

【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22年7月22日(2010.7.22)

【公開番号】特開2008-29329(P2008-29329A)

【公開日】平成20年2月14日(2008.2.14)

【年通号数】公開・登録公報2008-006

【出願番号】特願2007-163859(P2007-163859)

【国際特許分類】

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 P 7/56 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 1/19

C 1 2 P 7/56 Z N A

C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成22年6月8日(2010.6.8)

【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】

ゼノプス・レービス (Xenopus laevis) 由来の L - 乳酸脱水素酵素をコードする遺伝子が導入された酵母。

【請求項 2】

前記 L - 乳酸脱水素酵素をコードする遺伝子が、配列番号 1 に示す核酸配列を有する遺伝子であることを特徴とする、請求項 1 に記載の酵母。

【請求項 3】

前記酵母がサッカロミセス (Saccharomyces) 属に属することを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の酵母。

【請求項 4】

前記酵母がサッカロミセス・セレビセ (Saccharomyces cerevisiae) であることを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれかの項に記載の酵母。

【請求項 5】

前記 L - 乳酸脱水素酵素をコードする遺伝子が、該遺伝子の発現を可能とするプロモーターの下流に導入されたことを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれかの項に記載の酵母。

【請求項 6】

前記 L - 乳酸脱水素酵素をコードする遺伝子が、染色体上のピルビン酸脱炭酸酵素 1 遺伝子 (PDC 1 遺伝子) のプロモーターの下流に発現可能な状態で導入されたことを特徴とする、請求項 1 ~ 5 いずれかの項に記載の酵母。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれかの項に記載の酵母を培養することを含む、L - 乳酸の製造方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】 0 0 0 8

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 0 0 8 】

上記課題を解決するために、本発明者らが鋭意検討した結果、ゼノプス・レービス (Xenopus laevis) 由来の L - 乳酸脱水素酵素をコードする遺伝子が導入された酵母を培養することにより、従来のウシ由来の L - 乳酸脱水素酵素をコードする遺伝子が導入された酵母を培養することよりも高い対糖収率で L - 乳酸を製造できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 0 0 9

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 0 0 9 】

すなわち、本発明は、ゼノプス・レービス (Xenopus laevis) 由来の L - 乳酸脱水素酵素をコードする遺伝子が導入された酵母を提供するものである。ゼノプス・レービス (Xenopus laevis) 由来の L - 乳酸脱水素酵素をコードする遺伝子が導入された酵母は、好ましくは、配列番号 1 に示す核酸配列を有する遺伝子が導入された酵母である。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 0 1 0

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 0 1 0 】

本発明の別の好ましい態様によれば、ゼノプス・レービス (Xenopus laevis) 由来の L - 乳酸脱水素酵素をコードする遺伝子が導入された酵母は、サッカロミセス (Saccharomyces) 属に属する酵母であり、さらに好ましくはサッカロミセス・セレビセ (Saccharomyces cerevisiae) である。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 0 1 1

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 0 1 1 】

本発明の別の好ましい態様によれば、ゼノプス・レービス (Xenopus laevis) 由来の L - 乳酸脱水素酵素をコードする遺伝子が染色体上のピルビン酸脱炭酸酵素 1 遺伝子 (PDC 1 遺伝子) のプロモーターの下流に発現可能な状態で導入された酵母である。

【手続補正 6】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 0 1 2

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 0 1 2 】

また、本発明は、上記ゼノプス・レービス (*Xenopus laevis*) 由来の L - 乳酸脱水素酵素が導入された酵母を培養することを含む、L - 乳酸の製造方法を提供するものである。

【手続補正 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0017

【補正方法】削除

【補正の内容】

【手続補正 8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0018

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0018】

本発明で使用するゼノプス・レービス (*Xenopus laevis*) 由来の L - ldh 遺伝子は、好ましくは、配列番号 1 に示す核酸配列を有する L - ldh 遺伝子である。

【手続補正 9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0019

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0019】

本発明で使用するゼノプス・レービス (*Xenopus laevis*) 由来の L - ldh 遺伝子には、遺伝的多型性や、変異誘発などによる変異型の遺伝子も含まれる。ここでいう遺伝的多型性とは、遺伝子上の自然突然変異により遺伝子の塩基配列が一部変化しているものである。また、変異誘発とは、人工的に遺伝子に変異を導入することをいい、例えば、部位特異的変異導入用キット (Mutan-K (タカラバイオ社製)) を用いる方法や、ランダム変異導入用キット (BD Diversify PCR Random Mutagenesis (CLONTech 社製)) を用いる方法などがある。

