

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6466836号  
(P6466836)

(45) 発行日 平成31年2月6日(2019.2.6)

(24) 登録日 平成31年1月18日(2019.1.18)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 Z N A

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 Z

C 1 2 P 7/64 (2006.01)

C 1 2 P 7/64

C 1 2 P 7/62 (2006.01)

C 1 2 P 7/62

C 1 2 N 9/10 (2006.01)

C 1 2 N 9/10

請求項の数 10 (全 36 頁)

(21) 出願番号 特願2015-518359 (P2015-518359)  
 (86) (22) 出願日 平成25年6月21日 (2013. 6. 21)  
 (65) 公表番号 特表2015-519918 (P2015-519918A)  
 (43) 公表日 平成27年7月16日 (2015. 7. 16)  
 (86) 国際出願番号 PCT/NZ2013/000108  
 (87) 国際公開番号 W02013/191567  
 (87) 国際公開日 平成25年12月27日 (2013. 12. 27)  
 審査請求日 平成28年6月17日 (2016. 6. 17)  
 (31) 優先権主張番号 61/662, 467  
 (32) 優先日 平成24年6月21日 (2012. 6. 21)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 510119555  
 ランザテク・ニュージーランド・リミテッ  
 ド  
 ニュージーランド国 1 0 1 0 オークラ  
 ンド, ショートランド ストリート 5 5  
 , レベル 1 2 ティーエムエフ グル  
 ープ内  
 (74) 代理人 100092783  
 弁理士 小林 浩  
 (74) 代理人 100120134  
 弁理士 大森 規雄  
 (74) 代理人 100104282  
 弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組み換え微生物およびそれにより作製されるバイオディーゼル

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

不特定アシルトランスフェラーゼ（ワックスエステルシンターゼ / アシル補酵素 A : ジ  
 アシルグリセロール アシルトランスフェラーゼ）をコードする外因性核酸を含む、遺伝  
 子改変した酸化炭素資化性酢酸産生細菌であって、クロストリジウム オートエタノゲナ  
 ム ( *Clostridium autoethanogenum* ) 由来である細菌。

【請求項 2】

前記不特定アシルトランスフェラーゼが、アシネトバクター バイリイ ( *Acinetobacter baylyi* ) 由来のものである、請求項 1 に記載の細菌。

【請求項 3】

前記核酸がプラスミドである、請求項 1 または 2 に記載の細菌。

【請求項 4】

前記不特定アシルトランスフェラーゼをコードする核酸が、クロストリジウム オート  
 エタノゲナム ( *Clostridium autoethanogenum* ) に最適化さ  
 れたコドンである、請求項 3 に記載の細菌。

【請求項 5】

C O および / または C O<sub>2</sub> をバイオディーゼルに変換する工程であって、前記工程が、  
 気体の C O 含有物質および / または C O<sub>2</sub> 含有物質を、培養媒体中の請求項 1 ~ 4 のい  
 ずれか一項に記載の酸化炭素資化性酢酸産生細菌の培養物を含むバイオリクターに通し  
 、これにより、前記細菌が前記 C O および / または C O<sub>2</sub> を前記バイオディーゼルに変換

10

20

することと、

前記バイオリクターから前記バイオディーゼルを回収することとを含む、工程。

【請求項 6】

前記物質が、工業廃ガスを含む、請求項 5 に記載の工程。

【請求項 7】

前記物質が合成ガスを含む、請求項 5 に記載の工程。

【請求項 8】

前記培養物が嫌気性である、請求項 5 ～ 7 のいずれか一項に記載の工程。

【請求項 9】

前記バイオディーゼルが、脂肪酸エチルエステルを含む、請求項 5 ～ 8 のいずれか一項に記載の工程。

【請求項 10】

前記バイオディーゼルが、脂肪酸ブチルエステルを含む、請求項 5 ～ 9 のいずれか一項に記載の工程。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、COを含む物質の微生物発酵によるバイオディーゼル産生のための組み換え微生物および方法に関する。

20

【背景技術】

【0002】

脂肪酸酸化炭素資化性アセトゲン *Clostridium autoethanogenum* または *C. ljungdahlii* を含む細菌は、脂質および細胞膜の生合成における脂肪酸を産生する。

【0003】

野生型のクロストリジウム株では、脂肪酸経路の流れの調節は、乾燥細胞の質量の通常 5 ～ 6 % (w/w) を占める脂質 (湿潤細胞の質量では 1 ～ 1.5 (w/w) %) に重要である (Lepage et al., 1987, Microbiology 133: 103 - 110)。概して、脂質の 95 % 超は、存在する脂肪酸と、12:0、14:0、14:1、16:0、16:1、17Δ、18:0、18:1、19Δ の比率にて、厳密に定義された C16 ～ C18 の長さの鎖の範囲内に存在する (Lepage et al., 1987, Microbiology 133: 103 - 110)。

30

【0004】

脂肪酸 (FA) およびその誘導体は、多くエネルギーを含んでおり、「ドロップイン」輸送として使用されるバイオ燃料 / ジェット燃料、および / 他の工業用化学化合物の精製物としての可能性を有する。脂肪酸誘導体の例として、バイオディーゼル、遊離脂肪酸、アルケン類、およびアルカン類が挙げられる。

【0005】

40

バイオディーゼルは、モノアルキルエステルであり、標準的なディーゼルエンジンとして単独で使うことができ、または石油のディーゼルと混合することができる。また、灯油の代わりとなる低炭素代替物として使用することもできる。2009 年、世界中で 35 億ガロン超のバイオディーゼルが使用されている。バイオディーゼルは、通常、アルコールの存在下での脂質のエステル交換反応による植物性または動物性の脂肪に化学的に由来し、グリセリンおよびモノアルキルエステルを得る。この工程により生成されるバイオディーゼルは、しかしながら、様々な範囲の長さの炭素鎖で明確化されていない多様な動物および植物供給源由来の油の変動により、ディーゼルエンジンに損傷を引き起こす可能性がある。(Fukuda et al., 2001, Biosci Bioeng 92: 405 - 416)。問題となる重要な点は、生産工程および燃料の経年化から

50

もたらされるモーターオイルの薄弱化、ピストンリングのコークス化、油圧部品の腐食、および注入システムでの析出であり、動物または植物由来のバイオディーゼルの使用をいくつかの型において拒絶する自動車の製造業者がいくらか現れるということである (Kopke et al., 2011, The Past, Present, and Future of Biofuels - Biobutanol as Promising Alternative, In: dos Santos Bernades (Ed.) Biofuel Production - Recent Developments and Prospects, Intech, 451 - 486)。  
【0006】

糖またはセルロース系供給原料を生成する食物または非食物である作物のいずれかを使用するバイオ燃料の現在の生成は、土地利用、食物の安全性、供給および環境問題の不安定性に関する欠点を有し得る。

10

【0007】

本発明の目的は、これらの問題を克服し、バイオディーゼルの生成方法を提供し、または、少なくとも公共に有益な選択肢を提供することである。

【発明の概要】

【0008】

本発明は、概して、特に、COを含む物質の微生物発酵によりバイオディーゼルを生成する方法、およびこのような方法に使用する組み換え微生物を提供する。

【0009】

20

第1の態様では、本発明は、バイオディーゼルおよび任意にCOを含む物質の発酵による1つ以上の他の産物を産生できる酸化炭素資化性アセトゲン組み換え微生物を提供する。

【0010】

1つの特定の実施形態では、本微生物は、組み換え微生物をもたらす親微生物中に存在しないバイオディーゼル生合成経路における1つ以上の外因性酵素（本明細書中で外因性酵素を指す）が発現するよう適合される。別の実施形態では、本微生物は、組み換え微生物をもたらす親微生物中に存在するバイオディーゼル生合成経路中の1つ以上の内因性酵素を過剰発現するよう適合される（本明細書中で内因性酵素を指す）。

【0011】

30

1つの実施形態では、この組み換え微生物は、組み換え微生物をもたらす親微生物よりも産生するバイオディーゼル量が多いよう適合される。

【0012】

1つの実施形態では、微生物が発現または過剰発現するよう適合される1つ以上の酵素は、アシルトランスフェラーゼである。

【0013】

1つの実施形態では、この酵素は、配列番号1に定義されるアシルトランスフェラーゼ、またはその機能的に等価な変異体である。

【0014】

1つの実施形態では、親微生物は、アルコールを産生するためにCOを含む物質を発酵できるが、アルコールをバイオディーゼルに変換できず、組み換え微生物が、エタノールのバイオディーゼルへの変換に関与する1つ以上の酵素を発現するよう適合される。

40

【0015】

1つの実施形態では、微生物は、1つ以上の外因性核酸の発現を増大するように適合され、この1つ以上の外因性核酸が、本明細書中に前述される酵素のうちの1つ以上をコードする、1つ以上の外因性核酸を含む。

【0016】

1つの実施形態では、発現を増大するよう適合した1つ以上の外因性核酸は、調節エレメントである。1つの実施形態では、この調節エレメントはプロモーターである。1つの実施形態では、このプロモーターは、構成的プロモーターである。1つの実施形態では、

50

このプロモーターは、Wood-Ljungdahl 遺伝子クラスター、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ー、Rnf 複合体オペロンプロモーター、ATP シンターゼオペロンプロモーター、およびホスホトランスアセチラーゼ/酢酸キナーゼオペロンプロモーターを含む群から選択される。

#### 【0017】

1つの実施形態では、この酢酸産生酸化炭素資化性組み換え微生物は、脂肪酸生合成経路における1つ以上の外因性酵素を発現するようさらに適合される。さらなる態様では、この微生物は、脂肪酸生合成経路中の1つ以上の内因性酵素を過剰発現するよう適合される。

#### 【0018】

10

1つの実施形態では、本微生物は、本明細書に前述する1つ以上の酵素をコードし、かつ1つ以上の酵素を発現するよう適合した1つ以上の外因性核酸を含む。1つの実施形態では、本微生物は、少なくとも2つの酵素をコードし、かつ、この少なくとも2つの酵素を発現するよう適合した1つ以上の外因性核酸を含む。他の実施形態では、本微生物は、5つ以上の酵素をコードし、かつ、この5つ以上の酵素を発現するよう適合した1つ以上の外因性核酸を含む。

#### 【0019】

1つの実施形態では、この1つ以上の外因性核酸は、核酸構築物またはベクターであり、1つの特定の実施形態では、本明細書に前述されるいずれかの組み合わせを指す酵素のうちの1つ以上をコードするプラスミドである。

20

#### 【0020】

1つの実施形態では、外因性核酸は、発現プラスミドである。

#### 【0021】

1つの特定の実施形態では、親微生物は *Clostridium autoethanogenum*、*Clostridium ljungdahlii*、*Clostridium ragsdalei*、*Clostridium carboxidivorans*、*Clostridium drakei*、*Clostridium scatologenes*、*Clostridium aceticum*、*Clostridium formicoaceticum*、*Clostridium magnum*、*Butyrivibacterium methylotrophicum*、*Acetobacterium woodii*、*Alkalibaculum bacchii*、*Blautia producta*、*Eubacterium limosum*、*Moorella thermoacetica*、*Moorella thermautotrophica*、*Sporomusa ovata*、*Sporomusa silvacetica*、*Sporomusa sphaeroides*、*Oxobacter pfennigii*、および *Thermoanaerobacter kluuvi* を含む酸化炭素資化性酢酸産生細菌の群から選択される。

30

#### 【0022】

1つの実施形態では、親微生物は、*Clostridium autoethanogenum* または *Clostridium ljungdahlii* である。1つの特定の実施形態では、微生物は、株 DSM 10061 の誘導体である、*Clostridium autoethanogenum* DSM 23693 である。別の特定の実施形態では、微生物は、*Clostridium ljungdahlii* DSM 13528 (または ATCC 55383) である。

40

#### 【0023】

第2の態様では、本発明は、微生物中で発現する際に、微生物にCOを含む物質の発酵によりバイオディーゼルを産生する1つ以上の酵素をコードする核酸を提供する。

#### 【0024】

1つの実施形態では、この核酸は、微生物中で発現する際に、COを含む物質の発酵によりバイオディーゼルの微生物に産生させる2つ以上の酵素をコードする。

50

## 【 0 0 2 5 】

1つの実施形態では、本発明の核酸は、このような酵素を5つ以上コードする。

## 【 0 0 2 6 】

1つの実施形態では、この酵素は、アシルトランスフェラーゼおよびその機能的に等価な変異体からなる群から選択される。

## 【 0 0 2 7 】

1つの実施形態では、アシルトランスフェラーゼをコードする核酸は配列番号1であり、またはその機能的に等価な変異体である。

## 【 0 0 2 8 】

1つの実施形態では、本発明の核酸はプロモーターをさらに含む。1つの実施形態では、このプロモーターは、制御下で遺伝子の構成的発現を可能にする。1つの特定の実施形態では、Wood-Ljungdahlクラスタープロモーターを使用する。他の特定の実施形態では、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ー、Rnf複合体オペロンプロモーター、ATPシンターゼオペロンプロモーター、またはホスホトランスアセチラーゼ/酢酸キナーゼオペロンプロモーターを使用する。1つの特定の実施形態では、このプロモーターは、C. autoethanogenum由来である。

10

## 【 0 0 2 9 】

第3の態様では、本発明は、第2の態様の1つ以上の核酸を含む核酸構築物またはベクターを提供する。

## 【 0 0 3 0 】

20

1つの特定の実施形態では、核酸構築物またはベクターは、発現構築物またはベクターである。1つの特定の実施形態では、発現構築物またはベクターはプラスミドである。

## 【 0 0 3 1 】

第4の態様では、本発明は、第2の態様の1つ以上の核酸または第3の態様のベクターもしくは構築物のいずれかを含む宿主生物を提供する。

## 【 0 0 3 2 】

第5の態様では、本発明は、本発明の第3の態様に記載される発現構築物またはベクターおよびメチル化構築物またはベクターを含む組成物を提供する。

## 【 0 0 3 3 】

好ましくは、本組成物は、本発明の第1の態様に係る組み換え微生物を生成できる。

30

## 【 0 0 3 4 】

1つの特定の実施形態では、発現構築物/ベクターおよび/またはメチル化構築物/ベクターはプラスミドである。

## 【 0 0 3 5 】

第6の態様では、本発明は、本発明の第1の態様の組み換え微生物を使用して、COを含む物質を発酵することを含む微生物発酵により、バイオディーゼルおよび任意の1つ以上の他の産物を産生する方法を提供する。

