

【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23年6月23日(2011.6.23)

【公表番号】特表2010-526536(P2010-526536A)

【公表日】平成22年8月5日(2010.8.5)

【年通号数】公開・登録公報2010-031

【出願番号】特願2010-507693(P2010-507693)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 P 7/06 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 R 1/01 (2006.01)

C 1 2 R 1/145 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 P 7/06 Z N A

C 1 2 P 7/06

C 1 2 N 1/21

C 1 2 P 7/06

C 1 2 R 1:01

C 1 2 P 7/06

C 1 2 R 1:145

【手続補正書】

【提出日】平成23年5月6日(2011.5.6)

【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】

配列番号 1 ～ 5、30 ～ 31、および 47 ～ 61 のいずれか 1 つのヌクレオチド配列、またはその相補体を含む、単離された核酸分子。

【請求項 2】

配列番号 1 ～ 5、30 ～ 31、および 47 ～ 61 のいずれか 1 つのヌクレオチド配列、またはその相補体と少なくとも 80 % の同一性を共有するヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項 3】

配列番号 1 ～ 5、30 ～ 31、および 47 ～ 61 のいずれか 1 つのヌクレオチド配列、またはその相補体と少なくとも約 95 % の配列同一性を有することを特徴とする、請求項 2 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 4】

好熱性または中温性の細菌において発現可能なプロモーターに機能的に連結された配列番号 1 ～ 5、30 ～ 31、および 47 ～ 61 のいずれか 1 つを含む、遺伝子構築物。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の遺伝子構築物を含む、組み換え好熱性または中温性の細菌。

【請求項 6】

請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項記載の核酸分子を含む、ベクター。

## 【請求項 7】

請求項 1～3 のいずれか 1 項記載の核酸分子を含む、宿主細胞。

## 【請求項 8】

第 1 の天然遺伝子が、部分的、実質的、もしくは完全に欠失、サイレンシング、不活化、またはダウンレギュレートされた、遺伝子改変された好熱性または中温性の微生物であって、

前記第 1 の天然遺伝子が、有機酸またはその塩の代謝産生に関与する第 1 の天然酵素をコードし、それによって、発酵生成物としてエタノールを産生する前記好熱性または中温性の微生物の天然の能力を増大させる、微生物。

## 【請求項 9】

前記微生物が、サーモアナエロバクテリウム (*Thermoanaerobacterium*)、サーモアナエロバクター (*Thermoanaerobacter*)、クロストリジウム (*Clostridium*)、ゲオバチルス (*Geobacillus*)、サッカロコッカス (*Saccharococcus*)、パエニバチルス (*Paenibacillus*)、バチルス (*Bacillus*)、カルディセルロシルプター (*Caldicellulosiruptor*)、アネロセルム (*Anaerocellum*) または アノキシバチルス (*Anoxybacillus*) 属の種であることを特徴とする、請求項 8 に記載の遺伝子改変微生物。

## 【請求項 10】

前記微生物が、下記：サーモアナエロバクテリウム・サーモスルフリゲネス (*Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes*)、サーモアナエロバクテリウム・アオテアロエンシス (*Thermoanaerobacterium aotearoense*)、サーモアナエロバクテリウム・ポリサッカロリティカム (*Thermoanaerobacterium polysaccharolyticum*)、サーモアナエロバクテリウム・ジアエ (*Thermoanaerobacterium zeae*)、サーモアナエロバクテリウム・キシラノリティカム (*Thermoanaerobacterium xylanolyticum*)、サーモアナエロバクテリウム・サッカロリティカム (*Thermoanaerobacterium saccharolyticum*)、サーモアナエロビウム・ブロッキイ (*Thermoanaerobium brockii*)、サーモアナエロバクテリウム・サーモサッカロリティカム (*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*)、サーモアナエロバクター・サーモヒドロスルフリカス (*Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus*)、サーモアナエロバクター・エタノリカス (*Thermoanaerobacter ethanolicus*)、サーモアナエロバクター・ブロッキイ (*Thermoanaerobacter brockii*)、クロストリジウム・サーモセルム (*Clostridium thermocellum*)、クロストリジウム・セルロリティカム (*Clostridium cellulolyticum*)、クロストリジウム・ファイトファーメンタンス (*Clostridium phytofermentans*)、クロストリジウム・ストラミノソルベンス (*Clostridium straminosolvens*)、ゲオバチルス・サーモグルコシダシウス (*Geobacillus thermoglucosidasius*)、ゲオバチルス・ステアロサーモフィラス (*Geobacillus stearothermophilus*)、サッカロコッカス・カルドキシロリティクス (*Saccharococcus caldoxylosilyticus*)、サッカロコッカス・サーモフィラス (*Saccharococcus thermophilus*)、パエニバチルス・キャンピナセンシス (*Paenibacillus campinasensis*)、バチルス・フラボテルムス (*Bacillus flavothermus*)、アノキシバチルス・カムチャッカエンシス (*Anoxybacillus kamchatkensis*)、アノキシバチルス・ゴネンシス (*Anoxybaci*

