド配列を含むように、*E. coli* 由来の
γ-アミノブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼを含む。いくつかの実施形態において、本
発明の微生物は、微生物が配列番号 5 2 に示されるアミノ酸配列をコードする配列番号 5
1 に示されるヌクレオチド配列を含むように、*E. coli* 由来のアルデヒドデヒドロゲ
ナーゼを含む。いくつかの実施形態では、本発明の微生物は、微生物が配列番号 5 4 に示
されるアミノ酸配列をコードする配列番号 5 3 に示されるヌクレオチド配列を含むように
、*E. coli* 由来の NADP-依存コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ I を含む
。いくつかの実施形態では、本発明の微生物は、微生物が配列番号 5 6 に示されるアミノ
酸配列をコードする配列番号 5 5 に示されるヌクレオチド配列を含むように、*G. oxy*
dans 由来のラクトアルデヒドデヒドロゲナーゼ/グリコールアルデヒドデヒドロゲナ
ーゼを含む。いくつかの実施形態では、本発明の微生物は、微生物がそれぞれ、配列番号
5 8 または配列番号 6 0 で示されるアミノ酸配列をコードする配列番号 5 7 または配列番
号 5 9 に示されるヌクレオチド配列を含むように、*P. fluorescens* 由来のアル
デヒドデヒドロゲナーゼ A を含む。グリコール酸をグリコアルデヒドに変換する酵素の
追加の非限定的な例は、GenBank 受入番号 WP_003202098、WP_00
3182567、ACT39044、ACT39074、WP_041112005、お
よび ACT40170 に見出すことができる。いくつかの実施形態では、グリコール酸を
グリコアルデヒドに変換する酵素が過剰発現される。

【 0 0 7 8 】

本発明の微生物は、グリコアルデヒドをエチレングリコールに変換する（図 1 の反応 1
0）酵素を含んでもよい。この酵素は、ラクトアルデヒドレダクターゼ [1 . 1 . 1
． 7 7] 、アルコールデヒドロゲナーゼ [1 . 1 . 1 . 1] 、アルコールデヒドロゲナ
ーゼ (NADP+) [1 . 1 . 1 . 2] 、グリセロールデヒドロゲナーゼ [1 . 1 . 1 . 7
2] 、グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ [1 . 1 . 1 . 8] 、またはアルデヒ
ドレダクターゼ [1 . 1 . 1 . 2 1] であり得る。いくつかの実施形態では、グリコアル
デヒドをエチレングリコールに変換する酵素は、内在性酵素である。いくつかの実施形態
では、グリコアルデヒドをエチレングリコールに変換する内在性酵素が過剰発現される。
他の実施形態では、グリコアルデヒドをエチレングリコールに変換する酵素は、異種酵素
である。いくつかの実施形態では、本発明の微生物は、微生物が配列番号 6 2 に示される
アミノ酸配列をコードする配列番号 6 1 に示されるヌクレオチド配列を含むように、*C.*
saccharoperbutylacetonicum 由来のラクトアルデヒドレダク
ターゼを含む。いくつかの実施形態では、本発明の微生物は、微生物が配列番号 6 4 に示
されるアミノ酸配列をコードする配列番号 6 3 に示されるヌクレオチド配列を含むように
、*C. ljungdahlii* 由来のラクトアルデヒドレダクターゼを含む。いくつかの
実施形態では、本発明の微生物は、微生物が配列番号 6 6 に示されるアミノ酸配列をコ
ードする配列番号 6 5 に示されるヌクレオチド配列を含むように、*E. coli* 由来のラク
トアルデヒドレダクターゼを含む。いくつかの実施形態では、本発明の微生物は、微生物
が配列番号 6 8 に示されるアミノ酸配列をコードする配列番号 6 7 に示されるヌクレオチ
ド配列を含むように、*C. beijerinckii* 由来のラクトアルデヒドレダクター
ゼを含む。いくつかの実施形態では、グリコアルデヒドをエチレングリコールに変換する
異種酵素が過剰発現される。

【 0 0 7 9 】

本発明の微生物は、ピルビン酸をリンゴ酸に変換する（図１の反応１１）を含むことができる。この酵素は、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ〔１．１．１．３７〕、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ（オキサロ酢酸脱炭酸）〔１．１．１．３８〕、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ（脱炭酸）〔１．１．１．３９〕、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ（オキサロ酢酸脱炭酸）（ NADP^+ ）〔１．１．１．４０〕、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ（ NADP^+ ）〔１．１．１．８２〕、 D -リンゴ酸デヒドロゲナーゼ（脱炭酸）〔１．１．１．８３〕、ジメチルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ〔１．１．１．８４〕、 3 -イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ〔１．１．１．８５〕、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ〔 NAD(P)^+ 〕〔１．１．１．２９９〕、またはリンゴ酸デヒドロゲナーゼ（キノン）〔１．１．５．４〕であり得る。いくつかの実施形態では、ピルビン酸をリンゴ酸に変換する酵素は、内在性酵素である。他の実施形態では、ピルビン酸をリンゴ酸に変換する酵素は、異種酵素である。例えば、いくつかの実施形態では、本発明の微生物は、微生物が配列番号２４に示されるアミノ酸配列をコードする配列番号２３に示されるヌクレオチド配列を含むように、*C. autoethanogenum*由来のリンゴ酸デヒドロゲナーゼを含む。いくつかの実施形態において、本発明の微生物は、微生物が配列番号２６に示されるアミノ酸配列をコードする配列番号２５に示されるヌクレオチド配列を含むように、*C. autoethanogenum*由来の NAD 依存リンゴ酸酵素を含む。

【００８０】

本発明の微生物は、リンゴ酸をグリオキシル酸に変換する（図１の反応１２）酵素を含むことができる。この酵素は、リンゴ酸シンターゼ〔２．３．３．９〕またはイソクエン酸リアーゼ〔４．１．３．１〕であり得る。いくつかの実施形態では、リンゴ酸をグリオキシル酸に変換する酵素は、異種酵素である。例えば、いくつかの実施形態では、本発明の微生物は、微生物がそれぞれ配列番号２８または配列番号３４に示されるアミノ酸をコードする配列番号２７または配列番号３３に示されるヌクレオチド配列を含むように、*Sporosarcina*種属からのリンゴ酸シンターゼ G を含む。いくつかの実施形態では、本発明の微生物は、微生物がそれぞれ配列番号３０または配列番号３６に示されるアミノ酸配列をコードする配列番号２９または配列番号３５に示されるヌクレオチド配列を含むように、*Bacillus*種由来のリンゴ酸シンターゼ G を含む。いくつかの実施形態では、本発明の微生物は、微生物が配列番号３２に示されるアミノ酸配列をコードする配列番号３１に示されるヌクレオチド配列を含むように、*S. coelicolor*由来のリンゴ酸シンターゼを含む。いくつかの実施形態では、本発明の微生物は、微生物が配列番号３８に示されるアミノ酸配列をコードする配列番号３７に示されるヌクレオチド配列を含むように、*B. infantis*由来のリンゴ酸シンターゼ G を含む。いくつかの実施形態では、本発明の微生物は、微生物が配列番号４０に示されるアミノ酸配列をコードする配列番号３９に示されるヌクレオチド配列を含むように、*C. cochlearium*由来のリンゴ酸シンターゼを含む。いくつかの実施形態では、本発明の微生物は、微生物が配列番号４２に示されるアミノ酸配列をコードする配列番号４１に示されるヌクレオチド配列を含むように、*B. megaterium*からのリンゴ酸シンターゼ G を含む。いくつかの実施形態では、本発明の微生物は、微生物が配列番号４４に示されるアミノ酸配列をコードする配列番号４３に示されるヌクレオチド配列を含むように、*Paenibacillus*種由来のリンゴ酸シンターゼを含む。いくつかの実施形態において、本発明の微生物は、微生物が配列番号４６に示されるアミノ酸配列をコードする配列番号４５に示されるヌクレオチド配列を含むように、*Lysinibacillus*種由来のリンゴ酸シンターゼを含む。いくつかの実施形態では、本発明の微生物は、微生物が配列番号４８に示されるアミノ酸配列をコードする配列番号４７に示されるヌクレオチド配列を含むように、*B. cereus*由来のリンゴ酸シンターゼを含む。

【００８１】

本発明の微生物は、ピルビン酸をホスホエノールピルビン酸に変換する（図１の反応１３）酵素を含むことができる。この酵素は、ピルビン酸キナーゼ〔２．７．１．４０〕、ピルビン酸リン酸ジキナーゼ〔２．７．９．１〕、またはピルビン酸水ジキナーゼ〔２．

7.9.2] であり得る。いくつかの実施形態では、ピルビン酸をホスホエノールピルビン酸に変換する酵素は、内在性酵素である。

【0082】

本発明の微生物は、ホスホエノールピルビン酸を2-ホスホ-D-グリセリン酸に変換する(図1の反応14)酵素を含むことができる。この酵素は、ホスホピルビン酸ヒドラーゼ[4.2.1.11]であり得る。いくつかの実施形態では、ホスホエノールピルビン酸を2-ホスホ-D-グリセリン酸に変換する酵素は、内在性酵素である。

【0083】

本発明の微生物は、2-ホスホ-D-グリセリン酸を3-ホスホ-D-グリセリン酸に変換する(図1の反応15)酵素を含むことができる。この酵素は、ホスホグリセリン酸ムターゼ[5.4.2.11/12]であり得る。いくつかの実施形態では、2-ホスホ-D-グリセリン酸を3-ホスホ-D-グリセリン酸に変換する酵素は、内在性酵素である。

10

【0084】

本発明の微生物は、3-ホスホ-D-グリセリン酸を3-ホスホノオキシピルビン酸に変換する(図1の反応16)酵素を含むことができる。この酵素は、ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼ[1.1.1.95]であり得る。いくつかの実施形態では、3-ホスホ-D-グリセリン酸を3-ホスホノオキシピルビン酸に変換する酵素は、内在性酵素である。

【0085】

本発明の微生物は、3-ホスホノオキシピルビン酸を3-ホスホ-L-セリンに変換(図1の反応17)する酵素を含むことができる。この酵素は、ホスホセリントランスアミナーゼ[2.6.1.52]であり得る。いくつかの実施形態では、3-ホスホノオキシピルビン酸を3-ホスホ-L-セリンに変換する酵素は、内在性酵素である。

20

【0086】

本発明の微生物は3-ホスホ-L-セリンをセリンに変換する(図1の反応18)酵素を含むことができる。この酵素はホスホセリンホスファターゼ[3.1.3.3]であり得る。いくつかの実施形態では、3-ホスホ-L-セリンをセリンに変換する酵素は、内在性酵素である。

【0087】

本発明の微生物はセリンをグリシンに変換する(図1の反応19)酵素を含むことができる。この酵素はグリシンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ[2.1.2.1]であり得る。いくつかの実施形態では、セリンをグリシンに変換する酵素は内在性酵素である。いくつかの実施形態では、セリンをグリシンに変換する酵素が過剰発現される。

30

【0088】

本発明の微生物は、グリシンをグリオキシル酸に変換する酵素(図1の反応20)を含むことができる。この酵素は、アラニン-グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ/トランスアミナーゼ[2.6.1.44]、セリン-グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ/トランスアミナーゼ[2.6.1.45]、セリン-ピルビン酸アミノトランスフェラーゼ/トランスアミナーゼ[2.6.1.51]、グリシン-オキサロ酢酸アミノトランスフェラーゼ/トランスアミナーゼ[2.6.1.35]、グリシントランスアミナーゼ[2.6.1.4]、グリシンデヒドロゲナーゼ[1.4.1.10]、アラニンデヒドロゲナーゼ[1.4.1.1]、またはグリシンデヒドロゲナーゼ[1.4.2.1]であり得る。いくつかの実施形態では、グリシンをグリオキシル酸に変換する酵素は、内在性酵素である。他の実施形態では、グリシンをグリオキシル酸に変換する酵素は、異種酵素である。例えば、いくつかの実施形態では、本発明の微生物は、微生物が配列番号14に示されるアミノ酸配列をコードする配列番号13に示されるヌクレオチド配列を含むように、*H. methylovorum*由来のセリン-グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼを含む。いくつかの実施形態では、本発明の微生物は、微生物が配列番号16に示されるアミノ酸配列をコードする配列番号15に示されるヌクレオチド配列を含むよ

40

50

うに、*S. thiotaurini*由来のアラニンーグリオキシル酸アミノトランスフェラーゼを含む。いくつかの実施形態では、本発明の微生物は、微生物が、配列番号18に示されるアミノ酸配列をコードする配列番号17に示されるヌクレオチド配列を含むように、*T. Tepidarius*由来のアラニンーグリオキシル酸アミノトランスフェラーゼを含む。いくつかの実施形態では、本発明の微生物は、微生物が、配列番号20に示されるアミノ酸配列をコードする配列番号19に示されるヌクレオチド配列を含むように、*C. acidurici*由来のクラスVアミノトランスフェラーゼを含む。いくつかの実施形態では、本発明の微生物は、微生物が配列番号22に示されるアミノ酸配列をコードする配列番号21に示されるヌクレオチド配列を含むように、*T. maritima*由来のセリンーピルビン酸アミノトランスフェラーゼを含む。いくつかの実施形態では、グリシンをグリオキシル酸に変換する酵素が過剰発現される。

10

【0089】

本発明の微生物はセリンをヒドロキシピルビン酸に変換する（図1の反応21）酵素を含むことができる。この酵素は、セリンーピルビン酸トランスアミナーゼ[2.6.1.51]、セリンーグリオキシル酸トランスアミナーゼ[2.6.1.45]、アラニンデヒドロゲナーゼ[1.4.1.1]、L-アミノ酸デヒドロゲナーゼ[1.4.1.5]、セリン2-デヒドロゲナーゼ[1.4.1.7]、アラニントランスアミナーゼ[2.6.1.2]、グルタミンーピルビン酸トランスアミナーゼ[2.6.1.15]、D-アミノ酸トランスアミナーゼ[2.6.1.21]、アラニンーグリオキシル酸トランスアミナーゼ[2.6.1.44]、またはセリンーピルビン酸トランスアミナーゼ[2.6.1.51]であり得る。いくつかの実施形態では、セリンをヒドロキシピルビン酸に変換する酵素は、内在性酵素である。他の実施形態では、セリンをヒドロキシピルビン酸に変換する酵素は、異種酵素である。セリンをヒドロキシピルビン酸に変換することができる酵素の非限定的な例は、GenBank受入番号WP_009989311およびNP_511062.1に見出すことができる。いくつかの実施形態では、セリンをヒドロキシピルビン酸に変換する酵素が過剰発現される。