## 【 0 0 3 6 】

1つの実施形態では、本方法は、

a. 本発明の第1の態様の1つ以上の微生物の培養物を含むバイオリアクターに、COを含む物質を提供するステップと、

40

b. バイオリアクター中でこの培養物を嫌氣的に発酵し、バイオディーゼルの産生するステップとを含む。

## 【 0 0 3 7 】

1つの実施形態では、本方法は、

a. 工業用工程の結果として生成されたCO含有ガスを捕獲するステップと、

b. 本発明の第1の態様の1つ以上の微生物を含む培養物により、CO含有ガスを嫌氣的に発酵してバイオディーゼルの産生するステップとを含む。

50

## 【 0 0 3 8 】

本方法の態様の特定の実施形態では、発酵は、水培養物媒体中で起こる。

## 【 0 0 3 9 】

本方法の態様の特定の実施形態では、物質の発酵は、バイオリアクター中で起こる。

## 【 0 0 4 0 】

好ましくは、C Oを含む物質は、C Oを含む気体性の物質である。1つの実施形態では、この物質は、工業排ガスを含む。特定の実施形態では、このガスは製鋼廃ガスまたは合成ガスである。

## 【 0 0 4 1 】

1つの実施形態では、この物質は、概して、少なくとも20～100容量%のC O、20～70容量%のC O、30～60容量%のC O、および40～55容量%のC Oなどの主要な比率のC Oを含む。特定の実施形態では、この物質は、約25容量%、約30容量%、約35容量%、約40容量%、約45容量%、約50容量%、約55容量%、または約60容量%のC Oを含む。

10

## 【 0 0 4 2 】

特定の実施形態では、この方法は、発酵プロセスからバイオディーゼルおよび任意に1つ以上の他の産物を回収するステップをさらに含む。

## 【 0 0 4 3 】

第7の態様では、本発明は、第6の態様の方法により産生されるバイオディーゼンを提供する。

20

## 【 0 0 4 4 】

別の態様では、本発明は、微生物がバイオディーゼンを産生でき、または親微生物を比較して多くの量のバイオディーゼル、および任意にC Oを含む物質の発酵による1つ以上の他の産物を産生できるような1つ以上の核酸の導入により酸化炭素資化性酢酸産生親微生物を変換することを含む、本発明の第1の態様による微生物の産生方法であって、この親微生物は、C Oを含む物質の発酵により、バイオディーゼンを産生できず、またはこの組み換え微生物よりも低レベルのバイオディーゼンを産生する、方法を提供する。

## 【 0 0 4 5 】

1つの特定の実施形態では、親微生物は、バイオディーゼル生合成経路の1つ以上の酵素を発現するよう適合した1つ以上の外因性酵素を導入することにより形質転換される。さらなる実施形態では、親微生物は、脂肪酸生合成経路の1つ以上の酵素を発現するよう適合した1つ以上の外因性核酸を導入することによりさらに形質転換される。さらなる実施形態では、親微生物は、脂肪酸生合成経路の1つ以上の酵素を発現するよう適合した1つ以上の内因性核酸を発現または過剰発現することによりさらに形質転換される。1つの実施形態では、親微生物は、親微生物中に天然に存在するバイオディーゼル経路の1つ以上の内因性酵素を過剰発現するよう適合した1つ以上の核酸で形質転換される。

30

## 【 0 0 4 6 】

ある実施形態では、1つ以上の酵素は本明細書中に前述されている。

## 【 0 0 4 7 】

1つの実施形態では、遺伝子改変される酸化炭素資化性酢酸産生細菌は、非特異的アセチルトランスフェラーゼ(ワックスエステルシンターゼ/アシル補酵素A:ジアシルグリセロール アシルトランスフェラーゼ)をコードする外因性核酸を含む。この細菌は、限定するものではないが、*Clostridium autoethanogenum*、*Clostridium ljungdahlii*、*Clostridium ragsdalei*、*Clostridium carboxidivorans*、*Clostridium drakei*、*Clostridium scatologenes*、*Clostridium aceticum*、*Clostridium formicoaceticum*、および*Clostridium magnum*を含むクロストリジウム(*Clostridium*)である。他の使用され得るクロストリジウム種は、酢酸産生性ではないが、*Clostridium acetobutylicum*、*Clostridi*

40

50

um beijerinckii、C. saccharobutylicum、C. saccharoperbutylaceticum、C. thermocellum、C. cellulolyticum、C. phytofermentans、C. kluyveri、およびC. pasteurianumを含む。

【0048】

また、この細菌は、たとえば、utyribacterium methylotrophicum、Acetobacterium woodii、Alkalibaculum bacchii、Blautia producta、Eubacterium limosum、Moorella thermoacetica、Moorella thermautotrophica、Sporomusa ovata、Sporomusa silvacetica、Sporomusa sphaeroides、Oxobacter pfennigii、またはThermoanaerobacter kiuviiであってもよい。外因性非特異的アセチルトランスフェラーゼは、非特異的なアセチルトランスフェラーゼである、Acinetobacter baylyiであってもよい。この核酸はプラスミド上であってもよい。非特異的アセチルトランスフェラーゼをコードする核酸は、C. autoethanogenumまたは他の宿主細菌に最適化されたコドンであってもよい。

10

【0049】

別の実施形態では、COおよび/またはCO<sub>2</sub>をバイオディーゼルに変換する工程が提供される。気体のCO含有物質および/またはCO<sub>2</sub>含有物質を酸化炭素資化性の酢酸産生細菌を含む培養媒体の培養物を含むバイオリアクターを通過させる。この細菌は、非特異的アセチルトランスフェラーゼ（ワックスエステルシンターゼ/アシル補酵素A：ジアシルグリセロール アシルトランスフェラーゼ）をコードする外因性核酸を含む。この細菌は、COおよび/またはCO<sub>2</sub>を直接バイオディーゼルに変換し、この際にアルコール（たとえばエタノールもしくはブタノール）または脂肪酸を供給する必要がない。この物質は工業用廃ガスを含んでも良い。この培養物は、嫌氣的に増殖かつ厳密に維持されてもよい。バイオディーゼルは、脂肪酸エチルエステルおよび/または脂肪酸ブチルエステルを含んでも良い。

20

【0050】

別の実施形態では、酸化炭素資化性酢酸産生細菌中で複製するプラスミドが提供される。このプラスミドは、非特異的アセチルトランスフェラーゼ（ワックスエステルシンターゼ/アシル補酵素A：ジアシルグリセロール アシルトランスフェラーゼ）をコードする外因性核酸を含む。この非特異的アセチルトランスフェラーゼをコードする核酸は、C. autoethanogenumに最適化されたコドンであってもよい。任意に、プラスミドは、例えば、所望のメチラーゼを含む細菌を介して通過することによりメチル化されてもよい。

30

【0051】

本発明はまた、本願の明細書に記載または示される一部、要素、および特徴を広く含むものであってもよく、個別または集合的であってもよく、これらの一部、要素および特徴のうちの2つ以上のいずれかの組み合わせであってもよい。特定の整数が、本明細書中に記載されているが、特定の整数が、本発明に関連する技術で知られている均等物を有すると本明細書に記載されており、このような均等物は、以下に個別に記載されていない限り、本明細書に組み込まれるものである。

40

【0052】

本発明のこれらの態様および他の態様は、すべて新規態様と考えられるものであり、このことは、以下の記載により明らかとなる。このような理解は、添付図面を参照しながら実施例のみにより得られるものである。

【図面の簡単な説明】

【0053】

【図1】は、一酸化炭素および/または水素のエタノールまたはブタノールなどのアルコ

50

ールへの変換、それに続く、不特定アシルトランスフェラーゼ (unspecificacyltransferase) によるアルコールおよび脂肪酸 C o A エステルの脂肪酸アシルエステル (バイオディーゼル) への変換を示す。

【 0 0 5 4 】

【 図 2 】は、発現プラスミド p M T L 8 5 2 4 5 - a t f の遺伝子マップである。

【 0 0 5 5 】

【 図 3 】 C O 由来のバイオディーゼル産物を確認する G C - M S 結果を示す。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 5 6 】

以下は、一般的な用語を用いた好ましい実施形態を含む本発明の説明である。本発明は、以下の「実施例」と見出しの下に得られる開示からさらに明瞭となる。この実施例は、本発明を指示する実験データ、本発明の多様な態様の特定の例、および本発明を実施する手段を提供する。

【 0 0 5 7 】

本発明に記載されるように、「発酵ブロス」は、少なくとも栄養培地および細菌細胞を含む培養媒体である。

【 0 0 5 8 】

本発明に記載されるように、「シャトル微生物」は、メチルトランスフェラーゼ酵素が、目的微生物から発現され、かつ目的微生物と異なる微生物である。

【 0 0 5 9 】

本発明に記載されるように、「目的微生物」は、発現構築物 / ベクターに含まれる遺伝子が、シャトル微生物から発現され、かつシャトル微生物と異なる微生物である。

【 0 0 6 0 】

「主要な発酵産物」という用語は、最も高い濃度および / または収率で産生される 1 つの発酵産物を意味することを意図するものである。

【 0 0 6 1 】

「効率が増大する」、「増大効率」などの用語は、発酵工程に関連して使用される際には、限定するものではないが、発酵を触媒する微生物の増殖の速度、上昇した産物濃度での増殖速度および / または産物の産生速度、消費した物質容量あたり産生された所望の産物の容量、所望の産物の産生速度または産生レベル、および、他の発酵産物と比較して産生される所望の産物の相対比率のうち、1 つ以上を増加させることが含まれる。

【 0 0 6 2 】

「一酸化炭素を含む物質」などの文言は、一酸化炭素が、たとえば、増殖および / または発酵用の 1 つ以上の細菌の株を利用できるいずれかの物質を含むと理解されるべきである。

【 0 0 6 3 】

「一酸化炭素を含む気体物質」などの文言および用語は、あるレベルの一酸化炭素を含むいずれかの気体を含む。ある実施形態では、この物質は、約 2 0 容量 % ~ 約 1 0 0 容量 % の C O、2 0 ~ 7 0 容量 % の C O、3 0 ~ 6 0 容量 % の C O、および 4 0 ~ 5 5 容量 % の C O を含む。特定の実施形態では、この物質は、約 2 5 容量 %、約 3 0 容量 %、約 3 5 容量 %、約 4 0 容量 %、約 4 5 容量 %、約 5 0 容量 %、約 5 5 容量 %、または約 6 0 容量 % の C O を含む。

【 0 0 6 4 】

水素を含む物質は必ずしも必要ではないが、H<sub>2</sub> の存在は、本発明の方法にしたがって産物を生成するために有害なものではない。特定の実施形態では、水素の存在は、アルコール産生の総合的な効率を改善する。たとえば、特定の実施形態では、本物質は、約 2 : 1、または 1 : 1、または 1 : 2 の比率の H<sub>2</sub> : C O を含んでもよい。1 つの実施形態では、本物質は、約 3 0 容量 % 以下の H<sub>2</sub>、約 2 0 容量 % 以下の H<sub>2</sub> 2、約 1 5 容量 % 以下

10

20

30

40

50

の $H_2$ 、または約10容量%以下の $H_2$ を含む。他の実施形態では、本物質流は、たとえば、5%未満、4%未満、3%未満、2%未満、もしくは1%未満といった低濃度の $H_2$ を含み、または水素を実質的に含まない。また、本物質は、たとえば、約1~80容量%、または1~約30容量%の $CO_2$ などの $CO_2$ を含んでもよい。1つの実施形態では、本物質は、約20容量%以下の $CO_2$ を含む。特定の実施形態では、約15容量%以下、約10容量%以下、約5容量%以下の $CO_2$ を含み、または実質的に $CO_2$ を含まない。

【0065】

以下の説明では、本発明の実施形態を「COを含む気体物質」を送達かつ発酵する点に関して記載する。しかしながら、気体物質は、代替的な形態にて提供されてもよいことが理解される。たとえば、COを含む気体物質は、液体中に溶解された状態で提供されてもよい。本質的に、液体は、一酸化炭素含有ガスで飽和されており、この液体をバイオリアクターに追加する。これは、標準的な方法を使用して達成される。たとえば、微小気泡分散ジェネレーター(Hensirisak et al. Scale-up of microbubble dispersion generator for aerobic fermentation; Applied Biochemistry and Biotechnology Volume 101, Number 3 / October, 2002)を使用できる。さらなる例として、COを含有する気体物質を、固体支持体上に吸着させてもよい。このような代替方法は、「COを含有する物質」などの文言の使用に包有される。

【0066】

本発明の特定の実施形態では、CO含有気体物質は、工業でのオフガスまたは廃ガスである。「工業での廃ガスまたはオフガス」は、工業用工程により精製されるCOを含むいずれかのガスを含み、かつ、鉄金属製品の製造、非鉄金属製品の製造、石油精製工程、石炭の気化、電力生成、カーボンブラックの生成、およびコークの製造の結果として生成されるガスを含むよう広く解釈されるべきである。さらなる例として、本明細書で他に記載されるものを含んでもよい。

【0067】

特段の記載がない限り、本明細書に使用される「発酵する」、「発酵工程」、または「発酵反応」などの文言は、この工程の増殖期および産物生合成期を含むよう意図される。本明細書にさらに記載されるように、いくつかの実施形態では、バイオリアクターは、第1の増殖リアクターおよび第2の発酵リアクターを含んでもよい。このように、金属または組成物を発酵反応に添加することは、これらのリアクターのいずれかまたは両方へ添加することを含むと理解される。

