(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2015-502168
(P2015-502168A)
(43)公表日　平成27年1月22日(2015.1.22)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21		4B024
C12N 9/28	(2006.01)	C12N	9/28	ZNA	4B050
C12N 9/42	(2006.01)	C12N	9/42		4B064
C12N 9/24	(2006.01)	C12N	9/24		4B065
C12N 9/02	(2006.01)	C12N	9/02		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 40 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2014-548054 (P2014-548054)
(86)(22)出願日　平成24年12月21日 (2012.12.21)
(85)翻訳文提出日　平成26年7月24日 (2014.7.24)
(86)国際出願番号　PCT/EP2012/076571
(87)国際公開番号　WO2013/092965
(87)国際公開日　平成25年6月27日 (2013.6.27)
(31)優先権主張番号　11306767.2
(32)優先日　平成23年12月23日 (2011.12.23)
(33)優先権主張国　欧州特許庁 (EP)
(31)優先権主張番号　61/579,808
(32)優先日　平成23年12月23日 (2011.12.23)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　513111145
ディノベ
ＤＥＩＮＯＶＥ
フランス国　３４７９０　グラベル　リュ・デ・ラ・ヴァル　シエール　１６８２　キャップ　シグマ－ゼドゥアーセ　ユーロメディシン　ドゥ
(74)代理人　100121728
弁理士　井関　勝守
(74)代理人　100165803
弁理士　金子　修平
(72)発明者　レオネッティ，ジャン－ポール
フランス国　エフ－３４１７０　カステルノ・ル・レ　リュ・モネ　９

最終頁に続く

(54)【発明の名称】再構成された転写ユニットを有する細菌及びその使用

(57)【要約】
本発明は、特にエタノールの生成のための組換え細菌及びその使用に関する。また、本発明は、そのような細菌の生成のための方法に関し、そのような生成に適する核酸コンストラクトにも関する。本発明は、特に、再構成バイオマス分解ユニットを有する細菌に関する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ゲノムに挿入された再構成バイオマス分解転写ユニットを備え、
前記ユニットは、単一のプロモーターの制御下にある少なくとも２つの遺伝子を含み、
前記少なくとも２つの遺伝子は、バイオマスを発酵性の糖に分解又は加水分解する異なるバイオマス分解酵素をコードするデイノコッカス（Deinococcus）又はその関連細菌。
【請求項２】
前記バイオマス分解酵素は、アミラーゼ、アラビノフラノシダーゼ、セルラーゼ、ラッカーゼ、α－グルクロニダーゼ及びエステラーゼから選択され、好ましくはアミラーゼ、アラビノフラノシダーゼ及びセルラーゼから選択される請求項１に記載の細菌。
【請求項３】
前記ユニットは、単一のプロモーターの制御下にある３つの遺伝子を含み、
前記３つの遺伝子は、好ましくはアミラーゼ、アラビノフラノシダーゼ及びセルラーゼから選択されるそれぞれ異なるバイオマス分解酵素をコードする請求項１又は２に記載の細菌。
【請求項４】
前記ユニットは、単一のプロモーターの制御下にある２つの異なるアミラーゼ遺伝子、又は１つのアミラーゼ遺伝子と１つのアラビノフラノシダーゼ遺伝子、又は２つの異なるアミラーゼ遺伝子と１つのアラビノフラノシダーゼ遺伝子とを含む請求項１～３のいずれか１項に記載の細菌。
【請求項５】
前記アミラーゼは、好ましくはSEQID NO: 2又は4（アミノ酸配列）を含むアミラーゼから選択されるαアミラーゼである請求項２～４のいずれか１項に記載の細菌。
【請求項６】
前記セルラーゼは、好ましくはSEQID NO: 8又は10（アミノ酸配列）を含むセルラーゼから選択されるエンドセルラーゼ又はエキソセルラーゼである請求項２～５のいずれか１項に記載の細菌。
【請求項７】
前記アラビノフラノシダーゼは、SEQID NO: 6（アミノ酸配列）を含む請求項２～６のいずれか１項に記載の細菌。
【請求項８】
前記ユニットは、第２のプロモーターの制御下にある少なくとも１つの追加の遺伝子をさらに含む請求項１～７のいずれか１項に記載の細菌。
【請求項９】
前記ユニットは、(i)単一のプロモーターの制御下にある１つのアミラーゼ遺伝子、又は１つのアミラーゼ遺伝子と１つのアラビノフラノシダーゼ遺伝子、又は２つのアミラーゼ遺伝子と１つのアラビノフラノシダーゼ遺伝子、並びに(ii)第２のプロモーターの制御下にある好ましくは１つのエンドセルラーゼ遺伝子と１つのエキソセルラーゼ遺伝子である少なくとも１つのセルラーゼ遺伝子を含む請求項８の細菌。
【請求項１０】
前記細菌はデイノコッカス細菌であり、
前記バイオマス分解酵素はデイノコッカス細菌に由来する請求項１～９のいずれか１項に記載の細菌。
【請求項１１】
前記単一のプロモーター又は前記第２のプロモーターは、デイノコッカスのpTufAプロモーター、pTufBプロモーター又はpGroESLプロモーターから選択される請求項１～１０のいずれか１項に記載の細菌。
【請求項１２】
前記再構成バイオマス分解転写ユニットは、非デイノコッカス由来の核酸を含まない請求項１～１１のいずれか１項に記載の細菌。

【請求項１３】
前記再構成バイオマス分解転写ユニットは、内在性遺伝子、好ましくは内在性アミラーゼ遺伝子に代えて前記細菌のゲノムに挿入される請求項１～１２のいずれか１項に記載の細菌。
【請求項１４】
好ましくは組換えエタノール生成転写ユニットである組換えアルコール生成転写ユニットをさらに含む請求項１～１３のいずれか１項に記載の細菌。
【請求項１５】
前記組換えアルコール生成転写ユニットは、アルコールデヒドロゲナーゼ及び／又はピルビン酸デカルボキシラーゼをコードする少なくとも１つの核酸配列を含む請求項１４に記載の細菌。
【請求項１６】
前記アルコール生成転写ユニットは、ＮＡＤＰ依存性ＡＤＨをコードする少なくとも１つの核酸を含む請求項１４又は１５に記載の細菌。
【請求項１７】
前記アルコール生成転写ユニットは、好ましくは内在性リン酸アセチルタランスフェラーゼに代えて前記細菌のゲノムに挿入される請求項１４～１６のいずれか１項に記載の細菌。
【請求項１８】
不活性型リン酸アセチルトランスフェラーゼ遺伝子を含むデイノコッカス（Deinococcus）又はその関連細菌。
【請求項１９】
ＮＡＤＰ依存性ＡＤＨをコードする少なくとも１つの組換え核酸配列を含むデイノコッカス（Deinococcus）又はその関連細菌。
【請求項２０】
D.geothermalis, D. cellulolysiticus, D. radiodurans, D. proteolyticus, D.radiopugnans, D. radiophilus, D. grandis, D. indicus, D. frigens, D. saxicola,D. maricopensis, D. marmoris, D. deserti, D.murrayi, D. aerius, D.aerolatus, D. aerophilus, D.aetherius, D. alpinitundrae, D. altitudinis, D. apachensis,D. aquaticus, D. aquatilis, D. aquiradiocola, D. aquivivus,D. caeni, D. claudionis, D.ficus, D. gobiensis, D. hohokamensis, D. hopiensis, D.misasensis, D. navajonensis, D. papagonensis, D.peraridilitoris, D. pimensis, D. piscis, D. radiomollis,D. roseus, D. sonorensis, D.wulumuqiensis, D. xibeiensis, D. xinjiangensis, D.yavapaiensis又はD. yunweiensisである請求項１～１９のいずれか１項に記載の細菌。
【請求項２１】
請求項１～２０のいずれか１項に記載の細菌と、少なくとも１種の他の細菌とを含む組成物。
【請求項２２】
請求項１～２０のいずれか１項に記載のデイノコッカス又はその関連細菌の酵素抽出物。
【請求項２３】
請求項１～１９のいずれか１項に記載の細菌、又は請求項２２に記載の抽出物を含む生体触媒
【請求項２４】
請求項１～２０のいずれか１項に記載のデイノコッカス若しくはその関連細菌、請求項２２に記載の抽出物、又は請求項２１に記載の組成物にバイオマスを曝露することを含むバイオマスを変換する方法。
【請求項２５】
請求項１～２０のいずれか１項に記載のデイノコッカス若しくはその関連細菌、請求項２２に記載の抽出物、又は請求項２１に記載の組成物に糖又はバイオマスを曝露すること

を含むアルコール、好ましくはエタノールを生成する方法。
【請求項２６】
アルコール、好ましくはエタノールを生成するための、請求項１～２０のいずれか１項に記載のデイノコッカス若しくはその関連細菌、請求項２２に記載の抽出物、又は請求項２１に記載の組成物の使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、組換え細菌、その調製及びその使用に関する。特に、本発明は、再構成された転写ユニットを有する細菌、並びにバイオマスの変換及び／又はバイオ燃料、特にエタノールの生成のためのその細菌の使用に関する。また、本発明は、細菌の核酸コンストラクト、混合培養物、組成物又は細菌から単離された抽出物、及びバイオエタノールを生成する方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
バイオ燃料は、例えば化学的、物理的及び／又は生物的処理並びに触媒を用いたバイオマスの分解及び発酵を含む多くのステップを経てバイオマスから生成され得る。一般に、バイオ燃料の生成は、セルラーゼ酵素がその基質と反応できるようにするために、少なくとも部分的にヘミセルロースを加水分解し、リグニンを除去し、セルロースを脱結晶化するためのバイオマスの前処理を必要とする。さらに、糖を効率的にエタノールに変換するために、微生物が、高いエタノールの収率及び生産性、酸、エタノール及び阻害剤に対する高い耐性、並びに単純な培養培地及び激しいプロセス条件下での活動性等を示すべきである。リグノセルロースからのバイオエタノール等のバイオ燃料の生成は、さらに、豊富で多様な利点を有し、原料コストが低いという利点を有する。しかしながら、これは、一般にエタノールの生成に用いられる微生物の発酵に利用可能な糖を作るための多くの処理を必要とする。
【０００３】
これらの要件の全てを満たすような細菌又は酵母を含む天然の微生物はない。
【０００４】
ここ数十年から、エタノールの生成の性能を改善するために、微生物が選択され、又は操作されている。エスケリキアコリ（Escherichia coli）、クレブシエラオキシトカ（Klebsiella oxytoca）及びザイモモナスモビリス（Zymomonas mobilis）等のグラム陰性細菌、クロストリジウムセルロリティカム（Clostridium cellulolyticum）又はラクトバチルスカゼイ（Lactobacillus casei）等のグラム陽性菌、並びにいくつかの酵母株は、セルロース基質からバイオエタノールを生成するために操作されてきた。特に、生合成遺伝子（ＰＤＣ又はＡＤＨ遺伝子等）は、細菌株内で複製されてきた。また、競合する経路は変更されてきた。
【０００５】
これらの微生物は、未だに欠点を示す。特に、ザイモモナスモビリス又はサッカロミケスケレウィシアエ（Saccharomyces cerevisiae）等の潜在的にエタノールを生成する微生物は、通常、リグノセルロース等の複合糖類を加水分解できない。Z. mobilisは、グルコース、フルクトース及びスクロースのみを発酵するため、バイオマスの変換にあまり適さない。また、それは、酢酸に対して極めて低い耐性を示す。サッカロミケス酵母において、最適な温度は約３７℃であり、それは、温度を十分に上昇できる大規模の工業的培養設備において最適ではない。
【０００６】
遺伝的に変更されたグラム陽性菌株又はゲオバチルス（Geobacillus）株が公表されている（ＷＯ９５／２７０６４及びＷＯ２００６／１３１７３４を参照）。しかしながら、工業的な考え方から満足できる代謝産物の生成は、これらの菌株において開示されていない。さらに、ゲオバチルス株は芽胞を生成し、実質的に工業的使用において欠点を有する

。
【０００７】
高いエタノール収率を得ることは、副産物の生成がほとんど無くエタノールを生成し、グルコース、キシロース、アラビノース、ガラクトース及びマンノース等の主要な糖類の全てを代謝する菌株を見つけることに等しい。また、適切な工業プロセスは、酵素及び培養条件がｐＨ及び温度に関して適合性があることを必要とし得る。
【０００８】
デイノコッカス（Deinococcus）は、１９５６年にAnderson及び共同研究者により単離されたグラム陽性菌である。この好極限性生物は、ＵＶ及び電離放射線、又は架橋剤（マイトマイシンＣ）によるＤＮＡダメージに耐性を有し、乾燥に対して耐性を有する。ＷＯ０１／０２３５２６は、デイノコッカスの放射線に対する並外れた耐性を示し、さらに、それらの操作、及びバイオレメディエーションにおける使用を提示している。ＷＯ２００９／０６３０７９は、デイノコッカス細菌が溶媒に耐性を有し、エタノールを生成するためにバイオマスを変換できることを示す。さらに、ＷＯ２０１０／１３０８０６は、エタノール生合成遺伝子が導入された組換えデイノコッカス菌株を開示する。これらの組換え菌株は、改善されたエタノールの生成能力を示す。
【０００９】
本発明は、より高く、優れたバイオマス分解特性を有する、改善された細菌の生成を開示する。特に、本発明は、改善されたバイオマス分解特性及びバイオ燃料生成特性を有する操作されたデイノコッカス又は関連する細菌を開示する。これらの細菌は、実質的に改善された生物性能を引き起こすような再構築された機能的転写ユニット及び／又は改変された代謝経路を含むように、発明者らにより操作されている。有利に、これらの細菌は、発明者らにより単離され、特徴付けられた特定の遺伝子を用いて操作されている、又は改善された細菌である非ＧＭＯを生じるようにそれらの発現を改善するために発明者らにより変換されている。これらの細菌は、工業的培養条件に適合し、バイオマス原料を用い、最適なエタノール生成のために組み込まれた遺伝子の適切な発現を維持するように操作されている。これらの細菌、その抽出物、又はそれらを含む組成物は、バイオマスを変換し、バイオ燃料を生成するために用いるのに特に適する。
【発明の概要】
【００１０】
本発明の対象は、ゲノム内に挿入された再構成バイオマス分解転写ユニットを含むデイノコッカス又はその関連細菌に関する。特に、それらの細菌は、単一のプロモーターの制御下にある少なくとも２つの遺伝子を含む再構成バイオマス分解転写ユニットを含み、その少なくとも２つの遺伝子は異なるバイオマス分解酵素をコードする。
【００１１】
好ましい実施形態において、再構成バイオマス分解転写ユニットは、非デイノコッカス遺伝子材料を含まず、それはそれらの活性を改善し、制御許容性を増大する。
【００１２】
本発明の他の好ましい実施形態において、細菌は、組換えアルコール生成転写ユニット、好ましくは組換えエタノール転写ユニットをさらに含む。
【００１３】
さらに好ましい実施形態において、細菌は、変更されたエタノール競合生合成経路を含む。特に、本発明の特定の対象は、リン酸アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、アラニンデヒドロゲナーゼ遺伝子、グルコースデヒドロゲナーゼ遺伝子、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ遺伝子、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子及び／又はリンゴ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子から選択される不活性型内在性遺伝子を含むデイノコッカス又はその関連細菌である。
【００１４】
本発明の更なる対象は、上記の細菌及び少なくとも１種の他の細菌を含む組成物に関する。