20

【0090】

本発明の微生物は、ヒドロキシピルビン酸をグリコアルデヒドに変換する（図1の反応22）酵素を含むことができる。この酵素は、ヒドロキシピルビン酸デカルボキシラーゼ[4.1.1.40]またはピルビン酸デカルボキシラーゼ[4.1.1.1]であり得る。この酵素は、他のデカルボキシラーゼでもよい[4.1.1.-]。いくつかの実施形態では、ヒドロキシピルビン酸をグリコアルデヒドに変換する酵素は、異種酵素である。ヒドロキシピルビン酸をグリコアルデヒドに変換できる酵素の非限定的な例は、GenBank受入番号CCG28866、SVF98953、PA0096、CAA54522、KRU13460、およびKLA26356に見出すことができる。

30

【0091】

本発明の微生物はD-グリセリン酸をヒドロキシピルビン酸に変換する（図1の反応23）酵素を含むことができる。この酵素は、グリオキシル酸レダクターゼ[EC1.1.1.26]、グリセリン酸デヒドロゲナーゼ[EC1.1.1.29]、またはヒドロキシピルビン酸レダクターゼ[EC1.1.1.81]であり得る。いくつかの実施形態では、D-グリセリン酸をヒドロキシピルビン酸に変換する酵素は、異種酵素である。D-グリセリン酸をヒドロキシピルビン酸に変換できる酵素の非限定的な例は、GenBank受入番号SUK16841、RPK22618、KPA02240、AGW90762、CAC11987、Q9CA90、およびQ9UBQ7に見出すことができる。

40

【0092】

本発明の微生物は、5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸をグリシンに変換する（図1の反応24）複合体の酵素を含むことができる。5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸は、Wood-Ljungdahl経路の還元的分岐における補因子であり、アセチル-CoAの生成における足場として機能する。この複合体は、グリシンデヒドロゲナーゼ[1.4.4.2]、ジヒドロリポイルデヒドロゲナーゼ[1.8.1.4]、およびアミノ

50

メチルトランスフェラーゼ（グリシンシンターゼ）〔2. 1. 2. 10〕を含むグリシン開裂系であり得る。いくつかの実施形態では、5, 10-メチレンテトラヒドロ葉酸をグリシンに変換する複合体の酵素は、内在性酵素である。いくつかの実施形態では、グリシン開裂系の酵素が過剰発現される。

【0093】

本発明の微生物は、ホスホエノールピルビン酸をオキサロ酢酸に変換する（図1の反応25）酵素を含むことができる。この酵素は、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ（ATP）〔4. 1. 1. 49〕または（GTP）〔4. 1. 1. 32〕であり得る。いくつかの実施形態では、ホスホエノールピルビン酸をオキサロ酢酸に変換する酵素は、内在性酵素である。他の実施形態では、ホスホエノールピルビン酸をオキサロ酢酸に変換する酵素は、異種酵素である。いくつかの実施形態では、ホスホエノールピルビン酸をオキサロ酢酸に変換する酵素が過剰発現される。

10

【0094】

いくつかの実施形態では、アセチル-CoAをピルビン酸に変換する（図1の反応1）酵素、ピルビン酸をオキサロ酢酸に変換する（図1の反応2）酵素、オキサロ酢酸をクエン酸に変換する（図1の反応5）酵素、クエン酸をアコニット酸に、アコニット酸をイソクエン酸に変換する（図1の反応6）酵素、イソクエン酸をグリオキシル酸に変換する（図1の反応7）酵素、グリオキシル酸をグリコール酸に変換する（図1の反応8）酵素、グリコール酸をグリコアルデヒドに変換する（図1の反応9）酵素、およびグリコアルデヒドをエチレングリコールに変換する（図1の反応10）酵素、を含む微生物は、エチレングリコールを生成する。非限定的な例において、オキサロ酢酸をクエン酸に変換する酵素は、*B. subtilis*由来のクエン酸シンターゼ（配列番号1～2）であり得る。非限定的な例において、イソクエン酸をグリオキシル酸に変換する酵素は、*E. coli*由来のイソクエン酸リアーゼ（配列番号11～12）であり得る。非限定的な例において、グリコール酸をグリコアルデヒドに変換する酵素は、*G. oxydans*由来のグリコールアルデヒドデヒドロゲナーゼ（配列番号55～56）または*P. fluorescens*由来のアルデヒドデヒドロゲナーゼ（配列番号57～58）であり得る。図1に示すように、反応2、5、6、8、9、および10を触媒する酵素の1つ以上が過剰発現され得る。例えば、実施例1および図3Bを参照されたい。

20

【0095】

いくつかの実施形態では、アセチル-CoAをピルビン酸に変換する（図1の反応1）酵素、ピルビン酸をホスホエノールピルビン酸に変換する（図1の反応13）酵素、ホスホエノールピルビン酸を2-ホスホ-D-グリセリン酸に変換する（図1の反応14）酵素、2-ホスホ-D-グリセリン酸を3-ホスホ-D-グリセリン酸に変換する（図1の反応15）酵素、3-ホスホ-D-グリセリン酸を3-ホスホノオキシピルビン酸に変換する（図1の反応16）酵素、3-ホスホノオキシピルビン酸を3-ホスホ-L-セリンに変換する（図1の反応17）酵素、3-ホスホ-L-セリンをセリンに変換する（図1の反応18）酵素、セリンをグリシンに変換する（図1の反応19）酵素、グリシンをグリオキシル酸に変換する（図1の反応20）酵素、グリオキシル酸をグリコール酸に変換する（図1の反応8）酵素、グリコール酸をグリコアルデヒドに変換する（図1の反応9）酵素、およびグリコアルデヒドをエチレングリコールに変換する（図1の反応10）酵素、を含む微生物はエチレングリコールを生成する。非限定的な例において、グリシンをグリオキシル酸に変換する酵素は、*S. thioaurini*由来のアラニン-グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ（配列番号15～16）または*C. acidurici*由来のクラスVアミノトランスフェラーゼ（配列番号19～20）であり得る。非限定的な例において、グリコール酸をグリコアルデヒドに変換する酵素は、*G. oxydans*由来のグリコールアルデヒドデヒドロゲナーゼ（配列番号55～56）または*P. fluorescens*由来のアルデヒドデヒドロゲナーゼ（配列番号57～58）であり得る。図1に示すように、ステップ19、20、8、9、および10の反応を触媒する酵素の1つ以上が過剰発現され得る。例えば、実施例2～4および図4B、5B、および6B

30

40

50

を参照されたい。

【0096】

いくつかの実施形態では、アセチル-C o Aをピルビン酸に変換する（図1の反応1）酵素、ピルビン酸をオキサロ酢酸に変換する（図1の反応2）酵素、オキサロ酢酸をシトリル-C o Aに変換する（図1の反応3）酵素、シトリル-C o Aをクエン酸に変換する（図1の反応4）酵素、クエン酸をアコニット酸に、およびアコニット酸をイソクエン酸に変換する（図1の反応6）酵素、イソクエン酸をグリオキシル酸に変換する（図1の反応7）酵素、グリオキシル酸をグリコール酸に変換する（図1の反応8）酵素、グリコール酸をグリコアルデヒドに変換する（図1の反応9）酵素、およびグリコアルデヒドをエチレングリコールに変換する（図1の反応10）酵素、を含む微生物は、エチレングリコールを生成する。非限定的な例において、イソクエン酸をグリオキシル酸に変換する酵素は、*E. coli*由来のイソクエン酸リアーゼ（配列番号11～12）であり得る。非限定的な例において、イソクエン酸をグリオキシル酸に変換する酵素は、*E. coli*由来のイソクエン酸リアーゼ（配列番号11～12）であり得る。非限定的な例において、グリコール酸をグリコアルデヒドに変換する酵素は、*G. oxydans*由来のグリコールアルデヒドデヒドロゲナーゼ（配列番号55～56）または*P. fluorescens*由来のアルデヒドデヒドロゲナーゼ（配列番号57～58）であり得る。図1に示すように、反応2、6、8、9、および10を触媒する酵素の1つ以上が過剰発現され得る。

10

【0097】

いくつかの実施形態では、アセチル-C o Aをピルビン酸に変換する（図1の反応1）酵素、ピルビン酸をリンゴ酸に変換する（図1の反応11）酵素、リンゴ酸をグリオキシル酸に変換する（図1の反応12）酵素、グリオキシル酸をグリコール酸に変換する（図1の反応8）酵素、グリコール酸をグリコアルデヒドに変換する（図1の反応9）酵素、およびグリコアルデヒドをエチレングリコールに変換する（図1の反応10）酵素、を含む微生物は、エチレングリコールを生成する。非限定的な例において、グリコール酸をグリコアルデヒドに変換する酵素は、*G. oxydans*由来のグリコールアルデヒドデヒドロゲナーゼ（配列番号55～56）または*P. fluorescens*由来のアルデヒドデヒドロゲナーゼ（配列番号57～58）であり得る。図1に示すように、ステップ8、9、および10の反応を触媒する酵素の1つ以上が過剰発現され得る。

20

【0098】

いくつかの実施形態では、5, 10-メチレンテトラヒドロ葉酸をグリシンに変換する（図1の反応24）酵素、グリシンをグリオキシル酸に変換する（図1の反応20）酵素、グリオキシル酸をグリコール酸に変換する（図1の反応8）酵素、グリコール酸をグリコアルデヒドに変換する（図1の反応9）酵素、およびグリコアルデヒドをエチレングリコールに変換する（図1の反応10）酵素、の複合体を含む微生物は、エチレングリコールを生成する。非限定的な例において、グリシンをグリオキシル酸に変換する酵素は、*S. thioaurini*由来のアラニン-グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ（配列番号15～16）または*C. acidurici*由来のクラスVアミノトランスフェラーゼ（配列番号19～20）であり得る。非限定的な例において、グリコール酸をグリコアルデヒドに変換する酵素は、*G. oxydans*由来のグリコールアルデヒドデヒドロゲナーゼ（配列番号55～56）または*P. fluorescens*由来のアルデヒドデヒドロゲナーゼ（配列番号57～58）であり得る。ステップ8、9、10、20、および24の反応を触媒する酵素の1つ以上が過剰発現され得る。

30

【0099】

いくつかの実施形態では、アセチル-C o Aをピルビン酸に変換する（図1の反応1）酵素、ピルビン酸をホスホエノールピルビン酸に変換する（図1の反応13）酵素、ホスホエノールピルビン酸をオキサロ酢酸に変換する（図1の反応25）酵素、オキサロ酢酸をシトリル-C o Aに変換する（図1の反応3）酵素、シトリル-C o Aをクエン酸に変換する（図1の反応4）酵素、クエン酸をアコニット酸に、およびアコニット酸をイソクエン酸に変換する（図1の反応6）酵素、イソクエン酸をグリオキシル酸に変換する（図

40

50

1の反応7) 酵素、グリオキシル酸をグリコール酸に変換する(図1の反応8) 酵素、グリコール酸をグリコアルデヒドに変換する(図1の反応9) 酵素、およびグリコアルデヒドをエチレングリコールに変換する(図1の反応10) 酵素、を含む微生物は、エチレングリコールを生成する。非限定的な例において、イソクエン酸をグリオキシル酸に変換する酵素は、*E. coli* 由来のイソクエン酸リアーゼ(配列番号11~12)であり得る。非限定的な例において、グリコール酸をグリコアルデヒドに変換する酵素は、*G. oxydans* 由来のグリコールアルデヒドデヒドロゲナーゼ(配列番号55~56)または *P. fluorescens* 由来のアルデヒドデヒドロゲナーゼ(配列番号57~58)であり得る。図1に示すように、反応2、6、8、9、10、および25を触媒する酵素の1つ以上が過剰発現され得る。

10

【0100】

いくつかの実施形態では、アセチル-CoAをピルビン酸に変換する(図1の反応1) 酵素、ピルビン酸をホスホエノールピルビン酸に変換する(図1の反応13) 酵素、ホスホエノールピルビン酸をオキサロ酢酸に変換する(図1の反応25) 酵素、オキサロ酢酸をクエン酸に変換する(図1の反応5) 酵素、クエン酸をアコニット酸に、アコニット酸をイソクエン酸に変換する(図1の反応6) 酵素、イソクエン酸をグリオキシル酸に変換する(図1の反応7) 酵素、グリオキシル酸をグリコール酸に変換する(図1の反応8) 酵素、グリコール酸をグリコアルデヒドに変換する(図1の反応9) 酵素、およびグリコアルデヒドをエチレングリコールに変換する(図1の反応10) 酵素、を含む微生物は、エチレングリコールを生成する。非限定的な例において、オキサロ酢酸をクエン酸に変換する酵素は、*B. subtilis* 由来のクエン酸シンターゼ(配列番号1~2)であり得る。非限定的な例において、イソクエン酸をグリオキシル酸に変換する酵素は、*E. coli* 由来のイソクエン酸リアーゼ(配列番号11~12)であり得る。非限定的な例において、グリコール酸をグリコアルデヒドに変換する酵素は、*G. oxydans* 由来のグリコールアルデヒドデヒドロゲナーゼ(配列番号55~56)または *P. fluorescens* 由来のアルデヒドデヒドロゲナーゼ(配列番号57~58)であり得る。図1に示すように、反応5、6、8、9、10、および25を触媒する酵素の1つ以上が過剰発現され得る。

20

【0101】

いくつかの実施形態では、アセチル-CoAをピルビン酸に変換する(図1の反応1) 酵素、ピルビン酸をホスホエノールピルビン酸に変換する(図1の反応13) 酵素、ホスホエノールピルビン酸を2-ホスホ-D-グリセリン酸に変換する(図1の反応14) 酵素、2-ホスホ-D-グリセリン酸を3-ホスホ-D-グリセリン酸に変換する酵素(図1の反応15)、3-ホスホ-D-グリセリン酸を3-ホスホノオキシピルビン酸に変換する(図1の反応16) 酵素、3-ホスホノオキシピルビン酸を3-ホスホ-L-セリンに変換する(図1の反応17) 酵素、3-ホスホ-L-セリンをセリンに変換する(図1の反応18) 酵素、セリンをヒドロキシピルビン酸に変換する(図1の反応21) 酵素、ヒドロキシピルビン酸をグリコアルデヒドに変換する(図1の反応22) 酵素、およびグリコアルデヒドをエチレングリコールに変換する(図1の反応10) 酵素、を含む微生物はエチレングリコールを生成する。グリコアルデヒドからエチレングリコールへの変換を触媒する酵素は過剰発現可能である。

30

40

【0102】

いくつかの実施形態では、D-グリセリン酸をヒドロキシピルビン酸に変換する(図1の反応23) 酵素、ヒドロキシピルビン酸をグリコアルデヒドに変換する(図1の反応22) 酵素、およびグリコアルデヒドをエチレングリコールに変換する(図1の反応10) 酵素は、エチレングリコールを生成する。グリコアルデヒドからエチレングリコールへの変換を触媒する酵素は過剰発現可能である。