illus gonensis)、カルディセルロシルプター・アセチゲネス(Caldicellulosiruptor acetigenus)、カルディセルロシルプター・サッカロリティカス(Caldicellulosiruptor saccharolyticus)、カルディセルロシルプター・クリストヤンソニー(Caldicellulosiruptor kristjanssonii)、カルディセルロシルプター・オーウェンセンシス(Caldicellulosiruptor owensensis)、カルディセルロシルプター・ラクトアセティカス(Caldicellulosiruptor lactoaceticus)、およびアネロセルム・テルモフィルム(Anaerocellum thermophilum)からなる群より選択される細菌であることを特徴とする、請求項8に記載の遺伝子改変微生物。

【請求項11】

前記微生物が、下記：

(a) ヘキソース糖を代謝する天然の能力を有する好熱性または中温性の微生物；  
(b) ペントース糖を代謝する天然の能力を有する好熱性または中温性の微生物；  
(c) ヘキソース糖およびペントース糖を代謝する天然の能力を有する好熱性または中温性の微生物

(d) セルロースを加水分解する天然の能力を有する好熱性または中温性の微生物；

(e) キシランを加水分解する天然の能力を有する好熱性または中温性の微生物；ならびに

(f) セルロースおよびキシランを加水分解する天然の能力を有する好熱性または中温性の微生物

からなる群より選択されることを特徴とする、請求項8に記載の遺伝子改変微生物。

【請求項12】

前記微生物が、ヘキソース糖を代謝する天然の能力を有し、

第1の非天然遺伝子が挿入され、ここで、前記第1の非天然遺伝子が、ペントース糖を代謝する能力を付与する第1の非天然酵素をコードし、それによって、前記好熱性または中温性の微生物に、ペントース糖からの発酵生成物としてエタノールを産生させることを特徴とする、請求項8に記載の遺伝子改変微生物。

【請求項13】

前記微生物が、ペントース糖を代謝する天然の能力を有し、

第1の非天然遺伝子が挿入され、ここで、前記第1の非天然遺伝子が、ヘキソース糖を代謝する能力を付与する第1の非天然酵素をコードし、それによって、前記好熱性または中温性の微生物に、ヘキソース糖からの発酵生成物としてエタノールを産生させることをすることを特徴とする、請求項8に記載の遺伝子改変微生物。

【請求項14】

前記有機酸が、乳酸および酢酸からなる群より選択されることを特徴とする、請求項8に記載の遺伝子改変微生物。

【請求項15】

前記第1の天然酵素が、乳酸デヒドロゲナーゼ、酢酸キナーゼ、およびホスホトランスアセチラーゼからなる群より選択されることを特徴とする、請求項8に記載の遺伝子改変微生物。

【請求項16】

第2の天然遺伝子が、部分的、実質的、もしくは完全に欠失、サイレンシング、不活化、またはダウンレギュレートされ、ここで、前記第2の天然遺伝子が、有機酸またはその塩の代謝産生に関与する第2の天然酵素をコードすることを特徴とする、請求項8に記載の遺伝子改変微生物。

【請求項17】

前記第2の天然酵素が、乳酸デヒドロゲナーゼ、酢酸キナーゼまたはホスホトランスアセチラーゼであることを特徴とする、請求項16に記載の遺伝子改変微生物。

【請求項18】

遺伝子改変された好熱性または中温性の微生物であって、

(a) 第1の天然遺伝子が、部分的、実質的、もしくは完全に欠失、サイレンシング、不活化、またはダウンレギュレートされ、ここで、前記第1の天然遺伝子が、有機酸またはその塩の代謝産生に關与する第1の天然酵素をコードし、

(b) 第1の非天然遺伝子が挿入され、ここで、前記第1の非天然遺伝子が、エタノールの代謝産生に關与する第1の非天然酵素をコードし、それによって、前記好熱性または中温性の微生物に、発酵生成物としてエタノールを産生させることを特徴とする、微生物。

【請求項19】

前記第1の非天然遺伝子が、ヘキソース糖またはペントース糖を代謝する能力を付与する第1の非天然酵素をコードすることを特徴とする、請求項18に記載の遺伝子改変微生物。

【請求項20】

前記第1の非天然遺伝子が、ヘキソース糖を代謝する能力を付与する第1の非天然酵素をコードし；

第2の非天然遺伝子が挿入され、ここで、前記第2の非天然遺伝子が、ペントース糖を代謝する能力を付与する第2の非天然酵素をコードすることを特徴とする、請求項18に記載の遺伝子改変微生物。