【００１５】
本発明の更なる対象は、上記の細菌及び培養培地を含む組成物に関する。
【００１６】
本発明の更なる対象は、上記の細菌の酵素抽出物に関する。
【００１７】
また、本発明は、上記の細菌又はその抽出物を含む生体触媒に関する。
【００１８】
本発明は、上記の細菌、抽出物又は組成物にバイオマスを曝露することを含むバイオマスの変換のための方法に関する。
【００１９】
本発明の更なる対象は、上記の細菌、抽出物又は組成物に糖又はバイオマスを曝露すること、及び好ましくは生成されたアルコールを回収することを含むアルコール、特にエタノールを生成するための方法である。
【００２０】
また、本発明は、アルコール、特にエタノールを生成するための上記細菌の使用に関する。
【００２１】
また、本発明は、デイノコッカス若しくはその関連細菌、又はその祖先を生成するための方法に関し、その方法は、
ａ）親デイノコッカス又はその関連細菌を準備すること、
ｂ）単一のプロモーターの制御下にあり、異なるバイオマス分解酵素をコードする少なくとも２つの遺伝子を前記の親細菌のゲノムに同時又は順次挿入すること、
ｃ）前記少なくとも２つの遺伝子の全てを発現するｂ）の細菌を選択すること、を含む。
【００２２】
また、本発明は、SEQ IDNOs: 11, 13, 16, 18, 23及び24から選択される配列を含む核酸に関する。
【００２３】
また、本発明は、SEQ IDNOs: 12及び14から選択されるアミノ酸配列を含む単離されたタンパク質、又はその機能を維持する変異体若しくは断片に関する。
【図面の簡単な説明】
【００２４】
【図１】再構成バイオマス分解ユニットを有するデイノコッカスを構築するための挿入ステップを示す図である。
【図２】再構成細胞のアミロース分解活性を示す図である。
【図３】再構成細胞のアミラーゼ活性を示す図である。２Ｌの培地を含む２つの対応する５Ｌ振とうフラスコで培養が行われた。左は時間の関数としてのＯＤ６００の測定である。右は細胞を含まない上清（青（◆）及び赤（■））並びに細胞ペレット（紫（▲）及び緑（×））で測定された時間関数としてのCeralpha活性を示す。活性は、１ｍＭ ＣａＣｌ$_2$を含む１００ｍＭ ＭＯＰＳバッファー（ｐＨ７．０）を用い、４５℃で測定された。
【図４】野生型Ｍ２３－３Ａ株及び再構成細胞のα－アミラーゼの局在を示す図である。濃縮培養上清（×２０）(2=M23-3A,3=DG_4)、細胞ペレット(4=M23-3A,5=DG_4)及び細胞ペレットのTriton X-100抽出物(6=M23-3A, 7=DG_4)は、SDS-PAGE及びザイモグラム技術（ｐＨ７．０）により分析された。SDS-PAGEは、サンプルをボイルすることなく非還元条件で行われた。
【図５】全粒粉３％で培養した際のバイオマス及びグルコースの定量結果を示す図である。
【図６】全粒粉３％で培養した際のエタノール及び有機酸の定量結果を示す図である。
【図７】澱粉乳（starchmilk）２０％で培養した際のバイオマス及び糖の定量結果を示す

図である。
【図８】澱粉乳２０％で培養した際のエタノール及び有機酸の定量結果を示す図である。
【発明を実施するための形態】
【００２５】
本発明は、バイオマスの変換及び／又はバイオ燃料若しくは他の代謝物の生成のためのデイノコッカス又はその関連細菌、及びそれらの使用に関する。
【００２６】
本開示は、以下の定義を参照することでより理解され得る。
【００２７】
定義
本発明において、酵素に関して「細菌由来」の用語は、その酵素が細菌等から単離されたこと、又はその酵素が細菌等から単離された又は特徴付けられた酵素のアミノ酸配列の全て又は生物活性部分を含むことを意味する。「デイノコッカス細菌又はその関連細菌由来」の用語は、デイノコッカス又はその関連細菌で同定された核酸配列又はアミノ酸配列から合成された組換え酵素、合成酵素及び／又は任意の変更がなされた酵素（例えば化学的、酵素的、物理的に変更）をさらに含む。
【００２８】
デイノコッカス細菌とは、以下に限定されないが、D.geothermalis, D. cellulolysiticus, D. radiodurans, D. proteolyticus, D.radiopugnans, D. radiophilus, D. grandis, D. indicus, D. frigens, D. saxicola,D. maricopensis, D. marmoris, D. deserti, D.murrayi, D. aerius, D.aerolatus, D. aerophilus, D.aetherius, D. alpinitundrae, D. altitudinis, D. apachensis,D. aquaticus, D. aquatilis, D. aquiradiocola, D. aquivivus,D. caeni, D. claudionis, D.ficus, D. gobiensis, D. hohokamensis, D. hopiensis, D.misasensis, D. navajonensis, D. papagonensis, D.peraridilitoris, D. pimensis, D. piscis, D. radiomollis,D. roseus, D. sonorensis, D.wulumuqiensis, D. xibeiensis, D. xinjiangensis, D.yavapaiensis 又は D. yunweiensis細菌等のデイノコッカス（Deinococcus）属の細菌を意味する。好ましくは、デイノコッカス細菌はD.geothermalis, D. cellulolysiticus, D. deserti, D.murrayi及びD. radioduransである。
【００２９】
デイノコッカスの「関連」細菌とは、(i)GTTACCCGGAATCACTGGGCGTA (SEQ IDNO: 26)プライマー及びGGTATCTACGCATTCCACCGCTA (SEQ ID NO: 25)プライマーを用いた増幅で、約１５８塩基対の断片を生じる１６ＳｒＤＮＡを含み、(ii)４ｍＪ／ｃｍ^{2}のＵＶ処理に耐性を有する細菌を意味する。特定の実施形態において、デイノコッカス関連細菌は、デイノコッカスの１６ＳｒＤＮＡ配列に対して少なくとも７０％、好ましくは少なくとも８０％の同一性を有する１６ｓ ｒＤＮＡを有する細菌である。
【００３０】
「遺伝子」とは、タンパク質をコードする核酸を意味する。遺伝子の用語は、ｃＤＮＡ又はｇＤＮＡ等のＤＮＡ、及びＲＮＡを含む。遺伝子は、例えば組換え法、酵素的方法及び／又は化学的方法によってまず調製され、その後、宿主細胞又はインビトロ系で複製され得る。一般に、遺伝子は、所望のタンパク質をコードするオープンリーディングフレームを含む。遺伝子は、転写ターミネーター、シグナルペプチド、ＩＲＥＳ、イントロン等の追加配列を含み得る。好ましくは、遺伝子はイントロンを含まない。
【００３１】
本発明において、「転写ユニット」は、１つのプロモーターの制御下にある少なくとも１つの遺伝子の群を意味する。
【００３２】
細菌における配列、核酸又はユニットに関して「再構成」又は「組換え」の用語は、その配列、核酸又はユニットが細菌内に自然に存在せず、その細菌又はその祖先に構築及び／又は挿入されたことを意味する。再構成又は組換えユニットにおいて、その配列は、それが構築又は挿入される細菌と同一の起源であることが好ましい。一例として、デイノコ

ッカス細菌内の再構成ユニットは、デイノコッカス細菌由来の核酸を本質的に含むことが好ましい。

【００３３】

タンパク質又は酵素に関して「断片」の用語は、そのタンパク質の少なくとも約１０，１５，２０，２５，４０，５０又はそれ以上、好ましくは少なくとも６０の連続するアミノ酸を含むそのタンパク質の断片を意味する。より好ましい断片は、それ自体が、又は他のポリペプチドと融合若しくは結合されて機能する。また、タンパク質の断片は、タンパク質の成熟型を意味する（すなわち、タンパク質のＮ末端におけるシグナルペプチドを含まない）。

【００３４】

タンパク質又は酵素に関して「変異体」の用語は、基準タンパク質に対して少なくとも５０％のアミノ酸配列の同一性を示し、より好ましくは少なくとも６０％、７０％、８０％又は９０％の同一性を示し、基準タンパク質の活性を維持するタンパク質を意味する。配列同一性（相同性）の程度は、BLAST 2.2.2又はFASTA version 3.0t78とデフォルトパラメータを含む、コンピュータプログラム及び関連するパラメータを用いて測定され得る。

【００３５】

好ましい変異体は、基準配列に対して少なくとも９０％、より好ましくは少なくとも９２％、９５％又は９７％の同一性レベルを有する。好ましい実施形態において、変異体は、基準タンパク質と比較して、1～50，1～40，1～30，1～25，1～20，1～15，1～10又は1～5の変異された（例えば欠失、置換又は挿入）アミノ酸残基を含む。それらが基準タンパク質の酵素活性の少なくとも２０％、好ましくは少なくとも３０％、より好ましくは少なくとも５０％を示す場合、タンパク質は変異体として認められる。

【００３６】

通常、本発明に係る「バイオマス」の用語は、特にセルロース及び／又はキシランを含むバイオマスを意味する。バイオマスの用語は、植物性又は動物性の有機材料といった生物由来の有機材料を含む。バイオマスは、未処理である又は前処理されていてもよい。通常、バイオマスは、セルロース又はキシランを含有する植物性又は動物性有機材料である。バイオマスの例は、以下のものに限定されないが、木材又は紙の製造に適さない成木を含む林産物、有機廃棄物、草、作物及び家畜糞尿等の農産物、並びに藻類及び海藻等の水産物を含む。バイオマスの例は、ススキ、アサ、テンサイ、コムギ、トウモロコシ、ポプラ、ヤナギ、モロコシ、サトウキビ、及びユーカリからアブラヤシに至る種々の樹木種を含む多くの型の植物由来の木材又は植物材料を含む。バイオマスの具体的な源は、以下のものに限定されないが、植物残渣、広葉樹又は針葉樹の幹、穂軸、麦わら、草、葉、種子、紙等を含む（例えばSunet al., Bioresource Technology 83 (2002) 1-11を参照）。また、バイオマスの用語は、加水分解の前処理がなされたバイオマス製品を本質的に含む変換されたバイオマス又は二次バイオマスを含む。

【００３７】

本発明においてバイオマスを「改変する」ことは、変換、分解、加水分解、転換又はプロセシングを含むそれの改変を含む。通常、バイオマスを「改変する」の用語は、発酵性糖が生じるバイオマスの改変を含む。また、通常、改変は、バイオマスの生体高分子の加水分解を含む。

【００３８】

「バイオマス分解酵素」は、バイオマス（又はバイオマスの成分）を分解物質に分解することに関わる酵素である。バイオマス分解酵素は、好ましくはバイオマスを発酵性糖に分解又は加水分解するのに寄与する酵素である。そのような酵素の例は、アミラーゼ、セルラーゼ、アラビノフラノシダーゼ（例えばα－Ｌ－アラビノフラノシダーゼ等）、キシラナーゼ、ラッカーゼ、α－グルクロニダーゼ、及びフェルラ酸エステラーゼ又はアセチルキシランエステラーゼ等のエステラーゼを含む。

【００３９】

「アルコール」又は「バイオアルコール」の用語は、１～５の炭素原子、好ましくは１～４の炭素原子を含む直鎖又は分枝型のアルコール、ジオール又はトリオールを特に意味する。「アルコール」の特定の好ましい例は、メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、プロパンジオール、ブタノール、２，３－ブタンジオール、１，４－ブタンジオール、イソブタノール又はグリセロールから選択されるC_{1-4}アルコールを含み、より好ましくはエタノールである。

【００４０】

本発明に係る「バイオ燃料」の用語は、以下のものに限定されないが、植物性油、バイオディーゼル、バイオアルコール、バイオガス、合成ガス及び固形バイオ燃料を含む。

【００４１】

バイオマス分解転写ユニット

デイノコッカス細菌では、ストレスにより害されるときにそのゲノムが全体又は部分的に再構築する能力を有することが示されてきた。バイオマスからバイオエネルギー製品を生成するためのデイノコッカス細菌の能力は、ＷＯ２００９／０６３０７９に開示されている。本発明は、それらの細菌の能力が代謝経路を再操作することにより改善され得ることを示す。特に、本発明は、再構成バイオマス分解転写ユニットを有する新規の細菌を提供する。本発明は、そのようなユニットが細胞増殖を変更することなくデイノコッカス又はその関連細菌のゲノムに挿入され得る。本発明は、単一のプロモーターからのいくつかの遺伝子の発現が可能であり、細胞内で酵素レベルのより良い制御が可能であることを示す。さらに、本発明は、単一の挿入サイトに５つの遺伝子を有する機能性再構成バイオマス分解ユニットを含む細菌を開示し、それは改善された能力を示す。さらに、本発明は、デイノコッカス由来の核酸を用いて構築されたそのような再操作された細菌を開示し、それは異種遺伝子材料を含まない。

【００４２】

これらの細菌は、有用な産物及び生体触媒であり、特に改善された能力でバイオマスを改変するのに適応される。

【００４３】

本発明のバイオマス分解転写ユニットは、好ましくは、単一のプロモーターの制御下にある少なくとも２つの異なる遺伝子を含む核酸分子を意味し、その２つの異なる遺伝子は２つの異なるバイオマス分解酵素をコードする。本発明は、特有のプロモーターの制御下にあるいくつかの遺伝子の、デイノコッカス細菌のゲノム内の１つの位置への挿入を開示する。そのような構成は、遺伝子の最適な発現を提供し、細菌の増殖に影響しない。バイオマス分解酵素は、アミラーゼ、キシラナーゼ、セルラーゼ、ラッカーゼ、アラビノフラノシダーゼ、α－グルクロニダーゼ及びエステラーゼから選択され得る。エステラーゼの好ましい例は、以下のものに限定されないが、フェルラ酸エステラーゼ又はアセチルキシランエステラーゼを含む。アラビノフラノシダーゼの特定の例は、以下のものに限定されないが、α－Ｌ－アラビノフラノシダーゼを含む。好ましい実施形態において、バイオマス分解酵素は、アミラーゼ、セルラーゼ及びアラビノフラノシダーゼから選択される。

【００４４】

好ましい実施形態において、そのユニットは、単一のプロモーターの制御下にある３つの遺伝子を含む。本発明のそのようなユニットの特定の例は、

２つの異なるアミラーゼ遺伝子、又は、

１つのアミラーゼ遺伝子と１つのアラビノフラノシダーゼ遺伝子、又は、

２つの異なるアミラーゼ遺伝子と１つのアラビノフラノシダーゼ遺伝子、を含む。

【００４５】

アミラーゼは、多糖類、特にデンプンの加水分解に携わる。デンプンは、１－４及び１－６グリコシド結合により互いに結合された多くのグルコースユニットからなる炭水化物である。「アミラーゼ」の用語は、α－アミラーゼ、β－アミラーゼ、グルコアミラーゼ、α－グルコシダーゼ又はプルラナーゼ（グリコシルヒドラーゼ）活性を有するポリペプチドを含む。α－アミラーゼは、より低分子量のマルトデキストリンを生成するためにデ

ンプンの内部のα－１，４グルコシド結合を加水分解する能力を有する。グルコアミラーゼは、α－１，４グルコシド結合及びα－１，６グルコシド結合により結合されたグルコースポリマーを加水分解する能力を有する。グルコアミラーゼは、グルカンからβ－Ｄグルコースを放出する能力を有する。

【００４６】

本発明で使用するためのアミラーゼ遺伝子は、好ましくはα－アミラーゼをコードする遺伝子である。より好ましくは、アミラーゼ遺伝子は、デイノコッカス細菌由来のアミラーゼをコードする。これに関して、出願人は、改善された特性を有するデイノコッカス細菌からの新規のアミラーゼ遺伝子を同定し、その配列はSEQ ID NOs: 2及び4（アミノ酸配列）に示される。

【００４７】

好ましい実施形態において、本発明の転写ユニットは、SEQ ID NOs: 2及び4のアミノ酸配列を含むα－アミラーゼ、又はその断片若しくは変異体をコードする遺伝子を含む。

【００４８】

発明者らにより行われた機能分析では、SEQ ID NOs: 2及び4のα－アミラーゼが異なる基質特異性を示し、このため、本発明の細菌でこれらの２つのアミラーゼを組み合わせることにより、活性の範囲が増大される。

