

【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21年12月17日 (2009.12.17)

【公表番号】特表2009-513136(P2009-513136A)

【公表日】平成21年4月2日 (2009.4.2)

【年通号数】公開・登録公報2009-013

【出願番号】特願2008-537902(P2008-537902)

【国際特許分類】

C 1 2 P 7/16 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

【F I】

C 1 2 P 7/16 Z N A

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 1/19

【手続補正書】

【提出日】平成21年10月15日 (2009.10.15)

【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】

- i) ピルビン酸からアセト乳酸へ (経路ステップ a)、
- ii) アセト乳酸から 2, 3 - ジヒドロキシイソ吉草酸へ (経路ステップ b)、
- iii) 2, 3 - ジヒドロキシイソ吉草酸から - ケトイソ吉草酸へ (経路ステップ c)

、

- iv) - ケトイソ吉草酸からイソブチルアルデヒドへ (経路ステップ d)、および
- v) イソブチルアルデヒドからイソブタノールへ (経路ステップ e)

よりなる群から選択される基質から産物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 DNA 分子を含んでなる組換え微生物宿主細胞であって、少なくとも 1 つの DNA 分子が前記微生物宿主細胞に対して異種であり、前記微生物宿主細胞がイソブタノールを生成する組換え微生物宿主細胞。

【請求項 2】

- i) ピルビン酸からアセト乳酸へ (経路ステップ a)、
- ii) アセト乳酸から 2, 3 - ジヒドロキシイソ吉草酸へ (経路ステップ b)、
- iii) 2, 3 - ジヒドロキシイソ吉草酸から - ケトイソ吉草酸へ (経路ステップ c)

、

- iv) - ケトイソ吉草酸からイソブチリル - CoA へ (経路ステップ f)、
- v) イソブチリル - CoA からイソブチルアルデヒドへ (経路ステップ g)、および
- vi) イソブチルアルデヒドからイソブタノールへ (経路ステップ e)

よりなる群から選択される基質から産物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 DNA 分子を含んでなる組換え微生物宿主細胞であって、少なくとも 1 つの DNA 分子が前記微生物宿主細胞に対して異種であり、前記微生物宿主細胞がイソブタノールを生成する組換え微生物宿主細胞。

**【請求項 3】**

- i) ピルビン酸からアセト乳酸へ (経路ステップ a)、
- ii) アセト乳酸から 2, 3 - ジヒドロキシイソ吉草酸へ (経路ステップ b)、
- iii) 2, 3 - ジヒドロキシイソ吉草酸から - ケトイソ吉草酸へ (経路ステップ c)

- iv) - ケトイソ吉草酸からバリンへ (経路ステップ h)、
- v) バリンからイソブチルアミンへ (経路ステップ i)、
- vi) イソブチルアミンからイソブチルアルデヒドへ (経路ステップ j)、および
- vii) イソブチルアルデヒドからイソブタノールへ (経路ステップ e)

よりなる群から選択される基質から産物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 DNA 分子を含んでなる組換え微生物宿主細胞であって、少なくとも 1 つの DNA 分子が前記微生物宿主細胞に対して異種であり、前記微生物宿主細胞がイソブタノールを生成する組換え微生物宿主細胞。

**【請求項 4】**

ピルビン酸からアセト乳酸への基質から産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、2 または 3 のいずれか一項に記載の宿主細胞。

**【請求項 5】**

アセト乳酸から 2, 3 - ジヒドロキシイソ吉草酸への基質から産物への変換を触媒するポリペプチドが、アセトヒドロキシ酸イソメロダクターゼである請求項 1、2 または 3 のいずれか一項に記載の宿主細胞。

**【請求項 6】**

2, 3 - ジヒドロキシイソ吉草酸から - ケトイソ吉草酸への基質から産物への変換を触媒するポリペプチドが、アセトヒドロキシ酸デヒドラターゼである請求項 1、2 または 3 のいずれか一項に記載の宿主細胞。

**【請求項 7】**

イソブチルアルデヒドからイソブタノールへの基質から産物への変換を触媒するポリペプチドが、分枝アルコールデヒドロゲナーゼである請求項 1、2 または 3 のいずれか一項に記載の宿主細胞。

**【請求項 8】**

- ケトイソ吉草酸からイソブチルアルデヒドへの基質から産物への変換を触媒するポリペプチドが、分枝 - ケト酸脱炭酸酵素である請求項 1 に記載の宿主細胞。

**【請求項 9】**

- ケトイソ吉草酸からイソブチリル - CoA への基質から産物への変換を触媒するポリペプチドが、分枝ケト酸デヒドロゲナーゼである請求項 2 に記載の宿主細胞。

**【請求項 10】**

イソブチリル - CoA からイソブチルアルデヒドへの基質から産物への変換を触媒するポリペプチドが、アシル化アルデヒドデヒドロゲナーゼである請求項 2 に記載の宿主細胞。