【手続補正 10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0020

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0020】

本発明で使用する酵母は、ゼノプス・レービス (*Xenopus laevis*) 由来の L - ldh 遺伝子を導入しうる酵母であれば制限はないが、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、シゾサッカロミセス (*Schizosaccharomyces*) 属、クリベロミセス (*Kluyveromyces*) 属又はカンジダ (*Candida*) 属に属する酵母が挙げられる。好ましくは、サッカロミセス・セレビス (*Saccharomyces cerevisiae*) であって、具体的には、NBRC 10505 株、NBRC 10506 株が好ましい。

【手続補正 11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0021

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0021】

本発明のゼノプス・レービス (*Xenopus laevis*) 由来の L - 乳酸脱水素酵素をコードする遺伝子を酵母に導入する方法としては、例えば、ゼノプス・レービス (*Xenopus laevis*) 由来の L - ldh 遺伝子をクローニングし、クローニングした該遺伝子を組み込んだ発現ベクターを酵母に形質転換する方法、クローニングした該遺伝子を染色体上の目的箇所に相同組換えで挿入する方法等が挙げられるが、これらに限られるものではない。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0022

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0022】

本発明で使用するゼノプス・レービス (*Xenopus laevis*) 由来の L - ldh 遺伝子をクローニングする方法としては特に制限はなく、既知の手法を用いることができる。例えば、既知の遺伝子情報に基づき、PCR (Polymerase Chain Reaction) 法を用いて必要な遺伝領域を増幅取得する方法や、ゲノムライブラリーや cDNA ライブラリーより相同性や酵素活性を指標としてクローニングする方法などが挙げられる。また、既知のタンパク質情報に基づき化学合成的又は遺伝子工学的に合成する方法も可能である。

【手続補正13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0023

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0023】

クローニングしたゼノプス・レービス (*Xenopus laevis*) 由来の L - ldh 遺伝子を組み込む発現ベクターとしては、酵母で汎用的に利用される発現ベクターを用いることができる。酵母で汎用的に利用される発現ベクターとは、酵母細胞内での自立的複製に必要な配列、大腸菌細胞内での自立的複製に必要な配列、酵母選択マーカー及び大腸菌選択マーカーを有しており、また、組み込んだゼノプス・レービス (*Xenopus laevis*) 由来の L - ldh 遺伝子を発現させるために、その発現を調節するオペレーター、プロモーター、ターミネーター又はエンハンサー等のいわゆる調節配列をも有していることが望ましい。

【手続補正14】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0025

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0025】

調節配列としては、ゼノプス・レービス (*Xenopus laevis*) 由来の L - ldh 遺伝子を発現可能なものであれば特に制限はないが、一例として酸性フォスファターゼ遺伝子 (PHO5)、グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (TDH1, 2, 3)、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子 (ADH1, 2, 3, 4, 5, 6, 7) 遺伝子、ガラクトース代謝系遺伝子 (GAL1, 7, 10)、シトクロム c 遺伝子

(CYC1)、トリオースリン酸イソメラーゼ遺伝子(TPI1)、ホスホグリセレートキナーゼ遺伝子(PGK1)、ホスホフルクトースキナーゼ遺伝子(PFK1)、ビルビンデカルボキシラーゼ遺伝子(PDC1, 5, 6)などのプロモーター配列及びTDH3遺伝子などのターミネーター配列が挙げられる。

【手続補正15】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0026

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0026】

上記発現ベクターのプロモーター下流にゼノプス・レービス(Xenopus laevis)由来のL-l dh遺伝子を導入することにより、該遺伝子を発現可能なベクターが得られる。得られたゼノプス・レービス(Xenopus laevis)由来のL-l dh遺伝子発現ベクターを、後述する方法により酵母に形質転換することにより、ゼノプス・レービス(Xenopus laevis)由来のL-l dh遺伝子を酵母に導入することができる。

【手続補正16】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0027

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0027】

また、ゼノプス・レービス(Xenopus laevis)由来のL-l dh遺伝子を染色体上に挿入することで、ゼノプス・レービス(Xenopus laevis)由来のL-l dh遺伝子を酵母に導入することができる。ゼノプス・レービス(Xenopus laevis)由来のL-l dh遺伝子を染色体中に挿入する方法に特に制限はないが、ゼノプス・レービス(Xenopus laevis)由来のL-l dh遺伝子を含むDNAを後述する方法により酵母に形質転換し、ゼノプス・レービス(Xenopus laevis)由来のL-l dh遺伝子を非相同組み換えによって染色体中のランダムな位置に挿入する方法や、ゼノプス・レービス(Xenopus laevis)由来のL-l dh遺伝子を含むDNAを相同組み換えにより目的とする箇所に挿入する方法などを用いることができる。好ましくは、相同組み換えによる方法である。