【００４９】

セルラーゼは、広葉樹及び針葉樹の主要な成分であるセルロース又はヘミセルロースを触媒する酵素である。セルラーゼは、エンドグルカナーゼ、エンドセルラーゼ、セロビオヒドロラーゼ（ＣＢＨ）若しくはセロビオシダーゼ、又はβ－グルコシダーゼ（セロビアーゼ；ＢＧＬ）等の種々の型のものであってもよい。本発明に使用するためのセルラーゼ遺伝子は、エンドセルラーゼ又はエキソセルラーゼをコードする遺伝子であることが好ましい。より好ましくは、セルラーゼ遺伝子は、デイノコッカス細菌由来のセルラーゼをコードする。これに関して、出願人は、改善された特性を有するデイノコッカス細菌から新規のセルラーゼ遺伝子を同定し、その配列はSEQ ID NOs: 8及び10（アミノ酸配列）に示される。

【００５０】

好ましい実施形態において、本発明の転写ユニットは、SEQ ID NOs: 8及び10のアミノ酸配列を含むセルラーゼ、又はその断片若しくは変異体をコードする遺伝子を含む。

【００５１】

アラビノフラノシダーゼ遺伝子は、アラビノフラノシダーゼをコードするいずれの遺伝子であってもよく、より好ましくはデイノコッカス細菌由来のアラビノフラノシダーゼをコードする遺伝子であってもよい。これに関して、出願人は、改善された特性を有するデイノコッカス細菌から新規のアラビノフラノシダーゼ遺伝子を同定し、その配列は、SEQ ID NOs: 5（核酸）及び6（アミノ酸）に示される。

【００５２】

好ましい実施形態において、本発明の転写ユニットは、SEQ ID NOs: 6のアミノ酸配列を含むアラビノフラノシダーゼ、又はその断片若しくは変異体をコードする遺伝子を含む。

【００５３】

本発明のバイオマス分解転写ユニットの例は、

SEQ ID NOs: 2及び4のアミノ酸配列を含むα－アミラーゼ、又はその断片若しくは変異体をコードする遺伝子；

SEQ ID NOs: 6のアミノ酸配列を含むアラビノフラノシダーゼ、又はその断片若しくは変異体をコードする遺伝子；及び

SEQ ID NOs: 8及び10のアミノ酸配列を含むセルラーゼ、又はその断片若しくは変異体をコードする遺伝子、から選択される単一のプロモーターの制御下にある少なくとも２つの遺伝子を含む。

【００５４】

本発明のバイオマス分解転写ユニットのより具体的な例は、実施例に記載されており、単一のプロモーターの制御下に、５’から３’に向かって、
SEQ ID NOs: 2のアミノ酸配列を含むα－アミラーゼ、又はその断片若しくは変異体をコードする遺伝子と、SEQ ID NOs: 4のアミノ酸配列を含むα－アミラーゼ、又はその断片若しくは変異体をコードする遺伝子；又は、
SEQ ID NOs: 2のアミノ酸配列を含むα－アミラーゼ、又はその断片若しくは変異体をコードする遺伝子と、SEQ ID NOs: 6のアミノ酸配列を含むアラビノフラノシダーゼ、又はその断片若しくは変異体をコードする遺伝子；又は、
SEQ ID NOs: 2のアミノ酸配列を含むα－アミラーゼ、又はその断片若しくは変異体をコードする遺伝子と、SEQ ID NOs: 4のアミノ酸配列を含むα－アミラーゼ、又はその断片若しくは変異体をコードする遺伝子と、SEQ ID NOs: 6のアミノ酸配列を含むアラビノフラノシダーゼ、又はその断片若しくは変異体をコードする遺伝子と、を含む。

【００５５】

本発明は、上記遺伝子の構成は、最適なエタノール生成のための組み込まれた遺伝子の適切な発現を可能とする。

【００５６】

そのユニットは、例えばラッカーゼ、キシラナーゼ又はエステラーゼをコードする代わりの遺伝子又は追加の遺伝子を含んでもよい。デイノコッカス又はその関連細菌から出願人により単離されたそのような他の遺伝子の具体例は、参照として本明細書に組み込まれるＰＣＴ／ＥＰ２０１１／０６９６６９及びＰＣＴ／ＥＰ２０１１／０６９６７０に開示されている。

【００５７】

転写ユニット内の遺伝子の発現は、単一のプロモーターにより制御される。そのプロモーターは、宿主と同種（例えばデイノコッカスの遺伝子からのプロモーター）、又は異種（例えば異なる細菌、ファージ、合成又はハイブリッドプロモーター等の異なる起源からのプロモーター）であってもよい。好ましいプロモーターは同種のプロモーターである。これに関して、種々のプロモーターが研究されており、遺伝子発現のために用いられてきた。適当なデイノコッカスのプロモーターの例は、翻訳伸張因子Ｔｕ遺伝子のtufA (DR0309)及びtufB (DR2050)からのPtufA及びPtufBプロモーター、pI3に配置するresU遺伝子のプロモーター、並びにgroESLオペロン(Lecointe et al, 2004; Meima et al, 2001)のPgroESLプロモーター領域、又はそのようなプロモーターの誘導体を含む。

【００５８】

本発明は、転写ユニットにおける遺伝子の適切なレベルの発現が、その遺伝子がPtufA、PtufB若しくはPgroESLから選択されるプロモーター、又はそれら由来のプロモーターの制御下にある場合に得られることを示す。

【００５９】

転写ユニットは、例えばターミネーター及び／又はエンハンサー等の追加の制御配列をさらに含み得る。

【００６０】

さらに、転写ユニットは、異なるプロモーターの制御下にある更なる遺伝子を含んでもよい。これに関して、同一又は異なるプロモーターにより制御され、バイオマス分解酵素をコードする追加の遺伝子を転写ユニットに挿入することが可能である。

【００６１】

特定の好ましい実施形態において、本発明の転写ユニットは、第２のプロモーターの制御下にある少なくとも１つの追加のバイオマス分解遺伝子をさらに含む。さらに好ましい実施形態において、転写ユニットは、１つのプロモーターの制御下にある２つの追加のバイオマス分解遺伝子を含む。本発明は、そのような再構成バイオマス分解ユニットがデイノコッカス株のゲノムの１つの位置で構築され得ることを示す。本発明は、そのオペロンの構成がエタノールの生成に最適な遺伝子発現を提供することを示す。本発明は、そのような細菌が生存可能で安定であることを示す。従って、これらの細菌は、バイオ燃料の生

成のための非常に有効な生体触媒となる。

【００６２】

特定の実施形態において、本発明は、再構成バイオマス分解転写ユニットを含むデイノコッカス又はその関連細菌に関し、そのユニットは、

(i)単一のプロモーターの制御下にある２つのアミラーゼ遺伝子、又は１つのアミラーゼ遺伝子と１つのアラビノフラノシダーゼ遺伝子、又は２つのアミラーゼ遺伝子と１つのアラビノフラノシダーゼ遺伝子、及び、

(ii)第２のプロモーターの制御下にある少なくとも１つのセルラーゼ遺伝子、好ましくは１つのエンドセルラーゼ遺伝子と１つのエキソセルラーゼ遺伝子、を含む。

【００６３】

これらの特定の遺伝子の組み合わせ及び配置は、その細菌における改善された発現及び活性を可能とする。

【００６４】

転写ユニットは、インビトロで調製されて細胞内に挿入されてもよく、又は遺伝子の逐次挿入により細胞内で構築されてもよい。従来の組換えＤＮＡ技術は、ＤＮＡ操作、クローニング及び細胞形質転換のために使用され得る。特に、核酸は、細菌のゲノムに挿入されてもよく、又は例えばプラスミド、エピソーム、人工クロモソーム等に（自己）複製分子として挿入されてもよい。

【００６５】

好ましい実施形態において、転写ユニットは、細菌のゲノムに組み込まれる。この目的のために、コンストラクトは、デイノコッカス細菌のゲノムに組み込まれるのに適当な１つ又はいくつかの組込みカセットにクローニングされる。通常、そのような組込みカセットは、組込み、好ましくは部位特異的組込みが可能な１つ又はいくつかの配列に結合された（又は隣接された）核酸を含む。そのような配列は、例えば交差による組込みが可能なゲノムの目的領域に相同な核酸配列であってもよい。

【００６６】

挿入は、ゲノムの非本質的な領域（例えば非コード領域）でなされ得る。しかしながら、好ましい実施形態において、挿入は、細菌のゲノム内の特定の遺伝子で行われる。これに関して、本発明の特定の細菌は、アミラーゼをコードする内在性遺伝子の全て又は一部の代わりに、そのゲノム内に組み込まれた再構成バイオマス分解転写ユニットを含む。本発明は、本発明の転写ユニットによる内在性遺伝子の置換がさらに細菌の特性を改善することを示す。これに関して、「遺伝子の一部」の用語は、欠失することにより細胞内で遺伝子の不活性化を十分に引き起こす遺伝子の部分を意味する。

【００６７】

例えばＷＯ２０１０／１３０８０６に開示されているように、種々の方法がデイノコッカス又はその関連細菌内に核酸を挿入するのに用いられ得る。特に、それらは、（塩化カルシウムの存在下でさらに増強され得る）自然形質転換、又はエレクトロポレーションにより挿入され得る。

【００６８】

代替的なクローニングサイトは、好ましくは、リン酸アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、アラニンデヒドロゲナーゼ遺伝子、グルコースデヒドロゲナーゼ遺伝子、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ遺伝子、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子又はリンゴ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子から選択される遺伝子の置換を含む。

【００６９】

代替的実施形態において、好ましいわけではないが、転写ユニットは、デイノコッカス内で複製され得る適当なベクター内にクローニングされ得る。通常、ベクターは、さらにクローニングされた挿入断片、選択遺伝子（例えば抗生物質耐性、色素等）、及びデイノコッカスで有効な複製開始点を含む。そのようなベクターの例は、pMD66, pI3, pRAD1 及びpUE30を含む。pMD66は、pI3 (Daly et al, 1994)の１２ｋｂの断片を含むD. radioduransns及びE. coliのための大きいベクター（２７ｋｂ）である。pI3は、Masters 及びMinton

(1992)により開示されている。pRAD1は、D.radioduransのための最小レプリコンを含むD. radiodurans-E. coliシャトルプラスミドである(Meima及びLidstrom, 2000)。pUE30は、デイノコッカスで複製可能なD. radiopugnans株由来の内在性プラスミドである（ＵＳ２００３／０１７５９７７を参照）。

【００７０】

また、本発明は、デイノコッカス若しくはその関連細菌、又はそれらの祖先を生成するための方法に関し、その方法は、

ａ）親デイノコッカス又はその関連細菌を準備することと；

ｂ）単一のプロモーターの制御下にあり、異なるバイオマス分解酵素をコードする少なくとも２つの遺伝子を前記親細菌のゲノム内に同時又は順次挿入することと；

ｃ）前記少なくとも２つの遺伝子の全てを発現するｂ）の細菌を選択することと、を含む。

【００７１】

挿入された核酸を有する細菌は、それ自体周知の技術に従って選択され得る。遺伝子の発現は、（例えば定量）ＰＣＲを用いて確認され、それらの酵素の生成は、本技術分野に周知であり、実施例で説明されたウエスタンブロット又は酵素アッセイにより確認され得る。

【００７２】

試験の項で開示されるように、再構成バイオマス分解転写ユニットを含むいくつかのデイノコッカス細菌が生成された。これらの細菌は培養可能であり、生存可能であり且つ安定であり、挿入されたユニットを含む。安定性としては、２回の増殖サイクル後に９５％以上の細菌がそのユニットをまだ含んでいることが好ましい。本発明の更なる利点は、バイオマス分解転写ユニットが、完全にデイノコッカス由来遺伝子材料で構成され得ることである。結果として、その細菌は、より安定で、より有効で、ＧＭＯでなく、極限の培養条件に適応される。また、発明者らにより同定され、特徴付けられた特定の酵素は、細菌に顕著な活性を与える強く相補的な活性を示す。

【００７３】

アルコール生成転写ユニット

好ましい実施形態において、本発明の細菌は、追加のバイオマス分解転写ユニットである組換えアルコール生成転写ユニットを含む。従って、そのような細菌は、バイオマスからバイオ燃料又は代謝物を生成するのに最適な遺伝子の組み合わせを発現する。

【００７４】

組換えアルコール生成転写ユニットは、好ましくはアルコールデヒドロゲナーゼ（ａｄｈ）及び／又はピルビン酸デヒドロゲナーゼ（ｐｄｃ）をコードする少なくとも１つの遺伝子を含む。

【００７５】

ピルビン酸デヒドロゲナーゼ(PDC,EC : 4.1.1.1)は、ピルビン酸をアセトアルデヒド及び二酸化炭素にするためのモノ酸化脱炭酸を触媒する。アルコールデヒドロゲナーゼ(ADH, EC : 1.1.1.1)は、アセトアルデヒドからエタノールへの転換を触媒する。デイノコッカス内へのＡＤＨ及び／又はＰＤＣ遺伝子の挿入は、出願人による先の出願に記載されている（ＷＯ２０１０／１３０８０６）。この代謝経路を生成する又は改善するために、ＰＤＣ及び／又はＡＤＨをコードする遺伝子は、クローニングされ、再構成バイオマス分解ユニットを有する本発明のデイノコッカス又はその関連細菌に首尾よく導入される。

【００７６】

特に、機能性ＰＤＣをコードする遺伝子は調製されてきた。その核酸分子がピルビン酸をアセトアルデヒド及び二酸化炭素にするためのモノ酸化脱炭酸を触媒するタンパク質をコードする限り、そのような核酸分子は、天然若しくは合成、又は成熟ＰＤＣ遺伝子の配列の全て又は一部を含み得る。ＰＤＣは、植物、真菌及び酵母に存在するが、細菌には稀に存在する。明白なＰＤＣは、十分に配列決定されたD. radioduransゲノムで見つかっていない。ＰＤＣ遺伝子は、Zymomonasmobilis (Brau及びSahm, 1986 ; Conway et al,1987

a ; Neale et al, 1987), Acetobacter pasteurianus (Genbank: AF368435)(Chandra et al, 2001), Sarcina ventriculi (Genbank: AF354297) (Lowe and Zeikus,1992)及びZymobacter palmae (Genbank: AF474145) (Raj etal, 2002)等の種々の菌株で同定されてきた。

【００７７】

好ましい実施形態において、ＰＤＣ核酸は、細菌のＰＤＣ遺伝子の全て又は一部の配列を含む。具体的な実施形態において、その核酸は、Zymomonas mobilisからのＰＤＣ遺伝子の配列(ZmPDC,ZMO1360)を含む。ＺｍＰＤＣは、１７０７塩基対を含み、SEQ ID NO: 15に示される。デイノコッカスで発現するのに最適な変異遺伝子配列は、本発明者らにより合成され、それはSEQ ID NO: 16に示される。

【００７８】

ＡＤＨ遺伝子は、以下のものに限定されないが、Zymomonas mobilis (Ingram et al, 1987), Lactobacillus brevis (Liu etal, 2007)又はGeobacillus stearothermophilus (Genbank:Z25544) (Talarico et al, 2005)を含む異なる生物からクローニングされてきた。デイノコッカスからのＡＤＨ遺伝子は、本発明者らにより単離され、クローニングされた。それらの遺伝子の配列及びコードされたＡＤＨ酵素の配列は、SEQ ID NOs: 11-14に開示されている。

【００７９】

ＡＤＨ活性をコードする細菌を生成するために、機能性ＡＤＨをコードする遺伝子が調製され、それは、核酸分子がアセトアルデヒドからエタノールに転換することを触媒するタンパク質をコードする限り、天然若しくは合成、又は成熟ＡＤＨ遺伝子の配列の全て又は一部を含み得る。

