

【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5月6日 (2011.5.6)

【公表番号】特表2010-524470(P2010-524470A)

【公表日】平成22年7月22日 (2010.7.22)

【年通号数】公開・登録公報2010-029

【出願番号】特願2010-504212(P2010-504212)

【国際特許分類】

C 1 2 P 7/42 (2006.01)

C 1 2 P 7/16 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 N 9/90 (2006.01)

C 1 2 N 9/88 (2006.01)

C 1 2 N 9/04 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 P 7/42

C 1 2 P 7/16 Z N A

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 Q 1/68 A

C 1 2 N 9/90

C 1 2 N 9/88

C 1 2 N 9/04 E

【手続補正書】

【提出日】平成23年3月16日 (2011.3.16)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 9 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【 0 1 9 8 】

精製 K A R I における活性アッセイ

本実施例で用いられるアッセイ条件は、20% (v/v) 精製試料 5 μ L を細胞抽出物の代わりに用いたこと以外では実施例 2 の場合と同じであった。精製試料のタンパク質濃度およびその比活性を表 7 に示す。試験対象の最速の成長者 (grower) である精製 P F 5 - K A R I の比活性は、K 1 2 - K A R I の比活性の 2 倍であった。これらの結果が実施例 2 におけるこれら 2 種の酵素の粗製剤を用いて得られたデータと一致することから、最少培地中での成長の間での倍加時間が大腸菌 (E. coli) 酵素よりも高い比活性を有する K A R I 酵素を同定するための手段として用いられうるという仮説に対してさらなる支持が得られる。

【表 8】

表 7
大腸菌(E.COLI)およびシュードモナス(Pseudomonas)株内での
KARI の濃度および比活性

試料	KARI の濃度(mg/ml)	比活性 μモル/分/mg KARI
K12-KARI	1.85	1.1
PF5-KARI	2.80	2.2

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0199

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0199】

以上、本発明を要約すると下記のとおりである。

1. アセトラクテートをジヒドロキシ - イソバレレートに変換するための方法であって、
 - a) 大腸菌 (E. coli) ケトール酸レダクトイソメラーゼの比活性よりも高い比活性のケトール酸レダクトイソメラーゼを有するポリペプチドをコードする遺伝子コンストラクトを含む微生物宿主細胞を提供するステップと、
 - b) (a) の宿主細胞をアセトラクテートと接触させるステップであって、2, 3 - ジヒドロキシイソバレレートが生成されるステップと、
 を含む方法。

2. 遺伝子コンストラクトが、以下の条件：
 - a) 約 7.5 の pH、
 - b) 約 22.5 の温度、および
 - c) 約 10 mM 超のカリウム

のもとで行われる NADPH 消費アッセイによって測定される際、精製タンパク質に基づく 1.1 μモル/分/mg を超える比活性のケトール酸レダクトイソメラーゼを有するポリペプチドをコードする、上記 1 に記載の方法。

3. イソブタノールを生成するための方法であって、

- a) 以下の遺伝子コンストラクト：
 - 1) ピルベートをアセトラクテートに変換する (経路ステップ a) アセトラクテートシンターゼ酵素をコードする少なくとも 1 つの遺伝子コンストラクト；
 - 2) (S) - アセトラクテートから 2, 3 - ジヒドロキシイソバレレートへの変換 (経路ステップ b) において、以下の条件：
 - i) 約 7.5 の pH、
 - ii) 約 22.5 の温度、および
 - iii) 約 10 mM 超のカリウム

のもとで行われる NADPH 消費アッセイによって測定される際、精製タンパク質に基づく 1.1 μモル/分/mg を超える比活性のケトール酸レダクトイソメラーゼ酵素をコードする少なくとも 1 つの遺伝子コンストラクト；

- 3) 2, 3 - ジヒドロキシイソバレレートを - ケトイソバレレートに変換する (経路ステップ c) ためのアセトヒドロキシ酸デヒドラターゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子コンストラクト；

- 4) - ケトイソバレレートをイソブチルアルデヒドに変換する (経路ステップ d) 分岐鎖ケト酸デカルボキシラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子コンストラクト；