【0103】

本発明の酵素は、本発明の微生物における発現のために最適化されたコドンであり得る。「コドン最適化」は、特定の株または種における核酸の最適化または改善された翻訳の

50

ための、遺伝子等の核酸の変異を指す。コドン最適化により、翻訳速度の高速化または翻訳精度の向上がもたらされ得る。好ましい実施形態では、本発明の遺伝子は、本発明の微生物における発現のために最適化されたコドンである。コドン最適化は基礎となる遺伝子配列を指すが、コドン最適化はしばしば翻訳の改善をもたらし、したがって酵素発現の改善をもたらす。したがって、本発明の酵素はまた、コドンが最適化されていると説明することもできる。

【0104】

本発明の酵素のうちの1つ以上は、過剰発現され得る。「過剰発現した」とは、本発明の微生物が由来する野生型または親微生物と比較して、本発明の微生物における核酸またはタンパク質の発現の増加を指す。過剰発現は、遺伝子コピー数、遺伝子転写速度、遺伝子翻訳速度、または酵素分解速度の変更を含む、当該技術分野において既知の任意の手段によって達成することができる。上記のように、図1の反応2、5、6、8、9、10、19、20、24、または25を触媒する1つ以上の酵素が過剰発現され得る。

【0105】

本発明の酵素は破壊的変異を含み得る。「破壊的変異」は、遺伝子または酵素の発現または活性を低下または排除する（すなわち、「破壊する」）変異を指す。破壊的変異は、遺伝子または酵素を、部分的に不活性化し得るか、完全に不活性化し得るか、または欠失し得る。破壊的変異は、ノックアウト（KO）変異であり得る。破壊的変異は、酵素によって生成される生成物の生合成を低減、防止、または阻害する任意の変異であり得る。破壊的変異は、例えば、酵素をコードする遺伝子における変異、酵素をコードする遺伝子の発現に關与する遺伝子調節エレメントにおける変異、酵素の活性を低下または阻害するタンパク質を生成する核酸の導入、または酵素の発現を阻害する核酸（例えば、アンチセンスRNA、siRNA、CRISPR）もしくはタンパク質の導入を含み得る。破壊的変異は、当該技術分野で既知の任意の方法を使用して導入されてもよい。

【0106】

いくつかの実施形態では、本発明の微生物は、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ [1.1.1.41] に破壊的変異を含む。イソクエン酸デヒドロゲナーゼはイソクエン酸を2-オキソグルタル酸に変換する。イソクエン酸デヒドロゲナーゼの欠失などによるイソクエン酸デヒドロゲナーゼの破壊により、イソクエン酸のレベルが増加する。

【0107】

いくつかの実施形態では、本発明の微生物は、グリセリン酸デヒドロゲナーゼ [1.1.1.29] に破壊的変異を含む。グリセリン酸デヒドロゲナーゼはグリオキシル酸をグリコール酸に変換する。イソクエン酸デヒドロゲナーゼの欠失などによるグリセリン酸デヒドロゲナーゼの破壊により、グリオキシル酸のレベルが増加する。

【0108】

いくつかの実施形態では、本発明の微生物は、グリコール酸デヒドロゲナーゼ [1.1.99.14] に破壊的変異を含む。グリコール酸デヒドロゲナーゼはグリオキシル酸をグリコール酸に変換する。グリコール酸デヒドロゲナーゼの欠失などによるグリコール酸デヒドロゲナーゼの破壊により、グリオキシル酸のレベルが増加する。

【0109】

いくつかの実施形態では、本発明の微生物は、アルデヒドフェレドキシンオキシドレダクターゼ [1.2.7.5] に破壊的変異を含む。アルデヒドフェレドキシンオキシドレダクターゼは、グリコール酸をグリコアルデヒドに変換する。アルデヒドフェレドキシンオキシドレダクターゼの欠失などによるアルデヒドフェレドキシンオキシドレダクターゼの破壊により、グリコール酸のレベルが増加する。

【0110】

いくつかの実施形態では、本発明の微生物は、アルデヒドデヒドロゲナーゼ [1.2.1.3/1.2.3.4/1.2.3.5] に破壊的変異を含む。アルデヒドデヒドロゲナーゼはグリコール酸をグリコアルデヒドに変換する。アルデヒドデヒドロゲナーゼの欠失などによるアルデヒドデヒドロゲナーゼの破壊により、グリコール酸のレベルが増加す

る。

【0111】

破壊的変異の導入は、本発明の微生物が誘導される親微生物と比較して、標的生成物を生成しないかもしくは実質的に標的生成物を生成しないか、または低減された量の標的生成物を生成する、本発明の微生物をもたらす。例えば、本発明の微生物は、標的生成物を生成しないか、または親微生物よりも、少なくとも約1%、3%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、もしくは95%少ない標的生成物を生成し得る。例えば、本発明の微生物は、約0.001、0.01、0.10、0.30、0.50、または1.0 g/L未満の標的生成物を生成することができる。

【0112】

例示的な配列および酵素の供給源は、本明細書において提供されるが、本発明は、これらの配列と供給源に限定されるものではなく—それはまた、変異体を包含する。「変異体」という用語は、核酸およびタンパク質の配列が、従来技術において開示されるかまたは本明細書に例示される参照核酸およびタンパク質の配列等の、参照核酸およびタンパク質の配列とは異なる、核酸およびタンパク質を含む。本発明は、参照核酸またはタンパク質と実質的に同じ機能を実行する変異体核酸またはタンパク質を使用して実施され得る。例えば、変異体タンパク質は、参照タンパク質と実質的に同じ機能を実行するか、または実質的に同じ反応に触媒作用を及ぼし得る。変異体遺伝子は、参照遺伝子と同じ、または実質的に同じタンパク質をコードし得る。変異体プロモータは、参照プロモータと実質的に同じ、1つ以上の遺伝子の発現を促進するための能力を有し得る。

【0113】

このような核酸またはタンパク質は、本明細書において「機能的に同等な変異体」と呼ばれ得る。例として、核酸の機能的に同等な変異体には、対立遺伝子変異体、遺伝子の断片、突然変異遺伝子、多型等が含まれ得る。他の微生物からの相同遺伝子も、機能的に同等な変異体の例である。これらとしては、*Clostridium acetobutylicum*、*Clostridium beijerinckii*、または*Clostridium ljungdahlii*などの種の相同遺伝子が挙げられ、それらの詳細は、GenbankまたはNCBIなどのウェブサイトで公開されており入手可能である。機能的に同等な変異形としてはまた、特定の微生物のコドン最適化の結果として配列が変化している核酸が挙げられる。核酸の機能的に同等な変異体は、好ましくは、参照核酸と少なくとも約70%、約80%、約85%、約90%、約95%、約98%、またはそれを超える核酸配列同一性（相同性割合）を有する。タンパク質の機能的に同等な変異体は、好ましくは、参照タンパク質と少なくとも約70%、約80%、約85%、約90%、約95%、約98%、またはそれを超えるアミノ酸同一性（相同性割合）を有する。変異体核酸またはタンパク質の機能的同等性は、当該技術分野で既知の任意の方法を使用して評価され得る。

【0114】

核酸は、当該技術分野で既知の任意の方法を使用して、本発明の微生物に送達され得る。例えば、核酸は裸の核酸として送達されてもよく、リボソーム等の1つ以上の薬剤とともに配合されてもよい。核酸は、必要に応じて、DNA、RNA、cDNA、またはそれらの組み合わせであってもよい。ある特定の実施形態では、制限阻害剤を使用してもよい。追加のベクターには、プラスミド、ウイルス、バクテリオファージ、コスミド、および人工染色体が含まれ得る。好ましい実施形態では、核酸は、プラスミドを使用して本発明の微生物に送達される。例として、形質転換（形質導入またはトランスフェクションを含む）は、エレクトロポレーション、超音波処理、ポリエチレングリコール媒介形質転換、化学的または自然の能力、プロトプラスト形質転換、プロファージ誘発、または接合によって達成され得る。活性制限酵素系を有するある特定の実施形態では、核酸を微生物に導入する前に核酸をメチル化する必要がある。得る。

【0115】

さらに、特定の核酸の発現を増加または制御するために、プロモータ等の調節エレメン

10

20

30

40

50

トを含むように核酸を設計してもよい。プロモータは、構成的プロモータまたは誘導性プロモータであり得る。理想的には、プロモータは、Wood-Ljungdahl経路プロモータ、フェレドキシンプロモータ、ピルビン酸フェレドキシンオキシドレダクターゼプロモータ、Rnf複合オペロンプロモータ、ATPシンターゼオペロンプロモータ、またはホスホトランスアセチラーゼ／アセテートキナーゼオペロンプロモータである。

【0116】

「基質」は、本発明の微生物のための炭素源および／またはエネルギー源を指す。多くの場合、基質は、ガス状であり、C1炭素源、例えば、CO、CO₂、および／またはCH₄を含む。好ましくは、基質は、COまたはCO+CO₂のC1炭素源を含む。基質は、H₂、N₂、または電子等の他の非炭素成分をさらに含み得る。しかしながら、他の実施形態では、基質は、糖、デンプン、繊維、リグニン、セルロース、またはヘミセルロースまたはそれらの組み合わせなどの炭水化物であってもよい。例えば、炭水化物は、フルクトース、ガラクトース、グルコース、ラクトース、マルトース、スクロース、キシロース、またはそれらのいくつかの組み合わせであり得る。一部の実施形態では、基質は(D)ーキシロースを含まない(Alkim, Microb Cell Fact, 14:127, 2015)。いくつかの実施形態では、基質はキシロースなどのペントースを含まない(Pereira, Metab Eng, 34:80-87, 2016)。いくつかの実施形態では、基質は、ガス状基質および炭水化物基質の両方を含み得る(混合栄養発酵)。

10

【0117】

ガス状基質は、概して、約1、2、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、または100mol%のCOなどの少なくともいくつかの量のCOを含む。ガス状基質は、約20~80、30~70、または40~60mol%のCOなど、ある範囲のCOを含み得る。好ましくは、ガス状基質は、約40~70mol%のCO(例えば、製鋼または高炉ガス)、約20~30mol%のCO(例えば、塩基性酸素転炉ガス)、または約15~45mol%のCO(例えば、合成ガス)を含む。いくつかの実施形態では、ガス状基質は、約1~10または1~20mol%のCOなどの比較的低量のCOを含み得る。本発明の微生物は、典型的には、ガス状基質中のCOの少なくとも一部分を生成物に変換する。いくつかの実施形態では、ガス状基質は、COを含まないか、または実質的に含まない(1mol%未満)。

20

30

【0118】

ガス状基質は、いくつかの量のH₂を含み得る。例えば、ガス状基質は、約1、2、5、10、15、20、または30mol%のH₂を含み得る。いくつかの実施形態では、ガス状基質は、約60、70、80、または90mol%のH₂など、比較的多量のH₂を含み得る。さらなる実施形態では、ガス状基質は、H₂を含まないか、または実質的に含まない(1mol%未満)。

【0119】

ガス状基質は、いくつかの量のCO₂を含み得る。例えば、ガス状基質は、約1~80または1~30mol%のCO₂を含み得る。いくつかの実施形態において、ガス状基質は、約20、15、10、または5mol%未満のCO₂を含み得る。別の実施形態において、ガス状基質は、CO₂を含まないか、または実質的に含まない(1mol%未満)。

40

【0120】

ガス状基質は、代替形態で提供することもできる。例えば、ガス状基質は、液体に溶解され得るか、または固体支持体上に吸着され得る。

【0121】

ガス状基質および／またはC1炭素源は、自動車の排出ガスまたはバイオマスガス化からなど、産業プロセスの副産物として、または何らかの他の源から得られる、廃ガスまたはオフガスであってもよい。ある特定の実施形態では、産業過程は、製鋼所製造等の鉄金属生成物製造、非鉄金属生成物製造、石油精製、石炭ガス化、電力生成、カーボンプラッ

50

ク生成、アンモニア生成、メタノール生成、およびコークス製造からなる群から選択される。これらの実施形態では、ガス状基質および／またはC1炭素源は、任意の従来の方法を使用して、それが大気中に放出される前に産業プロセスから捕捉されてもよい。

【0122】

ガス状基質および／またはC1炭素源は、石炭もしくは精錬残渣のガス化、バイオマスもしくはリグノセルロース物質のガス化、または天然ガスの改質によって得られる合成ガスなどの、合成ガスであってもよい。別の実施形態では、合成ガスは、都市固形廃棄物または産業固形廃棄物のガス化から得られてもよい。

【0123】

ガス状基質の組成は、反応の効率および／または費用に著しい影響を及ぼし得る。例えば、酸素(O₂)の存在は、嫌気性発酵過程の効率を低減し得る。基質の組成に応じて、基質を処理、スクラブ、または濾過して、毒素、望ましくない成分、またはちり粒子等のいかなる望ましくない不純物も除去すること、および／または所望の成分の濃度を増加させることが望ましくあり得る。

【0124】

特定の実施形態において、発酵は、糖、デンプン、繊維、リグニン、セルロース、またはヘミセルロースなどの炭水化物基質の不在下で実施される。

【0125】

いくつかの実施形態において、以下に示すように、COおよびH₂からエチレングリコール(MEG)への全体的なエネルギー論は、グルコースからエチレングリコールへのエネルギー論よりも好ましく、COおよびH₂の、より負のギブス自由エネルギー、ΔrG[°]m値は、エチレングリコールへのより大きな推進力を示している。基質としてのグルコースとCOの比較のための全体的な反応ΔrGの計算を、生物学的システムにおける経路または経路の個々のステップの全体的な実現可能性を評価するための標準的な方法である、equilibrator(<http://equilibrator.weizmann.ac.il/>)を使用して実行した(Flamholz, E. Noor, A. Bar-Even, R. Milo (2012) eQuilibrator—the biochemical thermodynamics calculator Nucleic Acids Res 40:D770–5; Noor, A. Bar-Even, A. Flamholz, Y. Lubling, D. Davidi, R. Milo (2012) An integrated open framework for thermodynamics of reactions that combines accuracy and coverage Bioinformatics 28:2037–2044; Noor, H. S. Haraldsdottir, R. Milo, R. M. T. Fleming (2013) Consistent Estimation of Gibbs Energy Using Component Contributions PLoS Comput Biol 9(7):e1003098; Noor, A. Bar-Even, A. Flamholz, E. Reznik, W. Liebermeister, R. Milo (2014) Pathway Thermodynamics Highlights Kinetic Obstacles in Central Metabolism PLoS Comput Biol 10(2):e1003483)。計算は次のとおりである。

【0126】

グルコース(aq) + 3NADH(aq)