【0068】

用語「バイオリアクター」は、1つ以上の容器、および/またはタワー、もしくはパイプ配置からなる発酵装置を含み、連続撹拌槽リアクター(CSTR)、固定化細胞リアクター(ICR)、トリクルベッド反応器(TBR)、気泡塔、ガスリフト発酵槽、スタティックミキサー、または気液接触に適した他の装置を含む。いくつかの実施形態では、バイオリアクターは第1の増殖リアクターおよび第2の発酵リアクターを含む。このように、物質をバイオリアクターまたは発酵反応に添加することを指す際には、適切なこれらのリアクターのいずれかまたは両方に添加することを含むことが理解される。

【0069】

「外因性核酸」は、導入される微生物外に起源を有する核酸である。外因性核酸は、限定するものではないが、導入される微生物(たとえば、組み換え微生物由来の親微生物)、導入された生物と異なる微生物の株または種類、人工的にまたは組み換えにて作成した微生物の株または種類を含むいずれかの適切な供給源に由来してもよい。1つの実施形態では、外因性核酸は導入され、かつ特定の遺伝子の発現または過剰発現を増大させる(たとえば、配列(たとえば遺伝子)の複製数を増大させ、または強力または構成的なプロモーターを導入して発現を増大させることにより)ために導入される微生物内に天然に存在する核酸配列を表す。別の実施形態では、外因性核酸は、導入され、かつ、微生物内に天

然に存在しない産物の発現、または微生物に対して未変性な遺伝子の発現の増大を可能にする微生物内に天然に存在しない核酸配列を示す（たとえば、プロモーターなどの調節エレメントを導入する場合）。外因性核酸は、導入される微生物のゲノムに統合される、または、染色体外の状態を保持するよう適合されてもよい。

#### 【 0 0 7 0 】

「外因性」は、タンパク質を指す際に使用してもよい。このことは、組み換え微生物由来の親微生物中に存在しないタンパク質を指す。

#### 【 0 0 7 1 】

組み換え微生物、および核酸またはタンパク質に関して本明細書で使用される「内因性」の用語は、組み換え微生物由来の親微生物に存在する核酸またはタンパク質のいずれかを指す。

10

#### 【 0 0 7 2 】

本明細書に記載される「バイオディーゼル」は、たとえば、脂肪酸エチルエステル（F A E E）および／または脂肪酸ブチルエステル（F A B E）を含む脂肪酸アルキルエステルを指す。この産生されるバイオディーゼルは、脂肪酸アルキルエステルの混合物であってもよい。

#### 【 0 0 7 3 】

本明細書に記載される「バイオディーゼル生合成」経路は、脂肪アシル C o A からバイオディーゼルまでの経路を指す。この経路の例示的な酵素は、限定するものではないが、アシルトランスフェラーゼ [ E C : 2 . 3 . - . - ] およびアシル C o A シンターゼ / 長鎖脂肪酸—C o A リガーゼ [ E C : 6 . 2 . 3 . 1 ] を含む。

20

#### 【 0 0 7 4 】

「脂肪酸生合成」経路は、アセチル C o A から脂肪酸 C o A の産生までの経路を指す。この経路の例示的な酵素は、限定するものではないが、アセチル C o A カルボキシラーゼ / ピオチンカルボキシラーゼ [ E C : 6 . 3 . 4 . 1 4 / E C : 6 . 4 . 1 . 2 / E C : 6 . 4 . 1 . 3 ]、マロニルトランスフェラーゼ / マロン酸デカルボキシラーゼ [ E C : 2 . 3 . 1 . 3 9 ]、脂肪酸シンターゼ [ E C : 2 . 3 . 1 . 8 5 / E C : 2 . 3 . 1 . 8 6 / E C : 2 . 3 . 1 . - ]、3 - オキソアシル - [ アシル - キャリヤー - タンパク質 ] シンターゼ [ E C : 2 . 3 . 1 . 4 1 / E C : 2 . 3 . 1 . 1 7 9 / E C : 2 . 3 . 1 . 1 8 0 ]、3 - オキソアシル - [ アシル - キャリヤータンパク質 ] レダクターゼ [ E C : 1 . 1 . 1 . 1 0 0 ]、3 - ヒドロキシミリストイル A C P デヒドラーゼ [ E C : 4 . 2 . 1 . - ]、3 - ヒドロキシデカノイル - [ アシル - キャリヤータンパク質 ] デヒドラーゼ [ E C : 4 . 2 . 1 . 6 0 ]、エノイル - [ アシル - キャリヤータンパク質 ] レダクターゼ [ E C : 1 . 3 . 1 . 9、E C : 1 . 3 . 1 . -、E C : 1 . 3 . 1 . - ]、脂肪アシル - A C P チオエステラーゼ [ E C : 3 . 1 . 2 . - 3 . 1 . 2 . 1 4 ]、オレオイル - [ アシル - キャリヤータンパク質 ] ヒドロラーゼ [ E C : 3 . 1 . 2 . 1 4 ]、アシル - [ アシル - キャリヤータンパク質 ] デサチュラーゼ [ E C : 1 . 1 4 . 1 9 . 2 ]、アセチル C o A アシルトランスフェラーゼ [ E C : 2 . 3 . 1 . 1 6 ]、3 - ヒドロキシアシル - C o A デヒドロゲナーゼ [ E C : 1 . 1 . 1 . 3 5 ]、エノイル - C o A ヒドラーゼ / 長鎖 3 - ヒドロキシアシル - C o A デヒドロゲナーゼ [ E C : 1 . 1 . 1 . 2 1 1、E C : 4 . 2 . 1 . 1 7 ]、エノイル - C o A ヒドラーゼ [ E C : 4 . 2 . 1 . 1 7 ]、トランス - 2 - エノイル - C o A レダクターゼ [ E C : 1 . 3 . 1 . 3 8 ]、パルミトイル - タンパク質チオエステラーゼ [ E C : 3 . 1 . 2 . 2 2 ]、脂肪酸伸長タンパク質 [ E C : 2 . 3 . 1 . - ]、3 - ケトアシル - C o A シンターゼ [ E C : 2 . 3 . 1 . - ]、β - ケトレダクターゼ [ E C : 1 . 1 . 1 . - ]、3 - ヒドロキシ アシル - C o A デヒドラーゼ [ E C : 4 . 2 . 1 . - ]、エノイル レダクターゼ [ E C : 1 . 3 . 1 . - ]、パルミトイル - C o A ヒドラーゼ [ E C : 3 . 1 . 2 . 2 ] を含む。

30

40

#### 【 0 0 7 5 】

本発明は、実質的に同一の機能を実施される場合、本明細書に特に例示される配列と異

50

なる核酸を使用して実施されてもよいことが理解される。タンパク質またはペプチドをコードする核酸配列では、このことは、コードしたタンパク質またはペプチドが、実質的に同一の機能を有することを意味する。プロモーター配列を示す核酸配列では、変異型配列は、1つ以上の遺伝子の発現を促進する性質を有する。このような核酸は、本明細書で「機能的に等価な変異体」であってもよい。たとえば、核酸の機能的に等価な変異体は、対立変異体、遺伝子のフラグメント、変異（欠損、挿入、ヌクレオチドの置換など）を含む遺伝子、および/または遺伝子多型などが挙げられる。他の微生物由来のホモログ遺伝子もまた、本明細書に特に例示される配列の機能的に等価な変異体の例として考慮されてもよい。これらの遺伝子は、*Clostridium acetobutylicum*、*Clostridium beijerinckii*、*C. ljungdahlii*、*Acinetobacter baylyi*などの種のホモログ遺伝子を含み、これらの詳細は、GenebankまたはNCBIなどのウェブサイトで公開されているため入手可能である。「機能的に等価な変異体」との文言は、特定の生物に最適化されたコドンの結果として配列が変動する核酸を含むとされてもよい。本明細書の核酸の「機能的に等価な変異体」は、同定した核酸と、好ましくは少なくとも約70%、好ましくは少なくとも約80%、より好ましくは少なくとも約85%、好ましくは約90%、好ましくは約95%以上の核酸配列同一性を有する。

#### 【0076】

また、本発明は、本明細書に特に例示されるアミノ酸配列と配列が異なるポリペプチドを使用して実施してもよいことが理解される。これらの変異体は、本明細書中で「機能的に等価な変異体」を指してもよい。タンパク質またはペプチドの機能的に等価な変異体は、同定したタンパク質またはペプチドと、少なくとも40%、好ましくは50%、好ましくは60%、好ましくは70%、好ましくは75%、好ましくは80%、好ましくは85%、好ましくは90%、好ましくは95%以上のアミノ酸同一性を共有するタンパク質またはペプチドを含み、かつ、対象となるペプチドまたはタンパク質と実質的に同一の機能を有する。このような変異体は、タンパク質またはペプチドのフラグメントの範囲内を含み、このフラグメントは、ポリペプチドの切断型を含み、欠損が1~5、1~10、1~15、1~20、1~25のアミノ酸であってもよく、ポリペプチドの各末端の1~25の残基が伸長してもよく、欠損が、領域内のいずれかの長さであってもよく、または内部に位置してもよい。本明細書の特定のポリペプチドの機能的に等価な変異体は、たとえば、前述の段落に例示されるように、他種の細菌のホモログ遺伝子により発現されるポリペプチドを含むとされるものである。

#### 【0077】

本明細書で使用される「実質的に同一の機能」は、核酸またはポリペプチドが、変異体である場合でも機能を実施することができることを意味する。たとえば、本発明の酵素の変異体は、元の酵素と同一の反応を触媒できる。しかしながら、この変異体は、元のポリペプチドまたは核酸と同一のレベルの活性を有することを意味するものではないと解釈される。

#### 【0078】

機能的に等価な変異体が、当業者に知られている方法を使用した変異体である核酸またはポリペプチドと実質的に同一の機能を有するかどうかを評価してもよい。しかしながら、たとえば、アシルトランスフェラーゼ活性を試験するアッセイは、Kalscheuer et al., 2004, Appl. Environ. Microbiol., 70: 7119-25; Stoveken et al., 2005, J. Bacteriol., 187: 1369-76に記載される。

#### 【0079】

本明細書で使用される際の「過剰に発現」、「過剰発現」などの用語および文言は、同一条件下の親微生物のタンパク質（核酸を含む）の発現レベルと比較した1つ以上のタンパク質の発現（同一のタンパク質をコードする1つ以上の核酸の発現を含む）のいずれかの増大を広く含むものである。タンパク質（または核酸）は、いずれかの特定のレベルに

発現する意味に解釈されるべきものではない。

【 0 0 8 0 】

「親微生物」は、本発明の組換え微生物を産生するために使用される微生物である。親微生物は、天然に存在する（すなわち野生型微生物である）または前もって改変されているが、本発明の対象である１つ以上の酵素を発現または過剰発現しない微生物である。したがって、本発明の組換え微生物を、親微生物中に発現または過剰発現しなかった１つ以上の酵素を発現または過剰発現するように改変してもよい。

【 0 0 8 1 】

核酸「構築物」または「ベクター」などの用語は、細胞に遺伝子物質を伝達するベヒクルとしての使用に適したいずれかの核酸（DNAおよびRNAを含む）として広く解釈される。この用語は、プラスミド、ウイルス（バクテリオファージを含む）、コスミド、および人口染色体を含むものとする。構築物またはベクターは、１つ以上の調節エレメント、複製起源、マルチクローニング部位、および／または選択可能マーカーを含んでもよい。１つの実施形態では、構築物またはベクターは、構築物またはベクターによりコードされた１つ以上の遺伝子発現を可能にするよう適合されている。核酸構築物またはベクターは、細胞への送達を促進する１以上の薬剤で製剤化した核酸（たとえば、リポソーム結合型核酸、核酸が含まれている生物）と同様に、裸の核酸を含む。

【 0 0 8 2 】

驚くべきことに、本発明者らは、CO含有物質からバイオディーゼルを産生するよう組み換え微生物を改変したことを示した。本発明者らは、組み換え生物を改変し、脂肪酸誘導体バイオディーゼルの産生ためにそれを使用する方法を発明した。また、本発明者らは、遊離脂肪酸、アルカン類およびアルケン類を含む他の脂肪酸誘導体も、本発明の一部としてこのバイオディーゼルを産生可能であると考え。これら全ての産物は、脂肪酸の鍵となる中間物質である脂肪酸アシルCoA（CoAとのチオエステル）または脂肪酸ACP（アシルキャリアータンパク質）由来とすることができる。

【 0 0 8 3 】

本発明により産生されるバイオディーゼルは、長鎖の、エネルギーの密集した化合物であり、かつ、この合成は、ATPなどのヌクレオシド三リン酸の形態でエネルギーを費やすことを細胞に要求する。好気性工程および／または物質として糖を使用する際には、いくつかのATP分子を得るために、解糖から十分なエネルギーが供給される必要がある。好気性工程および／または物質として糖を使用する際の脂肪酸生合成経路を介したバイオディーゼルの産生は、多くの反応が必要とされるが高いATP供給力により推進されて、C5ペントースおよびC6ヘキソース分子がより長鎖の脂肪酸に変換されることにより、比較的直接的な方法で行われる。本発明は、糖系物質からバイオ燃料を生産することより利点を持ち得、工業用工程からの一酸化炭素を含む排ガスを利用するバイオディーゼを生産する代替手段を提供する。

【 0 0 8 4 】

COまたはCO<sub>2</sub>のようなC<sub>1</sub>物質を使用した嫌気的アセトゲンでは、解糖系のように脂肪酸などの長い分子を形成することは難しく、正味エネルギーは、炭素を固定化するWood-Ljungdahl経路での十分なレベルのリン酸化を取得し、分子のATPを取得するためにCO<sub>2</sub>をギ酸塩に活性化し、膜勾配を取得する。アセトゲン（未処置の生物および組み換え生物）で記録される大部分の炭素原子を含む最終産物は、C<sub>4</sub>化合物ブタノールおよび2,3ブタンジオールである。

