

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2009年3月5日 (05.03.2009)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2009/028582 A1

- (51) 国際特許分類:  
C12N 1/21 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)  
C12N 1/15 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)  
C12N 1/19 (2006.01) C12P 7/04 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2008/065355
- (22) 国際出願日: 2008年8月28日 (28.08.2008)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2007-222633 2007年8月29日 (29.08.2007) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 財団法人地球環境産業技術研究機構 (RESEARCH INSTITUTE OF INNOVATIVE TECHNOLOGY FOR THE EARTH) [JP/JP]; 〒6190292 京都府木津川市木津川台9丁目2番地 Kyoto (JP). 本田技研工業株式会社 (HONDA GIKEN KOGYO KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1078556 東京都港区南青山2丁目1番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 湯川 英明 (YUKAWA, Hideaki) [JP/JP]; 〒6190292 京都府木津川市木津川台9丁目2番地 財団法人地球環境産業技術研究機構内 Kyoto (JP). 乾 将行 (INUI, Masayuki) [JP/JP]; 〒6190292 京都府木津川市木津川台9丁目
- 2番地 財団法人地球環境産業技術研究機構内 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 岩谷 龍 (IWATANI, Ryo); 〒5300003 大阪府大阪市北区堂島2丁目1番31号 京阪堂島ビル3階 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書  
— 明細書とは別に規則13の2に基づいて提出された生物材料の寄託に関する表示。  
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

(54) Title: TRANSFORMANTS CAPABLE OF PRODUCING ISOPROPANOL

(54) 発明の名称: イソプロパノール生産能を有する形質転換体

(57) Abstract: A transformant which is capable of producing isopropanol characterized by having been constructed by transferring any one of the following genes (a) to (d) into an aerobic bacterium or a facultative anaerobic bacterium: (a) a foreign gene encoding an enzyme which has acetyl-CoA acetyltransferase activity; (b) a foreign gene encoding an enzyme which has acetoacetyl CoA:acetate CoA transferase activity; (c) a foreign gene encoding an enzyme which has acetoacetate decarboxylase activity; and (d) a foreign gene encoding an enzyme which has isopropanol dehydrogenase activity.

(57) 要約: 以下の(a)~(d)の遺伝子を好気性細菌または通性嫌気性細菌に導入したことを特徴とする、イソプロパノール生産能を有する形質転換体。(a) アセチル-CoA アセチルトランスフェラーゼ (Acetyl-CoA acetyltransferase) 活性を有する酵素をコードする外来性遺伝子 (b) アセトアセチル-CoA:アセテート CoA-トランスフェラーゼ (Acetoacetyl CoA:acetate CoA transferase) 活性を有する酵素をコードする外来性遺伝子 (c) アセトアセテート デカルボキシラーゼ (Acetoacetate decarboxylase) 活性を有する酵素をコードする外来性遺伝子 (d) イソプロパノール デヒドロゲナーゼ (Isopropanol dehydrogenase) 活性を有する酵素をコードする外来性遺伝子



WO 2009/028582 A1

## 明 細 書

### イソプロパノール生産能を有する形質転換体

#### 技術分野

[0001] 本発明は、イソプロパノール生産技術に関する。さらに詳しくは、イソプロパノール生産機能を付与するために特定の遺伝子操作が施された好気性細菌または通性嫌気性細菌の形質転換体及びそれによる効率的なイソプロパノールの製造技術に関する。

#### 背景技術

[0002] イソプロパノールは、塗料やインキ等の工業用溶剤、そして、各種の工業原料として、現在、世界的には凡そ年間180万トン、我国でも約18万トンが生産されている。また、イソプロパノールは、簡単な脱水反応によりプロピレンに変換することができ、現在、年間310万トンが我国では製造されているポリプロピレンの原料となる。

しかし、これらの製品は何れも、化石原油資源由来のものである。

地球温暖化問題、化石資源枯渇問題、さらには、近年の原油価格の高騰問題等、地球環境的にも、また、重要な化学製品原料資源の海外依存度の低下の観点からも、ほぼ全量を輸入している原油資源とは異なる再生可能資源からのエネルギーや化学製品の製造法の開発が強く望まれている。バイオマス等再生可能資源からイソプロパノールへの高効率製造技術は、これらの諸問題を解決することが出来る方策の一つとなる。

