

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成26年10月16日 (2014.10.16)

【公表番号】特表2013-539370(P2013-539370A)

【公表日】平成25年10月24日 (2013.10.24)

【年通号数】公開・登録公報2013-058

【出願番号】特願2013-528269(P2013-528269)

【国際特許分類】

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 P 7/16 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 R 1/865 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 Z N A

C 1 2 N 1/15

C 1 2 P 7/16

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 P 7/16

C 1 2 R 1:865

【手続補正書】

【提出日】平成26年8月28日 (2014.8.28)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

イソブタノール生合成経路を含む組換え宿主細胞であって、該経路が、染色体に組み込まれた異種ポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドによって触媒されるピルベートからアセトラクテートへの基質から生成物への変換を含み、該経路が、プラスミド上のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドによって触媒されるアセトラクテートから 2, 3 - ジヒドロキシイソバレレートへの基質から生成物への変換を含み、そしてピルベートからアセトラクテートへの変換を触媒するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが染色体に組み込まれていない組換え宿主細胞と比較して、イソブタノール生成の力価が増加している、上記組換え宿主細胞。

【請求項 2】

2, 3 - ブタンジオール、2 - ブタノール、又は 2 - ブタノン生合成経路を含む組換え宿主細胞であって、該経路が、染色体に組み込まれた異種ポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドによって触媒されるピルベートからアセトラクテートへの基質から生成物への変換を含み、そして該経路が、プラスミド上のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドによって触媒される少なくとも 1 つの基質から生成物への変換を含む、上記組換え宿主細胞。

【請求項 3】

細菌、シアノバクテリア、糸状菌、及び酵母からなる群から選択される、請求項 1 又は

2 に記載の組換え宿主細胞。

【請求項 4】

クロストリジウム属 (*Clostridium*)、ザイモモナス属 (*Zymomonas*)、エシェリキア属 (*Escherichia*)、サルモネラ属 (*Salmonella*)、ロドコッカス属 (*Rhodococcus*)、シュードモナス属 (*Pseudomonas*)、バチルス属 (*Bacillus*)、ラクトバチルス属 (*Lactobacillus*)、エンテロコッカス属 (*Enterococcus*)、アルカリゲネス属 (*Alcaligenes*)、クレブシエラ属 (*Klebsiella*)、パエニバチルス属 (*Paenibacillus*)、アルスロバクター属 (*Arthrobacter*)、コリネバクテリウム属 (*Corynebacterium*)、ブレヴィバクテリウム属 (*Brevibacterium*)、ピキア属 (*Pichia*)、カンジダ属 (*Candida*)、ハンゼヌラ属 (*Hansenula*)、イサチェンキア属 (*Issatchenkia*)、クルイベロミセス属 (*Kluyveromyces*)、及びサッカロミセス属 (*Saccharomyces*) からなる群から選択される属のメンバーである、請求項 1 又は 2 に記載の組換え宿主細胞。

【請求項 5】

大腸菌 (*Escherichia coli*)、ラクトバチルス・プランタルム (*Lactobacillus plantarum*) 又はサッカロミセス・セレビスiae (*Saccharomyces cerevisiae*) である、請求項 1 又は 2 に記載の組換え宿主細胞。

【請求項 6】

ポリペプチドが宿主細胞サイトゾルで発現する、請求項 1 又は 2 に記載の組換え宿主細胞。

【請求項 7】

基質から生成物への変換：2, 3 - ジヒドロキシイソバレレートから - ケトイソバレレート； - ケトイソバレレートからイソブチルアルデヒド；及びイソブチルアルデヒドからイソブタノールへの変換を触媒するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 1 又は 3 ~ 6 のいずれか一項に記載の組換え宿主細胞。

【請求項 8】

基質から生成物への変換：2, 3 - ジヒドロキシイソバレレートから - ケトイソバレレート； - ケトイソバレレートからイソブチリル - CoA；イソブチリル - CoA からイソブチルアルデヒド；及びイソブチルアルデヒドからイソブタノールへの変換を触媒するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 1 又は 3 ~ 6 のいずれか一項に記載の組換え宿主細胞。

【請求項 9】

基質から生成物への変換：2, 3 - ジヒドロキシイソバレレートから - ケトイソバレレート； - ケトイソバレレートからバリン；バリンからイソブチルアミン；イソブチルアミンからイソブチルアルデヒド；及びイソブチルアルデヒドからイソブタノールへの変換を触媒するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 1 又は 3 ~ 6 のいずれか一項に記載の組換え宿主細胞。

【請求項 10】

基質から生成物への変換：アセトラクテートからアセトイン；アセトインから 2, 3 - ブタンジオール；2, 3 - ブタンジオールから 2 - ブタノン；及び 2 - ブタノンから 2 - ブタノールへの変換を触媒するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 2 ~ 6 のいずれか一項に記載の組換え宿主細胞。

【請求項 11】

ピルベートからアセトラクテートへの基質から生成物への変換を触媒するポリペプチドが、アセト乳酸シンターゼである、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の組換え宿主細胞。

【請求項 12】

アセト乳酸シンターゼが、配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、又は 18 から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約 80% の同一性を有する、請求項 11 に記載の組換え宿主。

【請求項 13】

宿主細胞におけるピルビン酸デカルボキシラーゼ、グリセロール - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ、又は Fr a 2 の一つ又はそれ以上の発現が低下するか、又は実質的に排除される、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の組換え宿主細胞。