【 0 0 8 5 】

本発明者らは、アセチルCoA中間物質を介してC<sub>1</sub>供給原料COを使用して、バイオディーゼルなどの長鎖脂肪酸分子を産生することが可能であることを示した。物質COおよびCO<sub>2</sub>は、Wood-Ljungdahl経路中で直接アセチルCoAにチャネル化され（脂肪酸生合成の開始時点）、解糖系を介して糖以降で、より少ない反応および酵素が必要とされ、ATPが少ないにも関わらず、より早く有効な工程を利用することができ

10

20

30

40

50

る。この量の少ないATPは、酸化炭素資化性アセトゲンで利用できるが、本発明者らは、（中間物質の反応のより高い化学的運動量により）この直接的な経路が、より高い代謝の流れを持続し得ることを考慮した。

#### 【0086】

本発明の特定の実施形態では、本発明者らは、本発明の組み換え微生物によるバイオディーゼルの産生（脂肪酸アルキルエステル）が、外因性アシルトランスフェラーゼの微生物に誘導することにより可能となることを見出した。バイオディーゼルの従来の産生方法は、アルコールの存在下での脂質（トリグリセリド）のエステル交換反応により、グリセリンおよびバイオディーゼルを得ることを含む。しかしながら、本発明は、アルコール（エタノールおよび/またはブタノール）ならびに脂肪酸の両方を共産生できる組み換え微生物を提供する。本発明者らは、この共産生が、FAEE（脂肪酸エチルエステル）および/またはFABE（脂肪酸ブチルエステル）のいずれかを含有するバイオディーゼルの*in vivo*の産生のための推進力を提供するために必要な物質を提供すると考えている。

#### 【0087】

本発明の実施形態を達成するために、*Acinetobacter baylyi*由来の不特定アシルトランスフェラーゼ（ワックスエステルシンターゼ/アシル補酵素A：ジアシルグリセロール アシルトランスフェラーゼ）を酢酸産生微生物に導入した。この微生物は、脂肪酸アルキルエステル（すなわちバイオディーゼル）に変換されるアルコール（たとえばエタノールまたはブタノール）および脂肪酸アシルCoAを産生する（図1）（Kalscheuer et al., 2004, Appl. Environ. Microbiol., 70: 7119-25; Stoveken et al., 2005, J. Bacteriol., 187: 1369-76）。脂肪酸アシルCoAは、脂肪酸の直接産物であり、たとえば、酸化炭素資化性アセトゲン中に存在し得る、例えば、アシルCoAシンターゼ（長鎖脂肪酸CoAリガーゼ）の作用により産生される。この酵素を使用したFAEEの*In vivo*産生は、外部から反応に供給される補足的な脂肪酸またはアルコールを除いて、示されていない（Kalscheuer et al., 2006, Microbiology, 152, 2529-36）。すべての生物が脂肪酸前駆物質を産生するが、*E. coli*のようなアルコールを（大量に）産生しない生物では、追加的な遺伝子改変が必要である。FABEの細菌産生は、以前に例示されていない。本発明は、そのような外部からのアルコールの供給を必要とせず、したがって、多くの利点を提供し得る。これらの利点は、供給原料の費用、器具およびパラメーター制御の複雑性の大幅な低減、ならびにこの工程により必要とされる操作および分離ステップの限定の低減などを含む。

#### 【0088】

本発明者らは、*Clostridium autoethanogenum*中で、本発明の有効性を例示したが、本発明は、酸化炭素資化性酢酸産生微生物および本明細書にさらに論述される広い群に提供可能であることが考慮される。

#### 【0089】

微生物

本明細書に前述されるように、本発明は、COを含む物質の発酵により、バイオディーゼルおよび任意に1つ以上の他の産物を産生できる組み換え微生物を提供する。

#### 【0090】

1つの特定の実施形態では、本微生物は、バイオディーゼル生合成経路の1つ以上の外因性酵素を発現するよう適合される。別の実施形態では、本微生物は、バイオディーゼル生合成経路の1つ以上の内因性酵素を過剰発現するよう適合される。

#### 【0091】

1つの実施形態では、組み換え微生物は、組み換え微生物をもたらす親微生物により大量のバイオディーゼルの産生するよう適合される。

#### 【0092】

1つの実施形態では組み換え微生物をもたらす親微生物が、COを含む物質を発酵して、アルコールを産生できるが、アルコールをバイオディーゼルに変換できず、かつ、組み換え微生物が、エタノールをバイオディーゼルに変換する際に関与する1つ以上の酵素を発現するよう適合される。

#### 【0093】

1つの実施形態では、酸化炭素資化性組み換え微生物は、脂肪酸生合成経路の1つ以上の外因性酵素を発現するようさらに適合可能である。さらなる態様では、本微生物は、脂肪酸生合成経路の1つ以上の内因性酵素を過剰発現するようさらに適合される。

#### 【0094】

本微生物は、たとえば、内因性遺伝子の発現の増大（たとえば、ある遺伝子の発現を推進するために、強力なまたは構成的なプロモーターを導入することによる）、酵素をコードし、かつこの酵素を発現するよう適合した外因性核酸、誘導することによる特定のコードをコードする遺伝子のコード数の増大、または親微生物内に天然に存在しない酵素をコードし、かつこの酵素を発現するよう適合した外因性核酸の誘導のいずれかを含む組み換え方法のいずれかによる1つ以上の酵素を発現または過剰発現するよう適合されてもよい。

10

#### 【0095】

ある実施形態では、親微生物は、a) 1つ以上の内因性遺伝子の増大または過剰発現、およびb) 1つ以上の外因性遺伝子の導入、これらの組み合わせを提供するために形質転換されてもよい。たとえば、バイオディーゼル生合成経路および任意の脂肪酸生合成経路の1つ以上の酵素をコードする1つ以上の遺伝子は親微生物に対して未変性であってもよいが、経路中の1つ以上の他の酵素をコードする1つ以上の他の遺伝子を含まなくてもよい。

20

#### 【0096】

1つの実施形態では、バイオディーゼル生合成経路の1つ以上の酵素は、アシルトランスフェラーゼおよびその機能的に等価な変異体からなる群から選択される。例として、アシルトランスフェラーゼの配列情報が提供される。

#### 【0097】

本発明に使用される酵素および機能的な変異体は、細菌または他の生物の異なる属および種を含む、いずれかの適切な供給源由来であってもよい。しかしながら、1つの実施形態では、アシルトランスフェラーゼは、配列番号1に記載される *Acinetobacter baylyi* 由来の酵素、またはその機能的に等価な変異体である。特定の実施形態では、アシルトランスフェラーゼは、*Acinetobacter baylyi* の 不特定アシルトランスフェラーゼ YP\_045555.1; Gene ID: 2879218 の特徴と同一の特徴を有する。アシルCoAシンターゼ/長鎖脂肪酸CoAリガーゼは、たとえば、受入番号 P69451 または Gene ID: 946327 の下で得られる。

30

#### 【0098】

1つの実施形態では、本微生物は、親微生物に存在する1つ以上の核酸の発現を増大させるよう適合され、かつ1つ以上の核酸が本明細書に前述される酵素の1つ以上をコードする1つ以上の外因性核酸を含む。1つの実施形態では、発現を増大するよう適合した1つ以上の外因性核酸は調節エレメントである。1つの実施形態では、調節エレメントはプロモーターである。1つの実施形態では、このプロモーターは、適切な発酵条件下で好ましくは高活性の構成的プロモーターである。誘導可能なプロモーターも使用できる。好ましい実施形態では、プロモーターは、Wood-Ljungdahl 遺伝子クラスター、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ー、Rnf 複合体オペロンプロモーター、ATPシンターゼオペロンプロモーター、およびホスホトランスアセチラーゼ/酢酸キナーゼオペロンプロモーターから選択される。適切な発酵条件下で発現、好ましくは高レベルの発現を行うことができる他のプロモーターも、例示的な実施形態の代

40

50

替物として有効であることは当業者に明らかである。

【0099】

1つの実施形態では、本微生物は、本明細書に前述の酵素の1つ以上をコードし、かつこの酵素を発現するよう適合した1つ以上の外因性核酸を含む。1つの実施形態では、本微生物は、少なくとも2つの酵素をコードし、かつこの酵素を発現するよう適合した1つ以上の外因性核酸を含む。他の実施形態では、本微生物は、3つの酵素をコードし、かつこの酵素を発現するよう適合した1つ以上の外因性核酸を含む。他の実施形態では、本微生物は、5つの酵素をコードし、かつこの酵素を発現するよう適合した1つ以上の外因性核酸を含む。

【0100】

1つの特定の実施形態では、本微生物は、アシルトランスフェラーゼまたはその機能的に等価な変異体をコードする1つ以上の外因性核酸を含む。

【0101】

1つの特定の実施形態では、アシルトランスフェラーゼは、配列番号1に例示される核酸によりコードされ、またはその機能的に等価な変異体である。

【0102】

本微生物は、1つ以上の外因性核酸を含んでもよい。(遺伝子または調節エレメント(たとえばプロモーター)などの)2つ以上の遺伝子エレメントで親微生物を形質転換することが望ましく、これらのエレメントは、1つ以上の外因性核酸上に含まれていてもよい。

【0103】

1つの実施形態では、1つ以上の外因性核酸は、核酸構築物またはベクターであり、1つの特定の実施形態では、本明細書に前述されるいずれかの酵素の組み合わせの内の1つ以上をコードするプラスミドである。

【0104】

外因性核酸は、親微生物の形質転換上の染色体外に維持されていてもよく、または親微生物のゲノム内に統合されていてもよい。したがって、これらは、染色体下構築物の統合(たとえば、宿主ゲノム上でホモログ組み換えおよび標的化統合を可能にする領域)、発現、かつ複製(たとえば、複製起源、プロモーター、および他の調節エレメントまたは配列)を支援するよう適合した追加的なヌクレオチド配列を含んでもよい。

【0105】

1つの実施形態では、本明細書に前述される1つ以上の酵素をコードする外因性核酸は、外因性核酸によりコードされる1つ以上の酵素の発現を促進するよう適合したプロモーターをさらに含む。1つの実施形態では、このプロモーターは、適切な発酵条件下で好ましくは高活性の構成的プロモーターである。誘導可能なプロモーターも使用できる。好ましい実施形態では、このプロモーターは、Wood-Ljungdahl遺伝子クラスター、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ー、Rnf複合体オペロンプロモーター、ATPシンターゼオペロンプロモーター、およびホスホトランスアセチラーゼ/酢酸キナーゼオペロンプロモーターから選択される。発現、好ましくは適切な発酵条件下での高レベルの発現を行うことのできる他のプロモーターが、例示的な実施形態の代替物として有効であることは当業者に明らかである。

【0106】

1つの実施形態では、外因性核酸は発現プラスミドである。

【0107】

1つの実施形態では、親酸化炭素資化性酢酸産生微生物は、*Clostridium autoethanogenum*、*Clostridium ljungdahlii*、*Clostridium ragsdalei*、*Clostridium carboxidivorans*、*Clostridium drakei*、*Clostridium scatologenes*、*Butyribacterium limosum*、*Butyribacterium methylotrophicum*、*Acetobact*

10

20

30

40

50

*erium woodii*、*Alkalibaculum bacchii*、*Blaugia producta*、*Eubacterium limosum*、*Moorella thermoacetica*、*Moorella thermotrophic*、*Oxobacter pfennigii*、および *Thermoanaerobacter kiuvii* から成る群から選択される。

#### 【0108】

第1または第2の態様の特定の実施形態では、親微生物は、*Clostridium autoethanogenum*、*Clostridium ljungdahlii*、*Clostridium ragsdalei*、*Clostridium carboxidivorans*、*Clostridium drakei*、*Clostridium scatologenes*、*Clostridium aceticum*、*Clostridium formicoaceticum*、*Clostridium magnum* を含む酸化炭素資化性クロストリジウムの群から選択される。

10

#### 【0109】

1つの実施形態では、微生物は、*C. autoethanogenum*、*C. ljungdahlii*、および「*C. ragsdalei*」ならびに関連する単離物を含む酸化炭素資化性クロストリジウムのクラスターから選択される。これらは、限定するものではないが、株 *C. autoethanogenum* JAI-1<sup>T</sup> (DSM10061) (Abrini, Naveau, & Nyns, 1994)、*C. autoethanogenum* LBS1560 (DSM19630) (WO/2009/064200)、*C. autoethanogenum* LBS1561 (DSM23693)、*C. ljungdahlii* PETC<sup>T</sup> (DSM13528 = ATCC 55383) (Tanner, Miller, & Yang, 1993)、*C. ljungdahlii* ERI-2 (ATCC 55380) (米国特許第5,593,886号)、*C. ljungdahlii* C-01 (ATCC 55988) (米国特許第6,368,819号)、*C. ljungdahlii* O-52 (ATCC 55989) (米国特許第6,368,819号)、または「*C. ragsdalei* P11<sup>T</sup>」(ATCC BAA-622) (WO 2008/028055) ならびに「*C. coskatii*」(米国特許第2011/0229947号)、「*Clostridium* sp. MT351」(Michael Tyurin & Kiriukhin, 2012) などの関連する単離物ならびに *C. ljungdahlii* OTA-1 (Tirado-Acevedo O. Production of Bioethanol from Synthesis Gas Using *Clostridium ljungdahlii*. PhD thesis, North Carolina State University, 2010) などのそれらの変異株を含む酸化炭素資化性クロストリジウムのクラスターから選択される。

20

30

#### 【0110】

これらの株は、クロストリジウムのリボソーム rRNA クラスター I (Collins et al., 1994) 内にサブクラスターを形成し、これは DNA-DNA 再会合および DNA フィンガープリントの実験 (WO 2008/028055 米国特許第2011/0229947号) により判定された個々の種であるにも関わらず、16S リボソーム rRNA 遺伝子レベルで少なくとも99%の同一性を有する。

40

#### 【0111】

このクラスターの株は、同様の遺伝子型および表現型を有する、共通した特徴により規定され、かつ、エネルギー変換および発酵代謝の同一の形態を共有する。このクラスターの株は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保存する。

#### 【0112】

このクラスターのすべての株は、4.2 MBp のゲノムサイズを有し (Kopke et al., 2010)、32 モル% 前後の GC 組成物 (Abrini et al., 1994; Kopke et al., 2010; Tanner et al.