[0003] バイオマス原料からの微生物によるイソプロパノール生成としては、アセトン・ブタノール発酵を行うクロストリジウム細菌の一種が、ブタノールに加えて、イソプロパノールを共産することが報告されている(イソプロパノール・ブタノール発酵)。これは、該発酵パターンを示すクロストリジウム細菌が有するイソプロパノール デヒドロゲナーゼの触媒反応によりアセトンが還元されてイソプロパノールが生産されることによる。

[0004] 近年、世界各国でのバイオ燃料生産利用の高まりの中で、アセトン・ブタノール発酵を利用したバイオ燃料としてのブタノール生産研究が再び注目されているが、これらはブタノール生産を主目的とした研究であり、イソプロパノールの生産を目的とした

研究はほとんどない。

[0005] これまでにイソプロパノールを生産する菌としては、イソプロパノール・ブタノール発酵菌として知られるクロストリディウム属細菌、クロストリジウム ベージェリンキー (*Clostridium beijerinckii*)、クロストリジウム オウランティブチリカム (*Clostridium aurantibutyricum*)などが報告されている(非特許文献1)。

[0006] しかしながら、*Clostridium*属細菌を用いたイソプロパノール生産には以下のような課題が存在する。

(1) *Clostridium*属細菌によるイソプロパノール・ブタノール発酵は、ブタノールが主要発酵代謝産物であり、イソプロパノールの生産性が低い。具体的には、*Clostridium*属細菌によるイソプロパノール/ブタノール生成比はおおよそ1/5~1/10である。

(2) *Clostridium*属細菌は、増殖、及びイソプロパノールの生産において絶対嫌気性条件を必要とする。従って、嫌気条件下での培養、すなわち、培養装置内を窒素ガスなどの不活性ガスで置換するなどの煩雑な培養操作が必要であり、かつ菌の増殖速度が極端に遅いために、それに伴うイソプロパノール生産速度が低い。これらの問題点を解決するには、高増殖速度の好気性微生物の利用が考えられるが、イソプロパノールを高効率に生産する好気条件下で増殖可能な微生物(好気性細菌または通性嫌気性細菌)は未だ知られていない。

(3) イソプロパノール・ブタノール発酵では、細胞増殖期において酢酸及び酪酸が生成され、細胞増殖が停止した定常期に発酵培養液のpHの酸性化が溶媒(イソプロパノール及びブタノール)生成期への移行の引き金となり代謝系が大幅に変化(代謝シフト)して、イソプロパノール及びブタノールが生成される。このように、イソプロパノール・ブタノール発酵においては発酵プロセスの厳密な制御が必要であり、発酵開始してからイソプロパノール及びブタノールが生成されるまでに時間を要する。また、これらのクロストリジウム菌においては、孢子形成期への移行によりイソプロパノール及びブタノール生成が停止し、イソプロパノールの生成が長時間持続しない等の課題がある。

従って、これらの課題を解決する新規イソプロパノール生産微生物の創製及びプロセスの開発が望まれている。

[0007] Clostridium属細菌を用いたイソプロパノール生産技術としては、以下のような技術が開示されている。

非特許文献1では、クロストリジウム ベージェリンキー (*Clostridium beijerinckii*) が、ブタノールに加えてイソプロパノールを、クロストリジウム オウランティブチリカム (*Clostridium aurantibutyricum*) が、ブタノール、アセトンに加えてイソプロパノールを生成することが開示されている。

[0008] また、非特許文献2及び非特許文献3では、Clostridium属細菌を固定化してイソプロパノールを連続的に生産する技術、非特許文献4では、凝集性のClostridium属細菌を用いてイソプロパノールを生産する技術、非特許文献5では、Clostridium属細菌によるイソプロパノール・ブタノール発酵において、高分子樹脂を添加することにより、生産物であるイソプロパノールやブタノールを吸着させて生産物阻害を軽減する技術が開示されている。しかしながら、これらは、ブタノール生産に主眼をおいた技術であり、尚且つ、いずれもClostridium属細菌を用いる嫌気条件下でのイソプロパノール生産技術であり、上記の(1)、(2)、(3)等で指摘される課題については何ら根本的な解決となっていない。

[0009] 一方、イソプロパノール生産技術ではないが、Clostridium属細菌を用いたアセトン・ブタノール生産技術としては、以下のような技術が開示されている。