⇌

3MEG(aq) + 3NAD⁺(aq) ΔrG[°]m = -104 kJ/mol

【0127】

6CO(aq) + 3H₂(aq) + 6NADH(aq)

⇌

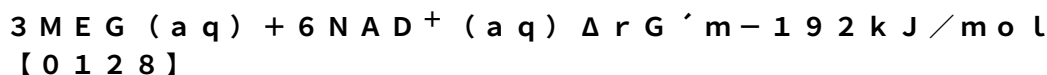
10

20

30

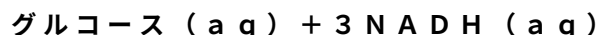
40

50

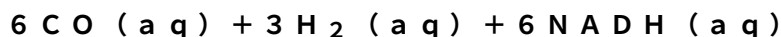
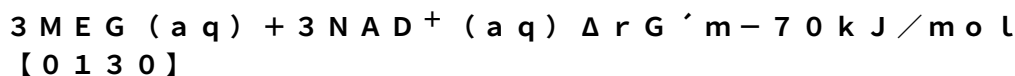


生理学的状態：

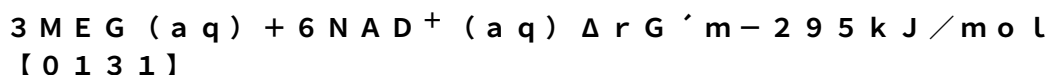
【0129】



⇌



⇌



エチレングリコール、グリオキシル酸、および／またはグリコール酸に加えて、本発明の微生物は、1つ以上の副産物を生成するために培養されてもよい。例えば、本発明の微生物は、エタノール（WO2007/117157）、アセテート（WO2007/117157）、ブタノール（WO2008/115080およびWO2012/053905）、ブチレート（WO2008/115080）、2, 3-ブタンジオール（WO2009/151342およびWO2016/094334）、ラクテート（WO2011/112103）、ブテン（WO2012/024522）、ブタジエン（WO2012/024522）、メチルエチルケトン（2-ブタノン）（WO2012/024522およびWO2013/185123）、エチレン（WO2012/026833）、アセトン（WO2012/115527）、イソプロパノール（WO2012/115527）、脂質（WO2013/036147）、3-ヒドロキシプロピオネート（3-HP）（WO2013/180581）、イソプレン（WO2013/180584）、脂肪酸（WO2013/191567）、2-ブタノール（WO2013/185123）、1, 2-プロパンジオール（WO2014/036152）、1-プロパノール（WO2014/0369152）、コリスメート由来生成物（WO2016/191625）、3-ヒドロキシブチレート（WO2017/066498）、および1, 3-ブタンジオール（WO2017/0066498）を生成することができるか、または生成するように操作することができる。いくつかの実施形態では、本発明の微生物は、エチレングリコールに加えて、エタノール、2, 3-ブタンジオール、および／またはコハク酸も生成する。特定の実施形態において、微生物バイオマス自体が生成物と見なされ得る。

【0132】

「天然生成物」は、遺伝子組換えされていない微生物によって生成される生成物である。例えば、エタノール、アセテート、および2, 3-ブタンジオールは、クロストリジウムオートエタノゲナム（*Clostridium autoethanogenum*）、クロストリジウムユングダーリー（*Clostridium ljungdahlii*）、およびクロストリジウムラグスダレイ（*Clostridium ragsdalei*）の天然生成物である。「非天然生成物」は、遺伝子組換えされた微生物によって生成されるが、遺伝子組換えされた微生物が由来する遺伝子組換えされていない微生物によって生成されない生成物である。エチレングリコールは、自然界に存在する微生物によって生成されることは知られていないため、すべての微生物の非天然生成物である。

【0133】

「選択性」は、微生物によって生成される全発酵生成物の生成に対する標的生成物の生成の比率を指す。本発明の微生物は、特定の選択性で、または最小の選択性で生成物を生成するように操作され得る。一実施形態では、標的生成物は、本発明の微生物によって生成される全発酵生成物の少なくとも約5%、10%、15%、20%、30%、50%、または75%を占める。一実施形態では、本発明の微生物によって生成される全発酵生成

10

20

30

40

50

物の少なくとも10%を占め、その結果エチレングリコールは、本発明の微生物が少なくとも10%のエチレングリコールに対する選択性を有する。一実施形態では、本発明の微生物によって生成される全発酵生成物の少なくとも30%を占め、その結果エチレングリコールは、本発明の微生物が少なくとも30%のエチレングリコールに対する選択性を有する。

【0134】

典型的には、培養は、バイオリアクタ中で実行される。「バイオリアクタ」という用語は、連続攪拌槽反応器(CSTR)、固定化細胞反応器(ICR)、トリクルベッド反応器(TBR)、気泡塔、ガスリフト発酵槽、静的ミキサ、またはガス-液体接触に好適な他の容器もしくは他のデバイス等の1つ以上の容器、塔、または配管からなる培養/発酵デバイスを含む。いくつかの実施形態では、バイオリアクタは、第1の増殖反応器および第2の培養/発酵反応器を含み得る。基質は、これらの反応器のうちの1つまたは両方に提供され得る。本明細書で使用する場合、「培養」および「発酵」という用語は、同じ意味で使用される。これらの用語は、培養/発酵過程の増殖期および生成物生合成期の両方を包含する。

10

【0135】

培養物は概して、微生物の増殖を可能にするのに十分な栄養素、ビタミン、および/または無機物を含有する水性培地中で維持される。好ましくは、水性培地は、最小嫌気性微生物増殖培地などの嫌気性微生物培地である。好適な培地は、当該技術分野において周知である。

20

【0136】

培養/発酵は、望ましくは、エチレングリコールの生成のために適切な条件下で実施されるべきである。必要に応じて、培養/発酵は、嫌気性条件下で実施される。考慮する反応条件は、圧力(または分圧)、温度、ガス流量、液体流量、培地pH、培地酸化還元電位、攪拌速度(連続攪拌槽反応器を使用する場合)、接種レベル、液相中のガスが制限されないことを確実にするための最大ガス基質濃度、および生成物阻害を回避するための最大生成物濃度を含む。特に、基質の導入速度は、液相中のガスの濃度が制限的にならないことを確実にするように制御されてもよい。

【0137】

上昇した圧力でバイオリアクタを操作することにより、気相から液相へのガス物質移動の速度を速めることができる。したがって、概して、大気圧よりも高い圧力で培養/発酵を実施することが好ましい。また、所与のガス変換速度が部分的に基質保持時間の関数であり、かつ保持時間がバイオリアクタの必要な容積を示すため、加圧システムの使用は、必要なバイオリアクタの容積、およびその結果として培養/発酵装置の資本コストを大幅に削減することができる。これはさらに、バイオリアクタ中の液体体積を入力ガス流量で除算したものとして定義される保持時間が、バイオリアクタが大気圧よりも上昇した圧力に維持されるときに減少され得ることを意味する。最適反応条件は、使用される特定の微生物に部分的に依存する。しかしながら、一般的には、大気圧よりも高い圧力で発酵を行うことが好ましい。また、所与のガス変換速度が部分的に基質保持時間の関数であり、かつ所望の保持時間を達成することがバイオリアクタの必要な体積をさらに示すため、加圧システムの使用は、必要なバイオリアクタの体積、およびその結果として発酵装置の資本コストを大幅に低減することができる。

30

40

【0138】

特定の実施形態において、発酵は、光の不在下で、または光合成微生物のエネルギー要求を満たすには不十分な量の光の存在下で行われる。特定の実施形態において、本発明の微生物は、非光合成微生物である。

【0139】

本発明の方法は、発酵ブロスからエチレングリコールを分離することをさらに含み得る。エチレングリコールは、例えば、蒸留、模擬移動床プロセス、膜処理、蒸発、パーペレーション、ガストリップング、相分離、イオン交換、または、例えば液-液抽出を

50

含む抽出発酵を含む、当技術分野で既知の任意の方法または方法の組み合わせを使用して、発酵ブロスから分離または精製することができる。一実施形態では、エチレングリコールは、逆浸透および／またはパーバレーションを使用して発酵ブロスから濃縮することができる（US 5, 552, 023）。蒸留により水を除去し、次いで、（高比率のエチレングリコールを含有する）底部を、蒸留または真空蒸留を使用して回収して、高純度エチレングリコール流を生成することができる。あるいは、逆浸透および／またはパーバレーションによる濃縮の有無にかかわらず、エチレングリコールは、アルデヒドとの反応蒸留（Atul, Chem Eng Sci, 59: 2881-2890, 2004）または炭化水素を使用する共沸蒸留（US 2, 218, 234）によってさらに精製できる。別のアプローチでは、エチレングリコールを水溶液から活性炭またはポリマー吸収剤に補足させ（逆浸透および／またはパーバレーションありまたはなしで）、低沸点有機溶媒を使用して回収できる（Chinn, Recovery of Glycols, Sugars, and Related Multiple-OH Compounds from Dilute-Aqueous Solution by Regenerable Adsorption onto Activated Carbons, University of California Berkeley, 1999）。次に、エチレングリコールを蒸留により有機溶媒から回収することができる。特定の実施形態では、エチレングリコールは、発酵ブロスの一部分をバイオリアクタから連続除去し、微生物細胞をブロスから分離し（濾過により簡便に）、かつエチレングリコールをブロスから回収することによって、発酵ブロスから回収される。アルコールや酸などの副産物も、ブロスから分離または精製することができる。アルコールは、例えば、蒸留によって回収され得る。酸は、例えば、活性炭上での吸着によって回収され得る。特定の実施形態では、分離された微生物細胞をバイオリアクタに戻すことができる。標的生成物が取り出された後に残っている無細胞透過液も、好ましくは、全体または部分的にバイオリアクタに戻される。追加の栄養素（ビタミンBなど）が、無細胞透過液に添加されて、培地を補充した後に、バイオリアクタに戻され得る。

10

20

30

40

50

【0140】

水性媒体からのジオールの回収は、いくつかの方法で実証されている。疑似移動床（SMB）技術は、エタノールと関連する含酸素化合物の水性混合物から2, 3-ブタエングリコールを回収するために使用されている（米国特許第8, 658, 845号）。反応性分離は、効果的なジオール回収のためにも実証されている。いくつかの実施形態では、エチレングリコールの回収は、ジオール含有流とアルデヒドとの反応、ジオールの分別および再生、濃縮されたジオール流を回収するための最終分別によって行われる。例えば、米国特許第7, 951, 980号を参照されたい。

【0141】

本発明は、微生物によって、および本明細書に記載の方法に従って生成されたエチレングリコールを含む組成物を提供する。例えば、エチレングリコールを含む組成物は、不凍液、防腐剤、脱水剤、または掘削流体であり得る。

【0142】

本発明はまた、微生物によって、および本明細書に記載される方法に従って生成されたエチレングリコールを含むポリマーを提供する。このようなポリマーは、例えば、ポリエチレングリコールなどのホモポリマーまたはポリエチレンテレフタレートなどのコポリマーであり得る。これらのポリマーの合成方法は、当技術分野でよく知られている。例えば、Herzberger et al., Chem Rev., 116(4): 2170-2243 (2016) および Xiao et al., Ind Eng Chem Res. 54(22): 5862-5869 (2015) を参照されたい。

【0143】

本発明はさらに、微生物によって、および本明細書に記載される方法に従って生成されるエチレングリコールを含むポリマーを含む組成物を提供する。例えば、組成物は、繊維、樹脂、フィルム、またはプラスチックであり得る。

【実施例】

【0144】

以下の実施例は、本発明をさらに例示するが、当然のことながら、いかなる方法によってもその範囲を制限すると解釈されるべきではない。

【0145】

実施例1：C. autoethanogenumにおけるCOおよび／またはCO₂とH₂からのエチレングリコールの生成のための、B. subtilisクエン酸シンターゼ、E. coliイソクエン酸リアーゼ、およびG. oxydansグリコールアルデヒドデヒドロゲナーゼを含む異種発現ベクターの構築

【0146】

B. subtilis由来のクエン酸シンターゼ (citZ；配列番号1～2)、E. coli由来のイソクエン酸リアーゼ (icl；配列番号11～12)、およびG. oxydans由来のグリコールアルデヒドデヒドロゲナーゼ (aldA1；配列番号55～56)をコードする遺伝子は、C. autoethanogenumでの発現のためにコドンに適合され (codon-adapted)、合成された。適応遺伝子は、標準のBsaIゴールデンゲートクローニングキット (New England Biolabs, Ipswich, MA) を使用して、発現シャトルベクターpIPL12にクローニングされた。pIPL12は、E. coliとC. autoethanogenumの両方の複製起点を含み、複製して両方の種で維持できるようにし、また pIPL12は、ほとんどのClostridiaでも機能する。pIPL12はさらに、ポジティブ選択のためにエリスロマイシン／クラリスロマイシン耐性を付与する23S rRNA (アデニン (2058) - N (6)) -メチルトランスフェラーゼErm (B)、大腸菌からの接合伝達のためのTraJ、異種遺伝子の発現のためのプロモータを含む。図2Aを参照されたい。citZ、icl、およびaldA1をpIPL12にクローニングしたときに作成された発現ベクターを、本明細書ではpMEG042と呼ぶ (図2B)。

【0147】

【表2】

表2：pMEG042発現ベクターの構築に使用したオリゴ。

配列番号	名称	配列
69	pIPL12-bb-F	CACACCAGGTCTCAAACCATGGAGATCTCGAGGCCTG
70	pIPL12-bb-R	CACACCAGGTCTCACATATGATAAGAAAGACTCTTGGC
71	citZ Bs1-F	CACACCAGGTCTCACATATGACAGCAACAAGGGGCC
72	citZ Bs1-R	CACACCAGGTCTCAATTGTAACACCTCCTTAATTAGTTATGCTCTTTCTTCTATAGGTACAAATTTTGTG
73	icl Ec-F	CACACCAGGTCTCACAAATGAAAAACAAGAACTCAACAAATAG
74	icl Ec-R	CACACCAGGTCTCAGTGTTCCCTCCTATGTGTTCTTAAAAATTGAGATTCTTCA GTTGAACCTG
75	aldA1 Go-F	CACACCAGGTCTCAACACATATGACTGAAAAAATAATTTATTTCATAAATGGATC
76	aldA1 Go-R	CACACCAGGTCTCAGGTTATGCATTTAGATATATTGTTTTTGTCTGTACG

【0148】

pMEG042構築物は、接合によりC. autoethanogenumに形質転換された。発現ベクターは、標準的な熱ショック形質転換を使用して、接合体ドナー株であるE. coli HB101+R702 (CA434) (Williams et al.

