

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載
 【部門区分】第1部門第1区分
 【発行日】平成27年4月2日(2015.4.2)

【公表番号】特表2014-506466(P2014-506466A)
 【公表日】平成26年3月17日(2014.3.17)
 【年通号数】公開・登録公報2014-014
 【出願番号】特願2013-553588(P2013-553588)
 【国際特許分類】

C 1 2 N 1/19 (2006.01)
 C 1 2 N 1/15 (2006.01)
 C 1 2 N 1/21 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 C 1 2 P 7/52 (2006.01)
 C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 1/19
 C 1 2 N 1/15 Z N A
 C 1 2 N 1/21
 C 1 2 N 5/00 1 0 1
 C 1 2 P 7/52
 C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】
 【提出日】平成27年2月10日(2015.2.10)

【手続補正1】
 【補正対象書類名】特許請求の範囲
 【補正対象項目名】全文
 【補正方法】変更
 【補正の内容】
 【特許請求の範囲】

【請求項1】

野生型対照と比較して、増加したイソ酪酸の生合成を示すために改変された組み換え微生物細胞であって、前記細胞がイソブチルアルデヒドのイソブチレートへの変換を触媒するポリペプチドをコードする少なくとも1つの異種DNA分子を含む、細胞。

【請求項2】

前記細胞が、サッカロミセス科 (Saccharomycetaceae) のメンバー (例えば、サッカロミセス セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)) などの真菌細胞；又は前記細胞が、プロトバクテリア門 (phylum Protobacteria) のメンバー、腸内細菌科 (Enterobacteriaceae) のメンバー (例えば、大腸菌 (Escherichia coli))、シュードモナス科 (Pseudomonaceae) のメンバー (例えば、シュードモナス プチダ (Pseudomonas putida))、ファーミキューテス門 (phylum Firmicutes) のメンバー、バチルス科 (Bacillaceae) のメンバー (例えば、バチルス ズブチリス (Bacillus subtilis))、若しくはストレプトコッカス科 (Streptococcaceae) のメンバー (例えば、ラクトコッカス ラクティス (Lactococcus lactis)) などの細菌細胞である、請求項1に記載の組み換え微生物細胞。

【請求項3】

前記イソブチルアルデヒドのイソブチレートへの変換を触媒するポリペプチドが、アル

デヒドデヒドロゲナーゼを含み；任意によりここで、前記アルデヒドデヒドロゲナーゼが、大腸菌 (*E. coli*) フェニルアセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ (*PadA*) を含み；又は任意によりここで、前記アルデヒドデヒドロゲナーゼが、大腸菌 (*E. coli*) アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ (*AldB*)、大腸菌 (*E. coli*) 3 ヒドロキシプロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼ (*AlDH*)、大腸菌 (*E. coli*) コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ (*GabD*)、若しくは大腸菌 (*E. coli*) アミノブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ (*YdcW*) を含み；又は任意によりここで、前記アルデヒドデヒドロゲナーゼが、*B. アンピファリア* (*B. ambifaria*) ケトグルタル酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ (*KDH_{ba}*) を含み；又は任意によりここで、前記アルデヒドデヒドロゲナーゼが、*P. プチダ* (*putida*) ケトグルタル酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ (*KDH_{pp}*) を含む、請求項 2 に記載の組み換え微生物細胞。

【請求項 4】

前記細胞が、イソブチルアルデヒドのイソブタノールへの変換を触媒するポリペプチドの遺伝的に改変されたバージョンをさらに含み、ここで前記遺伝的に改変されたバージョンのポリペプチドが、野生型ポリペプチドと比較して、触媒活性の低下を示し；任意によりここで、前記遺伝的に改変されたポリペプチドが、アルコールデヒドロゲナーゼ、例えば、遺伝的に改変された *adhE* 若しくは遺伝的に改変された *adhP* によってコードされるポリペプチドを含むものなどを含み；又は任意によりここで、前記遺伝的に改変されたポリペプチドが、エタノールアミン利用タンパク質、例えば、遺伝的に改変された *eutG* によってコードされるポリペプチドを含むものなどを含み；又は任意によりここで、前記遺伝的に改変されたポリペプチドが、遺伝的に改変された *yiA*、*Y*、遺伝的に改変された *yqhD*、若しくは遺伝的に改変された *yigB* によってコードされるポリペプチドを含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の組み換え微生物細胞。