特許文献1では、孢子形成に関わる遺伝子を制御することにより、孢子形成期を遅らせ、結果としてブタノール生産を向上させる技術、特許文献2及び非特許文献6では、連続発酵法において、gas-stripping法により、連続的にブタノールを抽出する技術、非特許文献7及び非特許文献8では、Clostridium属細菌を固定化してブタノールを生産する技術、非特許文献9では、Clostridium属細菌を連続発酵法において高濃度菌体を用い、菌体をリサイクルする技術が開示されている。これらの技術は、Clostridium属細菌を用いたイソプロパノール・ブタノール発酵にも適応可能と考えられるが、いずれもClostridium属細菌を用いる嫌気条件下での生産技術である点では何ら変わりなく、上記の課題については何ら根本的な解決となっていない。

非特許文献1: Applied and Environmental Microbiology, Vol. 45, 1983, p1160-1163.

非特許文献2: Enzyme and Microbial Technology, Vol. 5, 1983, p46-54.

非特許文献3:Biotechnology and Bioengineering, Vol. 39, 1992, p148-156.

非特許文献4:Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 32, 1989, p22-26.

非特許文献5:Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 25, 1986, p29-31.

非特許文献6:Bioprocess and Biosystems Engineering, Vol.27, 2005, p207-214.

非特許文献7:Pakistan Journal of Biological Sciences, Vol.9, 2006, p1923-1928.

非特許文献8:Applied Biochemistry and Biotechnology, Vol.113-116, 2004, p887-898.

非特許文献9:Journal of Biotechnol, Vol.120, p197-206.

特許文献1:PCT 公開公報 WO2006007530

特許文献2:米国 公開特許公報 US 2005089979

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

- [0010] 本発明は、再生可能資源を原料としてイソプロパノールを生産することができる組換え微生物、及び該微生物を用いて効率よくイソプロパノールを製造することができる方法を提供することを課題とする。

### 課題を解決するための手段

- [0011] 本発明は前記の課題を解決すべく研究を重ね、アセチル-CoA アセチルトランスフェラーゼ活性を有する酵素をコードする外来性遺伝子、アセトアセチル-CoA:アセテート CoA-トランスフェラーゼ活性を有する酵素をコードする外来性遺伝子、アセトアセテート デカルボキシラーゼ活性を有する酵素をコードする外来性遺伝子、及びイソプロパノール デヒドロゲナーゼ活性を有する酵素をコードする外来性遺伝子を好気性細菌または通性嫌気性細菌に導入することにより創製される形質転換体がイソプロパノールを効率よく生産することを見出した。このような組換え微生物は、従来のイソプロパノール生産菌であるClostridium属細菌が、増殖、及びイソプロパノールの生産にて絶対嫌気性条件を必要とするため、その低増殖速度により、イソプロパノール生産速度が低いのに対して、好気条件下で増殖可能な微生物(好気性細菌または通性嫌気性細菌)であることから、増殖速度が速く、その分イソプロパノール生産速度が速くなるため、優れたイソプロパノール生産能を有する。このため、本発明の形

質転換体を用いると、効率的なイソプロパノール生産が可能となることから、イソプロパノール生産プロセス設計及び運転が容易である。本発明は、上記知見に基づき完成されたものであり、以下の微生物及びこの微生物を用いるイソプロパノールの製造方法を提供する。

[0012] (1)以下の(a)～(d)の遺伝子を好気性細菌または通性嫌気性細菌に導入したことを特徴とする、イソプロパノール生産能を有する形質転換体。

(a)アセチル-CoA アセチルトランスフェラーゼ (Acetyl-CoA acetyltransferase) 活性を有する酵素をコードする外来性遺伝子

(b)アセトアセチル-CoA:アセテート CoA-トランスフェラーゼ (Acetoacetyl CoA:acetate CoA transferase) 活性を有する酵素をコードする外来性遺伝子

(c)アセトアセテート デカルボキシラーゼ (Acetoacetate decarboxylase) 活性を有する酵素をコードする外来性遺伝子

(d)イソプロパノール デヒドロゲナーゼ (Isopropanol dehydrogenase) 活性を有する酵素をコードする外来性遺伝子

[0013] (2) (a)アセチル-CoA アセチルトランスフェラーゼ活性を有する酵素をコードする外来性遺伝子として、配列番号13の塩基配列からなるDNA、または配列番号13の塩基配列若しくは配列番号13の塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつアセチル-CoA アセチルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAを用い;