1990) (ドナー) に最初に導入された。ドナー細胞を 37℃で1時間 SOC 培地で回収した後、100 µg/mL のスペクチノマイシンおよび 500 µg/mL のエリスロマイシンを含む LB 培地プレートにプレーティングし、37℃で一晩インキュベートした。翌日、100 µg/mL のスペクチノマイシンと 500 µg/mL のエリスロマイシンを含む 5 mL の LB アリコートにいくつかのドナーコロニーを接種し、37℃で約4時間、または培養液が目に見えて密度が高くなるまで、まだ静止期に入っていない状態で培養した。1.5 mL のドナー培養物を 4000 rpm および 20~25℃で2分間の遠心分離によって収集し、上清を廃棄した。ドナー細胞を 500 µL の滅菌 PBS 緩衝液に穏やかに再懸濁し、4000 rpm で2分間遠心分離し、PBS 上清を廃棄した。

【0149】

10

ペレットを嫌気性チャンバーに導入し、*C. autoethanogenum* 培養 (レシピエント) の指数関数期の後期に 200 µL で穏やかに再懸濁した。*C. autoethanogenum* DSM10061 および DSM23693 (DSM10061 の派生物) は、DSMZ (The German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig, Germany) から取得した。菌株は、標準的な嫌気性技術 (Hungate 1969; Wolfe 1971) を使用して、pH 5.6 で PETC 培地 (米国特許第 9,738,875 号を参照) 中、37℃で増殖させた。

【0150】

20

接合混合物 (ドナー細胞とレシピエント細胞の混合物) を PETC-MES + フルクトース寒天プレートにスポットし、放置して乾燥させた。スポットが、もはや目に見えて濡れなくなったときに、プレートを、圧力ジャーに導入し、合成ガス (50% CO₂、10% N₂、30% CO₂、10% H₂) で 25~30 psi に加圧し、37℃で約24時間インキュベートした。次に、10 µL の白金耳を使用して穏やかに掻き取ることにより、接合混合物をプレートから取り出した。取り出した混合物を 200~300 µL の PETC 培地に懸濁した。接合混合物の 100 µL アリコートを、5 µg/mL のクラリスロマイシンを補充した PETC 培地寒天プレートにプレーティングし、プラスミドを担持する形質転換体を選択した。

【0151】

30

pMEG042 プラスミドを担持する *C. autoethanogenum* の3つの異なるコロニーを 5 µg/mL のクラリスロマイシンを含む 2 mL の PETC-MES 培地に接種し、50% CO₂、10% N₂、30% CO₂、10% H₂ とともにおよび 100 rpm のオービタル振とうを用いて3日間、37℃で独立栄養的に増殖させた。培養物を、血清ボトル内で 5 µg/mL のクラリスロマイシンを含む 10 mL の PETC-MES 培地で OD₆₀₀ が 0.05 になるように希釈し、50% CO₂、10% N₂、30% CO₂、10% H₂ および 100 rpm のオービタル振とうを用いて37℃で独立栄養的に最大20日間増殖させ、毎日サンプリングしてバイオマスと代謝産物を測定した (図3A および 3B)。エチレングリコールの生成を、ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC-MS) を使用して測定し、他の代謝産物を、下記のように高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を使用して測定した。

40

【0152】

エチレングリコール濃度は、Agilent VF-WAXms カラム (15m × 0.25 µm × 0.25 µm) および RSH オートサンプラーを装備した Thermo Scientific ISQ LT GCMS で測定した。200 µL のブロスに 200 µL のメタノールで希釈して試料を調製した。試料をボルテックスした後、14,000 rpm で3分間遠心分離し、200 µL の上澄みをインサート付きガラスバイアルに移した。1.0 µL の注入、5対1のスプリット比、240℃の注入口温度を使用して、試料を分析のためにオートサンプラーに移した。クロマトグラフィーは、80℃、0.5分保持、10℃/分で150℃まで昇温、25℃/分で220℃まで昇温、3分最終保持のオー

50

ブンプログラムを使用して、実行した。カラムの流量は4.0 mL/分で、0.5分間保持した後、キャリアガスとしてヘリウムを使用して、100 mL/分/分の速度で1.5 mL/分に低下させた。MSイオン源は、トランスファーラインを240℃に設定して260℃に維持した。定量は、33.0 m/zを定量ピークとして、31.0+62.0 m/zを確認ピークとして使用して、線形外部標準キャリブレーションを使用して行った。

【0153】

エタノール、アセテート、2,3-ブタンジオール、グリオキシル酸、およびグリコール酸の濃度は、屈折率(RI)検出を備えたAgilent 1260 Infinity LCのHPLCにより35℃で測定した。試料は、80℃で5分間加熱した後、14,000 rpmで3分間遠心分離して調製し、上清を分析のためにガラスバイアルに移した。分離は、Phenomenex Rezex (商標) ROA-有機酸H+ (8%) カラム (300 mm×7.8 mm×8 μm) への10 μL注入で、0.7 mL/分および35℃で、アイソクラティック条件下、5 mM硫酸移動相を使用して行われた。

【0154】

独立栄養増殖の約3日後、エチレングリコール前駆体のグリコール酸が観察され、10日後、エチレングリコールの生成が観察された(図3B)。

【0155】

実施例2: C. autoethanogenumにおけるCOおよび/またはCO₂およびH₂からのエチレングリコールの生成のためのS. thiotauriniアラニン-グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼおよびP. fluorescensアルデヒドデヒドロゲナーゼを含む異種発現ベクターの構築。

【0156】

S. thiotaurini由来のアラニン-グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ(pucG; 配列番号15~16)およびP. fluorescens Q8r1-96由来のアルデヒドデヒドロゲナーゼ(aldA1; 配列番号57~58)をコードする遺伝子は、C. autoethanogenumでの発現のためコドンに適合され、合成された。コドンに適合した遺伝子をpIPL12(図2A)にクローニングし、得られた発現ベクター、pMEG058を、実施例1に記載されているように、C. autoethanogenumに導入した。図2Cを参照されたい。

【0157】

【表3】

表3: pMEG058発現ベクターの構築に使用したオリゴ。

配列番号	名称	配列
69	pIPL12-bb-F	CACACCAGGTCTCAAAACCATGGAGATCTCGAGGCCTG
70	pIPL12-bb-R	CACACCAGGTCTCACATATGATAAGAAAGACTCTTGGC
77	PucG-St-hil-F	CACACCAGGTCTCACATATGCAATTAGGCCCTTTTAATCCACCA
78	PucG-St-hil-R	CACACCAGGTCTCAGTGTTCTCTCTATGTGTTCTTATGCTTGCGCAAGTGCT
79	aldA1-Pfq8-F	CACACCAGGTCTCAACACATATGCTTTCAGTGCCCTGTATTCCAG
80	aldA1-Pfq8-R	CACACCAGGTCTCAGGTTAAAGACTGGAGATATACTGCATGAG

【0158】

実施例1に記載されるように、pMEG058プラスミドを担持するC. autoethanogenumの2つの異なるコロニーを、5 μg/mLのクラリスロマイシンを含む2 mLのPETC-MES培地に接種し、独立栄養的に増殖させた。図4Aを参照され

たい。独立栄養増殖の約3日後、グリコール酸が観察され、8日後、エチレングリコールの生成が観察された（図4B）。

【0159】

実施例3：C. autoethanogenumにおけるCOおよび／またはCO₂およびH₂からのエチレングリコールの生成のための、S. thiotauriniアラニン-グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼおよびG. oxydansグリコールアルデヒドデヒドロゲナーゼを含む異種発現ベクターの構築

【0160】

S. thiotaurini由来のアラニン-グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ（pucG；配列番号15～16）およびG. oxydans由来のグリコールアルデヒドデヒドロゲナーゼ（aldA1；配列番号55～56）をコードする遺伝子は、C. autoethanogenumでの発現のためにコドンに適合され、合成された。コドンに適合した遺伝子をpIPL12（図2A）にクローニングし、得られた発現ベクター、pMEG059を、実施例1に記載されているように、C. autoethanogenumに導入した。図2Dを参照されたい。

【0161】

【表4】

表4：pMEG059発現ベクターの構築に使用したオリゴ。

配列番号	名称	配列
69	pIPL12-bb-F	CACACCAGGTCTCAAACCATGGAGATCTCGAGGCCTG
70	pIPL12-bb-R	CACACCAGGTCTCACATATGATAAGAAGACTCTTGCC
77	PucG-Stthi1-F	CACACCAGGTCTCACATATGCAATTTAGGCCTTTAAATCCACCA
78	PucG-Stthi1-R	CACACCAGGTCTCAGTGTTCCTCCTATGTGTTCCTTATGCTTGCGCAAGTGCCT
75	aldA1-Gb-F	CACACCAGGTCTCAACACATATGACTGAAAAAATAATTTTATTCATAAATGGATC
76	aldA1-Gb-R	CACACCAGGTCTCAGGTTATGCATTTAGATATATTGTTTTTGTCTGTACG

【0162】

実施例1に記載されるように、pMEG059プラスミドを担持するC. autoethanogenumの2つの異なるコロニーを、5 μg/mLのクラリスロマイシンを含む2 mLのPETC-MES培地に接種し、独立栄養的に増殖させた。図5Aを参照されたい。独立栄養増殖の約3日後、グリコール酸が観察され、10日後、エチレングリコールの生成が観察された（図5B）。

【0163】

実施例4：C. autoethanogenumにおけるCOおよび／またはCO₂およびH₂からのエチレングリコールの生成のためのアラニン-グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼおよびアルデヒドデヒドロゲナーゼを含む異種発現ベクターの構築。

【0164】

C. acidurici由来のクラスVアミノトランスフェラーゼ（SgA；配列番号19、20）およびP. fluorescens Q8r1-96由来のアルデヒドデヒドロゲナーゼ（aldA1；配列番号57～58）をコードする遺伝子は、C. autoethanogenumでの発現のためコドンに適合され、合成された。コドンに適合した遺伝子をpIPL12（図2A）にクローニングし、得られた発現ベクター、pMEG061を、実施例1に記載されているように、C. autoethanogenumに導入した。図2Eを参照されたい。

【0165】

【表 5】

表 5 : pMEG061 発現ベクターの構築に使用したオリゴ。

配列番号	名称	配列
69	pIPL12- bb-F	CACACCCAGGTCTCAAAACCATGGAGAT CTCGAGGCCTG
70	pIPL12- bb-R	CACACCCAGGTCTCACATATGATAAAGA AGACTCTTGGC
81	SgaA Ca ci1-F	CACACCCAGGTCTCACATATGAGAACT CCATTTATTATGAC
82	SgaA Ca ci1-R	CACACCCAGGTCTCAGTGTTCCTCCTA TGTGTTCCCTAATCTACAAAGTGCTTG
79	aldA1 P fq8-F	CACACCCAGGTCTCAACACATATGTCT TCAGTGCCTGTATTCCAG
80	aldA1 P fq8-R	CACACCCAGGTCTCAGGTTAAGACTGG AGATATACTGCATGAG

10

【0166】

実施例 1 に記載されるように、pMEG061 プラスミドを担持する *C. autoethanogenum* の 3 つの異なるコロニーを、 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ のクラリスロマイシンを含む 2 mL の PETC-MES 培地に接種し、独立栄養的に増殖させた。図 6 A を参照されたい。独立栄養増殖の約 3 日後、グリコール酸が観察され、16 日後、エチレングリコールの生成が観察された (図 6 B)。

20

【0167】

実施例 5 : エチレングリコールへのさまざまなルートの最大収量のモデリング

Marcellin, Green Chem, 18 : 3020-3028, 2016 に記載されているような *Clostridium autoethanogenum* のゲノムスケールの代謝モデルを利用して、エチレングリコールへの異なるルートの最大収量を予測した。異種代謝反応を野生型 *Clostridium autoethanogenum* モデル構造に追加して、非天然化合物生成経路の組み込みを示した。本明細書に記載の実験作業に使用されるモデルは、*Clostridium autoethanogenum* に基づくが、代謝の類似性を考慮すると、結果は、他の Wood-Ljungdahl 微生物にも当てはまると期待することは当然であり得る。

30

【0168】

エチレングリコールの生成は、cobrapy バージョン 0.8.2 (Ebrahim, COBRAPy: Constraints-Based Reconstruction and Analysis for Python, BMC Syst Biol, 7 : 74, 2013) を使用し、ソルバーインターフェイスとして optlang バージョン 1.2.3 (Jensen, Optlang: An Algebraic Modeling Language for Mathematical Optimization, "The Journal of Open Source Software, 2, doi:10.21105/joss.00139, 2017) を、最適化ソルバーとして Gurobi Optimizer バージョン 7.0.2 を使用する、制約ベースの計算モデリング技術フラックスバランス分析 (FBA) および代謝調整の線形最小化 (LMOMA) を使用してシミュレートされた (Maia, Proceedings of the Genetic and Evolutionary Computation Conference Companion on-GECCO'17, New York, New York, ACM Press, 1661-1668, 2017)。

40

【0169】

モデル化により、実施例 1 ~ 4 で本明細書に記載された経路により、 0.37 mol のエチレングリコール / mol CO の予測収量が明らかになった。これは、糖新生を必要と

50

し、予測される最高の収量が、約 0.18 mol のエチレングリコール / mol CO に相当する、約 0.44 g のエチレングリコール / g CO であることが見出された、Islam et al. Metab Eng, 41:173-181, 2017 によって記述された仮説的経路による予測収量の 2 倍以上である。

【0170】

本明細書に列举される公表文献、特許出願、および特許を含む全ての参考文献は、各参考文献があたかも参照により組み込まれることが個々にかつ具体的に示され、かつその全体が本明細書中に記載された場合と同じ程度まで、参照により本明細書に組み込まれる。本明細書における任意の先行技術への言及は、その先行技術が任意の国における努力傾注分野の共通の一般的知識の一部をなすという承認ではなく、かつそのように解釈されるべきではない。

10

【0171】

本発明の記載との関連で（特に、以下の特許請求の範囲との関連で）、用語「a」および「an」および「the」ならびに同様の指示語の使用は、本明細書に別段の指示がない限り、または文脈によって明らかに相反することがない限り、単数および複数の両方を包含すると解釈されるものとする。用語「含むこと (comprising)」、「有すること」、「含むこと (including)」、および「含有すること」は、特に断りのない限り、非限定的な用語（すなわち、「～を含むがこれらに限定されないこと」を意味する）と解釈されるものとする。「から本質的になる」という用語は、組成物、プロセス、または方法の範囲を、特定の材料もしくは工程、または組成物、プロセス、もしくはは方法の基本的かつ新規の特性に実質的に影響しないものに限定する。選択詞の使用（例えば「または」）は、選択詞の一方、両方、またはこれらの任意の組み合わせを意味すると理解されるべきである。本明細書で使用される場合、「約」という用語は、別段の指示がない限り、指示された範囲、値、または構造の $\pm 20\%$ を意味する。