50

., 1993) (WO 2008/028055; 米国特許第2011/0229947号)を有し、かつ、Wood-Ljungdahl経路(一酸化炭素デヒドロゲナーゼ、ホルミルテトラヒドロ葉酸シンテターゼ、メチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼ、ホルミルテトラヒドロ葉酸シクロヒドロラーゼ、メチレンテトラヒドロ葉酸レダクターゼ、および一酸化炭素デヒドロゲナーゼ/アセチルCoAシンターゼ)、ヒドロゲナーゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼ、Rnf複合体(rnfCDGEB)、ピルビン酸:フェレドキシンオキシドレダクターゼ、アルデヒド:フェレドキシンオキシドレダクターゼ(Kopke et al., 2010, 2011)の酵素をコードする保存された本質的な鍵遺伝子オペロンを有する。ガス摂取を担う、Wood-Ljungdahl経路遺伝子の組織および数は、核酸およびアミノ酸配列の相違にも関わらず、すべての種で同一であると分かった(Kopke et al., 2011)。

10

#### 【0113】

すべての株は、同様の形態およびサイズ(対数増殖細胞は、 $0.5 \sim 0.7 \times 3 \sim 5 \mu\text{m}$ )を有し、中温性(30~37の最適増殖温度)であり、厳密に嫌気性である(Abrini et al., 1994; Tanner et al., 1993)(WO 2008/028055)。さらに、全ての株は、同一のPH範囲(pH4~7.5、最適初期pH5.5~6)、同様の増殖速度を有するCO含有ガス上での強力な独立栄養性増殖、ならびに特定の条件下で形成した2,3-ブタノールおよび乳酸を含む主要な発酵最終産物としてのエタノールおよび酢酸での代謝プロファイルなどの主要な系統的性質を共有する(Abrini et al., 1994; Kopke et al., 2011; Tanner et al., 1993)。しかしながら、種によって多様な糖(たとえばラムノース、アラビノース)、酸(たとえばグルコン酸、クエン酸)、アミノ酸(たとえばアルギニン、ヒスチジン)、または他の物質(たとえばベタイン、ブタノール)の物質の利用に差異が生じる。このような種の一部は、特定のビタミン類(たとえばチアミン、ビオチン)に対して栄養要求性であることが見出されるものもあり、見出されないものもある。カルボン酸の対応するアルコールへの還元は、これらの生物の範囲内で示される(Perez, Richter, Loftus, & Angenent, 2012)。

20

#### 【0114】

したがって、記載されるこれらの性質は、C. autoethanogenumまたはC. ljungdahliiに特異的ではないが、酸化炭素資化性、エタノール合成クロストリジウムの一般的な性質を示す。本発明は、生産性に差異がある可能性があるが、これらすべての株に作用することが予想される。

30

#### 【0115】

本発明の組み換え酸化炭素資化性酢酸産生微生物は、組み換え親微生物を産生する先行技術のいずれかを使用して、親酸化炭素資化性酢酸産生微生物および1つ以上の外因性核酸から調製されてもよい。例示的な意味のみとして、形質転換(形質誘導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、電気融合、超音波処理、ポリエチレングリコール媒介形質転換、接合、または化学的かつ天然のコンピテンスにより達成されてもよい。適切な形質転換技術は、たとえば、Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, 1989に記載される。

40

#### 【0116】

エレクトロポレーションは、C. ljungdahlii (Kopke et al., 2010; Leang, Ueki, Nevin, & Lovley, 2012) (PCT/NZ2011/000203; WO2012/053905)、C. autoethanogenum (PCT/NZ2011/000203; WO2012/053905)、Acetobacterium woodii (Strat

50

z, Sauer, Kuhn, & Durre, 1994)、または Moorella thermoacetica (Kita et al., 2012)などのいくつかの酸化炭素資化性アセトゲンに記載されており、C. acetobutylicum (Mermelstein, Welker, Bennett, & Papoutsakis, 1992), C. cellulolyticum (Jennert, Tardif, Young, & Young, 2000)またはC. thermocellum (MV Tyurin, Desai, & Lynd, 2004)などの多くのクロストリジウム中で使用される標準的な方法である。

【0117】

電気融合は、酢酸産生Clostridium sp. MT351 (Tyurin and Kiriukhin, 2012)に記載される。

10

【0118】

プロファージ誘発は、C. scatologenes (Prasanna Tamarapu Parthasarathy, 2010, Development of a Genetic Modification System in Clostridium scatologenes ATCC 25775 for Generation of Mutants, Masters Project Western Kentucky University)の場合と同様に酸化炭素資化性アセトゲンに記載されている。

【0119】

20

アセトゲンClostridium difficile (Herbert, O'Keefe, Purdy, Elmore, & Minton, 2003)およびC. acetobutylicum (Williams, Young, & Young, 1990)を含む多くの他のクロストリジウムの選択方法として接合が記載されている。

【0120】

1つの実施形態では、親株は、単一の炭素およびエネルギー供給源としてCOを使用する。

【0121】

1つの実施形態では、親微生物は、Clostridium autoethanogenumまたはClostridium ljungdahliiである。1つの特定の実施形態では、微生物は、Clostridium autoethanogenum DSM23693である。別の特定の実施形態では、この微生物は、Clostridium ljungdahlii DSM13528 (またはATCC55383)である。

30

【0122】

核酸

本発明はまた、本発明の組み換え微生物を産生する際に使用する1つ以上の核酸または核酸構築物を提供する。

【0123】

40

1つの実施形態では、この核酸は、微生物中で発現する際に、微生物がCOを含む物質の発酵によりバイオディーゼルを産生できるようにするバイオディーゼル生合成経路の1つ以上の酵素をコードする配列を含む。1つの特定の実施形態では、本発明は、微生物中で発現する際に、微生物に、COを含む物質の発酵によりバイオディーゼルの産生できるようにする2つ以上の酵素をコードする核酸を提供する。1つの実施形態では、本発明の核酸は、このような3つの酵素、または5つの酵素をコードする。

【0124】

1つの特定の実施形態では、酵素は、アシルトランスフェラーゼおよびその機能的に等価な変異体からなる群から選択される。

【0125】

50

本明細書中に記載される酵素をコードする例示的なアミノ酸配列および核酸配列は、本明細書に前述した Gene bank から取得できる。しかしながら、当業者は、本明細書に含まれる情報を有し、本発明の酵素をコードする適切な代替核酸またはその機能的に等価な変異体を、Gene bank および他のデータベースまたは遺伝子コードを容易に理解する。

【0126】

1つの実施形態では、アシルトランスフェラーゼは、配列番号1の配列によりコードされ、またはその機能的に等価な変異体である。

【0127】

1つの実施形態では、核酸は、脂肪酸生合成経路の1つ以上の外因性酵素をさらにコードする。さらなる態様では、核酸は、脂肪酸生合成経路の1つ以上の内因性酵素をさらにコードする。

【0128】

1つの実施形態では、本発明の核酸は、プロモーターをさらに含む。1つの実施形態では、このプロモーターは、制御下で遺伝子の構成的発現を可能にする。しかしながら、誘導可能なプロモーターを使用してもよい。当業者は、本発明のプロモーターを容易に理解する。好ましくは、このプロモーターは、適切な発酵条件下で高レベルの発現を行う。特定の実施形態では、Wood-Ljungdahl クラスタープロモーターを使用する。別の実施形態では、ホスホトランスアセチラーゼ/酢酸キナーゼオペロンプロモーターを使用する。別の実施形態では、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ー、Rnf 複合体オペロンプロモーターまたはATPシンターゼオペロンプロモーターを使用する。1つの特定の実施形態では、プロモーターは、C. autoethanogenum 由来である。

【0129】

本発明の核酸は、親微生物の形質転換上で染色体の外にある状態を保持してもよく、または微生物のゲノム内に統合するよう適合されてもよい。したがって、本発明の核酸は、統合（たとえば、ホモログ組み換えおよび宿主ゲノム内への標的化した統合を可能にする領域）または安定した外染色体構築物の発現および複製（たとえば、複製起源、プロモーターおよび他の調節配列）を支援するよう適合した追加的な核酸配列を含んでもよい。

【0130】

1つの実施形態では、核酸は、核酸構築物またはベクターである。1つの特定の実施形態では、核酸構築物またはベクターは、発現構築物またはベクターであるが、他のクロニングに使用されるような他の構築物またはベクターも、本発明に含まれる。1つの特定の実施形態では、発現構築物またはベクターはプラスミドである。

【0131】

本発明の発現構築物/ベクターは、プロモーターおよびもし望ましい場合、さらなるタンパク質の発現に適した追加的な遺伝子に加えて、任意の数の調節エレメントを含んでもよい。1つの実施形態では、発現構築物/ベクターは1つのプロモーターを含む。別の実施形態では、発現構築物/ベクターは、2つ以上のプロモーターを含む。1つの特定の実施形態では、発現構築物/ベクターは、発現される各遺伝子の1つのプロモーターを含む。1つの実施形態では、発現構築物/ベクターは、1つ以上のリボソーム結合部位、好ましくは、発現される各遺伝子のリボソーム結合部位を含む。

【0132】

本明細書に記載される核酸配列および構築物/ベクター配列は、リボソーム結合部位および/または制限部位に必要とされるような標準的なリンカーヌクレオチドを含んでもよいことは当業者に理解される。このようなリンカー配列は必須であると解釈されるべきではなく、定義される配列上に限定を提供するものではない。

【0133】

本発明の発現構築物/ベクターを含む核酸および核酸構築物は、当業者にとって標準であるいずれかの技術を使用して構築されてもよい。たとえば、化学的合成または組み換え

10

20

30

40

50

技術を使用してもよい。このような技術は、たとえば、Sambrook et al (Molecular Cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989)に記載される。さらなる例示的な技術は、以下の実施例に記載される。本質的に、個々の遺伝子および調節エレメントは、遺伝子が所望のタンパク質を形成して発現できるように互いに作動可能に連結される。本発明の使用に適したベクターは、当業者に理解されるであろう。しかしながら、例として、以下のベクター pMTL80000 vectors、pIMP1、pJIR750 および以下の本明細書の実施例に例示されるプラスミドが適切であってもよい。

【0134】

本発明の核酸は、RNA、DNA、またはcDNAを含むいずれかの適切な形態であってもよい。

【0135】

また、本発明は、本明細書に記載されるいずれか1つ以上の核酸を含むウイルス、細菌、および酵母微生物を含む、宿主生物、特に微生物である。

【0136】

微生物産生方法

1つ以上の外因性核酸は、裸の核酸として親微生物に送達されてもよく、または形質転換工程を促進するため、1つ以上の薬剤で製剤化されてもよい(たとえば、リポソーム結合核酸、この核酸が含まれる生物)。この1つ以上の核酸は、適宜、DNA、RNA、またはその組み合わせであってもよく、ある実施形態では、制限阻害剤を使用してもよい(たとえば、N. E. et al. (2000) Microbial. Molec. Biol. Rev. 64, 412.) 参照)。

【0137】

本発明の微生物は、組み換え微生物を産生する当業者に知られているいずれかの技術を使用した親微生物および1つ以上の外因性核酸から調製されてもよい。例として、形質転換(形質誘導またはトランスフェクション)を、エレクトロポレーション、電気融合、超音波処理、ポリエチレングリコール媒介形質転換、化学的かつ天然のコンピテンス、または接合により達成されてもよい。適切な形質転換技術は、たとえば、Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, 1989に記載される。

【0138】

エレクトロポレーションは、C. ljungdahlii (Kopke et al. 2010, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 107: 13087-92; PCT/NZ2011/000203; WO2012/053905), C. autoethanogenum (PCT/NZ2011/000203; WO2012/053905)、またはAcetobacterium woodii (Straetz et al., 1994, Appl. Environ. Microbiol. 60:1033-37)などのいくつかの酸化炭素資化性アセトゲンに記載されており、C. acetobutylicum (Mermelstein et al., 1992, Biotechnology, 10, 190-195)、C. cellulolyticum (Jennert et al., 2000, Microbiology, 146: 3071-3080)、またはC. thermocellum (Tyurin et al., 2004, Appl. Environ. Microbiol. 70: 883-890)などの多くのクロストリジウムに使用される標準的な方法である。プロファージ誘導は、C. scato-logenes (Prasanna Tamarapu Parthasara thy, 2010, Development of a Genetic Modi

10

20

30

40

50

fication System in *Clostridium scatologenes* ATCC 25775 for Generation of Mutants, Masters Project Western Kentucky University) の場合と同様に酸化炭素資化性アセトゲンに例示されており、接合は、*Clostridium difficile* (Herbert et al., 2003, FEMS Microbiol. Lett. 229: 103-110)、または *C. acetobutylicum* (Williams et al., 1990, J. Gen. Microbiol. 136: 819-826) を含む多くのクロストリジウムの選択方法として記載されており、クロストリジウム酸化炭素資化性アセトゲンと同様の形式で利用できる。

10

#### 【0139】

ある実施形態では、形質転換される微生物中で活性である制限系のため、微生物中に誘導される核酸をメチル化することが必要である。このことは、以下に記載の方法を含む多様な技術を使用して実施でき、以下の実施例にさらに例示される。

#### 【0140】

例として、1つの実施形態では、本発明の組み換え微生物は、以下のステップ：

(i) 本明細書に記載される発現構築物／ベクターおよび(ii)メチルトランスフェラーゼ遺伝子を含むメチル化構築物／ベクターのシャトル微生物への導入；

メチルトランスフェラーゼ遺伝子の発現；

シャトル微生物から1つ以上の構築物／ベクターの単離；および

目的微生物への1つ以上の構築物／ベクターの導入を含む、方法により産生される。

20

#### 【0141】

1つの実施形態では、メチルトランスフェラーゼ遺伝子は構成的に発現される。別の実施形態では、メチルトランスフェラーゼ遺伝子の発現が誘導される。

#### 【0142】

シャトル微生物は、微生物であり、好ましくは、陰性微生物であり、この微生物は発現構築物／ベクターを作製する核酸配列のメチル化を促進する。特定の実施形態では、シャトル微生物は、制限陰性 *E. coli*、*Bacillus subtilis*、または *Lactococcus lactis* である。

