

【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】0198

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0198】

精製KARI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 μL 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PFS-KARIの比活性は、K12-KARI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KARI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1.1μ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1.1μ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ロ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)分歧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、バチルス、乳酸桿菌、腸球菌、アルカリゲネス、クレブシエラ、パエニバチルス、アルスロバクター、コリネバクテリウム、ブレビバクテリウム、ピキア、カンジダ、ハンセヌラ、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. 細胞がラクトバチルス・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・セレビシエである、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ロ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1.1μモル/分/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1.1μモル/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持つ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增幅し、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1.1μモル/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。

18. 活性細菌種が、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、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1.1μ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。

【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1.1μモル/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1.1μモル/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。