【請求項 5】

前記触媒活性の低下が、野生型と比較して、少なくとも 50% 低下を含む、請求項 4 に記載の組み換え微生物細胞。

【請求項 6】

前記細胞が、ピルビン酸の、乳酸塩、ギ酸塩、及び酢酸塩の任意の 1 つ以上への変換を触媒するポリペプチドの遺伝的に改変されたバージョンをさらに含み、ここで前記遺伝的に改変されたバージョンのポリペプチドが、野生型のポリペプチドと比較して、触媒活性の低下を示し、任意によりここで、遺伝的に改変されたポリペプチドが、乳酸デヒドロゲナーゼ、例えば、遺伝的に改変された *ldhA* によってコードされるポリペプチドを含むものなどを含み；又は任意によりここで、前記遺伝的に改変されたポリペプチドが、ピルビン酸ギ酸リアーゼ I、例えば、遺伝的に改変された *pf1B* によってコードされるポリペプチドを含むものなどを含み；又は任意によりここで、前記遺伝的に改変されたポリペプチドが、ピルビン酸オキシダーゼ、例えば、遺伝的に改変された *poxB* によってコードされるポリペプチドを含むものなどを含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の組み換え微生物細胞。

【請求項 7】

前記細胞が、アセチル CoA のエタノール又はアセチル P への変換を触媒するポリペプチドの遺伝的に改変されたバージョンをさらに含み、ここで前記遺伝的に改変されたバージョンのポリペプチドが、野生型のポリペプチドと比較して、触媒活性の低下を示し、；任意によりここで、遺伝的に改変されたポリペプチドが、アルコールデヒドロゲナーゼ、例えば、遺伝的に改変された *adhE* によってコードされるポリペプチドを含むものなどを含み；又は任意によりここで、遺伝的に改変されたポリペプチドが、リン酸アセチルトランスフェラーゼ、例えば、遺伝的に改変された *pta* によってコードされるポリペプチドを含むものなどを含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の組み換え微生物細胞。

【請求項 8】

2 ケトイソ吉草酸のイソブチルアルデヒドへの変換を触媒するポリペプチドをさらに含み、任意によりここで、前記ポリペプチドが、2 ケト酸デカルボキシラーゼを含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の組み換え微生物細胞；又はピルビン酸の 2 ケトイソ吉草酸への変換を連続して触媒する複数のポリペプチドをさらに含み、任意によりここで、前記複数のポリペプチドが、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ、ケトール酸レダクトイソメラーゼ、及びアセト乳酸シンターゼの 1 つ以上を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の組み換え微生物細胞。

【請求項 9】

イソブチレートを生成するために組み換え細胞に有効な条件下、炭素源を含む培地において、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の組み換え微生物細胞をインキュベートすることを含む方法であって、ここで前記炭素源が、グルコース、図 1 の化合物 6、図 1 の化合物 7、図 1 の化合物 8、図 1 の化合物 9、及び図 1 の化合物 10 の 1 つ以上を含む、方法。

【請求項 10】

改変された宿主細胞が、イソブチルアルデヒドのイソブチレートへの変換を触媒するように、プロモーターと作動可能に連結した、イソブチルアルデヒドのイソブチレートへの変換を触媒するポリペプチドをコードする異種ポリヌクレオチドを宿主細胞中に導入することを含む方法。

【請求項 11】

前記宿主細胞が、サッカロミセス科 (Saccharomycetaceae) のメンバー (例えば、サッカロミセス セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)) などの真菌細胞；又は前記細胞が、プロトバクテリア門 (phylum Proteobacteria) のメンバー、腸内細菌科 (Enterobacteriaceae) のメンバー (例えば、大腸菌 (Escherichia coli))、シュードモナス科 (Pseudomonaceae) のメンバー (例えば、シュードモナス ブチダ (Pseudomonas putida))、ファーミキューテス門 (phylum Firmicutes) のメンバー、バチルス科 (Bacillaceae) のメンバー (例えば、バチルス ズブチリス (Bacillus subtilis))、若しくはストレプトコッカス科 (Streptococcaceae) のメンバー (例えば、ラクトコッカス ラクティス (Lactococcus lactis)) などの細菌細胞である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記宿主細胞が、請求項 1 ~ 8 に記載の組み換え微生物細胞の 1 つ以上を含む、請求項 10 又は 11 に記載の方法。

【請求項 13】

イソブチレートを他の化合物に変換する 1 つ以上のステップをさらに含む、請求項 9 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

イソブチルアルデヒドをイソブチレートに変換する能力を増加するために改変されたイソブチルアルデヒドのイソブチレートへの変換を触媒する少なくとも 1 つの内因性酵素を含み、さらに、イソブチルアルデヒドのイソブチレート以外の産物への変換を触媒するポリペプチドの遺伝子的に改変されたバージョンを含む、遺伝子的に改変された微生物細胞であって、ここで前記遺伝子的に改変されたバージョンのポリペプチドが、野生型のポリペプチドと比較して、触媒活性の低下を示す、細胞。

【請求項 15】

前記遺伝子的に改変されたバージョンのポリペプチドが、遺伝的に改変されたバージョンのアルコールデヒドロゲナーゼである、請求項 14 に記載の遺伝的に改変された微生物細胞。