5) イソブチルアルデヒドをイソブタノールに変換する(経路ステップ e) ための分岐鎖アルコールデヒドロゲナーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子コンストラクト；を含む組換え微生物宿主細胞を提供するステップと、

b) (a) の宿主細胞をイソブタノールが生成される条件下で成長させるステップと、を含む方法。

4. 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 つの遺伝子コンストラクトがシュードモナスから単離される、上記 1 ~ 3 のいずれか一つに記載の方法。

5. 宿主細胞が、細菌、シアノバクテリア、糸状菌および酵母からなる群から選択される、上記 1 ~ 3 のいずれか一つに記載の方法。

6. 宿主細胞が、クロストリジウム、ザイモモナス、エシェリキア、サルモネラ、ロドコッカス、シュードモナス、パチルス、乳酸桿菌、腸球菌、アルカリゲネス、クレブシエラ、パエニパチルス、アルスロバクター、コリネバクテリウム、プレバクテリウム、ピキア、カンジダ、ハンセンラ、ビブリオおよびサッカロミセスからなる群から選択される属のメンバーである、上記 4 に記載の方法。

7. 宿主細胞が大腸菌である、上記 6 に記載の方法。

8. 細胞がラクトパチルス・プランタルムである、上記 6 に記載の方法。

9. 細胞がサッカロミセス・セレビシェである、上記 6 に記載の方法。

10. アセトラクテートシンターゼが配列番号 2 で示されるアミノ酸配列を有する、上記 3 に記載の方法。

11. 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 34、配列番号 35、および配列番号 36 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、上記 1 ~ 3 のいずれか一つに記載の方法。

12. アセトヒドロキシ酸デヒドラターゼ活性が配列番号 6 で示されるアミノ酸配列を有する、上記 3 に記載の方法。

13. 分岐鎖アルコールデヒドロゲナーゼが配列番号 10 で示されるアミノ酸配列を有する、上記 3 に記載の方法。

14. 分岐鎖 - ケト酸デカルボキシラーゼが配列番号 8 で示されるアミノ酸配列を有する、上記 3 に記載の方法。

15. 大腸菌ケトール酸レダクトイソメラーゼの比活性を超える比活性を有するケトール酸レダクトイソメラーゼ酵素を含む組換え宿主細胞。

16. ケトール酸レダクトイソメラーゼ酵素が、以下の条件：

a) 約 7.5 の pH、

b) 約 22.5 の温度、および

c) 約 10 mM 超のカリウム

のもとで行われる NADPH 消費アッセイによって測定される際、精製タンパク質に基づく $1.1 \mu\text{mol} / \text{分} / \text{mg}$ を超える比活性を有する、上記 15 に記載の組換え宿主細胞。

17. 以下の条件：

i) 約 7.5 の pH、

ii) 約 22.5 の温度、および

iii) 約 10 mM 超のカリウム；

のもとで行われる NADPH 消費アッセイによって測定される際、精製タンパク質に基づく $1.1 \mu\text{mol} / \text{分} / \text{mg}$ を超える比活性を有するケトール酸レダクトイソメラーゼ酵素をコードする遺伝子コンストラクトの同定および単離のための方法であって、

a) M9 最少培地中で成長させる場合、大腸菌の倍加時間よりも短い倍加時間を有する細菌種を同定するステップと、

b) (a) の細菌種をケトール酸レダクトイソメラーゼ活性についてスクリーニングし、活性細菌種を同定するステップと、

c) (b) の活性細菌種のゲノム DNA を、ケトール酸レダクトイソメラーゼをコードすることで知られる遺伝子コンストラクトに対して相同性を有する核酸配列でプローブし

、前記活性細菌種由来のケトール酸レダクトイソメラーゼをコードする遺伝子コンストラクトを同定し、単離するステップと、

d) 前記活性細菌種由来のケトール酸レダクトイソメラーゼをコードする前記遺伝子コンストラクトを増幅し、発現するステップと、

e) ステップ (d) の前記発現された遺伝子コンストラクトを、以下の条件：

i) 約 7.5 の pH、

ii) 約 22.5 の温度、および

iii) 約 10 mM 超のカリウム

のもとで行われる NADPH 消費アッセイによって測定される際、精製タンパク質に基づく $1.1 \mu\text{mol} / \text{分} / \text{mg}$ を超える比活性を有するものについてスクリーニングするステップと、