20

【0172】

本明細書の値の範囲の記述は、本明細書に別段の指示がない限り、範囲内に入る各個々の値を個々に言及する省略法としての役割を果たすことを単に意図し、各個々の値は、あたかも本明細書に個々に列举されたかのように、本明細書中に組み込まれる。例えば、任意の濃度範囲、パーセント範囲、比率範囲、整数範囲、サイズ範囲、または厚さ範囲は、別段の指示がない限り、列举された範囲内の任意の整数の値、および適切な場合、その分数（整数の 10 分の 1 、および 100 分の 1 など）を含むと理解されるべきである。

30

【0173】

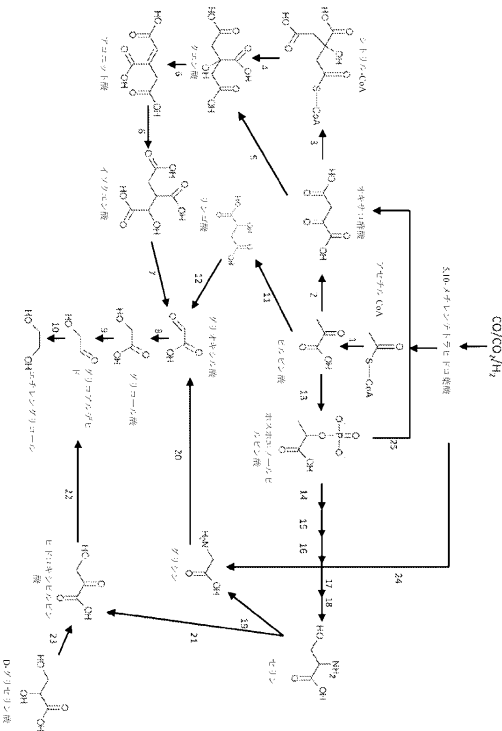
本明細書に記載される全ての方法は、本明細書に別段の指示がない限り、または文脈と明らかに相反することがない限り、任意の好適な順序で実施され得る。本明細書に提供されるありとあらゆる例または例示的な言葉（例えば、「など」）の使用は、本発明をよりよく説明することを単に意図し、別段の請求がない限り、本発明の範囲を制限しない。本明細書におけるいかなる言葉も、本発明の実施に不可欠な任意の非請求要素を示すものと解釈されるべきではない。

【0174】

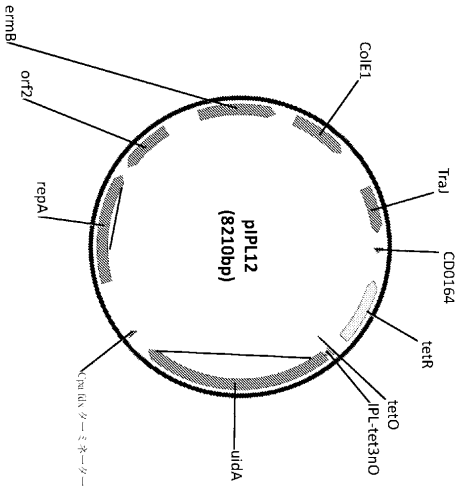
本発明の好ましい実施形態が本明細書に記載される。それらの好ましい実施形態の変化形は、上記の説明を読むことによって当業者に明らかとなり得る。本発明者らは、当業者が必要に応じてそのような変化形を採用することを予想し、本発明者らは、本発明が本明細書に具体的に記載されるものとは別の方法で実施されることを意図する。したがって、本発明は、適用法によって許可された通り、本明細書に添付される特許請求の範囲に記載される主題の全ての修正物および均等物を含む。さらに、好ましい実施形態の全ての考えられる変化形における上記の要素の任意の組み合わせは、本明細書で別段の指示がない限り、または文脈と明らかに相反することがない限り、本発明によって包含される。