【００８０】

好ましい実施形態において、ＡＤＨ核酸配列は、細菌のＡＤＨ遺伝子の全て又は一部の配列を含む。具体的な実施形態において、Zymomonas mobilis からのＡＤＨ遺伝子の配列を含む(ZmADH,ZMO1596)。ＺｍＡＤＨ IIは１１５２塩基対を含み、その配列はＷＯ２０１０／１３０８０６に示されている（SEQ ID NO: 17も参照）。デイノコッカスでの発現のために最適化された変異遺伝子配列は、本発明者らにより合成され、SEQ ID NO: 18に示される。

【００８１】

他の好ましい実施形態において、その核酸は、アミノ酸配列SEQ ID NO: 12又は14の全て又は一部を含むＡＤＨをコードする。

【００８２】

他の具体的な実施形態において、アルコール生成転写ユニットは、ＮＡＤＰ依存性ＡＤＨ又はＰＤＣをコードする少なくとも１つの遺伝子を含む。

【００８３】

代謝フラックス比分析は、いくつかのデイノコッカスが、ＮＡＤＰＨの重要な部分が酸化還元電位として生成されるペントースリン酸経路を主に介してグルコースを消費する驚くべき特性を示すことを明らかにした。このＮＡＤＰＨプールを使用するために、ＮＡＤＰ依存性ＡＤＨ遺伝子が用いられ得る。これに関して、エタノールユニットは、Moorella sp (例えばSEQ ID NO: 19の全て又は機能部を含む)由来のＡＤＨ遺伝子ＨＵＣ ２２－１、又はZymomonas (SEQ ID NO:20の全て又は機能部を含む)由来のＴｚａｄｈを含み得る。本発明は、デイノコッカス細菌が高いレベルのＮＡＤＰＨフラックスを有するため、デイノコッカス細菌におけるそのような遺伝子の発現が特に有益であることを示す。

【００８４】

従って、本発明の対象はデイノコッカス又はその関連細菌にあり、その細菌は、ＮＡＤＰ依存性ＡＤＨ又はＰＤＣをコードする少なくとも１つの組換え核酸配列を含む。

【００８５】

本発明の更なる対象は、デイノコッカス又はその関連細菌であり、その細菌は、ＮＡＤＰ依存性ＡＤＨをコードする少なくとも１つの組換え核酸配列、及びＮＡＤ依存性ＡＤＨ

をコードする少なくとも１つの組換え核酸配列を含む。

【００８６】

核酸は、上記のように、細菌のゲノムに挿入され得る、又は例えばプラスミド、エピソーム、人工クロモソーム等に（自己）複製分子として挿入され得る。好ましい実施形態において、エタノール生成転写ユニットは、内在性遺伝子に代えて、より好ましくはリン酸アセチルトランスフェラーゼ遺伝子に代えて、前記細菌のゲノムに挿入される

これに関して、本発明の対象は、デイノコッカス又はその関連細菌にあり、その細菌は、不活性型リン酸アセチルトランスフェラーゼ遺伝子（ｐｔａ）を含む。解糖系で生成されるアセチルＣｏＡは、エタノール生成で用いられることが可能であり、二次的な競合経路である酢酸の産生に用いられ得る。ｐｔａ遺伝子の欠失により、酢酸生成はエタノール生成を促進するために低減（又は廃止）されるべきである。本発明は、この遺伝子が細菌の増殖を変更することなく欠失されて、バイオ燃料の生成のための細菌の能力を改善し得ることを示す。

【００８７】

適切なＰＤＣ又はＡＤＨの発現は、定量ＰＣＲを用いて確認され、これらの酵素の生成は、本技術分野において周知のウエスタンブロット又は酵素アッセイにより確認され得る。ＰＤＣ活性は、NAD^+の還元を分析することにより測定が可能であり、ＡＤＨ活性は、それらの酵素の活性によるNAD^+の還元又はＮＡＤＨの酸化により測定が可能である(Conway et al, 1987a及びb)。

【００８８】

競合経路の欠失

本発明の細菌の特性は、細胞内の競合反応又は経路を欠失又は変更することにより、さらに改善され得る。

【００８９】

本発明者らは、競合経路に関わる遺伝子が不活性化された新規の細菌を作製した。そのような細菌は、所望の経路により多くのそれらのエネルギーを用いることによりバイオマスからのバイオ燃料の生成において改善された効率を示す。より具体的に、本発明の特定の対象は、リン酸アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、アラニンデヒドロゲナーゼ遺伝子、グルコースデヒドロゲナーゼ遺伝子、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ遺伝子、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーザ遺伝子及び／又はリンゴ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子から選択された不活性型内在性遺伝子を含むデイノコッカス又はその関連細菌である。

【００９０】

特定の実施形態において、標的遺伝子は、その全て又は一部が欠失され、機能性タンパク質をコードしない。標的遺伝子は、前記細菌又はその祖先において、相同組換え、遺伝子置換、標的変異、又は本技術分野において周知の他の方法により不活性化されていてもよい。

【００９１】

好ましい実施形態において、その遺伝子は、その遺伝子の少なくとも一部の欠失により不活性化され、それは異種核酸（例えば選択マーカー）により置換されていてもよい。

【００９２】

好ましい実施形態において、本発明の細菌は、前記遺伝子の一部、好ましくは連続する少なくとも１００ヌクレオチド、より好ましくは連続する少なくとも２００、３００、４００又は５００ヌクレオチドを欠いている。実施例において、リン酸アセチルトランスフェラーゼ遺伝子の全体を欠いている欠陥デイノコッカス株が作製された。この菌株は、その遺伝子の一部と相同の２つの領域に隣接されたエタノール生成転写ユニットを含む特定のコンストラクトを用いた二重交差により調製された。一般に、相同領域は、ハイブリダイゼーション及び交差をできるようにするのに十分な長さであるべきであり、例えば約２００ヌクレオチド以上、好ましくは３００ヌクレオチド以上、通常３００～７００ヌクレオチドである。そのようなコンストラクトは、本発明の特定の対象である。

【００９３】
これに関して、本発明は、上記のようなデイノコッカス細菌又はその祖先を生成するための方法に関し、その方法は、
（親）デイノコッカス細菌を準備することと；
リン酸アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、アラニンデヒドロゲナーゼ遺伝子、グルコースデヒドロゲナーゼ遺伝子、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ遺伝子、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子及び／又はリンゴ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子から選択される内在性遺伝子を不活性化するようにその細菌を処理することと；
不活性化された前記遺伝子を有する細菌を選択することと、を含む。
【００９４】
培養、組成物及び使用
本発明の細菌は、デイノコッカス種又はその関連細菌種から調製され得る。その例は、本出願において上で挙げられている。それらは、D.geothermalis, D. cellulolysiticus, D. deserti, D.murrayi及びD.radiodurans.から選択されるデイノコッカス細菌種であることが好ましい。
【００９５】
本発明で使用されるのに適する親菌株の実例は、以下のものに限られないが、D. geothermalis DSM 11300 (DRH05),D. geothermalis DSM 11301 (DRH06), D. geothermalis DSM 11302 (DRH07), D.geothermalis HAMBI 2481 (DRH37), D. geothermalis HAMBI 2480 (DRH38), D.geothermalis HAMBI 2411 (DRH39), D. geothermalis HAMBI 2791 (DRH41), D. geothermalisM36-7D; D. radiodurans R1 (ATCC 13939) ; D. murrayiM11-9D (CNCM I-4155);又はD. murrayi M13-1A (CNCM I-4157)を含む。
【００９６】
本発明の実施のために用いられ得るデイノコッカスの他の菌株は、公的保管場所で寄託され、又は当業者により得られ得る。
【００９７】
本発明の細菌は、適切な培養培地及び／又は装置で培養及び／又は維持され得る。そのような培地の例は、複合グルコース培地、又は実施例で開示されるような、例えば合成培地スクロース、合成培地デンプン等の合成培地を含む。適切な培地は、商業的にも入手可能である。
【００９８】
本発明の更なる対象は、上記のような細菌及び少なくとも１つの他の細菌を含む組成物に関する。
【００９９】
本発明の更なる対象は、上記のような細菌及び培養培地を含む組成物に関する。
【０１００】
本発明の更なる対象は、上記のような細菌の酵素抽出物に関する。酵素抽出物は、少なくとも再構成ユニットによりコードされたバイオマス分解酵素を含む。
【０１０１】
本発明は、上記のような細菌又はその抽出物を含む生体触媒に関する。
【０１０２】
さらに、本発明は、上記のような細菌、抽出物又は組成物にバイオマスを曝露することを含むバイオマスを変換するための方法に関する。
【０１０３】
本発明の更なる対象は、上記のような細菌、抽出物又は組成物に糖又はバイオマスを曝露することを含むバイオ燃料を生成するための方法である。好ましくは、その方法は、生成されたバイオ燃料を回収するステップを含む。
【０１０４】
本発明は、バイオ燃料又は代謝物を生成するための上記のような細菌の使用に関する。
【０１０５】

基質は、培養培地、又は種々の型のバイオマス若しくはそれ由来の製品であってもよい。特に、バイオ燃料は、特に植物性若しくは動物性バイオマスといった再生可能な資源、又は一般廃棄物及び産業廃棄物から生成され得る。

【０１０６】

より好ましくは、本発明の方法は、エタノールの生成のために用いられる。

【０１０７】

本発明の方法は、変換反応器において実施され得る。「反応器」とは、従来の発酵タンク、又は本発明の実施のために特別に設計されたバイオマスの変換のための装置若しくはシステムを意味し、具体的に、バイオリアクタ、バイオフィルタ、回転生物接触器、並びに気相及び／又は液層バイオリアクタ、特にバイオマス又はバイオマス誘導体の処理に適合されたそれらの装置からなる。本発明に従って用いられる装置は、連続的に又はバッチ毎に用いられ得る。

【０１０８】

本発明の方法の実施のために、反応器において、少なくとも１つの本発明の細菌又はその細菌抽出物が用いられ、その反応器は、物理化学的条件がその中で設定及び維持され、前記細菌が検討中での適用に操作可能であり、任意に、細菌の増殖が可能であり、好ましくはその中で促進されるように、配置及び供給される。

【０１０９】

その方法は、基質及び細菌に依存して、好気性、嫌気性又は微好気性条件下で行われ得る。本発明の利点は、培養培地にエタノールが含まれるようなストレス条件に抵抗するといった本発明の細菌の能力に関する。本発明の方法は、約４０℃以上、特に４０℃～７０℃の温度、酸性ｐＨ条件、及び／又はエタノールの存在下で行われることが好ましい。

【０１１０】

本発明の更なる態様及び利点は、以下の実施例に開示され、それは例としてみなされるべきであり、本発明の範囲を限定しないものとみなされるべきである。

【実施例】

【０１１１】

Ａ．材料及び方法

細菌株及び培養条件

エスケリキアコリ（E.coli）株であるSCS110、JM109又はDH5αを、プラスミドを増殖するのに用いた。それらを、Luria-Bertani(LB)培地（１Ｌ中：トリプトン１０ｇ、酵母エキス ５ｇ、塩化ナトリウム １０ｇ）を用いて、３７℃、２００ｒｐｍで培養した。固体培地は１．５％のアガーを加えることで調製した。

【０１１２】

デイノコッカス細菌を、ＰＧＹを用いて４５℃、２００ｒｐｍで培養した。ＰＧＹ培地の成分は以下の通りであり、１Ｌ中にペプトン（１０ｇ）、酵母エキス（５ｇ）及びグルコース（１ｇ）である。その固体培地の成分は、１Ｌ中においてペプトン（１０ｇ）、酵母エキス（５ｇ）、グルコース（１ｇ）及びアガー（１５ｇ）である。

【０１１３】

必要とする際に、ＬＢ又はＰＧＹには、適切な抗生物質を添加した：

‐クロラムフェニコール、D.geothermalisには最終濃度を３μｇ／ｍＬとし、E.coliには最終濃度を３０μｇ／ｍＬとする、

-ブレオシン、D. geothermalisには最終濃度を６μｇ／ｍＬとし、E.coliには最終濃度を１０μｇ／ｍＬとする、

-アンピシリン、E.coliには最終濃度を１００μｇ／ｍＬとする。

【０１１４】

形質転換

E.coliの形質転換を、StratageneのSCS110、又はPromegaのJM109といった商業的に入手可能なコンピテンとセルを用いて行った。

【０１１５】

デイノコッカス細菌において、定常期における新鮮培養液を５０ｍｌのＰＧＹで１００倍希釈した。その細菌を後期対数期（OD_{600nm}＝０．８）まで増殖し、そのペレットを、所定量の氷冷2×PGY/10%v/v グリセロール/30mM$CaCl_2$で再懸諾した。形質転換のために、所定量のプラスミドＤＮＡを１００μＬの細胞に添加した。その混合液を、氷上で３０分間インキュベートした後、４２℃に９０秒間移し、再び氷上で５分間インキュベートした。２００μＬの新鮮な２×ＰＧＹ培地を添加し、形質転換体を３７℃、２００ｒｐｍで２時間振とうした。それらを段階希釈され、適切な選択的ＰＧＹプレートに播種した。

【０１１６】

ＤＮＡ操作

E.coli細胞からのプラスミドのミニプレップは、QIAGENのミニプレップＤＮＡ精製システムを用いて行い、ミディプレップは、Macherey-Nagel社のNucleoBond Xtra Midi Plus EFプラスミドＤＮＡ精製キットを用いて行った。これらの調製は、定常期における３ｍＬ～１００ｍＬのE.coli培養液を用いて行った。

【０１１７】

デイノコッカスからのゲノムＤＮＡ抽出を、Qiagenから商業的に入手できるDNeasy（登録商標）Blood and Tissueキットを用いて行った。これらの調製は、５ｍＬの定常期培養液を用いて行った。

【０１１８】

オリゴヌクレオチドは、Eurogentec社により合成された。ＰＣＲ増幅に用いられたポリメラーゼは、Finzyme社のPHUSION Hi-Fidelityポリメラーゼであり、オーバーラップＰＣＲにおいてはNovagen社のKOD Xtreme-hot start DNAポリメラーゼである。ＰＣＲ断片は、Promega社のWizard SV Gel and PCR Clean-UpSystemキットを用いて精製した。

【０１１９】

遺伝子材料は、アガロースゲル電気泳動により分離した。ＤＮＡは、Eppendorf社のバイオフォトメータを用いて定量した。

【０１２０】

ＤＮＡインサートは、GenecustEurope社により合成され、適切なベクター内にクローニングした。

【０１２１】

デイノコッカスのクロモソーム内への遺伝子挿入方法

デイノコッカスのクロモソーム内へのＤＮＡ断片の挿入は、相同組換えメカニズムを用いて行った。挿入カセットは、以下のように設計した：挿入される領域のＤＮＡ配列を、クロモソーム標的の上流又は下流の配列に相同な５００ｂｐ領域に隣接させた（図１を参照）。

【０１２２】

最初の２ステップ（12_1103遺伝子をコードする内在性αアミラーゼの欠失、及びpTufB-amy1の挿入）において、挿入カセットは、pMD66温度感受性シャトルベクターにより運ばれ、デイノコッカス内にトランスフォームされ、高温処理（５２℃で４日間）がクロモソームへの挿入及びプラスミドの消失をさせるために用いられた。

【０１２３】

他のすべての挿入／欠失において、挿入カセットを、Puc57自殺ベクターにクローニングし、デイノコッカスにトランスフォームした。クロモソーム内に所望の領域を組み込まれた形質転換体を、適切な抗生物質を含むＰＧＹ培地により選択した。

【０１２４】

正確な挿入／欠失は、遺伝子ＤＮＡにおけるＰＣＲ、マーカー置換（可能であればクロラムフェニコールからブレオシン、又はブレオシンからクロラムフェニコール）、及び所望の領域で変異されたクロモソームの配列決定により確認された。

