

【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27年2月5日 (2015.2.5)

【公表番号】特表2013-545491(P2013-545491A)

【公表日】平成25年12月26日 (2013.12.26)

【年通号数】公開・登録公報2013-069

【出願番号】特願2013-544683(P2013-544683)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 P 7/06 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 1/21 Z N A

C 1 2 P 7/06

【手続補正書】

【提出日】平成26年12月10日 (2014.12.10)

【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】

z m o 1 4 3 2 オープンリーディングフレーム中に少なくとも 1 つの遺伝的改変を有する、キシロース資化性エタノール産生性の、組換えザイモモナス (Z y m o m o n a s) 属微生物。

【請求項 2】

配列番号 3 および配列番号 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項 3】

配列番号 3 および配列番号 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、ポリペプチド。

【請求項 4】

a) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする z m o 1 4 3 2 オープンリーディングフレームを含む、キシロース資化性エタノール産生性のザイモモナス (Z y m o m o n a s) 属微生物を提供する工程と、

b) a) の z m o 1 4 3 2 オープンリーディングフレームに変異を導入する工程であって、前記変異したオープンリーディングフレームの発現によって配列番号 3 および配列番号 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドが発現する、前記工程と、
を含む組換えザイモモナス (Z y m o m o n a s) の生産方法。

【請求項 5】

a) 請求項 1 に記載の組換えザイモモナス (Z y m o m o n a s) を提供する工程と、
b) キシロース含有バイオマス加水分解物培地を提供する工程と、
c) b) のバイオマス加水分解物培地中で a) のザイモモナス (Z y m o m o n a s) を生育させ、エタノールが産生される工程と、

を含むエタノールの生産方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0101

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0101】

酢酸アンモニウム含有の培地のストレス条件下で、*Z. mobilis*株ZW801-4の培養物を生育に適応させ、共通の所有者を有する米国特許出願公開第20110014670A1号明細書に記載のZW705を生成した。この特許文献は、本明細書において参照により援用されている。ZW801-4の連続培養は、250ml攪拌型の、pHおよび温度調節式発酵槽(Sixfors; Bottmingen, Switzerland)で行った。発酵用の基礎培地は、5g/Lの酵母抽出物、15mMのリン酸アンモニウム、1g/Lの硫酸マグネシウム、10mMのソルビトール、50g/Lのキシロースおよび50g/Lのグルコースであった。特定の希釈率で測定された確立済み生育速度を97日間にわたって維持しながら、酢酸アンモニウムの濃度を徐々に上げ、上述の連続培地に添加して、高濃度のアセテートおよびアンモニアの存在下での生育に適応させた。酢酸アンモニウムの濃度を160mMまで上げた。リン酸アンモニウムを添加してアンモニウムイオン濃度を更に上昇させ、139日間の連続培養の終了時までに最終的な総アンモニウムイオン濃度210mMにした。単一コロニーに平板培養し、その選択された単一コロニーを増殖して、適応された母集団から株ZW705を単離した。

以下に本発明の具体的態様をいくつか例示的に示す。

(1) zmo1432オープンリーディングフレーム中に少なくとも1つの遺伝的改変を有する、キシロース資化性エタノール産生性の、組換えザイモモナス(*Zymomonas*)属微生物。

(2) 少なくとも1つの遺伝的改変を有する前記zmo1432オープンリーディングフレームが、配列番号2に示す前記アミノ酸配列に対して少なくとも約95%の相同性を持つアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードし、

前記変異体タンパク質を存在させることによって、前記同じ条件下にて前記遺伝的改変の無いザイモモナス(*Zymomonas*)による産生と比較して、バイオマス加水分解物培地での発酵中に前記ザイモモナス(*Zymomonas*)によるエタノール産生を増強する、(1)に記載の組換えザイモモナス(*Zymomonas*)。

(3) 遺伝的改変が、

1) 配列番号2の位置366におけるスレオニンからアルギニンへの置換、および、

2) 配列番号2の位置117におけるセリンからフェニルアラニンへの置換、

からなる群から選択されるアミノ酸置換を生じさせるzmo1432コード領域における変異である、(2)に記載の組換えザイモモナス(*Zymomonas*)。

(4) zmo1432オープンリーディングフレーム中の少なくとも1つの遺伝的改変の無いザイモモナス(*Zymomonas*)と比較してバイオマス加水分解物に対する耐性に優れる、請求項1に記載の組換えザイモモナス(*Zymomonas*)。

(5) 配列番号3および配列番号4からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする、ポリヌクレオチド。

(6) 配列番号3および配列番号4からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、ポリペプチド。

(7) a) 配列番号2に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするzmo1432オープンリーディングフレームを含む、キシロース資化性エタノール産生性のザイモモナス(*Zymomonas*)属微生物を提供する工程と、

b) a)のzmo1432オープンリーディングフレームに変異を導入する工程であって、前記変異したオープンリーディングフレームの発現によって配列番号3および配列番号4からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドが発現する、前記工

程と、

を含む組換えザイモモナス (Z y m o m o n a s) の生産方法。

(8) a) (1) に記載の組換えザイモモナス (Z y m o m o n a s) を提供する工程と、

b) キシロース含有バイオマス加水分解物培地を提供する工程と、

c) b) のバイオマス加水分解物培地中で a) のザイモモナス (Z y m o m o n a s) を生育させ、エタノールが産生される工程と、

を含むエタノールの生産方法。