40

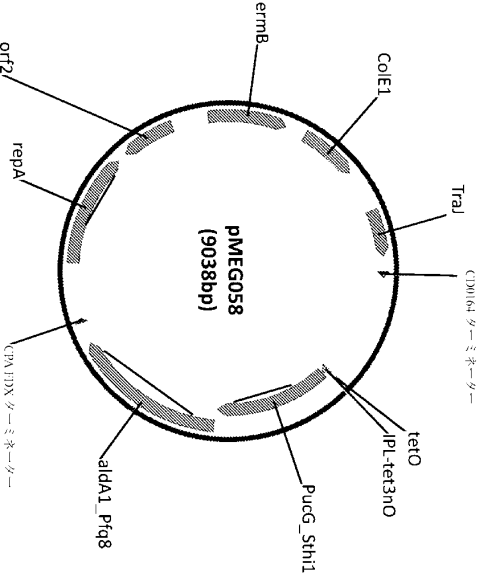
【図面】
【図 1】



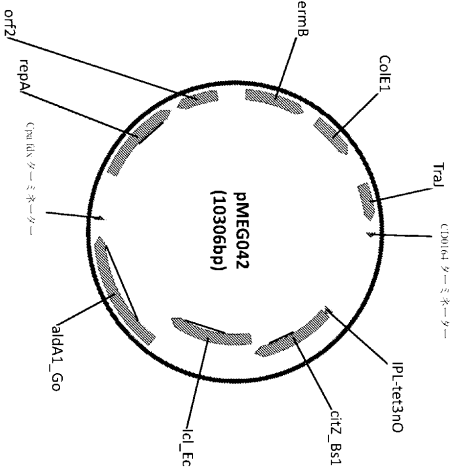
【図 2 A】



【図 2 C】



【図 2 B】



10

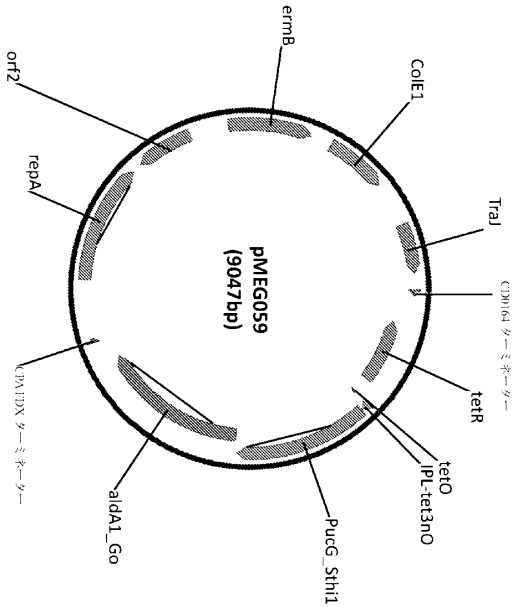
20

30

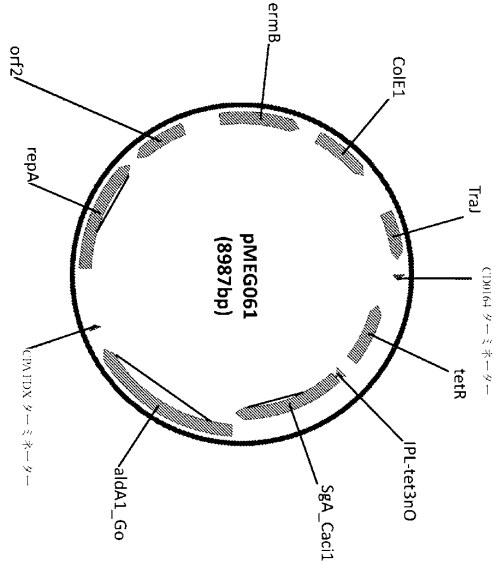
40

50

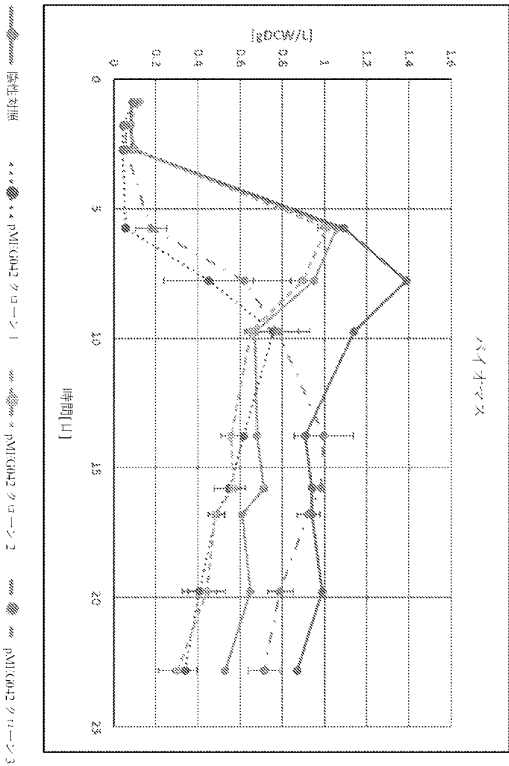
【図 2 D】



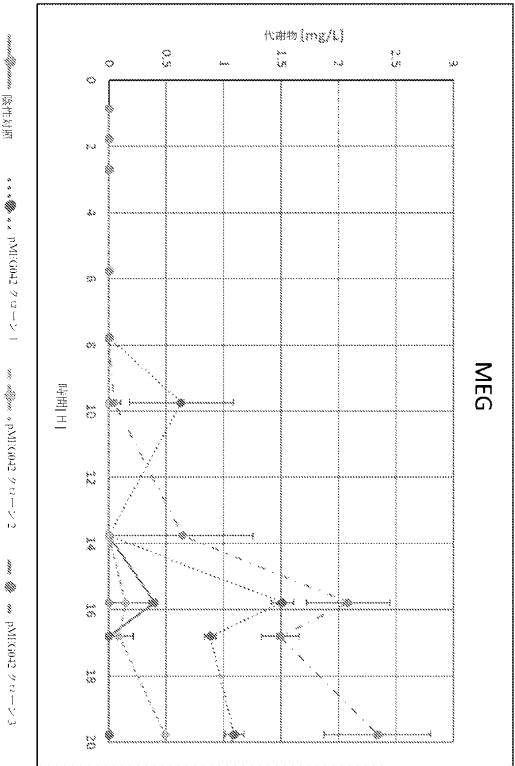
【図 2 E】



【図 3 A】



【図 3 B】



10

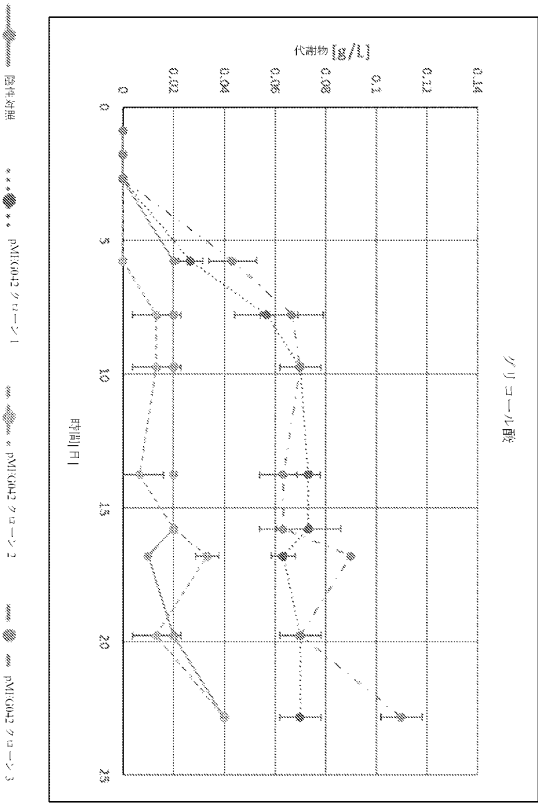
20

30

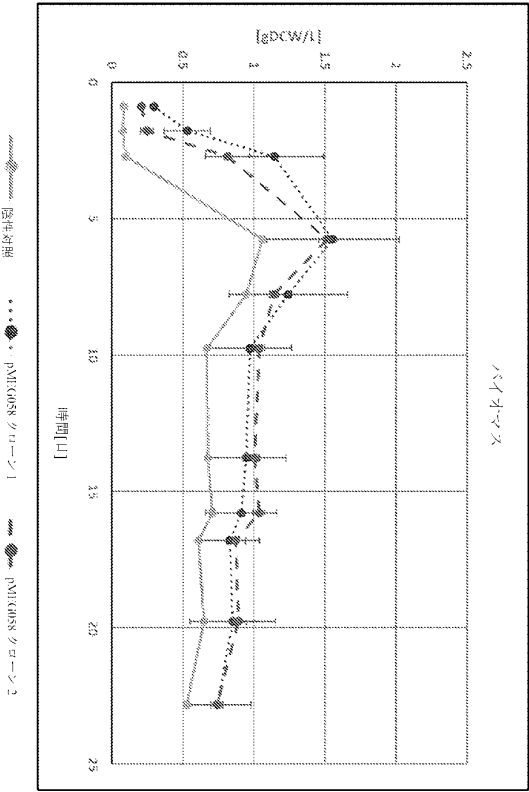
40

50

【図 3 C】



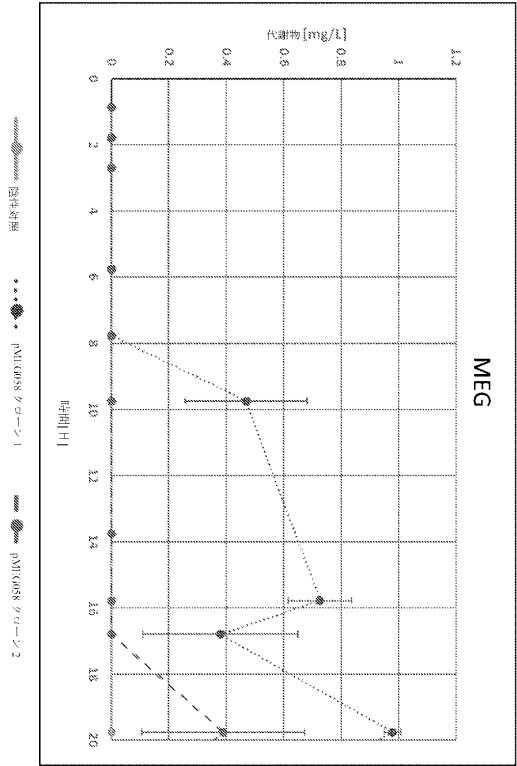
【図 4 A】



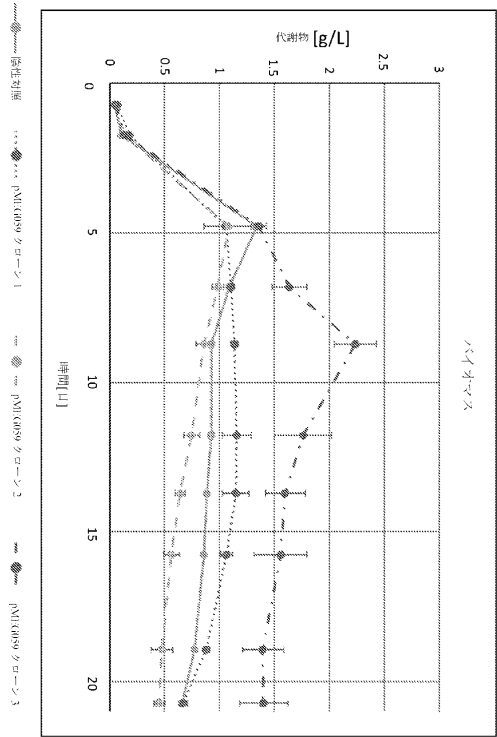
10

20

【図 4 B】



【図 5 A】

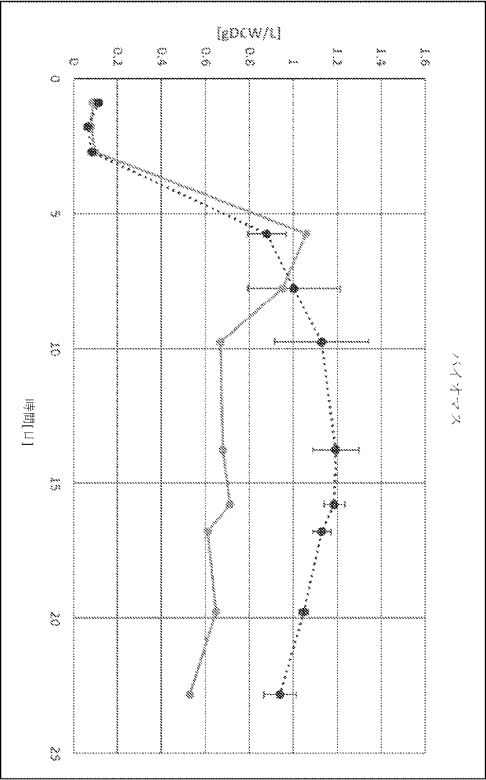


30

40

50

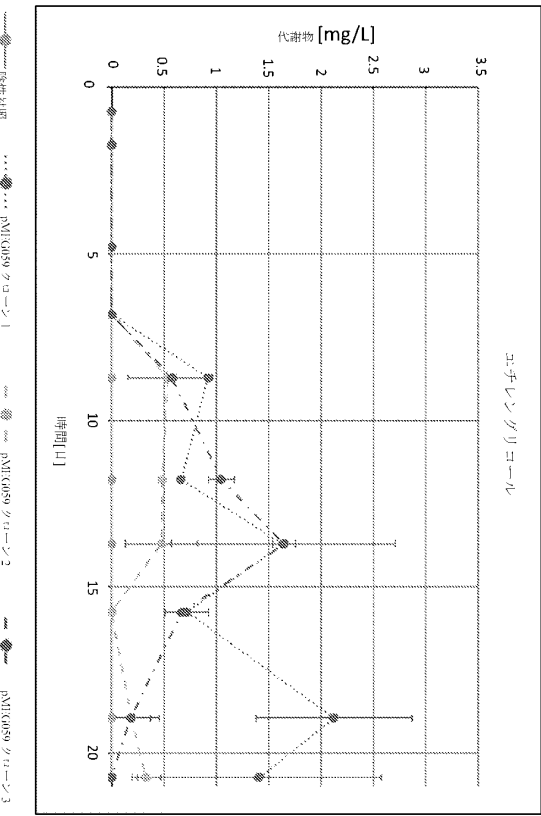
【図 6 A】



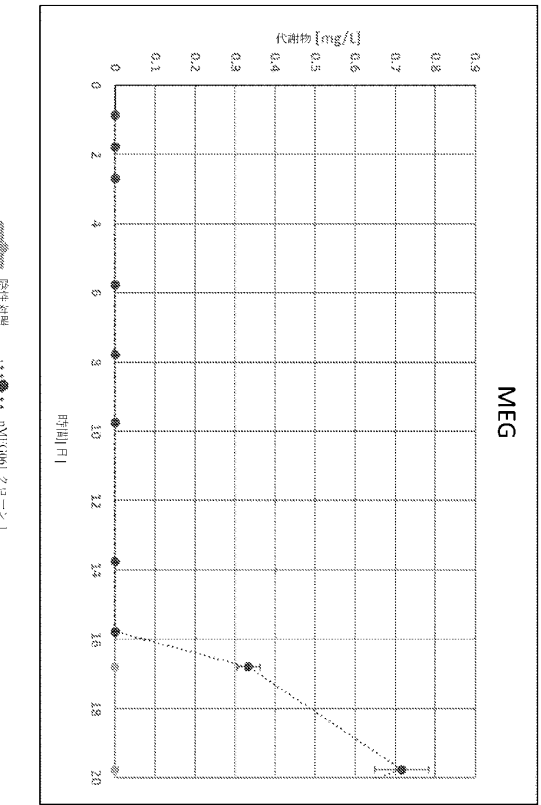
10

20

【図 5 B】



【図 6 B】



30

40

50

【配列表】

2023123701000001.app

10

20

30

40

50

【手続補正書】

【提出日】令和5年7月3日(2023.7.3)

【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】

ガス状基質からエチレングリコールまたはエチレングリコールの前駆体を生成できる遺伝子操作された C 1 固定微生物であって、E C 番号 1 . 2 . 1 . 2 1 を有するグリコールアルデヒドデヒドロゲナーゼ、E C 番号 1 . 2 . 1 . 2 2 を有するラクトアルデヒドデヒドロゲナーゼ、E C 番号 1 . 2 . 1 . 2 4 を有するコハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、E C 番号 1 . 2 . 1 . 2 6 を有する 2 , 5 - ジオキソ吉草酸デヒドロゲナーゼ、E C 番号 1 . 2 . 1 . 8 を有するベタイン-アルデヒドデヒドロゲナーゼ、または E C 番号 1 . 2 . 7 . 5 を有するアルデヒドフェレドキシンオキシドレダクターゼから選択される異種酵素をコードする核酸を含む、微生物。

10

【請求項2】

前記微生物が、5 , 1 0 - メチレンテトラヒドロ葉酸、オキサロ酢酸、クエン酸、リンゴ酸、およびグリシンからなる群から選択される1つ以上の中間体を介してエチレングリコールまたはエチレングリコールの前駆体を生成する、請求項1に記載の微生物。

20

【請求項3】

前記微生物が、

i) オキサロ酢酸をクエン酸に変換できる異種酵素をコードする核酸、

i i) グリシンをグリオキシル酸に変換できる異種酵素をコードする核酸、

i i i) イソクエン酸をグリオキシル酸に変換できる異種酵素をコードする核酸、および

i v) グリコール酸をグリコールアルデヒドに変換できる異種酵素をコードする核酸、のうちの1つ以上を含む、請求項1に記載の微生物。

【請求項4】

a . オキサロ酢酸をクエン酸に変換できる前記異種酵素が、クエン酸 [S i] - シンターゼ [2 . 3 . 3 . 1] 、 A T P クエン酸シンターゼ [2 . 3 . 3 . 8] またはクエン酸 (R e) - シンターゼ [2 . 3 . 3 . 3] であり、

30

b . グリシンをグリオキシル酸に変換できる前記異種酵素が、アラニン-グリオキシル酸トランスアミナーゼ [2 . 6 . 1 . 4 4] 、セリン-グリオキシル酸トランスアミナーゼ [2 . 6 . 1 . 4 5] 、セリン-ピルビン酸トランスアミナーゼ [2 . 6 . 1 . 5 1] 、グリシン-オキサロ酢酸トランスアミナーゼ [2 . 6 . 1 . 3 5] 、グリシントランスアミナーゼ [2 . 6 . 1 . 4] 、グリシンデヒドロゲナーゼ [1 . 4 . 1 . 1 0] 、アラニンデヒドロゲナーゼ [1 . 4 . 1 . 1] 、またはグリシンデヒドロゲナーゼ [1 . 4 . 2 . 1] であり、かつ／または

c . イソクエン酸をグリオキシル酸に変換できる前記異種酵素が、イソクエン酸リアーゼ [4 . 1 . 3 . 1] である、請求項3に記載の微生物。

40

【請求項5】

前記異種酵素のうちの1つ以上が、B a c i l l u s 、 C l o s t r i d i u m 、 E s c h e r i c h i a 、 G l u c o n o b a c t e r 、 H y p h o m i c r o b i u m 、 L y s i n i b a c i l l u s 、 P a e n i b a c i l l u s 、 P s e u d o m o n a s 、 S e d i m e n t i c o l a 、 S p o r o s a r c i n a 、 S t r e p t o m y c e s 、 T h e r m i t h i o b a c i l l u s 、 T h e r m o t o g a 、および Z e a からなる群から選択される属に由来する、請求項3に記載の微生物。

【請求項6】

前記異種酵素のうちの1つ以上が、前記微生物における発現のためにコドン最適化され

50

ている、請求項 3 に記載の微生物。

【請求項 7】

前記微生物は、E C 番号 1. 2. 7. 1 を有するアセチル-C o A をピルビン酸に変換できる酵素、E C 番号 6. 4. 1. 1 を有するピルビン酸をオキサロ酢酸に変換できる酵素、E C 番号 1. 1. 1. 37、1. 1. 1. 38、1. 1. 1. 39、1. 1. 1. 40、1. 1. 1. 82、1. 1. 1. 83、1. 1. 1. 84、1. 1. 1. 85、1. 1. 1. 299、または 1. 1. 5. 4 を有するピルビン酸をリンゴ酸に変換できる酵素、E C 番号 2. 7. 1. 40 または 2. 7. 9. 2 を有するピルビン酸をホスフェノールピルビン酸に変換できる酵素、E C 番号 4. 1. 3. 34 を有するオキサロ酢酸をシトリル-C o A に変換できる酵素、E C 番号 2. 8. 3. 10 を有するシトリル-C o A をクエン酸に変換できる酵素、E C 番号 4. 2. 1. 3 を有するクエン酸をアコニット酸に、およびアコニット酸をイソクエン酸に変換できる酵素、E C 番号 4. 1. 1. 49 または 4. 1. 1. 32 を有するホスホエノールピルビン酸をオキサロ酢酸に変換できる酵素、E C 番号 4. 2. 1. 11 を有するホスホエノールピルビン酸を 2-ホスホ-D-グリセリン酸に変換できる酵素、E C 番号 5. 4. 2. 11 / 12 を有する 2-ホスホ-D-グリセリン酸を 3-ホスホ-D-グリセリン酸に変換できる酵素、E C 番号 1. 1. 1. 95 を有する 3-ホスホ-D-グリセリン酸を 3-ホスホノオキシピルビン酸に変換できる酵素、E C 番号 2. 6. 1. 52 を有する 3-ホスホノオキシピルビン酸を 3-ホスホ-L-セリンに変換できる酵素、E C 番号 3. 1. 3. 3 を有する 3-ホスホ-L-セリンをセリンに変換できる酵素、E C 番号 2. 1. 2. 1 を有するセリンをグリシンに変換できる酵素、E C 番号 1. 4. 4. 2、1. 81. 4、または 2. 1. 2. 10 を有する 5, 10-メチレンテトラヒドロ葉酸をグリシンに変換できる酵素、E C 番号 2. 6. 1. 51、2. 6. 1. 45、1. 4. 1. 1、1. 4. 1. 5、1. 4. 1. 7、2. 6. 1. 2、2. 6. 1. 15、2. 6. 1. 21、または 2. 6. 1. 44 を有するセリンをヒドロキシピルビン酸に変換できる酵素、E C 番号 1. 1. 1. 29 または 1. 1. 1. 81 を有する D-グリセリン酸をヒドロキシピルビン酸に変換できる酵素、E C 番号 2. 3. 3. 9 または 4. 1. 3. 1 を有するリンゴ酸をグリオキシル酸に変換できる酵素、E C 番号 1. 1. 1. 29、1. 1. 1. 26 / 79、または 1. 1. 99. 14 を有するグリオキシル酸をグリコール酸に変換できる酵素、E C 番号 4. 1. 1. 40 または 4. 1. 1. 1 を有するヒドロキシピルビン酸をグリコールアルデヒドに変換できる酵素、および E C 番号 1. 1. 1. 77、1. 1. 1. 1、1. 1. 1. 2、1. 1. 1. 72、1. 1. 1. 8、または 1. 1. 1. 21 を有するグリコールアルデヒドをエチレングリコールに変換できる酵素、をコードする核酸のうちの 1 つ以上をさらに含む、請求項 3 に記載の微生物。

10

20

30

【請求項 8】

前記微生物が、

- i) 前記オキサロ酢酸をクエン酸に変換できる異種酵素、
- i i) 前記グリシンをグリオキシル酸に変換できる異種酵素および / または
- i i i) 前記グリコール酸をグリコールアルデヒドに変換できる異種酵素、を過剰発現する、請求項 3 に記載の微生物。

40

【請求項 9】

前記微生物が、

- i) E C 番号 6. 4. 1. 1 を有する前記ピルビン酸をオキサロ酢酸に変換できる酵素、
- i i) E C 番号 4. 2. 1. 3 を有する前記クエン酸をアコニット酸に、およびアコニット酸をイソクエン酸に変換できる酵素、
- i i i) E C 番号 4. 1. 1. 49 または 4. 1. 1. 32 を有する前記ホスホエノールピルビン酸をオキサロ酢酸に変換できる酵素、
- i v) E C 番号 2. 1. 2. 1 を有する前記セリンをグリシンに変換できる酵素、
- v) E C 番号 1. 4. 4. 2、1. 81. 4、または 2. 1. 2. 10 を有する前記 5, 10-メチレンテトラヒドロ葉酸をグリシンに変換できる酵素、

50

v i) E C 番 号 2 . 3 . 3 . 9 を 有 する 前 記 グリ オ キ シ ル 酸 を グリ コ ール 酸 に 変 換 できる 酵 素、お よ び / ま た は

v i i) E C 番 号 1 . 1 . 1 . 7 7、1 . 1 . 1 . 1、1 . 1 . 1 . 2、1 . 1 . 1 . 7 2、1 . 1 . 1 . 8、ま た は 1 . 1 . 1 . 2 1 を 有 する 前 記 グリ コ ール アル デ ヒ ド を エ チ レ ン グリ コ ール に 変 換 できる 酵 素、を 過 剰 発 現 する、請 求 項 5 に 記 載 の 微 生 物。