30

#### 【0143】

メチル化構築物／ベクターは、メチルトランスフェラーゼをコードする核酸配列である。

#### 【0144】

発現構築物／ベクターおよびメチル化構築物／ベクターをシャトル微生物に導入すると、メチル化構築物／ベクター上に存在するメチルトランスフェラーゼが誘導される。本発明の1つの特定の実施形態では、メチル化構築物／ベクターは、誘導可能なlacプロモーターを含み、ラクトースまたはその類似体、より好ましくはイソプロピルβ-D-チオ-ガラクトース(IPTG)の添加により誘導されるが、この誘導は、いずれかの適切なプロモーター系によるものであってもよい。他の適切なプロモーターは、ara、tet、またはT7系を含む。本発明のさらなる実施形態では、メチル化構築物／ベクターのプロモーターは、構成的プロモーターである。

40

#### 【0145】

特定の実施形態では、メチル化構築物／ベクターは、メチル化構築物／ベクターに存在するいずれかの遺伝子が、シャトル微生物に発現するようシャトル微生物の同一性に特異的な複製起源を有する。好ましくは、発現構築物／ベクターは、発現構築物／ベクター上のいずれかの遺伝子が、目的微生物に発現されるように、目的微生物の同一性に特異的な複製起源を有する。

#### 【0146】

メチルトランスフェラーゼ酵素の発現は、発現構築物／ベクター上に存在する遺伝子の

50

メチル化をもたらす。その後、発現構築物／ベクターは、既知のいずれかの方法によってシャトル微生物から単離されてもよい。例示的な意味として、以下の本明細書に記載される実施例に記載される方法を使用して、発現構築物／ベクターを単離してもよい。

【0147】

特定の実施形態では、構築物／ベクターの両方が単離される。

【0148】

発現構築物／ベクターは、既知のいずれかの方法を使用して目的微生物に導入されてもよい。しかしながら、例として、以下の実施例に記載される方法を使用してもよい。発現構築物／ベクターがメチル化されているため、発現構築物／ベクター上に存在する核酸配列は、目的微生物に組み込むことができ、かつ、成功裡に発現できる。

10

【0149】

メチルトランスフェラーゼ遺伝子は、シャトル微生物に導入され、かつ過剰発現されてもよい。したがって、1つの実施形態では、結果として得られるメチルトランスフェラーゼ酵素を、既知の方法を使用して収集してもよく、発現プラスミドをメチル化するために *in vitro* で使用してもよい。その後、発現構築物／ベクターを発現のために目的微生物に導入してもよい。別の実施形態では、メチルトランスフェラーゼ遺伝子を、シャトル微生物のゲノムに導入し、発現構築物／ベクターを、シャトル微生物の導入し、シャトル微生物から1つ以上の構築物／ベクターを単離し、発現構築物／ベクターを目的微生物に導入する。

【0150】

20

上述の発現構築物／ベクターおよびメチル化構築物／ベクターを組み合わせて物質としての組成物を提供してもよいことが予想される。このような組成物は、本発明の組み換え微生物を産生するために制限障壁機構を回避する際の特定の用途を有する。

【0151】

1つの特定の実施形態では、本発現構築物／ベクターおよび／またはメチル化構築物／ベクターはプラスミドである。

【0152】

当業者は、本発明の微生物を産生する際に使用する適切なメチルトランスフェラーゼの数を理解するものである。しかしながら、例として、*Bacillus subtilis* のファージΦT1メチルトランスフェラーゼおよび以下の実施例に記載されるメチルトランスフェラーゼを使用してもよい。1つの実施形態では、メチルトランスフェラーゼは、配列番号12のアミノ酸配列を有し、またはその機能的に等価な変異体である。適切なメチルトランスフェラーゼをコードする核酸は、適切なメチルトランスフェラーゼをコードする核酸は、所望のメチルトランスフェラーゼおよび遺伝子コードを考慮して含まれることが容易に理解される。1つの実施形態では、メチルトランスフェラーゼをコードする核酸は、以下の実施例に記載される（たとえば、配列番号17の核酸またはその機能的に等価な変異体）。

30

【0153】

メチルトランスフェラーゼ遺伝子の発現を可能にするよう適合した任意の数の構築物／ベクターを使用して、メチル化構築物／ベクターを産生してもよい。しかしながら、例として、以下の実施例に記載したプラスミドを使用してもよい（たとえば、配列番号14）。

40

【0154】

産生方法

本発明は、本発明の組み換え微生物を使用して、COを含む物質を発酵することを含む微生物発酵により、バイオディーゼルおよび任意の1つ以上の他の産物の産生方法を提供する。本発明の方法を使用して、工業工程からの合計大気炭素排出を低減してもよい。

【0155】

好ましくは、この発酵は、本発明の組み換え微生物を使用して、バイオリアクター中の物質を嫌氣的に発酵して少なくともバイオディーゼルの産生するステップを含む。

50

## 【 0 1 5 6 】

1つの実施形態では、本方法は、

a．本発明の1つ以上の培養物を含むバイオリアクターにCOを含む物質を提供するステップと、

b．バイオリアクター中の培養物を嫌氣的に発酵して少なくともバイオディーゼルの生産するステップと

を含む。

## 【 0 1 5 7 】

1つの実施形態では、本方法は、

a．工業工程の結果として生成されたCO含有ガスを捕獲するステップと、

b．本発明の1つ以上の微生物を含む培養物により、CO含有ガスを嫌氣的に発酵してバイオディーゼルの生産するステップと

を含む。

## 【 0 1 5 8 】

本発明の実施形態では、微生物により発酵した気体物質は、COを含む気体物質である。気体物質は、工業工程の副産物として得られるCO含有廃ガスであってもよく、または自動車から排煙などの他のいくつかの供給源由来であってもよい。ある実施形態では、工業用工程は、製鋼などの鉄製品の製造、非製鋼製品の製造、石油精製工程、石炭の気化、電力生産、カーボンブラックの生成、アンモニアの生成、メタノールの生成、およびコークからなる群から選択される。これらの実施形態では、CO含有ガスは従来のいずれかの方法を使用して大気に放出される前に工業用工程から捕獲してもよい。COは、合成ガス（一酸化炭素および水素を含むガス）の成分であってもよい。工業用工程から生成したCOは、通常、燃焼してCO<sub>2</sub>を生成し、したがって、本発明は、CO<sub>2</sub>温室ガスの排出を低減し、バイオ燃料として使用するためのバイオディーゼルの生産の際の特定の用途を有する。気体のCO含有物質の組成に応じて、この物質を発酵に導入する前に、ダスト粒子などの望ましくない不純物のいずれかを除去するために処置することが望ましい。例えば、既知の方法を使用して気体物質を濾過し、または洗浄してもよい。

## 【 0 1 5 9 】

発生する細菌の増殖およびバイオディーゼルの生産では、CO含有物質の気体に加えて、適切な栄養媒体をバイオリアクターに供給する必要がある。

## 【 0 1 6 0 】

本方法の態様の特定の実施形態では、発酵は、水培養媒体中で起こる。本方法の態様の特定の実施形態では、物質の発酵は、バイオリアクター中で起こる。

## 【 0 1 6 1 】

物質および媒体は、連続形態、バッチ、またはバッチ供給形態でバイオリアクターに供給されてもよい。栄養培地は、使用される微生物の増殖を可能にするために十分なビタミン類および無機類を含む。COを使用した発酵に適した嫌氣的媒体は当業者に知られている。たとえば、適切な培地は、B i e b e l ( 2 0 0 1 ) に記載される。本発明の1つの実施形態では培地は、以下の実施例に記載される。

## 【 0 1 6 2 】

発酵は、発生する産生に対する適切な発酵条件下で実施されることが望ましい。考慮すべき反応条件は、圧力、温度、気体の流量、液体の流量、培地のpH、培地の酸化還元電位、攪拌速度（連続して攪拌タンクリアクターを使用する場合）、接種レベル、液相中のCOが制限されないことを保証する最大気体物質濃度、および阻害産物を回避するための最大産物濃度が挙げられる。

## 【 0 1 6 3 】

さらに、大抵の場合、物質流のCO濃度（または気体物質のCO分圧）を増大し、かつ、COが基質である場合の発酵効率を増大させることが望ましい。圧力を増大して作動させることにより、気相から液相へのCOの伝達速度が顕著に増大して、発酵の生産用の炭素供給源として微生物により行うことができる。このことは、同様に、保持時間（導入さ

10

20

30

40

50

れる気体流量により分けられるバイオリアクターの液体容量として定義される)を、バイオリアクターが、大気圧より大きい圧力で維持される際に短縮できることを意味する。最適反応条件は、使用される本発明の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、発酵は、大気圧より高い圧力で実施することが好ましい。また、得られるCOからバイオディーゼルへの変換速度は、部分的に、物質の保持時間の関数であり、所望の保持時間を達成することは、必要とするバイオリアクターの容量を示し、加圧系の使用は、必要とされるバイオリアクターの容量を顕著に低減でき、結果として発酵器具の主要な費用を顕著に低減できる。米国特許第5,593,886号により得られる実施形態では、反応作動圧の増大に応じて低減できる。すなわち、10大気圧で作動するバイオリアクターは、1大気圧での作動の1/10の容量のみ必要である。

10

#### 【0164】

例として、上昇した圧力での気体からエタノールへの発酵の利点が記載される。例えば、国際公開特許公報02/08438は、30psigから75psigの圧力下で実施した気体からエタノールへの発酵を記載しており、この文献では、150g/l/日および369g/l/日のエタノール生産性が得られる。しかしながら、たとえば、大気圧での同様の媒体および導入気体組成を使用して実施した発酵は、1日あたりリットルあたり10~20倍少ないエタノールを産生することが見いだされた。

#### 【0165】

また、CO含有気体物質の導入の比率は、液相中のCOの濃度が、限定されないよう保証されることが望ましい。このことは、1つ以上の産物が、培養物により消費され得るCO限定条件の結果によるものである。

20

#### 【0166】

発酵反応を供給するために使用される気体流の組成は、この反応の効率および/または費用に顕著に影響を与えることができる。たとえば、O<sub>2</sub>は、嫌氣的発酵工程の効率を低減し得る。発酵の前後の発酵工程段階の望ましくないまたは不必要な気体の処理は、このような場合の負担を増大し得る(例えば、気体流は、バイオリアクターに入る前に加圧され、不必要なエネルギーを使用して、発酵に必要なではない気体を加圧し得る)。したがって、望ましくない成分を除去し、かつ、望ましい成分の濃度を増大させるために、物質流、特に、工業供給源由来の物質流を処理することが望ましい。

#### 【0167】

ある実施形態では、本発明の細菌の培養物を、水培養媒体で維持する。好ましくは、この水培養媒体は、最小嫌氣的微生物増殖媒体である。適切な媒体は当業者により知られており、たとえば、米国特許第5,173,429号、同第5,593,886号、および国際公開特許公報第02/08438号および以下の実施例に記載される文献に記載される。

30

#### 【0168】

バイオディーゼルまたはバイオディーゼルおよび/もしくは1つ以上の他の生成物を含む混合流は、分別蒸留、蒸発、浸透気化法、気体のストリップング、および液体—液体抽出などを含む抽出発酵などの当業者に知られている方法により発酵プロスから回収されてもよい。また、産物は、相の分離により抽出できる媒体に拡散または分泌されてもよい。

40

#### 【0169】

本発明の好ましい実施形態では、バイオディーゼルおよび1つ以上の産物を、バイオリアクターからプロスの一部を連続的に除去し、プロスから微生物細胞(濾過により簡便に)分離し、かつ、プロスから1つ以上の産物を回収することにより、発酵プロスから回収する。アルコールを、たとえば蒸留により簡便に回収してもよい。アセトンは、たとえば、蒸留により回収されてもよい。生成された酸はいずれも、たとえば活性炭に吸着させて回収してもよい。分離した微生物細胞を、好ましくは、発酵バイオリアクターに戻す。アルコールおよび酸を除去した後に残る、細胞を含まない透過物は、好ましくは発酵バイオリアクターに戻される。バイオリアクターに戻す前に、栄養媒体を補充するために、さらなる栄養物(ビタミンBなど)を、細胞を含まない透過物に添加してもよい。

50

## 【 0 1 7 0 】

また、バイオリアクターに戻す前に、活性炭に対する酢酸の吸着を高めるために上述のようにブロスの pH を調整する場合、pH は、発酵バイオリアクターのブロスの pH と同様の pH に再調整されるべきである。

## 【実施例】

## 【 0 1 7 1 】

本発明を、以下の非限定的な実施例を参照して説明する。

## 【 0 1 7 2 】

実施例 1：CO 由来のバイオディーゼルの産生

10

酢酸産生酸化炭素資化性 (acetogenic carboxydrotroph) の *Clostridium autoethanogenum* を、バイオディーゼル脂肪酸アシルエステル、ブタン酸ブチルエステル (FABE) の産生のために、*Acinetobacter baylyi* の 不特定 アシルトランスフェラーゼで改変した。ブタノール産生を、*Clostridium autoethanogenum* の遺伝子改変株を使用して以前に例証した (WO 2012/053905)。

## 【 0 1 7 3 】

株および増殖条件

すべてのサブクローニングステップを、以前に記載される標準的な株および増殖条件を使用して *E. coli* 中で実施した (Sambrook et al, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, 1989; Ausubel et al, Current protocols in molecular biology, John Wiley & Sons, Ltd., Hoboken, 1987)。