(b)アセトアセチル-CoA:アセテート CoA-トランスフェラーゼ活性を有する酵素をコードする外来性遺伝子として、配列番号14の塩基配列からなるDNA、または配列番号14の塩基配列若しくは配列番号14の塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつアセトアセチル-CoA:アセテート CoA-トランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAを用い;

(c)アセトアセテート デカルボキシラーゼ活性を有する酵素をコードする外来性遺伝子として、配列番号15の塩基配列からなるDNA、または配列番号15の塩基配列若しくは配列番号15の塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつアセトアセテート デカルボキシラーゼ活性を有する

ポリペプチドをコードするDNAを用い;

(d) イソプロパノール デヒドロゲナーゼ活性を有する酵素をコードする外来性遺伝子として、配列番号16の塩基配列からなるDNA、または配列番号16の塩基配列若しくは配列番号16の塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつイソプロパノール デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAを用いる上記(1)記載の形質転換体。

[0014] (3) 好気性細菌または通性嫌気性細菌が、エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) である上記(1)または(2)記載の形質転換体。

(4)(a) アセチル-CoA アセチルトランスフェラーゼ活性を有する酵素をコードする外来性遺伝子、(b) アセトアセチル-CoA:アセテート CoA-トランスフェラーゼ活性を有する酵素をコードする外来性遺伝子、(c) アセトアセテート デカルボキシラーゼ活性を有する酵素をコードする外来性遺伝子、及び(d) イソプロパノール デヒドロゲナーゼ活性を有する酵素をコードする外来性遺伝子のそれぞれとして、クロストリジウム ベーゼリンキー (*Clostridium beijerinckii*)、クロストリジウム オウランティブチリカム (*Clostridium aurantibutyricum*)、クロストリジウム アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*)、クロストリジウム サッカロペルブチルアセトニカム (*Clostridium saccharoperbutylaceticum*)、クロストリジウム サッカロアセトブチリカム (*Clostridium saccharoacetobutylicum*)、クロストリジウム パスツールリアウム (*Clostridium pasteurianum*)、クロストリジウム スポロゲンズ (*Clostridium sporogenes*)、クロストリジウム カダベリス (*Clostridium cadaveris*)、クロストリジウム テタノモルフウム (*Clostridium tetanomorphum*)、及びラルストニア ユートロファ (*Ralstonia eutropha*) からなる群より選ばれる同一または異なる微生物由来の *thl* 遺伝子、*ctfAB* 遺伝子、*adc* 遺伝子及び *adh* 遺伝子を用いる上記(1)記載の形質転換体。

[0015] (5) 形質転換体が、エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) JM109/pCRC201 (受託番号 FERM BP-10978) またはエシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) JM109/pCRC202 (受託番号 FERM BP-10979) である上記(1)記載の形質転換体。

(6) 上記(1)～(5)のいずれか一項記載の形質転換体を糖類を含有する培地中で培養する工程と、培養物からイソプロパノールを回収する工程とを含むイソプロパノール

ルの製造方法。

## 発明の効果

[0016] 本発明の形質転換体は、糖類から極めて効率よくイソプロパノールを生産することができる。

本発明により、再生可能資源を原料とした効率的なイソプロパノール生産が可能となり、石油資源原料に依存しないイソプロパノール工業生産プロセスの新規な構築が可能となる。

## 図面の簡単な説明

[0017] [図1]図1は、実施例1(3)項において作製したプラスミドpCRC201を示す図である。  
[図2]図2は、実施例1(3)項において作製したプラスミドpCRC202の作製方法を示す図である。

## 発明を実施するための最良の形態

[0018] 以下に、本発明を詳細に説明する。

### (I)イソプロパノール生産能を有する形質転換体

本発明のイソプロパノール生産能を有する形質転換体は、以下の(a)～(d)の遺伝子を好気性細菌または通性嫌気性細菌に導入した形質転換体である。

(a)アセチル-CoA アセチルトランスフェラーゼ活性を有する酵素をコードする外来性遺伝子

(b)アセトアセチル-CoA:アセテート CoA-トランスフェラーゼ活性を有する酵素をコードする外来性遺伝子

(c)アセトアセテート デカルボキシラーゼ活性を有する酵素をコードする外来性遺伝子

(d)イソプロパノール デヒドロゲナーゼ活性を有する酵素をコードする外来性遺伝子

### [0019] 宿主

本発明において形質転換の対象となる宿主は、イソプロパノール生産関連遺伝子群を含む組換えベクターにより形質転換され、これらの遺伝子がコードするイソプロパノール生産関連酵素が発現し、結果としてイソプロパノールを生産することができる好気性細菌または通性嫌気性細菌であれば特に限定されない。宿主としては、例え