【手続補正17】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0028

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0028】

ゼノプス・レービス(Xenopus laevis)由来のL-l dh遺伝子を含むDNAを染色体中の目的箇所に、好ましくはPDC1遺伝子のプロモーターの下流に相同組み換えで挿入する方法としては、ゼノプス・レービス(Xenopus laevis)由来のL-l dh遺伝子を含むDNAの上流及び下流に、導入目的箇所に相同的な部分を付加するようにデザインしたプライマーを用いてPCRを行い、得られたPCR断片を後述する方法により酵母に形質転換する方法が挙げられるが、これに限定されるものではない。また、形質転換株の選択を容易にするために、上記PCR断片には酵母選択マーカが含まれることが好ましい。

## 【手続補正 18】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0030

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0030】

(1) ステップ1: ゼノプス・レービス (Xenopus laevis) 由来の L - l d h 遺伝子の下流にターミネーターがつながったプラスミドを鋳型とし、プライマー 1, 2 をセットとして ゼノプス・レービス (Xenopus laevis) 由来の L - l d h 遺伝子及びターミネーターを含む断片を P C R で増幅する。プライマー 1 は、導入目的箇所の上流側に相対的な配列 40 b p 以上を付加するようにデザインし、プライマー 2 は、ターミネーターより下流のプラスミド由来の配列をもとにデザインする。好ましくは、プライマー 1 に付加する導入目的箇所の上流側に相当する配列は、ビルビン酸脱炭酸酵素 1 遺伝子 ( P D C 1 遺伝子 ) の上流に相当する配列である。

## 【手続補正 19】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0033

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0033】

上記で得られた ゼノプス・レービス (Xenopus laevis) 由来の L - l d h 遺伝子発現ベクターまたは P C R 断片を酵母に導入するには、形質転換、形質導入、トランスフェクション、コトランスフェクションまたはエレクトロポレーション等の方法を用いることができる。具体的には、例えば、酢酸リチウムを用いる方法やプロトプラスト法等がある。

## 【手続補正 20】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0035

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0035】

本発明の ゼノプス・レービス (Xenopus laevis) 由来の L - l d h 遺伝子が導入された酵母を培養することにより、培地中に L - 乳酸を製造することができる。

## 【手続補正 21】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0050

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0050】

(実施例 1: ゼノプス・レービス (Xenopus laevis) 由来の L - l d h 遺伝子発現ベクターの作製)

ゼノプス・レービス (Xenopus laevis) 由来の L - l d h 遺伝子として、配列番号 1 に示す核酸配列を有する L - l d h 遺伝子を使用した。ゼノプス・レービス (Xenopus laevis) 由来の L - l d h 遺伝子のクローニングは P C R 法により行った。P C R には、ゼノプス・レービスの腎臓由来 c D N A ライブラリー (STRATA GENE 社製) より付属のプロトコールに従い調製したファージミド D N A を鋳型とした。

## 【手続補正 2 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 5 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 5 3】

上記ゼノプス・レービス (*Xenopus laevis*) 由来の L - l d h 遺伝子が挿入された p U C 1 1 8 ベクターを制限酵素 S a l I 及び N o t I で切断し、DNA 断片を 1 % アガロースゲル電気泳動により分離、定法に従いゼノプス・レービス (*Xenopus laevis*) 由来の L - l d h 遺伝子を含む断片を精製した。得られた L - l d h 遺伝子を含む断片を、図 2 に示す発現ベクター p T R S 1 1 の X h o I / N o t I 切断部位にライゲーションし、上記と同様な方法でプラスミド DNA を回収し、制限酵素 X h o I 及び N o t I で切断することにより、ゼノプス・レービス (*Xenopus laevis*) 由来の L - l d h 遺伝子が挿入された発現ベクターを選抜した。以後、このようにして作製したゼノプス・レービス (*Xenopus laevis*) 由来の L - l d h 遺伝子を組み込んだ発現ベクターを p T R S 1 0 2 とする。

## 【手続補正 2 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 5 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 5 7】

( 実施例 2 : ゼノプス・レービス (*Xenopus laevis*) 由来の L - l d h 遺伝子発現ベクターの酵母への導入 )

