

【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25年11月14日(2013.11.14)

【公表番号】特表2013-505740(P2013-505740A)

【公表日】平成25年2月21日(2013.2.21)

【年通号数】公開・登録公報2013-009

【出願番号】特願2012-532274(P2012-532274)

【国際特許分類】

C 12 N	15/09	(2006.01)
C 12 N	1/19	(2006.01)
C 12 N	1/15	(2006.01)
C 12 N	1/21	(2006.01)
C 12 N	5/10	(2006.01)
C 12 P	7/16	(2006.01)
C 12 P	7/42	(2006.01)

【F I】

C 12 N	15/00	A
C 12 N	1/19	Z N A
C 12 N	1/15	
C 12 N	1/21	
C 12 N	5/00	1 0 1
C 12 P	7/16	
C 12 P	7/42	

【手続補正書】

【提出日】平成25年9月27日(2013.9.27)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0192

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0192】

個々のコロニーのパッチを、まず3mlのSEG(2%グルコース、0.1%EtOH)培地に播種し、150rpmの回転ドラム中、30で1晩(20時間)増殖させた。20mlのSEG培地が入っている125mlのフラスコに、1晩培養物をOD600約0.3になるまで播種し、しっかりと蓋を閉めた。150rpmで振盪しながら、培養物を30で増殖させた。一般方法であるHPLCによる分析用に、様々な時点でサンプリングを行った。

図4および5に示す結果から、L.ラクティス(L.lactis)由来のI1vCコード領域を含む酵母株は、シュードモナス・フルオレッセンス(Pseudomonas fluorescens)由来のi1vCおよび出芽酵母(Saccharomyces cerevisiae)由来のILV5を含む酵母株より、速く増殖し、多くのイソブタノールを生成したことがわかる。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0193

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0193】

以上、本発明を要約すると下記のとおりである。

1. ケトール酸レダクトイソメラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの核酸分子を含む酵母細胞であって、該リペプチドが、KARIのSLSLクレードのメンバーである、上記酵母細胞。

2. SLSLクレードが、スタフィロコッカス、リステリア、エンテロコッカス、マクロコッカス、ストレプトコッカス、ラクトコッカス、ロイコノストック、ラクトバチルスからなる群から選択される細菌に内在するケトール酸レダクトイソメラーゼからなる、上記1に記載の酵母細胞。

3. ケトール酸レダクトイソメラーゼ活性を有するポリペプチドは、配列番号：2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、および245からなる群から選択される配列と少なくとも約80%同一であるアミノ酸配列を有する、上記1に記載の酵母細胞。

4. 細胞が、サッカロミセス、シゾサッカロミセス、ハンゼヌラ、カンジダ、クルイベロミセス、ヤロウイア、イサチエンキア、およびピキア（Pichia）からなる群から選択される属の酵母のメンバーである、上記1に記載の酵母細胞。

5. ケトール酸レダクトイソメラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの核酸分子を含むイソブタノール生成微生物細胞であって、該ポリペプチドが、KARIのSLSLクレードのメンバーである、上記微生物細胞。

6. SLSLクレードが、スタフィロコッカス、リステリア、エンテロコッカス、マクロコッカス、ストレプトコッカス、ラクトコッカス、ロイコノストック、ラクトバチルスからなる群から選択される細菌に内在するケトール酸レダクトイソメラーゼからなる、上記5に記載の微生物細胞。

7. ケトール酸レダクトイソメラーゼ活性をコードするポリペプチドが、配列番号：2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、および245からなる群から選択される配列と少なくとも約80%同一であるアミノ酸配列を有する、上記5に記載の微生物細胞。

8. 細胞が細菌細胞または酵母細胞である、上記5に記載の宿主微生物細胞。

9. 宿主細胞が、エシェリキア、ロドコッカス、シュードモナス、バチルス、エンテロコッカス、ラクトコッカス、ラクトバチルス、ロイコノストック、オエノコッカス、ペディオコッカス、ストレプトコッカス、クロストリジウム、ザイモモナス、サルモネラ、ペディオコッカス、アルカリゲネス、クレブシエラ、パエニバチルス、アルスロバクター、コリネバクテリウム、およびブレビバクテリウムからなる群から選択される属の細菌細胞である、上記8に記載の宿主微生物細胞。

10. 宿主細胞が、サッカロミセス、シゾサッカロミセス、ハンゼヌラ、カンジダ、クルイベロミセス、ヤロウイア、イサチエンキア、およびピキアからなる群から選択される属の酵母細胞である、上記8に記載の宿主微生物細胞。