ば大腸菌、コリネ型細菌、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*)、スタフィロコッカス属 (*Staphylococcus*)、エンテロコッカス属 (*Enterococcus*)、バチルス (*Bacillus*) 属 (例えば、枯草菌等)、ストレプトミセス (*Streptomyces*) などの細菌; 例えばアスペルギルス属菌などの真菌細胞; 例えばパン酵母、メタノール資化性酵母などの酵母細胞; あるいはこれらのコンピテントセルなどが挙げられる。

好ましくは大腸菌とコリネ型細菌である。大腸菌の中でも好ましい株として、エシエリヒア コリ (*Escherichia coli*) B、W3110、W3100、CSH50、JM105、JM109、DH1、MC1060、HB101などが挙げられる。

[0020] コリネ型細菌とは、バージーズ・マニユアル・デターミネイティブ・バクテリオロジー [*Bergeys Manual of Determinative Bacteriology*, Vol. 8, 599 (1974)] に定義されている一群の微生物であり、通常の好氣的条件で増殖するものならば特に限定されるものではない。具体例を挙げれば、コリネバクテリウム属菌、ブレビバクテリウム属菌、アースロバクター属菌、マイコバクテリウム属菌またはマイクロコッカス属菌等が挙げられる。

[0021] さらにコリネ型細菌としては、具体的には、コリネバクテリウム属菌として、コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) R (FERM P-18976)、ATCC13032、ATCC13058、ATCC13059、ATCC13060、ATCC13232、ATCC13286、ATCC13287、ATCC13655、ATCC13745、ATCC13746、ATCC13761、ATCC14020またはATCC31831等が挙げられる。

[0022] ブレビバクテリウム属菌としては、ブレビバクテリウム ラクトファーメンタム (*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC13869、ブレビバクテリウム フラバム (*Brevibacterium flavum*) MJ-233 (FERM BP-1497) もしくは MJ-233AB-41 (FERM BP-1498)、またはブレビバクテリウム アンモニアゲネス (*Brevibacterium ammoniagenes*) ATCC6872等が挙げられる。

[0023] アースロバクター属菌としては、アースロバクター グロビフォルミス (*Arthrobacter globiformis*) ATCC8010、ATCC4336、ATCC21056、ATCC31250、ATCC31738またはATCC35698等が挙げられる。

[0024] マイコバクテリウム属菌としては、マイコバクテリウム ボビス (*Mycobacterium bovis*) A

TCC19210またはATCC27289等が挙げられる。

[0025] マイクロコッカス属菌としては、マイクロコッカス フロイデンライヒ(Micrococcus freudenreichii)NO. 239(FERM P-13221)、マイクロコッカス ルテウス(Micrococcus leuteus)NO. 240(FERM P-13222)または、マイクロコッカス ウレアエ(Micrococcus ureae)IAM1010またはマイクロコッカス ロゼウス(Micrococcus roseus)IFO3764等が挙げられる。

[0026] また、これらの大腸菌及びコリネ型細菌は、野生株の他に、その変異株や人為的な遺伝子組換え体であってもよい。例えば、このような大腸菌としては、ラクテート デヒドロゲナーゼ(lactate dehydrogenase)、フマレート レダクターゼ(fumarate reductase)、フォルメート デヒドロゲナーゼ(formate dehydrogenase)などの遺伝子破壊株が挙げられる。このようなコリネ型細菌としては、ラクテート デヒドロゲナーゼ(lactate dehydrogenase)、フォスフォエノールピルベート カルボキシラーゼ(phosphoenolpyruvate carboxylase)、マレート デヒドロゲナーゼ(malate dehydrogenase)等の遺伝子破壊株などが挙げられる。

[0027] イソプロパノール生産関連遺伝子

上記(a)～(d)のイソプロパノール生産関連遺伝子としては、これらの遺伝子を含むDNA断片の塩基配列が既知であれば、その配列に従って合成したDNA断片を使用することが出来る。DNA配列が不明の場合であっても、イソプロパノール生産関連酵素タンパク質間で保存されているアミノ酸配列をもとにハイブリダイゼーション法、PCR法により断片を取得することが可能である。さらに他の既知のイソプロパノール生産関連遺伝子配列を基に設計したミックスプライマーを用い、ディジェネレートPCRによって断片を取得することが可能である。