【０１２５】

図１は最初の挿入ステップ、並びにバイオマス分解遺伝子の挿入及び正確な挿入の確認

に用いられる方法を示す図である。

【０１２６】

アルコールデヒドロゲナーゼ活性試験

パラローザニリンを２．５ｇ／ｍＬで含む無水エタノール４ｍｌを、５０ｍｇの亜硫酸水素ナトリウムを含む２００ｍＬのＬＢアガーに加えた(Conway et al, 1987b)。ＴＧＹアガープレート（必要であれば適切な抗生物質が添加される）で増殖された２日齢のD. radiodurans細胞を、インジケータープレートに播種し、３７℃で２～３時間培養した。

【０１２７】

代謝物質生成

この方法は、バイオマス又はバイオマス誘導体から所望の代謝物質を生成するための遺伝的に変異された微生物の能力の評価を可能にする。

【０１２８】

この試験は３０℃で行われる。

【０１２９】

複合培地グルコースで準備された（定常期の）前培養液から、６ｍＬの栄養強化培地に播種される（１％ｖ／ｖで播種）。

【０１３０】

試験される栄養強化培地は、複合培地グルコース、合成培地スクロース、合成培地デンプンである。

【０１３１】

複合培地グルコースは、浸透水中に２ｇ／Ｌのペプトン、５ｇ／Ｌの酵母エキス及び１０ｇ／Ｌのグルコースを含み、オートクレーブ（１２０℃で１５分）により無菌化される。この溶液に以下の溶液が加えられる：ＭＯＰＳバッファー溶液（１０×）ｐＨ７［酸性MOPS400mM , NH_4Cl 200mM , NaOH 100mM , KOH 100mM ,$CaCl_2$ 5μM, Na_2SO_4 2.76mM, $MgCl_2$5.28 mM］、微量栄養素（１００００×）［$(NH_4)_6(Mo_7)$24 300mM, $H_3BO_3$4mM, $CoCl_2$ 0.3mM, $CuSO_4$ 0.1mM, $MnCl_2$ 2.5mM, $ZnSO_4$ 0.1mM］、$FeCl_3$(100×) 2mMを含む$C_6H_5Na_3O_7$20mM溶液、及びK_2HPO_4 1g/L：これらの溶液は、濾過（０．２μｍ）により無菌化される。

【０１３２】

合成培地は、浸透水に溶解された１０ｇ／Ｌの炭素源を含み、溶液はオートクレーブ（１２０℃で１５分）により無菌化される。この溶液に以下の溶液が加えられる：MOPSバッファー溶液(10×) pH7 [酸性MOPS400mM , NH_4Cl 200mM , NaOH 100mM , KOH 100mM ,$CaCl_2$ 5μM, Na_2SO_4 2.76mM, $MgCl_2$5.28 mM]; 微量栄養素 (10000×) [$(NH_4)_6(Mo_7)$24 300mM, H_3BO_3 4mM, $CoCl_2$ 0.3mM, $CuSO_4$0.1mM, $MnCl_2$ 2.5 mM, $ZnSO_4$ 0.1mM]; $FeCl_3$(100×) 2mMを含む$C_6H_5Na_3O_7$20mM溶液; K_2HPO_4 1g/L：これらの溶液は、濾過（０．２μｍ）により無菌化される。

【０１３３】

野生株の場合を除いて、これらの培養培地に、クロラムフェニコールを播種前に３μｇ／ｍＬで添加する。

【０１３４】

培養は、好気状態及び嫌気状態(Biomerieux,Genbag)の両方で行う。

【０１３５】

好気状態での培養は、インキュベータにおいて攪拌しながら３０℃で７日間行う。その培養液に対して、その後４０００ｒｐｍで１０分間の遠心分離を行う。上清を濾過し（０．２μｍ）、他のチューブに入れ、－８０℃に置く。

【０１３６】

嫌気状態での培養は、インキュベータにおいて３０℃で４週間行う。その培養液に対して、その後４０００ｒｐｍで１０分間の遠心分離を行う。上清を濾過し（０．２μｍ）、他のチューブに入れ、－８０℃に置く。

【０１３７】

ガスクロマトグラフィＦＩＤ分析（VarianCP-WAX 57 CB 25m×0.32mmカラム）を、アル

コールの定量に用いた。有機酸を、液体クロマトグラフィ質量分析法(MicrOTOF-QII Bruker)又はキャピラリー電気泳動(5 mM 2,6-ピリジンジカルボン酸 0.5 mM 臭化セチルトリメチルアンモニウム; pH 5.6 調整バッファー / 長さ61cm, 径50μmのキャピラリー（Agilent）)により定量した。残存グルコースを、ＨＰＬＣと屈折率測定法とを組み合わせて定量した(Phenomenex LUNA 3μm NH_2 100A 150×4.6mm カラム, アセトニトリル/H_2O85:15 移動相)。

【０１３８】

酸及びエタノールの生成を、好気条件において全粒粉を３％又は６％含む培地での７日間培養後に異なる菌株において観察した。

【０１３９】

Ｂ．２つの遺伝子の再構成バイオマス分解転写ユニットを含むデイノコッカス菌株の操作

D. geothermalis DSM 11300を、親株として用いる。別々の一連の試験において、同一のプロトコールが以下に示すような他のデイノコッカス又はその関連細菌に適用される。

DRH05 D.geothermalis DSM 11300
DRH06 D.geothermalis DSM 11301
DRH07 D.geothermalis DSM 11302
DRH37 D.geothermalis HAMBI 2481
DRH38 D.geothermalis HAMBI 2480
DRH39 D.geothermalis HAMBI 2411
DRH41 D.geothermalis HAMBI 2791
M36-7D D.geothermalis
DR1 D.radiodurans ATCC 13939
M11-9DD. murrayi CNCM I-4155
M13-1A D.murrayi CNCM I-4157。

【０１４０】

Ｂ１．wt α-amylase 12_1103 (amy)をコードする遺伝子の欠失

pTufAプロモーターの制御下にあるブレオシン耐性遺伝子（bleo）を含むＤＮＡ断片を、親菌株のクロモソーム内に挿入し、相同組換えにより内在性α-amylase12_1103 (amy)を置換し、ＤＧ_０６菌株を得た。挿入は、内在性α－アミラーゼをコードする遺伝子のすぐ上流及び下流の領域と相同な５００ｂｐの断片を用いて行った。ＡＴＧからストップコドンまでのα－アミラーゼのオープンリーディングフレームの全部の完全置換は、ＰＣＲ及び配列決定により確認した。

【０１４１】

Ｂ２． amyの位置における、Ｍ２３-３Ａ菌株からのα－アミラーゼをコードする遺伝子M23r-3A.18_109(amy1)の挿入

クロラムフェニコール耐性遺伝子(cat,SEQ ID NO: 23)を含むオペロンであり、pTufBの制御下にあるα-Amylaseをコードする遺伝子M23r-3A.18_109 (amy1 - SEQID NO: 1)を含むＤＮＡ断片を、ＤＧ_０６菌株（amy::pTufA-bleo）のクロモソーム内に挿入し、pTufA-bleoと置換し、ＤＧ_０２菌株(amy::pTufB-amy1-cat)を得た。挿入は、pTufA-bleoカセットのすぐ上流及び下流の領域と相同の５００ｂｐの断片を用いて行い、従ってpTufA-bleoカセットの全部が置換される。挿入は、マーカーの置換（bleoからcat）、及びＰＣＲによって確認した。amy1をコードする配列は、タンパク質の分泌をさせるためにＮ末端シグナルペプチド配列に結合される。

【０１４２】

Ｂ３．amy1遺伝子の下流における、Ｍ２３-３Ａ菌株からのα-アミラーゼをコードする遺伝子M23r-3A.305_673 .amy2の挿入

α-アミラーゼをコードするM23r-3A.305_673 .amy2遺伝子(SEQ ID NO: 3)、及びpTufA-bleo耐性カセットを含むＤＮＡ断片を、ＤＧ_０２菌株(amy::pTufB-amy1-cat)のクロモソームにおけるamy1遺伝子のすぐ下流に挿入し、cat耐性遺伝子を置換した。挿入は、cat遺

伝子のすぐ上流及び下流の領域と相同の５００ｂｐの断片を用いて行い、従ってcat遺伝子の全部が欠失される。これにより生じた菌株であるＤＧ_０４(amy::pTufB-amy1-amy2-pTufA-bleo)は、pTufBプロモーターの制御下にある両方のアミラーゼのオペロンを含む。挿入は、マーカー置換（catからbleo）と、ＰＣＲにより確認されたオペロン構造とによって確認した。

【０１４３】

Ｂ４．再構成細菌におけるアミラーゼ発現及びデンプン分解活性

ａ－プレート上のデンプン分解試験

細胞を、後期対数期に富栄養培地で増殖した。２～８μＬの培養液(OD600 nmで基準化された定量)を、０．５％デンプンを含む最小培地プレート上に滴下し、３７℃でインキュベートした。

【０１４４】

その３日後に、デンプン分解ハローをグラムのヨウ素着色を用いて可視化した。

【０１４５】

その結果は図２に示され、再構成菌株における強力なアミラーゼ活性が見られる。

【０１４６】

ｂ－ＤＧ_０４菌株のデンプン分解性の特徴付け

α－アミラーゼM23r-2A.18_109及びM23r-2A.305_673を含むＤＧ_０４菌株(amy::pTufB-M23r2A.18_109-M23r-2A.305_673-pTu?A-bleo)を、０．５％の可溶性デンプン(Sigma S976)を含む合成最小培地で増殖した。その培地は、5 mM $CaCl_2$及び6 μg/ml ブレオマイシン(Calbiochem203408)が加えられている。培養は、２Ｌの培地を含む５Ｌの振とうフラスコで行った。サンプルを、毎日取り、ＯＤ６００及びα－アミラーゼ活性を測定した。

【０１４７】

図３に示すように、α－アミラーゼ活性が観察され、その最大の活性は、細胞表面から検出された。

【０１４８】

細胞表面に配置されたα－アミラーゼ活性を放出するように、細胞ペレットに対してTritonX-100抽出を試験した。細胞を、2mM$CaCl_2$を含む100 mM MOPSバッファーに懸濁し、TritonX-100を最終濃度０．１％になるように添加した。サンプルを、十分に混合し、室温で１５分間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を、遠心分離により除去し、上清に対してα－アミラーゼの分析を行った。約４５％のα－アミラーゼ活性は、Triton抽出により細胞表面から放出され得る。

【０１４９】

濃縮されたＤＧ_０４の培養上清、細胞及びTriton抽出物に対して、SDS-PAGE及びザイモグラム法によりさらに分析した（図４）。デンプン分解性デイノコッカス株M23-3Aを、基準菌株として用いた。ＤＧ_４を、ザイモグラムゲルに５つの活性バンドを示した。２つの主要なバンドは、１００ｋＤａ付近に検出され、２つの他の活性バンドは６５ｋＤａ付近に位置した。標的α－アミラーゼ（第２のα－アミラーゼ）の理論上の分子量は、１０９ｋＤａであり、主要なバンドの１つが標的酵素である可能性が高い。１つの弱いバンドは５０ｋＤａ付近に観察され、これは第１のα－アミラーゼの分子量（ＭＷ＝５３ｋＤａ）に相当する。親菌株は、いくつかのデンプン分解性遺伝子を含む。しかしながら、明確なシグナル配列は、２つの挿入されたα－アミラーゼ遺伝子からのみ同定されている。従って、同定されていないバンドは、細胞外酵素のタンパク質分解、又は細胞内活性を放出する部分的な細胞溶解に由来し得る。ゲルアーティファクト及びタンパク質凝集は、分析に用いられた非還元条件に起因するザイモグラムの結果についての考えられる説明である。親菌株における最も高い活性は、細胞ペレットサンプル（レーン５）で検出され、活性がTriton抽出により細胞表面から部分的に放出されたため、第２のα－アミラーゼの精製がTriton抽出物から行われ得ることが提示される。デンプン分解性野生株M23-3Aにおいて、５０ｋＤａの分子量を有する非常に弱い活性は、培養上清から検出され（レーン２）、一方、１００ｋＤａ付近の２つの活性バンドが細胞ペレットサンプル（レーン４）で観

察された。その結果は、M23-3A野生株において、小さいM23r-2A.18_109 α－アミラーゼ（第１のα－アミラーゼ）が上清にあることを示す。これに対して、大きいM23-3A.305_673α－アミラーゼ（第２のα－アミラーゼ）が細胞表面に見られる。

【０１５０】

Ｃ．３つの遺伝子の再構成バイオマス分解ユニットを有するデイノコッカス株の操作

ＤＲＨ４６株からのα－Ｌ－アラビノフラノシダーゼ 61_237をコードする配列（arabinofur）を含むＤＮＡ断片、及びpgroESL-catクロラムフェニコール耐性カセットを、ＤＧ_０４株(amy::pTufB-amy1-amy2-pTufA-bleo)のamy2遺伝子のすぐ下流でクロモソームに挿入し、pTufA-bleoを除去し、アミラーゼと同一のオペロンにarabinofur遺伝子を配置した。挿入は、pTufA-bleoカセットのすぐ上流及び下流の領域に相同な５００ｂｐ断片を用いて行い、従ってpTufA-bleoカセットの全部が置換される。その結果生じたＤＧ_１６株(amy:: pTufB -amy1-amy2-arabinofur-pgroESL-cat)は、マーカー置換（bleoからcat）、及びＰＣＲにより確認されたそのオペロン構造で確認した。

【０１５１】

Ｄ．４つの遺伝子の再構成バイオマス分解ユニットを有するデイノコッカス株の操作

－ＤＲＨ４６株からのDRH46.66_2727遺伝子（endocell）をコードするエンドセルラーゼのarabinofur遺伝子の下流への挿入

ＤＲＨ０４６株からのエンドセルラーゼをコードする66_2727遺伝子がBleo耐性遺伝子のオペロンで、pTufAプロモーターの制御下にある場合、以下のコンストラクト(pTufA-endocell-bleo)を含むＤＮＡ断片は、ＤＧ_１６株のクロモソームにおけるarabinofur遺伝子の下流に挿入され、ＤＧ_１６Ｂ(amy::pTufB-amy1-amy2-arabinofur-pTufA-endocell-bleo)が得られた。

【０１５２】

Ｅ．５つの遺伝子の再構成バイオマス分解ユニットを有するデイノコッカス株の操作

Ｍ１－３Ｈ株からのエキソセルラーゼをコードし、pgroESL-sacB$_{Bs}$-cat [sacBであるバチルスサブティリス（Bacillus subtilis）からのレバンスクラーゼ遺伝子がcat 耐性遺伝子のオペロンにあり、pgroESLプロモーターの制御下にある] 転写ユニットをコードする配列が続く284_1-4遺伝子（exocell）を含む挿入カセットを、ＤＧ_１６Ｂ株のクロモソーム内のendocell遺伝子のオペロンに挿入するために用い、その結果、ＤＧ_１６Ｃ株(amy::pTufB-amy1-amy2-arabinofur-pTufA-endocell-exocell-pgroESL-sacB-cat)が得られた。

【０１５３】

Ｆ．アルコール生成転写ユニット及びバイオマス分解ユニットを有するデイノコッカスの操作

ＰＤＣ及びＡＤＨ遺伝子を含むエタノール生成ユニットを、細胞内に挿入し、バイオマス分解ユニットも挿入した。

【０１５４】

Ｆ１．第１の一連の試験において、pgroESLプロモーターの制御下にあり、ザイモモナスモビリス（Zymomonasmobilis）からのピルビン酸デカルボキシラーゼをコードする遺伝子（pdczm）とZ. mobilisからのアルコールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子（adhzm）を有するオペロンを含むカセット、及びpTufA-bleoブレオシン耐性カセットを、ＤＧ_１６株のクロモソーム内のリン酸アセチルトランスフェラーゼをコードする内在性pta遺伝子（26_1230）、又はリン酸アセチルトランスフェラーゼ遺伝子（pta,26_1230）と酢酸キナーゼ遺伝子（act,26_1224）を含む酢酸生成オペロンの全体の位置に挿入した。この結果生じた菌株は、それぞれ、ＤＧ_１７(amy::pTufB-amy1-amy2-arabinofur; pta::pgroESL-pdc$_{Zm}$-adh$_{Zm}$-pTufA-bleo)及びＤＧ_１９と呼ばれる。