11. アセト乳酸をジヒドロキシイソ吉草酸に変換する方法であって、

a) ケトール酸レダクトイソメラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの核酸分子を含む酵母細胞を備えるステップであって、ここで該ポリペプチドはKARIのSLSLクレードのメンバーである、該ステップと；

b) (a)の酵母細胞とアセト乳酸を接触させるステップであって、ここで2,3-ジヒドロキシイソ吉草酸が生産される、該ステップと；を含む、上記方法。

12. SLSLクレードが、スタフィロコッカス、リステリア、エンテロコッカス、マクロコッカス、ストレプトコッカス、ラクトコッカス、ロイコノストック、ラクトバチルスからなる群から選択される細菌に内在するケトール酸レダクトイソメラーゼからなる、上記11に記載の方法。

13. イソブタノールを生産する方法であって、

a) ケトール酸レダクトイソメラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくと

も1つの核酸分子を含む、イソブタノール生合成経路を含む微生物細胞を備えるステップであって、ここで該ポリペプチドは、KARIのSLSLクレードのメンバーである、該ステップと；

b)ステップ(a)の微生物細胞を、イソブタノールが生成される条件下で増殖させるステップと；

を含む、上記方法。

14. SLSLクレードが、スタフィロコッカス、リストリア、エンテロコッカス、マクロコッカス、ストレプトコッカス、ラクトコッカス、ロイコノストック、ラクトバチルスからなる群から選択される細菌に内在するケトール酸レダクトイソメラーゼからなる、上記13に記載の方法。

15. ケトール酸レダクトイソメラーゼ活性を有するポリペプチドが、配列番号：2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、および245からなる群から選択される配列と少なくとも約80%同一であるアミノ酸配列を有する、上記13に記載の方法。

16. 酵母細胞であって、不活性化されたピルビン酸デカルボキシラーゼ遺伝子を少なくとも1つ有するようにエンジニアリングされ、配列番号：198、203、204、208、または211からなる群から選択されるプラスミドのコード領域と少なくとも約80%同一性を有するコード領域を有するプラスミドを含む、上記酵母細胞。

17. 酵母細胞であって、不活性化されたピルビン酸デカルボキシラーゼ遺伝子を少なくとも1つ有するようにエンジニアリングされ、配列番号：198、203、204、208、または211からなる群から選択されるプラスミドのキメラ遺伝子と少なくとも約80%の同一性を有するキメラ遺伝子を有するプラスミドを含む、上記酵母細胞。

18. 配列番号：198、203、204、208、または211の配列を有するプラスミド。

【手続補正3】

【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】

ケトール酸レダクトイソメラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの核酸分子を含む酵母細胞であって、該リペプチドが、KARIのSLSLクレードのメンバーである、上記酵母細胞。

【請求項2】

ケトール酸レダクトイソメラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの核酸分子を含むイソブタノール生成微生物細胞であって、該ポリペプチドが、KARIのSLSLクレードのメンバーである、上記微生物細胞。

【請求項3】

アセト乳酸をジヒドロキシイソ吉草酸に変換する方法であって、

a)ケトール酸レダクトイソメラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの核酸分子を含む酵母細胞を備えるステップであって、ここで該ポリペプチドはKARIのSLSLクレードのメンバーである、該ステップと；

b)(a)の酵母細胞とアセト乳酸を接触させるステップであって、ここで2,3-ジヒドロキシイソ吉草酸が生産される、該ステップと；を含む、上記方法。

【請求項4】

イソブタノールを生産する方法であって、

a)ケトール酸レダクトイソメラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの核酸分子を含む、イソブタノール生合成経路を含む微生物細胞を備えるステップ

であって、ここで該ポリペプチドは、K A R IのS L S Lクレードのメンバーである、該ステップと；

b)ステップ(a)の微生物細胞を、イソブタノールが生成される条件下で増殖させるステップと；

を含む、上記方法。

【請求項5】

酵母細胞であって、不活化されたピルビン酸デカルボキシラーゼ遺伝子を少なくとも1つ有するようにエンジニアリングされ、配列番号：198、203、204、208、または211からなる群から選択されるプラスミドのコード領域と少なくとも約80%同一性を有するコード領域を有するプラスミドを含む、上記酵母細胞。

【請求項6】

酵母細胞であって、不活化されたピルビン酸デカルボキシラーゼ遺伝子を少なくとも1つ有するようにエンジニアリングされ、配列番号：198、203、204、208、または211からなる群から選択されるプラスミドのキメラ遺伝子と少なくとも約80%の同一性を有するキメラ遺伝子を有するプラスミドを含む、上記酵母細胞。

【請求項7】

配列番号：198、203、204、208、または211の配列を有するプラスミド。