[0028] 上記(a)～(d)のイソプロパノール生産関連遺伝子はイソプロパノール生産活性が保持されている限り、塩基配列の一部が他の塩基と置換されていてもよく、削除されていてもよく、また新たに塩基が挿入されていてもよく、さらには塩基配列の一部が転位されていてもよい。これら誘導体のいずれも本発明に用いることができる。上記の一部とは、例えばアミノ酸残基換算で、1乃至数個(1～5個、好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個)であってよい。

[0029] 上記(a)～(d)の遺伝子は、通常イソプロパノール生産菌が保有する。イソプロパノールを生産する菌としては、ブタノール・イソプロパノール発酵菌として知られるクロストリディウム属細菌、クロストリジウム ベーージェリンキー (*Clostridium beijerinckii*)、クロストリジウム オウランティブチリカム (*Clostridium aurantibutyricum*)などが挙げられ [Geprge, H.A. et al., Acetone, Isopropanol, and Butanol Production by *Clostridium beijerinckii* (syn. *Clostridium butylicum*) and *Clostridium aurantibutyricum*. Appl. Environ. Microbiol. 45:1160-1163 (1983)]、アセチル-CoAから4ステップの反応によりイソプロパノールが生成されることがすでに報告されている [Mitchell, W.J., Physiology of carbohydrate to solvent conversion by clostridia. Adv. Microb. Physiol. 39:31-130 (1998)]。

[0030] これらのクロストリジウム属細菌におけるイソプロパノール生成経路、すなわちアセチル-CoAからイソプロパノールへの代謝経路は、具体的にはアセチル-CoAからアセトアセチル-CoAの反応を触媒するアセチル-CoA アセチルトランスフェラーゼ (Acetyl-CoA acetyltransferase) (別名チオーラゼ (Thiolase)) (以下、遺伝子を「thl」、酵素を「THL」と記す)、アセトアセチル-CoAからアセトアセテートの反応を触媒するアセトアセチル-CoA:アセテート CoA-トランスフェラーゼ (Acetoacetyl CoA:acetate CoA transferase) (以下、遺伝子を「ctfAB」、酵素を「CTF」と記す)、アセトアセテートからアセトンの反応を触媒するアセトアセテート デカルボキシラーゼ (Acetoacetate decarboxylase) (以下、遺伝子を「adc」、酵素を「ADC」と記す)、及びアセトンからイソプロパノールの反応を触媒するイソプロパノール デヒドロゲナーゼ (Isopropanol dehydrogenase) (別名プライマリー-セカンダリー アルコール デヒドロゲナーゼ (Primary-secondary alcohol dehydrogenase)) (以下、遺伝子を「adh」、酵素を「ADH」と記す)から構成されている。

本発明では該代謝系を用いる。また、イソプロパノール生成機能を有する限り、上記(a)～(d)の遺伝子の由来微生物の種類、組み合わせ、及び導入の順番等は限定されない。

[0031] さらに、上記(a)～(d)の遺伝子は、イソプロパノール生産能を有さない菌から取得してもよい。具体的には、以下の例が挙げられる。

クロストリディウム属細菌には、イソプロパノールは生産しないが、ブタノール・アセトン発酵を行うクロストリジウム アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*)、クロストリジウム サッカロペルブチルアセトニカム (*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*)、クロストリジウム サッカロアセトブチリカム (*Clostridium saccharoacetobutylicum*)、クロストリジウム パスツールリアウム (*Clostridium pasteurianum*)、クロストリジウム スポロゲンズ (*Clostridium sporogenes*)、クロストリジウム カダベリス (*Clostridium cadaveris*)、クロストリジウム テタノモルフユウム (*Clostridium tetanomorphum*)などが報告されている [Geprge, H.A. et al., Acetone, Isopropanol, and Butanol Production by *Clostridium beijerinckii* (syn. *Clostridium butylicum*) and *Clostridium aurantibutyricum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:1160-1163 (1983)]。これらのブタノール・アセトン発酵を行うクロストリジウム属細菌は、アセトンを生産するため、アセチル-CoAからアセトンまでの3ステップの酵素 (THL、CTF及びADC)をコードする遺伝子を有することが報告されている [Noelling, J. et al., Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *J. Bacteriol.* 183:4823-4838]。従って、ブタノール・イソプロパノール発酵を行うクロストリジウム ベーゼリンキー (*Clostridium beijerinckii*)及び/またはクロストリジウム オウランティブチリカム (*Clostridium aurantibutyricum*)由来のTHLをコードする遺伝子、CTFをコードする遺伝子及びADCをコードする遺伝子の代わりに、またはこれらと共に、それぞれ、上述のブタノール・アセトン発酵を行うクロストリジウム細菌由来のTHLをコードする遺伝子、CTFをコードする遺伝子及びADCをコードする遺伝子を用いてもよい。