【０１５５】

pta遺伝子の欠失のために、pta遺伝子のすぐ上流及び下流の領域に相同な５００ｂｐの断片を相同領域として用いた。（pta遺伝子のオペロンにある）隣接するack遺伝子における極性効果を避けるために、ptaから最初のＡＴＧコドンは保存された。

【０１５６】
酢酸生成オペロン全体の位置における挿入のために、ack-ptaオペロンのすぐ上流及び下流の領域に相同な５００ｂｐの断片を、相同領域として用いた。
【０１５７】
デンプンを加水分解するためのこれらの細菌の能力及び性能は、試験の項に開示されているように決定された。その結果は、以下の表１に示される。
【０１５８】
【表１】

菌株	デンプンの加水分解 (%)
DG	10
DG_04	80
DG_16	80
DG_17	80

【０１５９】
これらの結果は、バイオマス分解ユニットの発現が細菌にデンプンを加水分解する改善された能力を与えることを示す。また、その細菌は未だ生存し、再構成ユニットは増殖特性に影響しない。
【０１６０】
以下の表２に示すように、ＤＧ及びＤＧ_１６のいずれも試験条件においてエタノールを生成しないが、ＤＧ_１７はチューブ内だけでなく、１Ｌの反応器内において多くの量のエタノールを生成する。
【０１６１】
【表２】

	EtOH 生成 (%) コムギ 3%	EtOH 生成 (%) コムギ 6%	EtOH 生成 (%) コムギ 6%
DG	0	0	-
DG_16	0	0	-
DG_17	0.1	0.08	0.04
	チューブ内で行われた試験		１Ｌバイオリアクタ内で行われた試験

【０１６２】

Ｆ２．試験の更なるステップにおいて、他のエタノール生成ユニットが構築され、細胞内に挿入された。これらの試験において、上記Ｆ１の方法と同様に、デイノコッカスＤＲＨ０５のｐｄｃ(SEQ ID NO: 16)及びａｄｈ(SEQ ID NO: 18)遺伝子のコドン最適化配列を用いて、２つの新規の菌株がＤＧ_１６から設計され、ＤＧ_１８(amy::pTufB-amy1-amy2-arabinofur;pta::pgroESL-pdc$_{Zm}$*-adh$_{Zm}$*-pTufA-bleo)及びＤＧ_２０(amy::pTufB-amy1-amy2-arabinofur;pta/ack::pgroESL-pdc$_{Zm}$*-adh$_{Zm}$*-pTufA-bleo)を得た。

【０１６３】

Ｆ３．ＮＡＤＰ依存性ＡＤＨをコードする遺伝子の挿入

代謝フラックス比分析は、親ＤＧ株において、５６％に至るグルコースがペントースリン酸経路を通って消費されることを示し、ＮＡＤＰＨの重要部分が酸化還元電位として生成されることを示す。ＥｔＯＨの生成のためのこのＮＡＤＰＨプールの使用のために、Moorella sp HUC 22-1からのＮＡＤＰ依存性ＡＤＨをコードする遺伝子はＤＧ_１７及びＤＧ_１８株のクロモソーム内のZ.mobilisからのＮＡＤ依存性ＡＤＨ遺伝子の下流に導入される。

【０１６４】

ＤＧ_２１(amy::TufB-amy1-amy2-arabinofur;pta::pgroESL-pdc$_{Zm}$-adh$_{Zm}$-adh$_{Mo}$-pTufA-kan)及びＤＧ_２２(amy::pTufB-amy1-amy2-arabinofur;pta/ack::pgroESL-pdc$_{Zm}$*-adh$_{Zm}$*-adh$_{Mo}$-pTufA-kan)と呼ばれるこれらの新規の菌株は、カナマイシンを含むプレートで菌株を選択することにより得られた。

【０１６５】

これらの菌株は２つの異なる型のＡＤＨを発現し、１つはＮＡＤに依存し、１つはＮＡＤＰに依存する。以下の表３に示すように、共発現はエタノール生成を最大にする。実際に、ＤＧ_１７と比較して、ＤＧ_２１菌株は、両方のＡＤＨ遺伝子の発現の結果、１Ｌバイオリアクタで５倍以上のエタノールを生成した。

【０１６６】

【表３】

	EtOH 生成 (%) コムギ 3%	EtOH 生成 (%) コムギ 6%	EtOH 生成 (%) on コムギ 6%
DG	0	0	-
DG_16	0	0	-
DG_17	0.1	0.08	0.04
DG_21	-	-	0.2
	チューブ内で行われた試験		１Ｌバイオリアクタで行われた試験

【０１６７】

Ｆ４．ＤＲＨ４６菌株からのエンドセルラーゼをコードするDRH46.66_2727 (endocell)遺伝子のarabinofur遺伝子の下流への挿入によるバイオマス分解ユニットの完成

エンドセルラーゼをコードするDRH46.66_2727遺伝子がbleo耐性遺伝子を有するオペロン内でpTufAプロモーターの制御下にある以下のコンストラクト(pTufA-endocell-bleo)を含むＤＮＡ断片を、ＤＧ_２１菌株(amy::pTufB-amy1-amy2-arabinofur;pta::pgroESL-pdc

$_{Zm}$-adh$_{Zm}$-adh$_{Mo}$-pTufB-kan)のクロモソームにおけるarabinofur遺伝子の下流に挿入し、ＤＧ_２３菌株(amy::pTufB-amy1-amy2-arabinofur-pTufA-endocell-bleo;pta::pgroESL-pdc$_{Zm}$-adh$_{Zm}$-adh$_{Mo}$-pTufA-kan)を得た。挿入は、cat遺伝子のすぐ上流及び下流の領域に相同な５００ｂｐの断片を用いて行い、従ってcat遺伝子の全部が置換された。菌株は、マーカー置換（catからbleo）及びＰＣＲにより確認した。

【０１６８】

エンドセルラーゼをコードする遺伝子を、ＤＧ_２２菌株内に挿入し、ＤＧ_２４菌株(amy::pTufB-amy1-amy2-arabinofur-pTufA-endocell-bleo;pta::pgorESL-pdc$_{Zm}$*-adh$_{Zm}$*-adh$_{Mo}$-pTufA-kan)を得た。

【０１６９】

Ｆ５．M1-3H菌株からのエキソセルラーゼをコードするM1-3H.284_1-4(exocell)遺伝子のendocell遺伝子を有するオペロンへの挿入

転写ユニットpgroESL-sacB$_{Bs}$-cat [cat耐性遺伝子を有するオペロン内で、pgroESL プロモーターの制御下にあるバチルスサブティリスからのレバンスクラーゼ遺伝子であるsacB]をコードする配列が続くエキソセルラーゼをコードする284_1-4(exocell)遺伝子を含む挿入カセットを、ＤＧ_２３及びＤＧ_２４のクロモソーム内への挿入に用い、その結果、ＤＧ_２５株(amy::pTufB-amy1-amy2-arabinofur-pTufA-endocell-exocell-pgroESL-sacB-cat,pta::pgroESL-pdc$_{Zm}$-adh$_{Zm}$-adh$_{Mo}$-pTufB-kan)及びＤＧ_２６(amy::pTufB-amy1-amy2-arabinofur-pTufA-endocell-exocell-pgroESL-sacB-cat,pta::pgroESL-pdc$_{Zm}$*-adh$_{Zm}$*-adh$_{Mo}$-pTufA-kan)を得た。挿入は、bleo遺伝子のすぐ上流及び下流の領域に相同な５００ｂｐの断片を用いて行い、従ってbleo遺伝子の全部が置換された。得られた菌株は、そのオペロン構造のＰＣＲにより確認され、マーカー置換（bleoからcat）により確認した。

【０１７０】

Ｇ．ＤＧ_１６における非ＧＭＯエタノールの生成経路の挿入

pgroESLプロモーターの制御下にあるデイノコッカスミサセンシス（Deinococcus misasensis）からのアセトアルデヒドデヒロドゲナーゼをコードする遺伝子(DSM22328.88_978)（SEQ ID NO: 11)、及びデイノコッカスセルロシリティカス（Deinoccocus cellulosilyticus）ＤＲＨ４６(SEQ IDNO: 13)を有するエタノール生成オペロン、並びにpTufA-bleoブレオシン耐性カセットを、ＤＧ_１６株のクロモソームにリン酸アセチルトランスフェラーゼをコードする内在性pta遺伝子（26_1230）の位置で挿入した。得られた菌株はＤＧ_２９(amy::pTufB-amy1-amy2-arabinofur; pta::pgroESL-acdh$_{DSM22328}$-adh$_{drh46}$-pTufA-bleo)と呼ばれる。

【０１７１】

Ｈ．最終変異菌株における抗生物質耐性遺伝子の除去

pgroESL-sacB$_{Bs}$-cat転写ユニットの欠失のために、pgroESL-sacB$_{Bs}$-catに隣接する領域の配列を含むＤＮＡ断片を、ＤＧ_２５及びＤＧ_２６株のクロモソーム内に挿入する。同一の方法が、「エタノール」オペロンからカナマイシン耐性遺伝子を除去するのに用いられる。B. subtilisからのsacB遺伝子は、スクロース毒性をコードするので対抗選択マーカーとして用いられる。最終オペロン構造は、ＰＣＲ及び配列決定により確認した。

【０１７２】

Ｉ．競合代謝経路の欠失によるエタノール生成の最適化

競合活性をコードする４つの標的遺伝子の欠失を、以下の欠失／除去カセットを用いて連続的に行う。カセットの骨格は、pgroESLプロモーターの制御下にあるsacB$_{Bs}$-cat転写ユニット（クロラムフェニコールcat耐性遺伝子を有するオペロンにおけるB. subtilisからのレバンスクラーゼ遺伝子）を含む。このカセットを、ブレオシン選択を用いて、ＤＧ菌株のクロモソーム内において標的遺伝子（一つずつ）の位置に挿入する。各挿入のために、標的位置に隣接する２つのクロモソーム領域が構築される場合、二次ＤＮＡ断片は、クロモソームからのpgroESL-sacB-catユニットの除去、スクロース含有培地での対抗選択をして、完全な欠失を得るために用いられる。

【０１７３】

この方法は、以下の遺伝子欠失のために用いられる：
-アラニンデヒドロゲナーゼをコードする31_22遺伝子
-グルコースデヒドロゲナーゼ１（ＧＨＤ１）をコードする52_885遺伝子
-グルコースデヒドロゲナーゼ２（ＧＨＤ２）をコードする22_1025遺伝子
-ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ（ＰＥＰＣＫ）をコードする52_1088遺伝子
-ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（ＰＥＰＣ）をコードする12_1095遺伝子
-リンゴ酸デヒドロゲナーゼをコードする34_424遺伝子
Ｊ．発酵槽における最適化生成
ＤＧ_２１株を、InforsHT multiforsの２重の１Ｌ発酵槽システムで培養した。両方の容器における培養条件は、４５℃、攪拌器速度が４００ｒｐｍ、流量が６５ｍＬ／ｍｉｎであり、１MNaOH及び１．５Ｍ H_3PO_4によりｐＨ７に維持した。
【０１７４】
種菌は、振とうフラスコ中の１０ｇ／Ｌグルコースを含む複合培地上に播種した。ブレオシン抗生物質を、６μｇ／ｍＬの最終濃度で添加した。種菌の培養条件は、４５℃で１５０ｒｐｍとした。最初の細胞を、グリセロールストックから２０ｍＬの培地を含む２５０ｍＬエルレンマイヤーフラスコに播種した。１６時間後、２００ｍＬの新鮮培地を含む１Ｌエルレンマイヤーフラスコに、ＯＤ６００ｎｍが０．０５となるように播種し、２２時間インキュベートした。２５０ｍＬからの十分な量の細胞懸濁液を、遠心分離機にかけ、１０ｇ／Ｌのグルコースを含む１０ｍＬの複合培地を含む播種ボトルに再懸濁した。細胞を、シリンジを用いて播種ボトルから容器に移した。
【０１７５】
培養培地は、ボトル内に成分を計量することにより調製し、冷水道水で１Ｌのマークまでボトルを満たした。その培地を、容器に注ぎ、１：１０で希釈されたシリカ消泡剤１ｍＬを、滅菌中に泡立つことを防止するために混合液中に加えた。容器は、１２１℃で２５分間オートクレーブした。各容器で用いられた培養培地は、以下の通りである。
【０１７６】
【表４】

容器	基質	NH_4Cl (g/L)	K_2HPO_4 (g/L)	$CaCl_2,\ 2H_2O$ (g/L)
1	コムギ 3%	1	1	0.5
2	澱粉乳 20%	1	1	0.5

【０１７７】
サンプリングは、無菌ボトルを用いることによりサンプリング用配管を介して手動で毎日行った。これらのサンプルからいくつかの分析を行った：
-バイオマスの定量を、ｑＰＣＲ法を実施することにより行った。
-遊離グルコースを、ＹＳＩ分析を用いて定量した。
-ガスクロマトグラフィＦＩＤ分析(Varian CP-WAX 57 CB 25m*0.32mmカラム)を、アルコールを定量するために用いた。
-有機酸を、液体クロマトグラフィ質量分析法(MicrOTOF-QIIBruker)により定量した。
【０１７８】
その結果を以下に示す。それらは、発酵槽において、ＤＧ_２１が約２ｇ／Ｌのタイターのエタノールを生成できることを示す。また、それらは、低グルコース消費及び高細胞密度が達成され得るという点で生成速度が非常に速いことを示し、さらに本発明の細菌の顕著な性能を示す。
【０１７９】

特に、図５は、コムギでの培養において定常期で約７ｇ／Ｌのバイオマス細胞濃度に達し得ることを示し、定常期でさえグルコースの消費が続くことを示す。

【０１８０】

図６は、エタノールの生成が直線的であり、９６時間の培養で約２ｇ／Ｌに達したことを示す。グルコースが培地から枯渇したとき、エタノールの生成はさらに増大せず、プラトーとなることが観察された。相関的に、コハク酸塩及び酢酸塩が上清に検出され、それぞれ、約３．０ｇ／Ｌ及び１．２ｇ／Ｌに達した。

【０１８１】

図７は、澱粉乳での培養下において、約１５ｇ／Ｌのバイオマス細胞密度が定常期で達成され、定常期であってもグルコース消費が続いたことを示す。１４４時間後、残りの総グルコース量は約２０ｇ／Ｌであり、低いグルコース消費速度を示す。