実施例 1 のようにして得られた p T R S 1 0 2 を酵母サッカロミセス・セレピセ N B R C 1 0 5 0 5 株の p d c 1 遺伝子を破壊した株 ( 以下、2 9 - 1 B 株と示す。 ) に形質転換した。形質転換は、YEASTMAKER YEAST Transformation System ( C L O N T E C H 社製 ) を用いた酢酸リチウム法により行い、詳細は付属のプロトコールに従った。宿主とする 2 9 - 1 B 株はウラシル合成能を欠損した株であり、p T R S 1 0 2 の持つ U R A 3 遺伝子の働きにより、ウラシル非添加培地上で p T R S 1 0 2 の導入された形質転換株の選択が可能である。このようにして得られた形質転換株へのゼノプス・レービス (*Xenopus laevis*) 由来の L - l d h 遺伝子発現ベクター導入の確認は、形質転換株から、ゲノム DNA 抽出キット G e n と る く ん ( タカラバイオ社製 ) によりプラスミド DNA を含むゲノム DNA を抽出し、これを鋳型として Premix Taq ( タカラバイオ社製 ) を用いた P C R により行った。確認用プライマーには、ゼノプス・レービス (*Xenopus laevis*) 由来の L - l d h 遺伝子をクローニングした際に用いたプライマー ( 配列番号 3 , 4 ) を使用した。その結果、p T R S 1 0 2 を形質転換した株において、ゼノプス・レービス (*Xenopus laevis*) 由来 L - l d h 遺伝子が導入されていることを確認した。以下、上記 p T R S 1 0 2 が導入された形質転換株を 2 9 - 1 B / p T R S 1 0 2 株とする。

## 【手続補正 2 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 5 9

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 5 9】

( 実施例 3 : ゼノプス・レービス (*Xenopus laevis*) 由来の L - l d h 遺伝子の P D C 1 遺伝子座への導入 )

実施例 1 で得られた p T R S 1 0 2 を増幅鋳型とし、オリゴヌクレオチド（配列番号 7 , 8 ）をプライマーセットとした P C R により、ゼノプス・レービス ( X e n o p u s l a e v i s ) 由来の L - l d h 遺伝子及び T D H 3 ターミネーター配列を含む 1 . 3 k b の P C R 断片を増幅した（図 1 のステップ 1 に相当）。ここで配列番号 7 は、P D C 1 遺伝子の開始コドンから上流 6 5 b p に相当する配列が付加されるようデザインした。

【手続補正 2 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 6 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 6 3】

上記のようにして得られた形質転換株が、ゼノプス・レービス ( X e n o p u s l a e v i s ) 由来の L - l d h 遺伝子が染色体上の P D C 1 遺伝子プロモーターの下流に導入されている酵母であることの確認は下記のように行った。まず、形質転換株のゲノム D N A をゲノム D N A 抽出キット G e n とるくん（タカラバイオ社製）により調製し、これを増幅鋳型とし、オリゴヌクレオチド（配列番号 1 1 , 1 2 ）をプライマーセットとした P C R により、約 2 . 8 k b の増幅 D N A 断片が得られることで確認した。なお、非形質転換株では、上記 P C R によって約 2 . 1 k b の増幅 D N A 断片が得られる。以下、上記 ゼノプス・レービス ( X e n o p u s l a e v i s ) 由来の L - l d h 遺伝子が染色体上の P D C 1 遺伝子プロモーターの下流に導入された形質転換株を、B 2 株とする。なお、P D C 1 遺伝子の上流及び下流配列は、S a c c h a r o m y c e s G e n o m e D a t a b a s e ( URL: <http://www.yeastgenome.org/> ) より取得することができる。

【手続補正 2 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 7 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 7 7】

表 2 及び表 3 の結果から、ゼノプス・レービス ( X e n o p u s l a e v i s ) 由来の L - l d h 遺伝子が導入された酵母を培養することにより、ウシ由来の L - l d h 遺伝子が導入された酵母を培養することよりも高い対糖収率で L - 乳酸を製造することができた。

【手続補正 2 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 7 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 7 8】

（実施例 6 : ゼノプス・レービス ( X e n o p u s l a e v i s ) 由来の L - l d h 遺伝子の T D H 3 遺伝子座への導入）

染色体中に挿入するゼノプス・レービス ( X e n o p u s l a e v i s ) 由来の L - l d h 遺伝子を T D H 3 プロモーターの下流に導入することで乳酸生産性の向上が可能であるか検討を行った。

【手続補正 2 8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 7 9



【補正方法】変更

【補正の内容】

【0079】

実施例3と同様な方法でゼノプス・レービス (Xenopus laevis)由来のL-ldh遺伝子をTDH3遺伝子座に導入するために、pTRS102のTDH3ターミネーターをADH1ターミネーターに変更したプラスミドを作製した。