20

## 【 0 1 7 4 】

*C. autoethanogenum* DSM10061 および DSM23693 (DSM10061 の誘導体) を、DSMZ (ドイツ収集の微生物および細胞培養物、Inhoffenstrasse 7 B, 38124、ドイツブラウンシュヴァイク市) から取得した。増殖を、厳密な嫌気条件および技術を使用して 37 で実行した (Hungate, 1969, Methods in Microbiology, vol. 3B. Academic Press, New York: 117-132; Wolfe, 1971, Adv. Microb. Physiol., 6: 107-146)。酵母抽出物を含まない化学的に規定された PETC 培地 (表 1) および唯一の炭素およびエネルギー供給源としての 30 psi の一酸化炭素含有製鋼廃ガス (ニュージーランドの Glenbrook の工場地帯で収集、組成: 44% CO、32% N<sub>2</sub>、22% CO<sub>2</sub>、2% H<sub>2</sub>) を使用した。

30

【表 1 - 1】

表 1 : P E T C 培地

| 培地組成                                     | 培地 1 L あたりの濃度            |
|------------------------------------------|--------------------------|
| NH <sub>4</sub> Cl                       | 1 g                      |
| KCl                                      | 0.1 g                    |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O     | 0.2 g                    |
| NaCl                                     | 0.8 g                    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>          | 0.1 g                    |
| CaCl <sub>2</sub>                        | 0.02 g                   |
| 微量金属溶液                                   | 10 ml                    |
| Wolfe's ビタミン溶液(Wolfe's Vitamin solution) | 10 ml                    |
| レサズリン (2 g/L 原液)                         | 0.5 ml                   |
| NaHCO <sub>3</sub>                       | 2 g                      |
| 還元剤                                      | 0.006-0.008 % (v/v)      |
| 蒸留水                                      | 最大 1 L, pH 5.5 (HCl で調整) |

10

20

【表 1 - 2】

| Wolfe's ビタミン溶液 (Wolfe's Vitamin solution) | 原液 1 L あたり |
|-------------------------------------------|------------|
| ビオチン                                      | 2 mg       |
| 葉酸                                        | 2 mg       |
| 塩酸ピリドキシン                                  | 10 mg      |
| リボフラビン                                    | 5 mg       |
| ニコチン酸                                     | 5 mg       |
| カルシウム D-(+)-パントテン酸                        | 5 mg       |
| ビタミン B12                                  | 0.1 mg     |
| p-アミノ安息香酸                                 | 5 mg       |
| リボ酸                                       | 5 mg       |
| チアミン                                      | 5 mg       |
| 蒸留水                                       | To 1 L     |

30

40

【表 1 - 3】

|                                                                                       |            |
|---------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 微量金属溶液                                                                                | 原液 1 L あたり |
| ニトリロ三酢酸                                                                               | 2 g        |
| MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O                                                   | 1 g        |
| Fe (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O | 0.8 g      |
| CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O                                                  | 0.2 g      |
| ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                                                  | 0.2 mg     |
| CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O                                                  | 0.02 g     |
| NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O                                                 | 0.02 g     |
| Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>                                                      | 0.02 g     |
| NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O                                                  | 0.02 g     |
| Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O                                    | 0.02 g     |
| 蒸留水                                                                                   | 1 L まで     |

10

【表 1 - 4】

|                   |                  |
|-------------------|------------------|
| 還元剤 原液            | 原液 1 0 0 m l あたり |
| NaOH              | 0.9 g            |
| Cystein.HCl       | 4 g              |
| Na <sub>2</sub> S | 4 g              |
| 蒸留水               | 100 mL まで        |

20

## 【 0 1 7 5 】

## 発現プラスミドの構築

30

標準的な組み換え DNA および分子クローニング技術を用いて、これらの技術は、Sambrook et al, 1989 および Ausubel et al, 1987 により記載される。Acinetobacter baylyi の不特定アシルトランスフェラーゼ (YP\_045555.1; Gene ID: 2879218) は最適化コドンであり、合成されていた (配列番号 1)。

## 【 0 1 7 6 】

Clostridium autoethanogenum DSM 10061 由来のゲノム DNA を、Bertram および Durre (1989) による改変方法を使用して単離した。1 晩置いた 100 ml の培養物を回収し (6,000 × g、15 分、4)、リン酸カリウム緩衝液 (10 mM、pH 7.5) で洗浄し、1.9 ml の STE 緩衝液 (50 mM のトリス HCl、1 mM の EDTA、200 mM のスクロース; pH 8.0) で懸濁した。300 μl のリゾチーム (~100,000 U) を添加して、この混合物を 37 で 30 分間インキュベートし、その後、10% (w/v) の SDS 溶液を 280 μl 添加し、さらに 10 分間インキュベートした。240 μl の EDTA 溶液 (0.5 M、pH 8)、20 μl のトリス-HCl (1 M、pH 7.5)、および 10 μl の RNa se A (Fermentas) を添加することにより室温で RNA を溶解した。そのあと、100 μl のプロテイナーゼ K (0.5 U) を添加し、タンパク質分解を、1~3 時間、37 で行った。最後に、600 μl の過塩素酸ナトリウム (5 M) を添加した後、フェノール-クロロホルム抽出およびイソプロパノール沈殿を行った。DNA の定量およ

40

50

び定性を、分光光度的に検査した。

#### 【0177】

*C. autoethanogenum*由来のホストランスアセチラーゼ/酢酸キナーゼプロモーター領域(配列番号4)を、オリゴヌクレオチド Ppt a - a c k - N o t I - F (配列番号: 2: G A G C G G C C G C A A T A T G A T A T T T A T G T C C) および Ppt a - a c k - N d e I - R (配列番号: 3: T T C C A T A T G T T T C A T G T T C A T T T C C T C C) を含むゲノムDNAからPCRにより増幅し、iProof High Fidelity DNAポリメラーゼ(Bio-Rad Laboratories)を適用して以下の、初期変性(98、30分間)、35サイクルの変性(98、10秒)、アニーリング(55、30秒)、および伸長(72、30秒間)のプログラムを最終的な伸長(72、10分間)の前に行った。

10

#### 【0178】

増幅したホストランスアセチラーゼ/酢酸キナーゼオペロン(Ppt a - a c k)の498bpのプロモーター領域を、Not I および Nde I 制限部位および株DH5α-T1R(Invitrogen)を使用してE. coli-ClostridiumシャトルベクターpMTL 85241 (FJ797651.1; Nigel Minton, University of Nottingham; Heap et al., 2009)に内にクローニングした。その後、合成したアシルトランスフェラーゼ遺伝子(配列番号1)を、Nde I および EcoRIを使用してクローニングし、プラスミドpMTL 85245 - a t f (配列番号: 5; Fig. 2)を形成した。この挿入断片を、表2に得られるオリゴヌクレオチドを使用して相補的に配列決定し、この結果を、a t f 遺伝子に変異のないことを確認した。

20

#### 【表2】

表2: 配列決定用のオリゴヌクレオチド

| オリゴヌクレオチド名 | DNA 配列(5' から 3')             | 配列番号: |
|------------|------------------------------|-------|
| Atf-F1     | AGACAACAACCTATGCATGTTGGAGGA  | 6     |
| Atf-R1     | GGGGATGTGCTGCAAGGCGA         | 7     |
| Atf-F2     | CATCATCAAGAAGGTTTGCAGCACAAAT | 8     |
| Atf-R2     | AGAGGTTCTCTTGGACCTGGAACAT    | 9     |
| Atf-F3     | TCGGIACCCGGGGATCCTCTA        | 10    |
| Atf-R3     | CATTCCTGCTACTCCATCTACCATTGC  | 11    |

30

#### 【0179】

##### DNAのメチル化

FAEE発現プラスミドpMTL 85245 - a t fのメチル化を、*C. autoethanogenum*, *C. ragsdalei* および *C. ljungdahlii* 由来のメチルトランスフェラーゼから設計し、合成したハイブリッドタイプIIメチルトランスフェラーゼ(配列番号12)を使用してE. coliでin vivoで実施した。このメチルトランスフェラーゼを、ベクターpGS20 (配列番号: 14)中の誘導型のlacプロモーター(配列番号13)に融合した。

40

#### 【0180】

発現プラスミドおよびメチル化プラスミドを、制限陰性E. coli XL1-Blue MRF' Kan(Stratagene)の同一の細胞に形質転換し、適合性のグラム-(-)の複製起源(発現プラスミドにおける高コピーのColE1およびメチル化プラスミドにおける低コピーのp15A)により可能である。In vivoでのメチル化は、1mMのIPTGの添加により誘導され、メチル化プラスミドは、QIAGENプラスミドミディキット(QIAGEN)を使用して単離した。得た混合物を*C. autoethanogenum* DSM23693での形質転換の実験に使用したが、大量(高コピー)の発現プラスミドのみが、クロストリジウム中で複製が可能なグラム-(+)複

50

製起源 (repl) を有する。

#### 【0181】

C. autoethanogenum への形質転換

完全な形質転換の実験の間、C. autoethanogenum DSM 23693 を、1 g/L の酵母抽出物および 10 g/L のフルクトース、ならびに炭素供給源としての 30 psi 製鋼廃ガス (ニュージーランドの Glenbrook の工場地帯で収集、組成: 44% CO、32% N<sub>2</sub>、22% CO<sub>2</sub>、2% H<sub>2</sub>) を補充した PETC 培地 (表 1) で増殖した。

#### 【0182】

完全な細胞を作製するために、50 ml の C. autoethanogenum DSM 23693 培養物を、新鮮な培地に 3 日間連続して継代培養した。これらの細胞を使用して、OD<sub>600nm</sub> が 0.05 の DL-スレオニン 40 ml を含む 50 ml の PETC 培地に接種した。この培養物の OD<sub>600nm</sub> が 0.4 に達した際に、この細胞を、嫌氣的チャンバーに移し、4,700 × g および 4 で回収した。この培養物を 2 回氷冷したエレクトロポレーションバッファー (270 mM のスクロース、1 mM の MgCl<sub>2</sub>、7 mM のリン酸ナトリウム、pH 7.4) で洗浄し、最終的に 600 μl の新鮮なエレクトロポレーションバッファーで懸濁した。この混合物を、1 μg のメチル化プラスミド混合物を含む 0.4 cm の電極ギャップを有するあらかじめ氷冷したエレクトロポレーションキュベットに移し、すぐに以下の設定 (2.5 kV, 600 Ω, および 25 μF) で Gene pulser Xcell electroporation system (Bio-Rad) を使用し電気を通した。3.7 ~ 4.0 ms の時定数を得た。この培養物を、5 ml の新鮮な培地に移した。細胞の再産生を、チューブホルダーに取り付けられた Spectronic Helios Epsilon Spectrophotometer (Thermo) を使用して 600 nm の波長でモニタリングした。バイオマスを最初に液滴した後、細胞は再び増殖を開始した。バイオマスがこの時点から 2 倍となると、細胞を集め、200 μl の新鮮な培地で懸濁し、4 μg/ml のクラリスロマイシンを含む選択的 PETC プレート (1.2% Bacto<sup>TM</sup> Agar (BD) を含む) 上にプレーティングした。37、30 psi の製鋼ガスでの接種の 4 ~ 5 日後、コロニーが視認可能となった。

#### 【0183】

このコロニーを使用して、4 μg/μl のクラリスロマイシンを含む 2 ml の PETC 培地を接種した。増殖が起こった際、この培養液を、4 μg/μl のクラリスロマイシンおよび唯一の炭素源として 30 psi の製鋼ガスを含む PETC 培地で、5 ml、次に 50 ml にスケールアップした。

#### 【0184】

成功した形質転換の確認

DNA の転換を確認するために、プラスミドミニプレップを、Zippy plasmid miniprep kit (Zymo) を使用して 10 ml の培養物容量から実施した。単離プラスミドの質が、クロストリジウムのエキソヌクレアーゼの活性により制限溶解に対して十分ではないため [Burchhardt および Durre, 1990]、PCR を、表 2 に得られる単離プラスミドおよびオリゴヌクレオチドを用いて実施し、プラスミドの存在を確認した。PCR を、iNtRON Maximise Premix PCR kit (Intron Bio Technologies) を使用し、以下の、最初の変性 (94、2 分間)、35 サイクルの変性 (94、20 秒間)、アニーリング (55、20 秒間)、および伸長 (72、60 秒間)、条件で、最終伸長ステップ (72、5 分間) の前に実施した。

#### 【0185】

クローンの同一性を確認するため、50 ml の C. autoethanogenum DSM 23693 培養物からゲノム DNA を単離した (上述参照)。オリゴヌクレオチド fD1 (配列番号: 15: ccgaattcgtcgcacaaacAGAGTTTGTATC

10

20

30

40

50

CTGGCTCAG)およびrP2(配列番号:16:cccgggatccaagcttACGGCTACCTTGTTACGACTT)[Weisberg et al., 1991]を使用して16sリボソームRNA遺伝子に対してPCRを実施し、この際、iNtRON Maximise Premix PCR kit(Intron Bio Technologies)を用いて、以下の、最初の変性(94、2分)、35サイクルの変性(94、20秒)、アニーリング(55、20秒間)、伸長(72、60秒)といった条件を、最終伸長ステップ(72、5分間)の前に行った。シーケンシングの結果は、C. autoethanogenum(Y18178, GI:7271109)の16sリボソームRNA遺伝子(rrsA)と少なくとも99.9%同一であった。

10

#### 【0186】

CO由来のバイオディーゼル産物を確認するための増殖実験

FAEE産生を例証するために、PETC培地を調製し、発現プラスミドpMTL85245-attfを有するC. autoethanogenum株を用いて接種した。50mL PETC培地(表1)の入った血清ビンを、製鋼廃ガス(ニュージーランドのGlennbrookの工場地帯で収集、組成:44% CO、32% N<sub>2</sub>、22% CO<sub>2</sub>、2% H<sub>2</sub>)由来の30psiのCO含有ガス流で加圧し、5日間培養した。同一の実験を、プラスミドを有さない野生型C. autoethanogenum株を用いて実行した。