【０１８２】

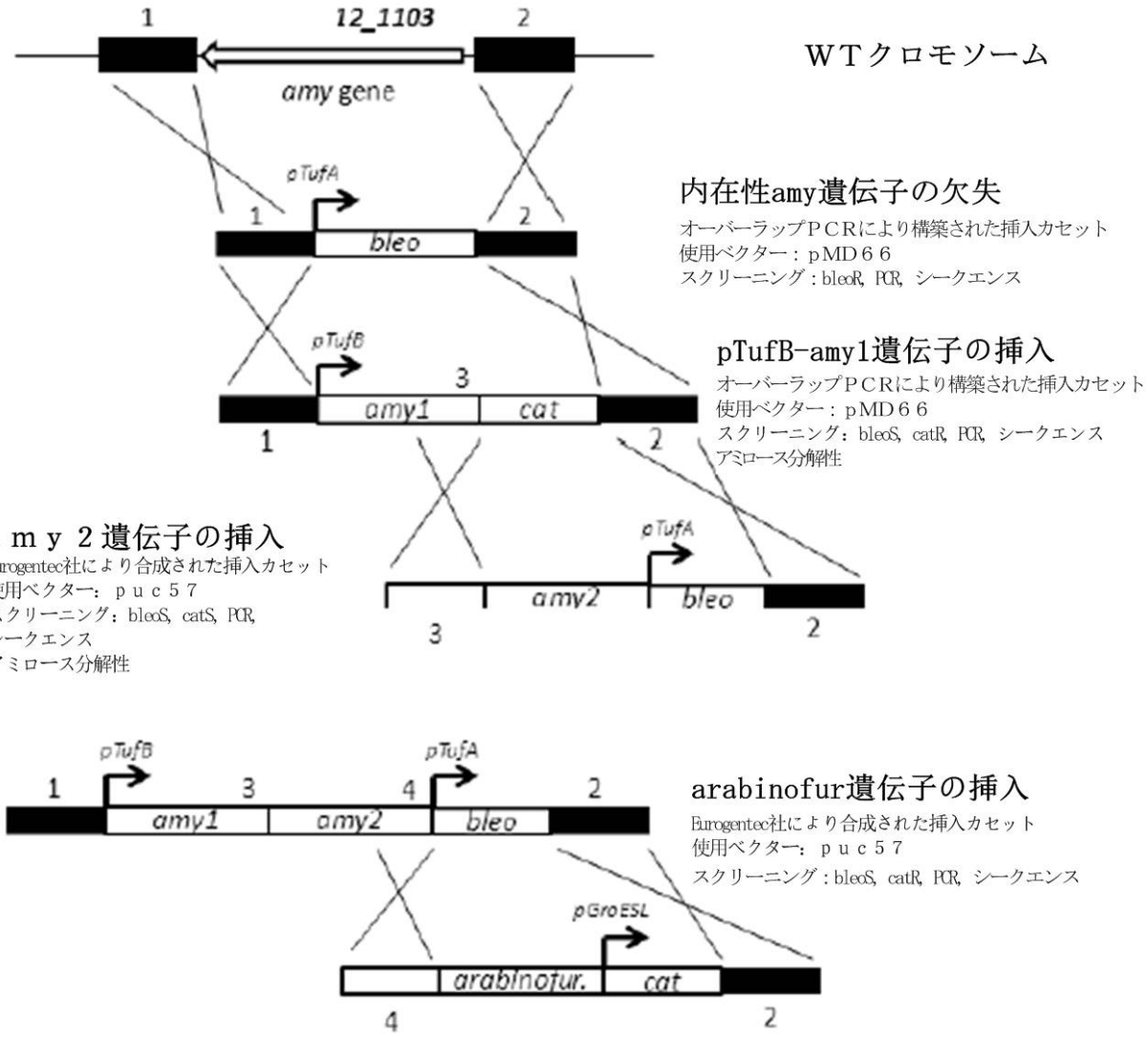
図８は、１４４時間の澱粉乳での培養において、エタノール生成が漸次的に増大し、約２ｇ／Ｌに達したことを示す。相対的に、酢酸塩の生成は顕著に低減した。

【０１８３】

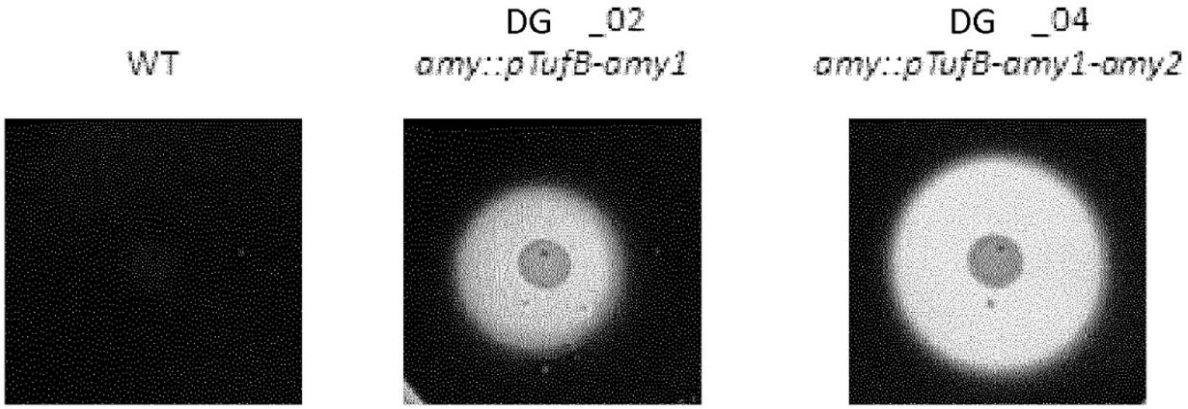
従って、これらの結果は、バイオマスから高レベルのエタノールの生成をする最近の性能を示す。