【手続補正29】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0083

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0083】

このpTRS150を鋳型とし、オリゴヌクレオチド(配列番号8, 15)をプライマーセットとしたPCRにより、ゼノプス・レービス (Xenopus laevis)由来のL-ldh遺伝子及びADH1ターミネーター配列を含む1.3kbのPCR断片を増幅した。ここで配列番号15のプライマーは、TDH3遺伝子の開始コドンから上流60bpに相当する配列が付加されるようデザインした。

【手続補正30】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0085

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0085】

それぞれのPCR断片を1%アガロースゲル電気泳動により分離、常法に従い精製した。ここで得られた各1.3kb断片、1.2kb断片を混合したものを増幅鋳型とし、オリゴヌクレオチド(配列番号15, 16)をプライマーセットとしたPCR法によって、ゼノプス・レービス (Xenopus laevis)由来のL-ldh遺伝子、ADH1ターミネーター及びURA3遺伝子が連結された約2.5kbのPCR断片を増幅した。

【手続補正31】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0086

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0086】

上記のPCR断片を1%アガロースゲル電気泳動により分離、常法に従い精製後、ゼノプス・レービス (Xenopus laevis)由来のL-ldh遺伝子がpdc1遺伝子座に導入されたB2株に形質転換し、ウラシル非添加培地で培養することにより、ゼノプス・レービス (Xenopus laevis)由来のL-ldh遺伝子が染色体上のTDH3遺伝子プロモーターの下流に導入されている形質転換株を選択した。

【手続補正32】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0087

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0087】

上記のようにして得られた形質転換株が、ゼノプス・レービス (Xenopus laevis) 由来の L - l d h 遺伝子が染色体上の T D H 3 遺伝子プロモーターの下流に導入されている酵母であることの確認は下記のように行った。まず、形質転換株のゲノム D N A をゲノム D N A 抽出キット G e n とるくん (タカラバイオ社製) により調製し、これを増幅鋳型とし、オリゴヌクレオチド (配列番号 17, 18) をプライマーセットとした P C R により、約 2.8 k b の増幅 D N A 断片が得られることで確認した。なお、非形質転換株では、上記 P C R によって約 2.1 k b の増幅 D N A 断片が得られる。以下、上記 ゼノプス・レービス (Xenopus laevis) 由来の L - l d h 遺伝子が染色体上の T D H 3 遺伝子プロモーターの下流に導入された形質転換株を B 3 株とする。なお、T D H 3 遺伝子座の上流及び下流配列は、S a c c h a r o m y c e s G e n o m e D a t a b a s e (URL: <http://www.yeastgenome.org/>) より取得することができる。

【手続補正 33】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0091

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0091】

表 4 の結果から、ゼノプス・レービス (Xenopus laevis) 由来の L - 乳酸脱水素酵素をコードする遺伝子が染色体上の P D C 1 遺伝子のプロモーターの下流に発現可能な状態で導入された酵母を改良することにより、より高い対糖収率で L - 乳酸を製造可能な酵母が作出できた。

【手続補正 34】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0092

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0092】

また、本発明の ゼノプス・レービス (Xenopus laevis) 由来の L - l d h 遺伝子が導入された酵母を既知の方法で更に改良し、該酵母を培養することでより高い対糖収率で L - 乳酸を製造することが可能である。

【手続補正 35】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0093

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0093】

(実施例 8、比較例 6: L - 乳酸脱水素酵素の活性)

実施例 2、比較例 2 で得られた 29 - 1 B / p T R S 102 株及び 29 - 1 B / p T R S 49 株を用いて、p H 5 ~ 7 における ゼノプス・レービス (Xenopus laevis) 由来の L - 乳酸脱水素酵素活性及びウシ由来の L - 乳酸脱水素酵素活性を比較した。

【手続補正 36】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0099

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【 0 0 9 9 】

この結果から、pH 5 ~ 7 において、ゼノプス・レービス (Xenopus laevis) 由来の L - 乳酸脱水素酵素活性は、ウシ由来の L - 乳酸脱水素酵素の活性よりも高いことがわかった。また、表 2 及び表 3 の結果から、本発明のゼノプス・レービス (Xenopus laevis) 由来の L - ldh 遺伝子が導入された酵母を培養することにより、ウシ由来の L - ldh 遺伝子が導入された酵母を培養することよりも高い対糖収率で L - 乳酸を製造することができることがわかった。