#### 【0187】

20

培養物を、ヘッドスペースのサンプリングを使用してGC-MSにより分析した。2mLの試料を含む20mLのバイアルを、繊維(Supelco PDMS 100 繊維)に10分間40℃に暴露し、その後、30m×0.25mm×0.25μmのZbWaxカラムを備えつけた5973MSDを含むアジレント社の6890 GCを使用して、以下の条件(インジェクターの温度:250℃、スプリットレス注入:250℃で10分間脱着;1mL/分の一定流量;オーブンに40℃で5分間保持、10℃/分で190℃まで上昇、5分間保持、3℃/分で208℃まで上昇、10℃/分で220℃まで上昇、10分間保持、60℃/分で40℃まで戻す;MSD:スキャンモード、1.47スキャン/秒で質量範囲38~650AMU)で分析した。アメリカ国立標準技術研究所(NIST)標準参照データベースに対するバイオディーゼル物質のブタン酸ブチルエステルと一致する2つのピークが、発現プラスミドを輸送する株に見いだされたが、プラスミドのない野生型株中には存在せず、1-オクタデカノール(C18)またはテトラデカノール(C14)、ヘプタデカン(C17)、9-オクタデカノール(C18)および11-ヘキサデカノール(C16)のようなC14~C18の範囲のいくつかの脂肪酸産物も同様である(表3、図3)。エタノールおよびブタノールのようなアルコールは、35℃で作動するRID(Refractive Index Detector)を備えたAgilent 1100 Series HPLCシステムおよび35℃を維持したAmi-nex HPX-87Hカラム(300×7.8分、粒径9μm)を使用して実施した。RID(Refractive Index Detector)は35℃で作動され、Alltec IOA-200有機物酸コールム(150×6.5mm、粒径8μm)を60℃で維持した。わずかに酸性化した水(0.005M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)を、0.25mL/分の流量での稼働相として使用した。タンパク質および他の細胞残物を除去するために、400μLの試料を100μLの2%(w/v)の5-スルホサリチル酸と混合し、14,000×gで3分間遠心機にかけ、沈殿残物を分離した。10μLの上清を、分析のためHPLCに注入した。

30

40

## 【表 3】

表 3：プラスミド pMTL85245-autl の発現を有する株 *C. autoethanogenum* の GC-MS 分析からの結果

| 保持時間    |                                | % NIST 一致 |
|---------|--------------------------------|-----------|
| 1.5-2.8 | CO <sub>2</sub>                | 90        |
| 3.84    | ジスルフィド                         | 90        |
| 4-4.5   | 酢酸                             | 96        |
| 14.37   | 1-オクタデカノール (Octadecanol)       | <50       |
| 16.35   | ブタン酸ブチルエステル                    | 50        |
| 16.64   | ブタン酸ブチルエステル                    | 78        |
| 18.84   | テトラデカノール                       | 95        |
| 21      | ヘプタデカン                         | >90       |
| 21.7    | 9-オクタデカノール(Z) / 11-ヘキサデカノール(Z) | 93 / 87   |

10

## 【0188】

本発明は本明細書に記載されている通りであり、これは、過度の実験を行うことなく本明細書を読むことにより本発明の実施を可能とすることを目的とする。しかしながら、本発明の範囲を逸脱することなく、多くの成分およびパラメーターを、特定の内容に変動または修正してもよく、知られている均等物に変えてもよいことは、当業者に明らかである。また、このような修正および均等物は、個々に設定されるように本明細書に組み込まれていることは明らかである。発明の名称、表題などは、本文書の読み手の理解を高めるために提供されるものであり、本発明の範囲を限定するように読み取られるものではない。

20

## 【0189】

もし存在する場合には、上記かつ以下に引用されるすべての特許出願、特許、および公開公報のすべての開示は、本明細書に参照として援用される。しかしながら、いずれの特許出願、特許、および公開公報に対する参照は、世界のいずれかの国の一般的に共通な知識の有効な先行技術または形態部分を構成するものではなく、認識されるものではなく、示唆されるものではない。

30

## 【0190】

特段の記載がない限り、「含む (comprise)」、「含んでいる (comprising)」などの用語は、排他的な意味と反対の包括的な意味として理解され、すなわち「限定するものではないが、～を含む」と理解される。

また、本発明は以下を提供する。

[1] 非特異的なアセチルトランスフェラーゼ (ワックスエステルシンターゼ / アシル補酵素 A：ジアシルグリセロール アセチルトランスフェラーゼ) をコードする外因性核酸を含む、遺伝子改変した酸化炭素資化性細菌。

40

[2] クロストリジウム (*Clostridium*) である、[1] に記載の細菌。

[3] 前記外因性非特異的なアセチルトランスフェラーゼが、*Acinetobacter baylyi* の非特異的なアセチルトランスフェラーゼである、[1] に記載の細菌。

[4] 前記核酸はプラスミドである、[1] に記載の細菌。

[5] *C. autoethanogenum* である、[1] に記載の細菌。

[6] *C. ljundahlii* である、[1] に記載の細菌。

[7] *Clostridium autoethanogenum*、*Clostridium ljundahlii*、*Clostridium ragsdalei*、*Clostridium carboxidivorans*、*Clostridium drakei*、*Clostridium scatologenes*、*Clostridium*

50

*m aceticum*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium magnum*, *Butyrivacterium methylotrophicum*, *Acetobacterium woodii*, *Alkalibaculum bacchii*, *Blautia producta*, *Eubacterium limosum*, *Moorella thermoacetica*, *Moorella thermautotrophica*, *Sporomusa ovata*, *Sporomusa silvacetica*, *Sporomusa sphaeroides*, *Oxobacter pfennigii*, および *Thermoanaerobacter kiuvi* からなる群から選択される、[ 1 ] に記載の細菌。

[ 8 ] 前記非特異的アセチルトランスフェラーゼをコードする核酸が、*C. autoethanogenum* に最適化されるコドンである、[ 5 ] に記載の細菌。

[ 9 ] CO および / または CO<sub>2</sub> をバイオディーゼルに変換する工程であって、前記工程が、

気体の CO 含有物質および / または CO<sub>2</sub> 含有物質を、培養媒体中の [ 1 ] に記載の酸化炭素資化性酢酸産生細菌の培養物を含むバイオリアクターに通し、これにより、前記細菌が前記 CO および / または CO<sub>2</sub> を前記バイオディーゼルに変換することと、

前記バイオリアクターから前記バイオディーゼルの回収することとを含む、工程。

[ 10 ] 前記物質が、工業廃ガスを含む、[ 9 ] に記載の工程。

[ 11 ] 前記培養物が厳密に嫌気性である、[ 9 ] に記載の工程。

[ 12 ] 前記バイオディーゼルが、脂肪酸エチルエステルを含む、[ 9 ] に記載の工程。

[ 13 ] 前記バイオディーゼルが、脂肪酸ブチルエステルを含む、[ 9 ] に記載の工程。

[ 14 ] 酸化炭素資化性酢酸産生細菌を複製するプラスミドであって、前記プラスミドが、非特異的アセチルトランスフェラーゼ ( ワックスエステルシンターゼ / アシル補酵素 A : ジアシルグリセロール アシルトランスフェラーゼ ) をコードする外因性核酸を含む、プラスミド。

[ 15 ] 前記非特異的アセチルトランスフェラーゼをコードする核酸が、*C. autoethanogenum* に最適化されたコドンである、[ 14 ] に記載のプラスミド。

[ 16 ] メチル化されている、[ 14 ] に記載のプラスミド。

#### 【 0191 】

##### 参考文献

Abrini, J., Naveau, H., & Nyns, E. J. (1994). *Clostridium autoethanogenum*, sp. nov., an anaerobic bacterium that produces ethanol from carbon monoxide. *Archives of microbiology*, 161(4), 345-351.

Collins, M. D., Lawson, P. A., Willems, A., Cordoba, J. J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., et al. (1994). The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *International journal of systematic bacteriology*, 44(4), 812-26.

Herbert, M., O'Keefe, T. a., Purdy, D., Elmore, M., & Minton, N. P. (2003). Gene transfer into *Clostridium difficile* CD630 and characterisation of its methylas

10

20

30

40

50

e genes. FEMS Microbiology Letters, 229 (1), 103-110.

Jennert, K. C., Tardif, C., Young, D. I., & Young, M. (2000). Gene transfer to *Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319. Microbiology (Reading, England), 146 Pt 12, 3071-80.

Kita, A., Iwasaki, Y., Sakai, S., Okuto, S., Takaoka, K., Suzuki, T., Yano, S., et al. (2012). Development of genetic transformation and heterologous expression system in carboxydotrophic thermophilic acetogen *Moorella thermoacetica*. Journal of Bioscience and Bioengineering, xx(x).

10

Kopke, M., Held, C., Hujer, S., Liesegang, H., Wiezer, A., Wollherr, A., Ehrenreich, A., et al. (2010). *Clostridium ljungdahlii* represents a microbial production platform based on syngas. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107(29).

20

Kopke, M., Mihalcea, C., Liew, F., Tizard, J. H., Ali, M. S., Conolly, J. J., Al-Sinawi, B., et al. (2011). 2,3-Butanediol Production By Acetogenic Bacteria, an Alternative Route To Chemical Synthesis, Using Industrial Waste Gas. Applied and environmental microbiology, 77(15), 5467-75.

30

Leang, C., Ueki, T., Nevin, K. P., & Lovley, D. R. (2012). A Genetic System for *Clostridium ljungdahlii*: A Chassis for Autotrophic Production of Biocommodities and a Model Homoacetogen. Applied and environmental microbiology, (November).

Mermelstein, L. D., Welker, N. E., Bennett, G. N., & Papoutsakis, E. T. (1992). Expression of cloned homologous fermentative genes in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Bio/technology (Nature Publishing Company), 10(2), 190-195.

40

Perez, J. M., Richter, H., Loftus, S. E., & Angenent, L. T. (2012). Biocatalytic reduction of short-chain carboxylic acids into their corresponding alcohols with syngas fermentation. Biotechnology and bioengineering, 1-30.

Stratz, M., Sauer, U., Kuhn, a, & Durre, P. (1994). Plasmid Transfer into the Hom

50

oacetogen *Acetobacterium woodii* by Electroporation and Conjugation. Applied and environmental microbiology, 60(3), 1033-7.

Tanner, R. S., Miller, L. M., & Yang, D. (1993). *Clostridium ljungdahlii* sp. nov., an acetogenic species in clostridial rRNA homology group I. International journal of systematic bacteriology, 43(2), 232.

10

Tyurin, Michael, & Kiriukhin, M. (2012). Electrofusion of cells of Acetogen *Clostridium* sp. MT 351 with *erm* (B) or *cat* in the chromosome. Journal of Biotech, 1-12.

Tyurin, MV, Desai, S., & Lynd, L. (2004). Electrottransformation of *Clostridium thermocellum*. Applied and environmental microbiology 70(2), 883-890.

Williams, D. R., Young, D. I., & Young, M. (1990). Conjugative plasmid transfer from *Escherichia coli* to *Clostridium acetobutylicum*. Journal of general microbiology, 136(5), 819-26.

20

【図 1】

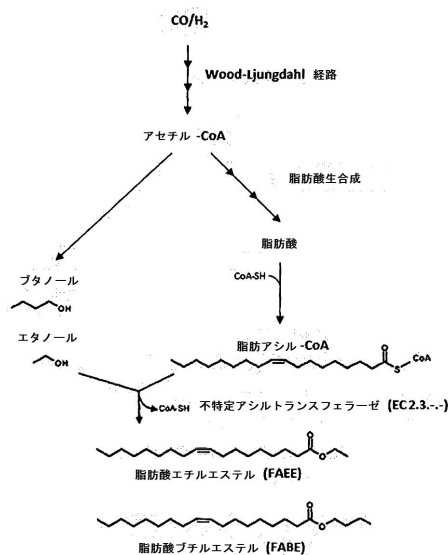


図 1

【図 2】

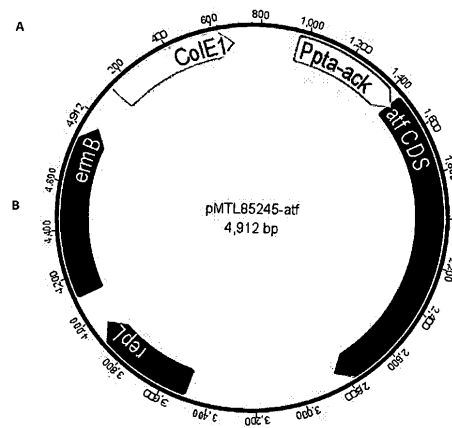


図 2

## 【図 3】

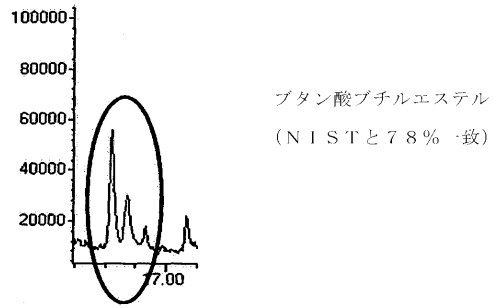


図 3

## 【配列表】

0006466836000001.app

## フロントページの続き

(72)発明者 リウ, フンミン

ニュージーランド国 1052 オークランド, パーネル, バルフォー・ロード 24

(72)発明者 コプケ, マイケル

ニュージーランド国 1052 オークランド, パーネル, バルフォー・ロード 24

審査官 小金井 悟

(56)参考文献 米国特許出願公開第2011/0111470(US, A1)

米国特許出願公開第2010/0071259(US, A1)

米国特許出願公開第2010/0199548(US, A1)

特表2010-505388(JP, A)

独国特許出願公開第102004052115(DE, A1)

特表2011-514236(JP, A)

国際公開第2012/053905(WO, A1)

Microbiology, 2006年 9月, Vol.152, p.2529-2536

Nature, 2010年 1月28日, Vol.463, p.559-562

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C12N 1/00 - 7/08

C12P 1/00 - 41/00