【図１】

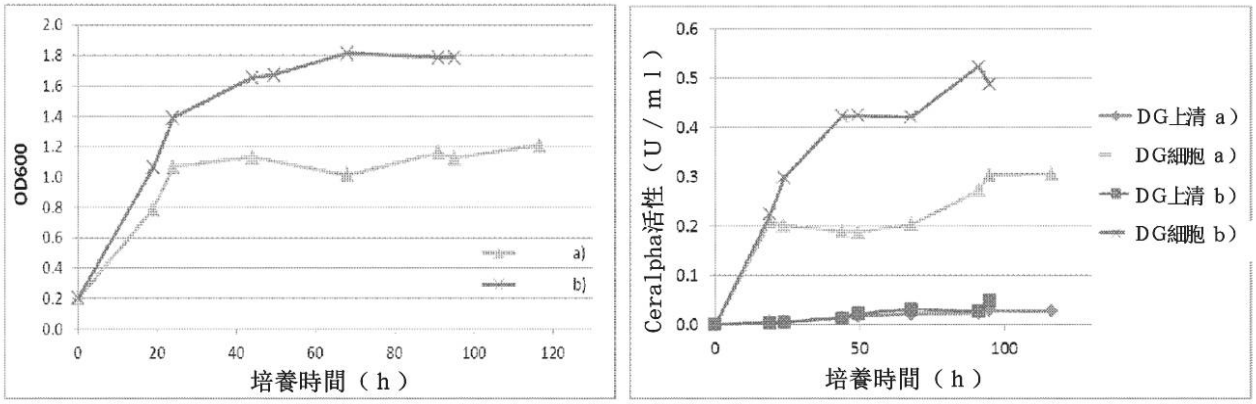
バイオマス分解



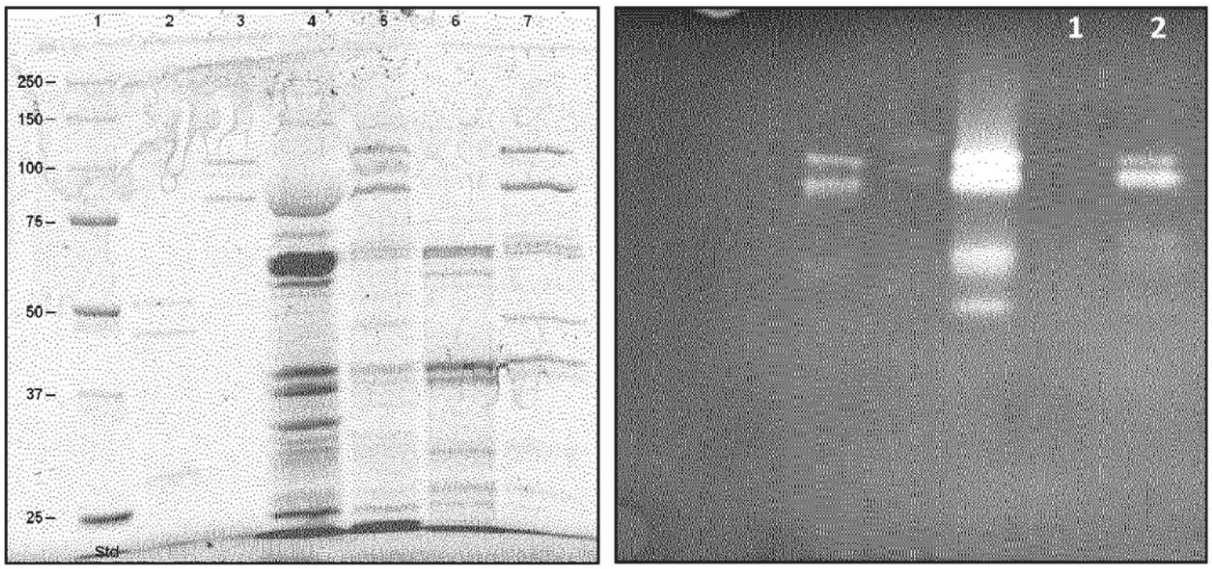
【図２】



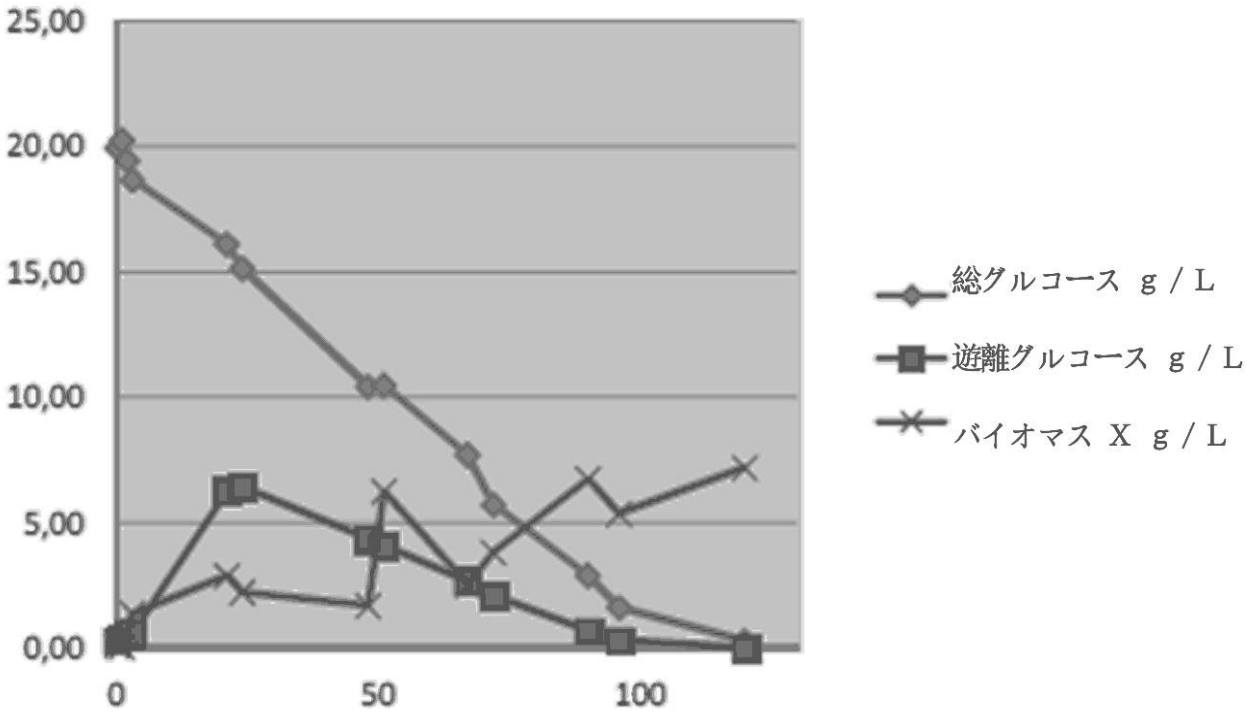
【図３】


OD600
培養時間（ｈ）
a)
b)
Ceralpha活性（Ｕ／ｍｌ）
DG上清 a）
DG細胞 a）
DG上清 b）
DG細胞 b）
培養時間（ｈ）

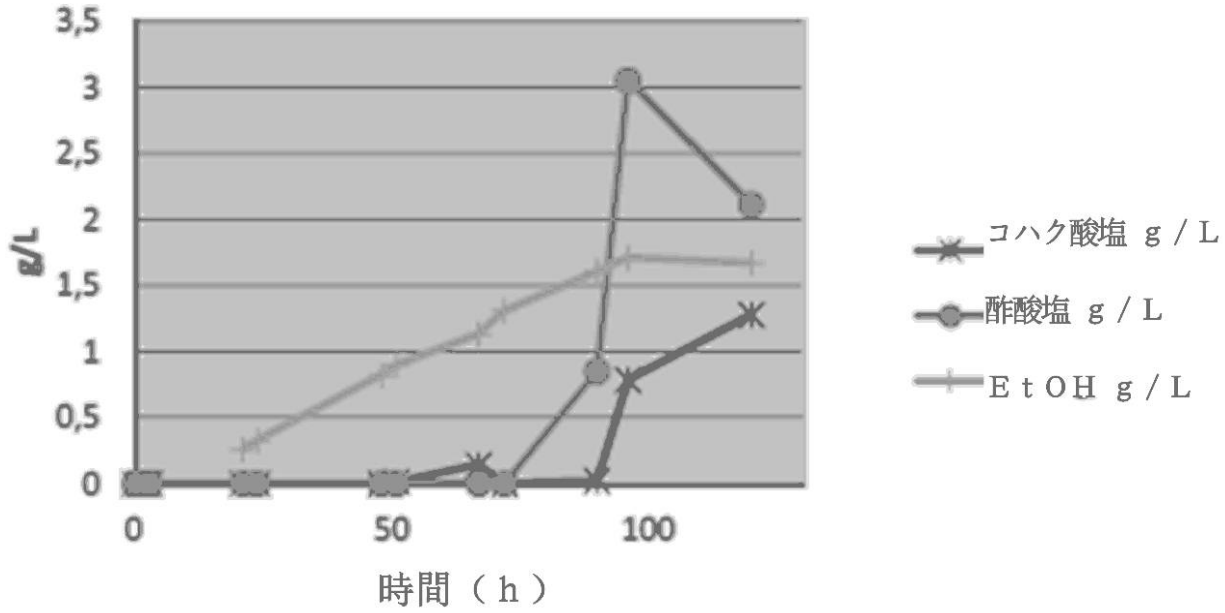
【図４】


1
2
3
4
5
6
7
250
150
100
75
50
37
25
Std
1
2

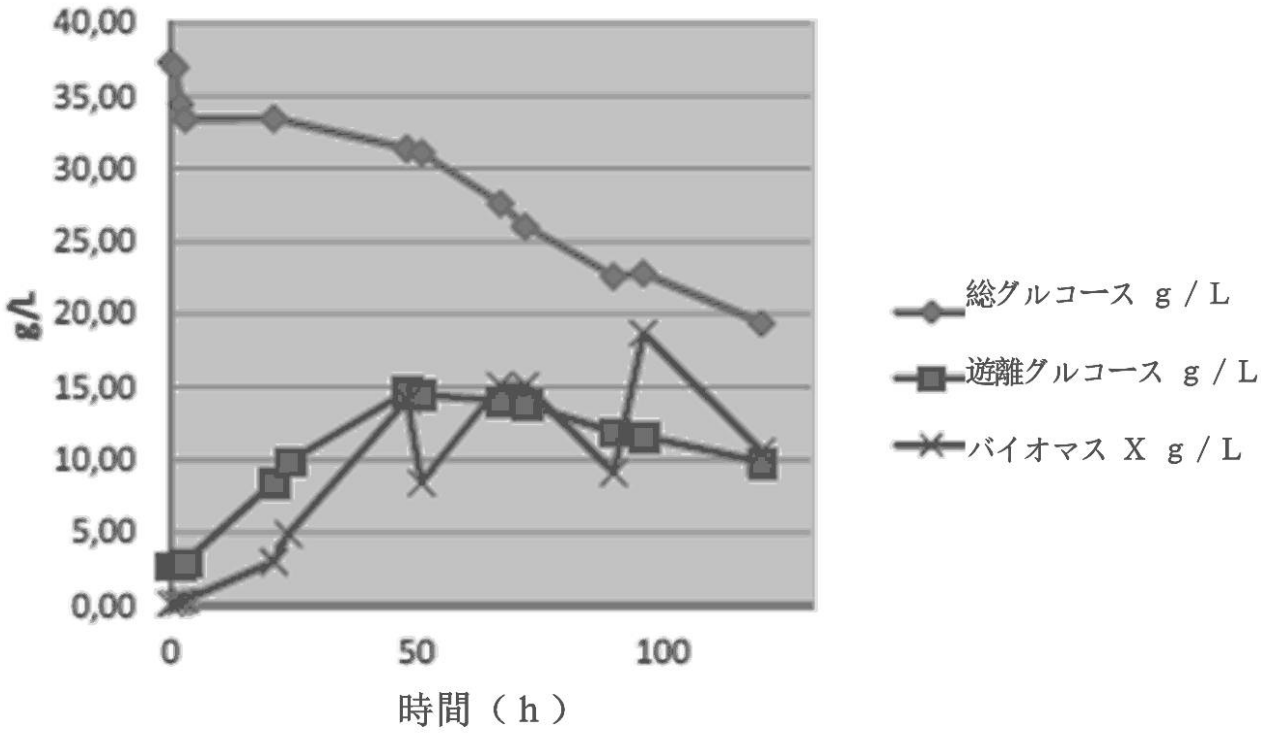
【図５】


25,00
20,00
15,00
10,00
5,00
0,00
0
50
100
総グルコース ｇ／Ｌ
遊離グルコース ｇ／Ｌ
バイオマス Ｘ ｇ／Ｌ

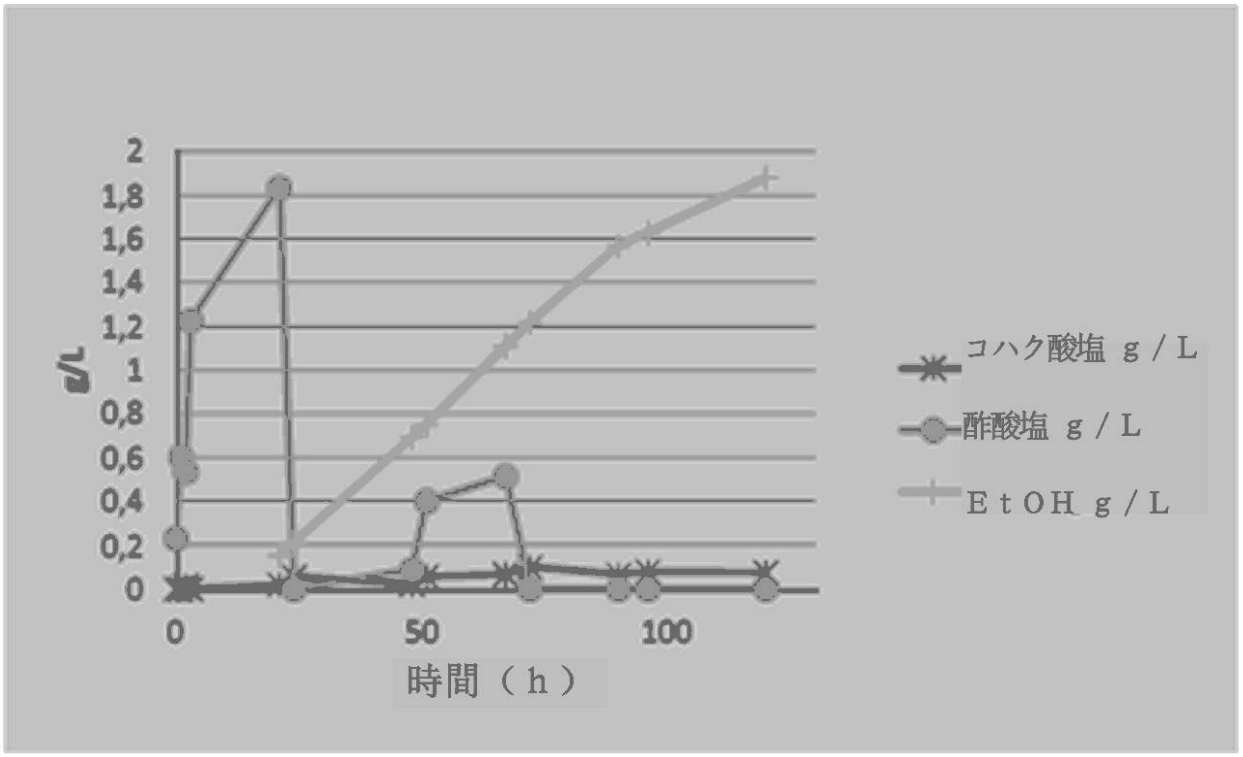
【図６】


3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
g/L
0
50
100
時間（ｈ）
コハク酸塩 ｇ／Ｌ
酢酸塩 ｇ／Ｌ
ＥｔＯＨ ｇ／Ｌ

【図７】


40,00
35,00
30,00
25,00
20,00
15,00
10,00
5,00
0,00
g/L
0
50
100
時間（ｈ）
総グルコース ｇ／Ｌ
遊離グルコース ｇ／Ｌ
バイオマス Ｘ ｇ／Ｌ

【図８】



【配列表】
2015502168000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2012/076571

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

   a. (means)

   [ ] on paper

   [X] in electronic form

   b. (time)

   [X] in the international application as filed

   [ ] together with the international application in electronic form

   [ ] subsequently to this Authority for the purpose of search

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 2009)

International application No.
PCT/EP2012/076571

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-17, 20-26(all partially)

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/076571

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N1/20 C12N9/04 C12N9/10 C12N9/24 C12N9/26
C12N9/42 C12N15/74 C12P7/06 C12N9/00
ADD.
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2010/130806 A1 (DEINOVE [FR]; BITON JACQUES [FR]; GERBER ESTHER [FR]) 18 November 2010 (2010-11-18) cited in the application the whole document example 2	1-17, 20-26
X	WO 2010/094665 A2 (DEINOVE [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; ISOP CATHY [FR]; JOSEPH PAS) 26 August 2010 (2010-08-26)	22-26
Y	the whole document example 5	1-17, 22-26

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
8 April 2013	19/06/2013

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Giebeler, Katharina

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/076571

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/063079 A1 (DEINOVE [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; LEONETTI JEAN-PAUL [FR]; MA) 22 May 2009 (2009-05-22) cited in the application	22-26
Y	the whole document table 2	1-17, 20-26

X	WO 2010/130812 A1 (DEINOVE [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; UNIV MONTPELLIER I [FR]; BI) 18 November 2010 (2010-11-18)	22-26
Y	the whole document table 2	1-17, 20-26

Y	PARK SEOK-HWEE ET AL: "Molecular cloning and characterization of maltogenic amylase from Deinococcus geothermalis DSM 11300", AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. ABSTRACTS OF PAPER. AT THE NATIONAL MEETING, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US, vol. 241, 31 March 2011 (2011-03-31), XP009157696, ISSN: 0065-7727 the whole document	1-17, 20-26

Y	DATABASE UniProt [Online] 13 June 2006 (2006-06-13), "SubName: Full=Alpha amylase, catalytic region; Flags: Precursor;", XP002672747, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:Q1IXJ3 Database accession no. Q1IXJ3 sequence	1-17, 20-26

Y	DATABASE UniProt [Online] 13 June 2006 (2006-06-13), "SubName: Full=Alpha amylase, catalytic region; Flags: Precursor;", XP002672748, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:Q1J0M2 Database accession no. Q1J0M2 sequence	1-17, 20-26

A	HAKI G D ET AL: "Developments in industrially important thermostable enzymes: A review", BIORESOURCE TECHNOLOGY, ELSEVIER BV, GB, vol. 89, no. 1, 1 August 2003 (2003-08-01), pages 17-34, XP002463394, ISSN: 0960-8524, DOI: 10.1016/S0960-8524(03)00033-6 the whole document	1-17, 20-26

	-/--	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/076571

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2005/042750 A1 (NOVOZYMES AS [DK]; OLSEN CARSTEN [DK]; RASMUSSEN MICHAEL DOLBERG [DK]) 12 May 2005 (2005-05-12) the whole document	1-17, 20-26
A	ZHOU SHENGDE ET AL: "Gene integration and expression and extracellular secretion of Erwinia chrysanthemi endoglucanase CelY (celY) and CelZ (celZ) in ethanologenic Klebsiella oxytoca P2", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 67, no. 1, 1 January 2001 (2001-01-01), pages 6-14, XP002192787, ISSN: 0099-2240, DOI: 10.1128/AEM.67.1.6-14.2001 the whole document	1-17, 20-26
A	ZHOU S ET AL: "SIMULTANEOUS SACCHARIFICATION AND FERMENTATION OF AMORPHOUS CELLULOSE TO ETHANOL BY RECOMBINANT KLEBSIELLA OXYTOCA SZ21 WITHOUT SUPPLEMENTAL CELLULASE", BIOTECHNOLOGY LETTERS, KEW, SURREY, GB, vol. 23, no. 18, 1 January 2001 (2001-01-01), pages 1455-1462, XP001064028, ISSN: 0141-5492, DOI: 10.1023/A:1011623509335 the whole document	1-17, 20-26
X,P	WO 2012/062767 A2 (DEINOVE [FR]; LEONETTI JEAN-PAUL [FR]; CLAVERIE JEAN-MICHEL [FR]; JOSE) 18 May 2012 (2012-05-18) cited in the application the whole document sequences 3, 62	1-17, 20-26

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2012/076571

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010130806 A1	18-11-2010	AU 2010247330 A1	01-12-2011
		CA 2760727 A1	18-11-2010
		CN 102421890 A	18-04-2012
		EA 201101627 A1	30-04-2012
		EP 2251415 A1	17-11-2010
		EP 2430150 A1	21-03-2012
		JP 2012526537 A	01-11-2012
		US 2012058533 A1	08-03-2012
		WO 2010130806 A1	18-11-2010
WO 2010094665 A2	26-08-2010	AU 2010215597 A1	25-08-2011
		CA 2751472 A1	26-08-2010
		CN 102369272 A	07-03-2012
		EA 201101213 A1	30-03-2012
		EP 2218773 A1	18-08-2010
		EP 2398891 A2	28-12-2011
		JP 2012517817 A	09-08-2012
		US 2011306085 A1	15-12-2011
		WO 2010094665 A2	26-08-2010
WO 2009063079 A1	22-05-2009	AU 2008322867 A1	22-05-2009
		CA 2704429 A1	22-05-2009
		CN 101861395 A	13-10-2010
		EA 201070605 A1	28-02-2011
		EP 2209900 A1	28-07-2010
		FR 2923491 A1	15-05-2009
		US 2011104766 A1	05-05-2011
		WO 2009063079 A1	22-05-2009
WO 2010130812 A1	18-11-2010	AU 2010247336 A1	19-01-2012
		CA 2761132 A1	18-11-2010
		CN 102482637 A	30-05-2012
		EA 201101626 A1	30-05-2012
		EP 2251414 A1	17-11-2010
		EP 2430149 A1	21-03-2012
		JP 2012526538 A	01-11-2012
		US 2012052540 A1	01-03-2012
		WO 2010130812 A1	18-11-2010
WO 2005042750 A1	12-05-2005	CN 1902318 A	24-01-2007
		EP 1687433 A1	09-08-2006
		US 2007134760 A1	14-06-2007
		US 2010151521 A1	17-06-2010
		WO 2005042750 A1	12-05-2005
WO 2012062767 A2	18-05-2012	AU 2011328211 A1	30-05-2013
		WO 2012062767 A2	18-05-2012

International Application No. PCT/EP2012/076571

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-17, 20-26(all partially)

A Deinococcus or related bacterium comprising a reconstructed biomass degradation transcriptional unit inserted in its genome, said unit comprising at least 2 genes under the control of a single promoter, said at least 2 genes encoding distinct biomass degradation enzymes, whereby the biomass degradation enzyme is amylase; compositions, processes and uses relating thereto.

---

2. claims: 1-17, 20-26(all partially)

A Deinococcus or related bacterium comprising a reconstructed biomass degradation transcriptional unit inserted in its genome, said unit comprising at least 2 genes under the control of a single promoter, said at least 2 genes encoding distinct biomass degradation enzymes, whereby the biomass degradation enzyme is arabinofuranosidase; compositions, processes and uses relating thereto.

---

3. claims: 1-17, 20-26(all partially)

A Deinococcus or related bacterium comprising a reconstructed biomass degradation transcriptional unit inserted in its genome, said unit comprising at least 2 genes under the control of a single promoter, said at least 2 genes encoding distinct biomass degradation enzymes, whereby the biomass degradation enzyme is cellulase; compositions, processes and uses relating thereto.

---

4. claims: 1-3, 5-17, 20-26(all partially)

A Deinococcus or related bacterium comprising a reconstructed biomass degradation transcriptional unit inserted in its genome, said unit comprising at least 2 genes under the control of a single promoter, said at least 2 genes encoding distinct biomass degradation enzymes, whereby the biomass degradation enzyme is xylanase; compositions, processes and uses relating thereto.

---

5. claims: 1-3, 5-17, 20-26(all partially)

A Deinococcus or related bacterium comprising a reconstructed biomass degradation transcriptional unit inserted in its genome, said unit comprising at least 2 genes under the control of a single promoter, said at least 2 genes encoding distinct biomass degradation enzymes,

International Application No. PCT/EP2012/076571

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

whereby the biomass degradation enzyme is laccase; compositions, processes and uses relating thereto.

---

6. claims: 1-3, 5-17, 20-26(all partially)

A Deinococcus or related bacterium comprising a reconstructed biomass degradation transcriptional unit inserted in its genome, said unit comprising at least 2 genes under the control of a single promoter, said at least 2 genes encoding distinct biomass degradation enzymes, whereby the biomass degradation enzyme is alpha-glucuronidase; compositions, processes and uses relating thereto.

---

7. claims: 1-3, 5-17, 20-26(all partially)

A Deinococcus or related bacterium comprising a reconstructed biomass degradation transcriptional unit inserted in its genome, said unit comprising at least 2 genes under the control of a single promoter, said at least 2 genes encoding distinct biomass degradation enzymes, whereby the biomass degradation enzyme is esterase; compositions, processes and uses relating thereto.

---

8. claims: 18(completely); 20-26(partially)

A Deinococcus or related bacterium, wherein said bacterium contains an inactivated phosphate acetyl transferase gene; compositions, processes and uses relating thereto.

---

9. claims: 19(completely); 20-26(partially)

A Deinococcus or related bacterium, wherein said bacterium comprises at least one recombinant nucleic acid sequence encoding an NADP-dependent ADH; compositions, processes and uses relating thereto.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード（参考）
C12N	*9/16*	*(2006.01)*	C12N	9/16		
C12P	*7/10*	*(2006.01)*	C12P	7/10		
C12P	*19/14*	*(2006.01)*	C12P	19/14	A	
C12N	*9/04*	*(2006.01)*	C12N	9/04	E	
C12N	*9/88*	*(2006.01)*	C12N	9/88		
C12N	*9/10*	*(2006.01)*	C12N	9/10		
C12N	*15/09*	*(2006.01)*	C12N	15/00	A	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC

Fターム(参考) 4B024 AA17 BA08 BA10 BA11 BA12 BA13 CA01 CA11 DA05 EA04 GA11
4B050 CC03 DD02 KK15 LL10
4B064 AC01 AC03 CA02 CA19 DA20
4B065 AA01X AA01Y AB01 AC14 BA01 CA05 CA06 CA20 CA55 CA60