を含む、方法。

18. 活性細菌種が、クロストリジウム、ザイモナス、エシェリキア、サルモネラ、ロドコッカス、シュードモナス、バチルス、ビブリオ、乳酸桿菌、腸球菌、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、上記 17 に記載の方法。

19. ステップ (a) の倍加時間が、M9 最少培地中で成長させる場合、大腸菌の倍加時間の 80% 以下である、上記 17 に記載の方法。

【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】

アセトラクテートをジヒドロキシ - イソバレレートに変換するための方法であって、

a) 大腸菌 (*E. coli*) ケトール酸レダクトイソメラーゼの比活性よりも高い比活性のケトール酸レダクトイソメラーゼを有するポリペプチドをコードする遺伝子コンストラクトを含む微生物宿主細胞を提供するステップと、

b) (a) の宿主細胞をアセトラクテートと接触させるステップであって、2, 3 - ジヒドロキシイソバレレートが生成されるステップと、

を含む方法。

【請求項 2】

イソブタノールを生成するための方法であって、

a) 以下の遺伝子コンストラクト：

1) ピルベートをアセトラクテートに変換する (経路ステップ a) アセトラクテートシンターゼ酵素をコードする少なくとも 1 つの遺伝子コンストラクト；

2) (S) - アセトラクテートから 2, 3 - ジヒドロキシイソバレレートへの変換 (経路ステップ b) において、以下の条件：

i) 約 7.5 の pH、

ii) 約 22.5 の温度、および

iii) 約 10 mM 超のカリウム

のもとで行われる NADPH 消費アッセイによって測定される際、精製タンパク質に基づく $1.1 \mu\text{mol} / \text{分} / \text{mg}$ を超える比活性のケトール酸レダクトイソメラーゼ酵素をコードする少なくとも 1 つの遺伝子コンストラクト；

3) 2, 3 - ジヒドロキシイソバレレートを - ケトイソバレレートに変換する (経路ステップ c) ためのアセトヒドロキシ酸デヒドラターゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子コンストラクト；

4) - ケトイソバレレートをイソブチルアルデヒドに変換する (経路ステップ d) 分岐鎖ケト酸デカルボキシラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子コンストラクト；

5) イソブチルアルデヒドをイソブタノールに変換する(経路ステップe)ための分岐鎖アルコールデヒドロゲナーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子コンストラクト;を含む組換え微生物宿主細胞を提供するステップと、
b) (a)の宿主細胞をイソブタノールが生成される条件下で成長させるステップと、を含む方法。

【請求項3】

大腸菌ケトール酸レダクトイソメラーゼの比活性を超える比活性を有するケトール酸レダクトイソメラーゼ酵素を含む組換え宿主細胞。

【請求項4】

以下の条件:

- i) 約7.5のpH、
- ii) 約22.5の温度、および
- iii) 約10mM超のカリウム;

のもとで行われるNADPH消費アッセイによって測定される際、精製タンパク質に基づく1.1μmol/分/mgを超える比活性を有するケトール酸レダクトイソメラーゼ酵素をコードする遺伝子コンストラクトの同定および単離のための方法であって、

a) M9最少培地中で成長させる場合、大腸菌の倍加時間よりも短い倍加時間を有する細菌種を同定するステップと、

b) (a)の細菌種をケトール酸レダクトイソメラーゼ活性についてスクリーニングし、活性細菌種を同定するステップと、

c) (b)の活性細菌種のゲノムDNAを、ケトール酸レダクトイソメラーゼをコードすることで知られる遺伝子コンストラクトに対して相同性を有する核酸配列でプローブし、前記活性細菌種由来のケトール酸レダクトイソメラーゼをコードする遺伝子コンストラクトを同定し、単離するステップと、

d) 前記活性細菌種由来のケトール酸レダクトイソメラーゼをコードする前記遺伝子コンストラクトを増幅し、発現するステップと、

e) ステップ(d)の前記発現された遺伝子コンストラクトを、以下の条件:

- i) 約7.5のpH、
- ii) 約22.5の温度、および
- iii) 約10mM超のカリウム

のもとで行われるNADPH消費アッセイによって測定される際、精製タンパク質に基づく1.1μmol/分/mgを超える比活性を有するものについてスクリーニングするステップと、
を含む、方法。