【請求項21】

前記有機酸が乳酸または酢酸であることを特徴とする、請求項18のいずれか1項記載の遺伝子改変微生物。

【請求項22】

前記第1の非天然酵素が、ピルビン酸デカルボキシラーゼ(PDC)またはアルコールデヒドロゲナーゼ(ADH)であることを特徴とする、請求項18に記載の遺伝子改変微生物。

【請求項23】

前記第2の非天然酵素が、キシロースイソメラーゼであるか、または、前記第2の非天然遺伝子が配列番号6、10、または14に対応することを特徴とする、請求項20に記載の遺伝子改変微生物。

【請求項24】

前記第2の非天然酵素が、キシロキナーゼであるか、または、前記第2の非天然遺伝子が配列番号7、11、または15に対応することを特徴とする、請求項20に記載の遺伝子改変微生物。

【請求項25】

前記第2の非天然酵素が、L-アラビノースイソメラーゼであるか、または、前記第2の非天然遺伝子が配列番号8、または12に対応することを特徴とする、請求項20に記載の遺伝子改変微生物。

【請求項26】

前記第2の非天然酵素が、L-リブロース-5-リン酸4-エピメラーゼであるか、または、前記第2の非天然遺伝子が配列番号9、または13に対応することを特徴とする、請求項20に記載の遺伝子改変微生物。

【請求項27】

前記微生物が、セルロースを加水分解する天然の能力を有し、

第1の非天然遺伝子が挿入され、ここで、前記第1の非天然遺伝子が、キシランを加水分解する能力を付与する第1の非天然酵素をコードすることを特徴とする、請求項8に記載の遺伝子改変微生物。

【請求項28】

前記微生物が、キシランを加水分解する天然の能力を有し、

第1の非天然遺伝子が挿入され、ここで、前記第1の非天然遺伝子が、セルロースを加水分解する能力を付与する第1の非天然酵素をコードすることを特徴とする、請求項8に

記載の遺伝子改変微生物。

【請求項 29】

前記第1の天然酵素が、乳酸デヒドロゲナーゼ、酢酸キナーゼ、およびホスホトランスアセチラーゼからなる群より選択されることを特徴とする、請求項18記載の遺伝子改変微生物。

【請求項 30】

第2の天然遺伝子が、部分的、実質的、もしくは完全に欠失、サイレンシング、不活化、またはダウンレギュレートされた、請求項18記載の遺伝子改変微生物であって、

前記第2の天然遺伝子が、有機酸またはその塩の代謝産生に關与する第2の天然酵素をコードすることを特徴とする、遺伝子改変微生物。

【請求項 31】

前記第2の天然酵素が、酢酸キナーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、またはホスホトランスアセチラーゼであることを特徴とする、請求項30に記載の遺伝子改変微生物。

【請求項 32】

遺伝子改変された好熱性または中温性の微生物であって、

(a) 第1の天然遺伝子が、部分的、実質的、もしくは完全に欠失、サイレンシング、不活化、またはダウンレギュレートされ、ここで、前記第1の天然遺伝子が、有機酸またはその塩の代謝産生に關与する第1の天然酵素をコードし、

(b) 第1の非天然遺伝子が挿入され、ここで、前記第1の非天然遺伝子が、多糖の加水分解に關与する第1の非天然酵素をコードし、

それによって、前記好熱性または中温性の微生物に、発酵生成物としてエタノールを産生させることを特徴とする、微生物。

【請求項 33】

前記第1の非天然遺伝子が、セルロースまたはキシランを加水分解する能力を付与する第1の非天然酵素をコードすることを特徴とする、請求項32に記載の遺伝子改変微生物。

【請求項 34】

前記有機酸が乳酸または酢酸であることを特徴とする、請求項32記載の遺伝子改変微生物。

【請求項 35】

前記微生物が中温性であることを特徴とする、請求項8記載の遺伝子改変微生物。

【請求項 36】

前記微生物が好熱性であることを特徴とする、請求項8記載の遺伝子改変微生物。

【請求項 37】

リグノセルロース系バイオマスと、請求項8～26のいずれか1項記載の遺伝子改変された好熱性または中温性の微生物とを接触させる工程を有してなる、リグノセルロース系バイオマスをエタノールに変換する方法。

【請求項 38】

前記微生物が中温性であることを特徴とする請求項18記載の遺伝子改変微生物。

【請求項 39】

前記微生物が好熱性であることを特徴とする請求項18記載の遺伝子改変微生物。

【請求項 40】

前記微生物が中温性であることを特徴とする請求項32記載の遺伝子改変微生物。

【請求項 41】

前記微生物が好熱性であることを特徴とする請求項32記載の遺伝子改変微生物。