【請 求 項 1 0】

前 記 微 生 物 が、イ ソ ク エ ン 酸 デ ヒ ド ロ ゲ ナ ー ゼ、グ リ セ リ ン 酸 デ ヒ ド ロ ゲ ナ ー ゼ、グ リ コ ール 酸 デ ヒ ド ロ ゲ ナ ー ゼ、グ リ セ リ ン 酸 デ ヒ ド ロ ゲ ナ ー ゼ、グ リ コ ール 酸 デ ヒ ド ロ ゲ ナ ー ゼ、アル デ ヒ ド フ ェ レ ド キ シ ン オ キ シ ド レ ダ ク タ ー ゼ、お よ び アル デ ヒ ド デ ヒ ド ロ ゲ ナ ー ゼ の う ち の 1 つ 以 上 に 破 壊 的 変 異 を 含 む、請 求 項 1 に 記 載 の 微 生 物。

10

【請 求 項 1 1】

前 記 微 生 物 が、A c e t o b a c t e r i u m、A l k a l i b a c u l u m、B l a u t i a、B u t y r i b a c t e r i u m、C l o s t r i d i u m、E u b a c t e r i u m、M o o r e l l a、O x o b a c t e r、S p o r o m u s a、お よ び T h e r m o a n a e r o b a c t e r か ら な る 群 か ら 選 択 さ れ る 属 の メ ン バ ー で あ る、請 求 項 1 に 記 載 の 微 生 物。

【請 求 項 1 2】

前 記 微 生 物 が、A c e t o b a c t e r i u m w o o d i i、A l k a l i b a c u l u m b a c c h i i、B l a u t i a p r o d u c t a、B u t y r i b a c t e r i u m m e t h y l o t r o p h i c u m、C l o s t r i d i u m a c e t i c u m、C l o s t r i d i u m a u t o e t h a n o g e n u m、C l o s t r i d i u m c a r b o x i d i v o r a n s、C l o s t r i d i u m c o s k a t i i、C l o s t r i d i u m d r a k e i、C l o s t r i d i u m f o r m i c o a c e t i c u m、C l o s t r i d i u m l j u n g d a h l i i、C l o s t r i d i u m m a g n u m、C l o s t r i d i u m r a g s d a l e i、C l o s t r i d i u m s c a t o l o g e n e s、E u b a c t e r i u m l i m o s u m、M o o r e l l a t h e r m a u t o t r o p h i c a、M o o r e l l a t h e r m o a c e t i c a、O x o b a c t e r p f e n n i g i i、S p o r o m u s a o v a t a、S p o r o m u s a s i l v a c e t i c a、S p o r o m u s a s p h a e r o i d e s、お よ び T h e r m o a n a e r o b a c t e r k i u v i か ら な る 群 か ら 選 択 さ れ る 親 微 生 物 に 由 来 する、請 求 項 1 に 記 載 の 微 生 物。

20

30

【請 求 項 1 3】

前 記 微 生 物 が、C l o s t r i d i u m a u t o e t h a n o g e n u m、C l o s t r i d i u m l j u n g d a h l i i、お よ び C l o s t r i d i u m r a g s d a l e i か ら な る 群 か ら 選 択 さ れ る 親 細 菌 に 由 来 する、請 求 項 1 2 に 記 載 の 微 生 物。

【請 求 項 1 4】

前 記 微 生 物 が、天 然 ま た は 異 種 の W o o d - L j u n g d a h l 経 路 を 含 む、請 求 項 1 に 記 載 の 微 生 物。

【請 求 項 1 5】

前 記 エ チ レ ン グリ コ ール の 前 駆 体 が グリ オ キ シ ル 酸 ま た は グリ コ ール 酸 で あ る、請 求 項 1 に 記 載 の 微 生 物。

40

【請 求 項 1 6】

前 記 ガ ス 状 基 質 の 存 在 下、栄 養 培 地 中 で 請 求 項 1 に 記 載 の 微 生 物 を 培 養 し、そ れ に よ っ て 前 記 微 生 物 が エ チ レ ン グリ コ ール ま た は エ チ レ ン グリ コ ール の 前 駆 体 を 生 成 す る こ と を 含 む、エ チ レ ン グリ コ ール ま た は エ チ レ ン グリ コ ール の 前 駆 体 の 生 成 方 法。

【請 求 項 1 7】

前 記 ガ ス 状 基 質 が、C O、C O₂、お よ び H₂ の う ち の 1 つ 以 上 を 含 む、請 求 項 1 6 に 記 載 の 方 法。

【請 求 項 1 8】

前 記 エ チ レ ン グリ コ ール の 前 駆 体 が グリ オ キ シ ル 酸 ま た は グリ コ ール 酸 で あ る、請 求 項

50

16に記載の方法。

【請求項19】

前記栄養培地からエチレングリコールまたはエチレングリコールの前駆体を分離することをさらに含む、請求項16に記載の方法。

【請求項20】

前記微生物がエタノール、2,3-ブタンジオール、およびコハク酸うちの1つ以上をさらに生成する、請求項16に記載の方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0174

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0174】

本発明の好ましい実施形態が本明細書に記載される。それらの好ましい実施形態の変化形は、上記の説明を読むことによって当業者に明らかとなり得る。本発明者らは、当業者が必要に応じてそのような変化形を採用することを予想し、本発明者らは、本発明が本明細書に具体的に記載されるものとは別の方法で実施されることを意図する。したがって、本発明は、適用法によって許可された通り、本明細書に添付される特許請求の範囲に記載される主題の全ての修正物および均等物を含む。さらに、好ましい実施形態の全ての考えられる変化形における上記の要素の任意の組み合わせは、本明細書で別段の指示がない限り、または文脈と明らかに相反することがない限り、本発明によって包含される。
本発明の様々な実施形態を以下に示す。

1. ガス状基質からエチレングリコールまたはエチレングリコールの前駆体を生成できる遺伝子操作された微生物。

2. 前記微生物が、5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸、オキサロ酢酸、クエン酸、リンゴ酸、およびグリシンからなる群から選択される1つ以上の中間体を介してエチレングリコールまたはエチレングリコールの前駆体を生成する、上記1に記載の微生物。

3. 前記微生物が、

a. オキサロ酢酸をクエン酸に変換できる異種酵素、
b. グリシンをグリオキシル酸に変換できる異種酵素、
c. イソクエン酸をグリオキシル酸に変換できる異種酵素、および
d. グリコール酸をグリコアルデヒドに変換できる異種酵素、のうちの1つ以上を含む、上記1に記載の微生物。

4. a. オキサロ酢酸をクエン酸に変換できる前記異種酵素が、クエン酸 [S i] -シンターゼ [2.3.3.1]、ATPクエン酸シンターゼ [2.3.3.8] またはクエン酸 (R e) -シンターゼ [2.3.3.3] であり、

b. グリシンをグリオキシル酸に変換できる前記異種酵素が、アラニン-グリオキシル酸トランスアミナーゼ [2.6.1.44]、セリン-グリオキシル酸トランスアミナーゼ [2.6.1.45]、セリン-ピルビン酸トランスアミナーゼ [2.6.1.51]、グリシン-オキサロ酢酸トランスアミナーゼ [2.6.1.35]、グリシントランスアミナーゼ [2.6.1.4]、グリシンデヒドロゲナーゼ [1.4.1.10]、アラニンデヒドロゲナーゼ [1.4.1.1]、またはグリシンデヒドロゲナーゼ [1.4.2.1] であり、

c. イソクエン酸をグリオキシル酸に変換できる前記異種酵素が、イソクエン酸リアーゼ [4.1.3.1] であり、かつ/または

d. グリコール酸をグリコアルデヒドに変換できる前記異種酵素が、グリコアルデヒドデヒドロゲナーゼ [1.2.1.21]、ラクトアルデヒドデヒドロゲナーゼ [1.2.1.22]、コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ [1.2.1.24]、2,5-ジオキソ吉草酸デヒドロゲナーゼ [1.2.1.26]、アルデヒドデヒドロゲナーゼ [1.2.1.3/4/5]、ベタイン-アルデヒドデヒドロゲナーゼ [1.2.

10

20

30

40

50

1. 8]、またはアルデヒドフェレドキシンオキシドレダクターゼ [1. 2. 7. 5] である、上記3に記載の微生物。

5. 前記異種酵素のうちの1つ以上が、*Bacillus*、*Clostridium*、*Escherichia*、*Gluconobacter*、*Hyphomicrobium*、*Lysinibacillus*、*Paenibacillus*、*Pseudomonas*、*Sedimenticola*、*Sporosarcina*、*Streptomyces*、*Thermithiobacillus*、*Thermotoga*、および *Zea* からなる群から選択される属に由来する、上記3に記載の微生物。

6. 前記異種酵素のうちの1つ以上が、前記微生物における発現のためにコドン最適化されている、上記3に記載の微生物。

7. 前記微生物は、アセチル-CoAをピルビン酸に変換できる酵素、ピルビン酸をオキサロ酢酸に変換できる酵素、ピルビン酸をリンゴ酸に変換できる酵素、ピルビン酸をホスフェノールピルビン酸に変換できる酵素、オキサロ酢酸をシトリル-CoAに変換できる酵素、シトリル-CoAをクエン酸に変換できる酵素、クエン酸をアコニット酸に、およびアコニット酸をイソクエン酸に変換できる酵素、ホスホエノールピルビン酸をオキサロ酢酸に変換できる酵素、ホスホエノールピルビン酸を2-ホスホ-D-グリセリン酸に変換できる酵素、2-ホスホ-D-グリセリン酸を3-ホスホ-D-グリセリン酸に変換できる酵素、3-ホスホ-D-グリセリン酸を3-ホスホノオキシピルビン酸に変換できる酵素、3-ホスホノオキシピルビン酸を3-ホスホ-L-セリンに変換できる酵素、3-ホスホ-L-セリンをセリンに変換できる酵素、セリンをグリシンに変換できる酵素、5, 10-メチレントトラヒドロ葉酸をグリシンに変換できる酵素、セリンをヒドロキシピルビン酸に変換できる酵素、D-グリセリン酸をヒドロキシピルビン酸に変換できる酵素、リンゴ酸をグリオキシル酸に変換できる酵素、グリオキシル酸をグリコール酸に変換できる酵素、ヒドロキシピルビン酸をグリコアルデヒドに変換できる酵素、およびグリコアルデヒドをエチレングリコールに変換できる酵素、のうちの1つ以上をさらに含む、上記3に記載の微生物。

8. 前記微生物が、

- a. 前記オキサロ酢酸をクエン酸に変換できる異種酵素、
- b. 前記グリシンをグリオキシル酸に変換できる異種酵素および／または
- c. 前記グリコール酸をグリコアルデヒドに変換できる異種酵素、を過剰発現する、上記3に記載の微生物。

9. 前記微生物が、

- a. 前記ピルビン酸をオキサロ酢酸に変換できる酵素、
- b. 前記クエン酸をアコニット酸に、およびアコニット酸をイソクエン酸に変換できる酵素、
- c. 前記ホスホエノールピルビン酸をオキサロ酢酸に変換できる酵素、
- d. 前記セリンをグリシンに変換できる酵素、
- e. 前記5, 10-メチレントトラヒドロ葉酸をグリシンに変換できる酵素、
- f. 前記グリオキシル酸をグリコール酸に変換できる酵素、および／または
- g. 前記グリコアルデヒドをエチレングリコールに変換できる酵素、を過剰発現する、上記7に記載の微生物。

10. 前記微生物が、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ、グリセリン酸デヒドロゲナーゼ、グリコール酸デヒドロゲナーゼ、グリセリン酸デヒドロゲナーゼ、グリコール酸デヒドロゲナーゼ、アルデヒドフェレドキシンオキシドレダクターゼ、およびアルデヒドデヒドロゲナーゼのうちの1つ以上に破壊的変異を含む、上記1に記載の微生物。

11. 前記微生物が、*Acetobacterium*、*Alkalibaculum*、*Blautia*、*Butyribacterium*、*Clostridium*、*Eubacterium*、*Moorella*、*Oxobacter*、*Sporomusa*、および *Thermoanaerobacter* からなる群から選択される属のメンバーである、上記1に記載の微生物。

10

20

30

40

50

12. 前記微生物が、*Acetobacterium woodii*、*Alkalibaculum bacchii*、*Blautia producta*、*Butyrivacterium methylophilum*、*Clostridium acet*
icum、*Clostridium autoethanogenum*、*Clostridium carboxidivorans*、*Clostridium coskati*
i、*Clostridium drakei*、*Clostridium formico*
aceticum、*Clostridium ljungdahlii*、*Clostridium magnum*、*Clostridium ragsdalei*、*Clostridium scatologenes*、*Eubacterium limosum*、*Moorella thermautotrophica*、*Moorella therm*
oacetica、*Oxobacter pfennigii*、*Sporomusa o*
vata、*Sporomusa silvacetica*、*Sporomusa sph*
aeroides、および*Thermoanaerobacter kiuvi*からなる群から選択される親微生物に由来する、上記1に記載の微生物。

10

13. 前記微生物が、*Clostridium autoethanogenum*、*Clostridium ljungdahlii*、および*Clostridium ragsdalei*からなる群から選択される親細菌に由来する、上記12に記載の微生物。

14. 前記微生物が、天然または異種のWood-Ljungdahl経路を含む、上記1に記載の微生物。

15. 前記エチレングリコールの前駆体がグリオキシル酸またはグリコール酸である、上記1に記載の微生物。

20

16. 前記ガス状基質の存在下、栄養培地中で上記1に記載の微生物を培養し、それによって前記微生物がエチレングリコールまたはエチレングリコールの前駆体を生成することを含む、エチレングリコールまたはエチレングリコールの前駆体の生成方法。

17. 前記ガス状基質が、CO、CO₂、およびH₂のうちの1つ以上を含む、上記16に記載の方法。

18. 前記エチレングリコールの前駆体がグリオキシル酸またはグリコール酸である、上記16に記載の方法。

19. 前記栄養培地からエチレングリコールまたはエチレングリコールの前駆体を分離することをさらに含む、上記16に記載の方法。

30

20. 前記微生物がエタノール、2,3-ブタンジオール、およびコハク酸うちの1つ以上をさらに生成する、上記16に記載の方法。

【外国語明細書】

2023123701000026.pdf

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 15/61 (2006.01)
C 1 2 N 15/55 (2006.01)
C 1 2 P 7/18 (2006.01)
C 1 2 N 1/00 (2006.01)
C 1 2 N 1/20 (2006.01)
C 1 2 N 15/52 (2006.01)

F I

C 1 2 N 15/61
C 1 2 N 15/55
C 1 2 P 7/18
C 1 2 N 1/00 Q
C 1 2 N 1/00 R
C 1 2 N 1/20 D
C 1 2 N 1/20 F
C 1 2 N 1/20 Z
C 1 2 N 15/52 Z

(72)発明者

ジェンセン, ラスムス
アメリカ合衆国 イリノイ州 6 0 0 7 7, スコーキー, ラモン アベニュー 8 0 4 5, スイート
4 0 0