【請求項 14】

ピルビン酸デカルボキシラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする内在性ポリヌクレオチドに欠失、突然変異、及び / 又は置換を含む、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の組換え宿主細胞。

【請求項 15】

ピルベートからアセトラクテートへの変換を触媒するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが、ピルビン酸デカルボキシラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする内在性ポリヌクレオチドに組み込まれる、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の組換え宿主細胞。

【請求項 16】

ポリヌクレオチドが、PDC 1 - TRX 1 遺伝子間領域で染色体に組み込まれる、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の組換え宿主細胞。

【請求項 17】

(a) ピルベートからアセトラクテートへの基質から生成物への変換を触媒するポリペプチドをコードし、染色体に組み込まれるポリヌクレオチドと；

(b) アセトラクテートから 2, 3 - ジヒドロキシイソバレレートへの基質から生成物への変換を触媒するポリペプチドをコードし、プラスミド上にあるポリヌクレオチドと；

(c) 2, 3 - ジヒドロキシイソバレレートから - ケトイソバレレートへの基質から生成物への変換を触媒するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと；

(d) - ケトイソバレレートからイソブチルアルデヒドへの基質から生成物への変換を触媒するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと；

を含む組換え宿主細胞であって、

ここで宿主細胞がピルビン酸デカルボキシラーゼ活性を実質的に含まず；そして

宿主細胞がイソブタノールを生産する、上記組換え宿主細胞。

【請求項 18】

(a) 請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の組換え宿主細胞、又はそれらの任意の組み合わせを備えるステップと；

(b) 生合成経路生成物が生成される条件下で、宿主細胞を発酵性炭素基質と接触させて発酵ブ罗斯を形成するステップと；

を含む方法。

【請求項 19】

発酵ブ罗斯を抽出剤と接触させて二相発酵混合物を生産するステップをさらに含む、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

抽出剤が、 $C_{12} \sim C_{22}$  脂肪アルコール、 $C_{12} \sim C_{22}$  脂肪酸、 $C_{12} \sim C_{22}$  脂肪酸のエステル、 $C_{12} \sim C_{22}$  脂肪アルデヒド、及び  $C_{12} \sim C_{22}$  脂肪アミドからなる群から選択される水不混和性有機抽出剤を含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

生合成経路生成物がアルコールであり、そして方法が、発酵ブ罗斯を有機酸、及びその有機酸によりアルコールをエステル化する能力を有する酵素と接触させるステップをさらに含む、請求項 18 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

生合成経路生成物がアルコールであり、そして方法が、発酵ブ罗斯の少なくとも一部分

を気化させて、水とアルコールとを含む蒸気流を形成するステップをさらに含む、請求項 18 ~ 21 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

生合成経路生成物がイソブタノールである、請求項 18 ~ 22 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

ブタノール生成速度又は力価が、ピルベートからアセトラクテートへの変換を触媒するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが染色体に組み込まれていない組換え宿主細胞と比較して、少なくとも約 10 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 2 倍、少なくとも約 3 倍、又は少なくとも約 4 倍大きな差で増加する、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

生合成経路のステップを触媒する非組込み型の組換えポリヌクレオチドのコピー数又は発現を増加させる方法であって、

生合成経路の生成物が生産される条件下で、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の組換え宿主細胞を発酵性炭素基質と接触させて発酵ブロスを形成するステップを含む、上記方法。

【請求項 26】

ピルベート利用生合成経路におけるフラックスを増加させる方法であって、

(a) 請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の組換え宿主細胞、又はそれらの任意の組み合わせを備えるステップと；

(b) 宿主細胞におけるピルベート利用生合成経路のフラックスが増加する条件下で、宿主細胞を発酵性炭素基質と接触させて発酵ブロスを形成するステップと；を含む、上記方法。

【請求項 27】

2, 3 - ブタンジオール、イソブタノール、2 - ブタノール、又は 2 - ブタノン生合成経路の生成物の形成を増加させる方法であって、

(i) 請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の組換え宿主細胞、又はそれらの任意の組み合わせを備えるステップと；

(ii) ピルベート利用経路の生成物が形成される条件下で宿主細胞を増殖させるステップと；を含む、

該組換え宿主細胞により形成される生成物の量が、ピルベートからアセトラクテートへの変換を触媒するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが染色体に組み込まれていない宿主細胞により形成される生成物の量より多い、上記方法。

【請求項 28】

(i) 請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の宿主細胞、又はそれらの任意の組み合わせ；

(ii) ブタノール；

(iii) 抽出剤；及び

(iv) 任意にエステル化酵素

を含む組成物。

【請求項 29】

抽出剤が、 $C_{12} \sim C_{22}$  脂肪アルコール、 $C_{12} \sim C_{22}$  脂肪酸、 $C_{12} \sim C_{22}$  脂肪酸のエステル、 $C_{12} \sim C_{22}$  脂肪アルデヒド及び  $C_{12} \sim C_{22}$  脂肪アルデヒドからなる群から選択される水不混和性有機抽出剤である、請求項 28 に記載の組成物。

【請求項 30】

アセトラクテートからアセトイン；アセトインから 3 - アミノ - 2 - ブタノール；3 - アミノ - 2 - ブタノールから 3 - アミノ - 2 - ブタノールホスフェート；及び 3 - アミノ

- 2 - ブタノールホスフェートから 2 - ブタノンへの基質から生成物への変換を触媒するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 2 ~ 6 のいずれか一項に記載の組換え宿主細胞。