**【請求項 11】**

- ケトイソ吉草酸からバリンへの基質から産物への変換を触媒するポリペプチドが、アミノ基転移酵素である請求項 3 に記載の宿主細胞。

**【請求項 12】**

バリンからイソブチルアミンへの基質から産物への変換を触媒するポリペプチドが、バリン脱炭酸酵素である請求項 3 に記載の宿主細胞。

**【請求項 13】**

イソブチルアミンからイソブチルアルデヒドへの基質から産物への変換を触媒するポリペプチドが、アミノ基転移酵素である請求項 3 に記載の宿主細胞。

**【請求項 14】**

細胞が、細菌、シアノ細菌、糸状菌、および酵母よりなる群から選択される請求項 1、2 または 3 のいずれか一項に記載の宿主細胞。

## 【請求項 15】

細胞が、クロストリジウム (*Clostridium*)、ザイモモナス (*Zymomonas*)、エシェリキア (*Escherichia*)、サルモネラ (*Salmonella*)、ロドコッカス (*Rhodococcus*)、シュードモナス (*Pseudomonas*)、バシラス (*Bacillus*)、乳酸桿菌 (*Lactobacillus*)、腸球菌 (*Enterococcus*)、アルカリゲネス (*Alcaligenes*)、クレブシエラ (*Klebsiella*)、パエニバシラス (*Paenibacillus*)、アルスロバクター (*Arthrobacter*)、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*)、ブレビバクテリウム (*Brevibacterium*)、ピチア (*Pichia*)、カンジダ (*Candida*)、ハンゼヌラ (*Hansenula*)、およびサッカロミセス (*Saccharomyces*) よりなる群から選択される属の一員である請求項 14 に記載の宿主細胞。

## 【請求項 16】

細胞が大腸菌 (*Escherichia coli*)、アルカリゲネス・ユートロファス (*Alcaligenes eutrophus*)、バシラス・リチェニホルミス (*Bacillus licheniformis*)、パエニバシラス・マセランス (*Paenibacillus macerans*)、ロドコッカス・エリスロポリス (*Rhodococcus erythropolis*)、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、ラクトバシラス・プランタルム (*Lactobacillus plantarum*)、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、エンテロコッカス・ガリナラム (*Enterococcus gallinarum*)、エンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*) およびサッカロミセス・セレヴィシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) よりなる群から選択される請求項 15 に記載の宿主細胞。

## 【請求項 17】

アセト乳酸シンターゼが、配列番号 2、配列番号 178、および配列番号 180 よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有する請求項 4 に記載の宿主細胞。

## 【請求項 18】

アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼが、配列番号 43、配列番号 181、配列番号 183、および配列番号 185 よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有する請求項 5 に記載の宿主細胞。

## 【請求項 19】

アセトヒドロキシ酸デヒドラターゼが、配列番号 6、配列番号 186、配列番号 188、および配列番号 190 よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有する請求項 6 に記載の宿主細胞。

## 【請求項 20】

分枝アルコールデヒドロゲナーゼが、配列番号 10、配列番号 199、配列番号 201、配列番号 203、および配列番号 204 よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有する請求項 7 に記載の宿主細胞。

## 【請求項 21】

分枝 - ケト酸脱炭酸酵素が、配列番号 8、配列番号 193、配列番号 195、および配列番号 197 よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有する請求項 8 に記載の宿主細胞。

## 【請求項 22】

分枝ケト酸デヒドロゲナーゼが 4 つのサブユニットを含んでなり、前記サブユニットのアミノ酸配列が、配列番号 214、配列番号 216、配列番号 218、配列番号 220、配列番号 210、配列番号 208、配列番号 206、および配列番号 212 よりなる群から選択される請求項 9 に記載の宿主細胞。

## 【請求項 23】

アシル化アルデヒドデヒドロゲナーゼが、配列番号 2 2 2、配列番号 2 2 4、配列番号 2 2 6、配列番号 2 2 8、および配列番号 2 3 0 よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有する請求項 1 0 に記載の宿主細胞。

【請求項 2 4】

アミノ基転移酵素が、配列番号 2 3 2、配列番号 2 3 4、配列番号 2 3 6、配列番号 2 3 8、および配列番号 2 4 0 よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有する請求項に 1 1 記載の宿主細胞。

【請求項 2 5】

バリンデヒドロゲナーゼが、配列番号 2 4 2 および配列番号 2 4 4 よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有する請求項 1 1 に記載の宿主細胞。

【請求項 2 6】

バリン脱炭酸酵素が配列番号 2 4 6 で示されるアミノ酸配列を有する請求項 1 2 に記載の宿主細胞。

【請求項 2 7】

アミノ基転移酵素が、配列番号 2 4 8、配列番号 2 5 0、配列番号 2 5 2、および配列番号 2 5 4 よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有する請求項 1 3 に記載の宿主細胞。

【請求項 2 8】

宿主細胞が通性嫌気性菌である請求項 1、2 または 3 のいずれか一項に記載の宿主細胞。

【請求項 2 9】

1) 請求項 1 ~ 2 8 のいずれか 1 項に記載の組換え微生物宿主細胞を提供するステップと、

2) イソブタノールが生成される条件下において発酵培地中で上記の宿主細胞を発酵性炭素基質と接触させるステップとを含む、イソブタノールの製造方法。

【請求項 3 0】

発酵性炭素基質が、単糖類、オリゴ糖類、および多糖類よりなる群から選択される請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 1】

炭素基質が、グルコース、スクロース、およびフルクトースよりなる群から選択される請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 2】

それによってイソブタノールが生成される条件が嫌気性である請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 3】

それによってイソブタノールが生成される条件が微好気性である請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 4】

宿主細胞を最少培地中で炭素基質に接触させる、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 5】

請求項 2 9 に記載の方法によって生成されるイソブタノール含有発酵培地。