[0032] また、現時点で600種を超える生物種のゲノム解読が行われていることにより、遺伝子データベースとの相同性検索により、多種の生物種由来の目的遺伝子の情報の抽出と、該遺伝子の単離が容易に実施可能となってきた。従って、上述のクロストリジウム属細菌以外の生物種由来のTHLをコードする遺伝子、CTFをコードする遺伝子、ADCをコードする遺伝子及びADHをコードする遺伝子も容易に単離可能である。上述のクロストリジウム属細菌由来のイソプロパノール生産関連遺伝子と比較的相同性の高いものを例にとると、THLをコードする遺伝子としては、クロストリジウム ペルFRINGENS (*Clostridium perfringens*)、クロストリジウム テタニ (*Clostridium tetani*)、ク

ロストリジウム クリュイベリ (*Clostridium kluyveri*)、ロストリジウム ブチリカム (*Clostridium butyricum*)、ロストリジウム ノバイ (*Clostridium novyi*)、ロストリジウム ボツリウム (*Clostridium botulinum*)、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*)、サーモシナス カルボキシディボランズ (*Thermosinus carboxydivorans*)、ロストリジウム ディフィシル (*Clostridium difficile*)、カルボキシドサーマス ハイドロゲノフォーマス (*Carboxydotherrmus hydrogenoformans*)、サーモアナエロバクテリウム テングコンゲネシス (*Thermoanaerobacter tengcongensis*)、デイスルフオトマキュラム レデュセンス (*Desulfotomaculum reducens*)、オーシャノスピラム スピーシーズ (*Oceanospirillum sp.*)、シュードモナス プチダ (*Pseudomonas putida*) など由来のTHLをコードする遺伝子が挙げられる。CTFをコードする遺伝子としては、サーモアナエロバクテリウム テングコンゲネシス (*Thermoanaerobacter tengcongensis*)、エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) K12 など由来のCTFをコードする遺伝子が挙げられる。ADCをコードする遺伝子としては、サッカロポリスポラ エリスラエラ (*Saccharopolyspora erythraea*)、ストレプトミセス ノガレイター (*Streptomyces nogalater*)、シュードモナス アエロギノーサ (*Pseudomonas aeruginosa*)、ストレプトミセス アベルミティリス (*Streptomyces avermitilis*) など由来のADCをコードする遺伝子が挙げられる。ADHをコードする遺伝子としては、サーモアナエロバクテリウム エサノリカス (*Thermoanaerobacter ethanolicus*)、サーモアナエロバクテリウム テングコンゲネシス (*Thermoanaerobacter tengcongensis*)、サーモアナエロバクテリウム ブロッキー (*Thermoanaerobacter brockii*)、サーモシナス カルボキシディボランズ (*Thermosinus carboxydivorans*)、メタノサシナ バーケリ (*Methanosarcina barkeri*) など由来のADHをコードする遺伝子が挙げられる。従って、上述のブタノール・イソプロパノール発酵やブタノール・アセトン発酵を行うロストリジウム属細菌由来のTHLをコードする遺伝子、CTFをコードする遺伝子、ADCをコードする遺伝子及びADHをコードする遺伝子の代わりに、またはこれらと共に、それぞれ、同じ酵素触媒反応を示す限り、例えばここに挙げた他の生物種由来のTHLをコードする遺伝子、CTFをコードする遺伝子、ADCをコードする遺伝子及びADHをコードする遺伝子を用いてもよい。

[0033] 本発明においては、上記(a)～(d)の遺伝子のそれぞれとして、ロストリジウム ベ

ーゼリンキー (*Clostridium beijerinckii*)、クロストリジウム オウランティブチリカム (*Clostridium aurantibutyricum*)、クロストリジウム アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*)、クロストリジウム サッカロペルブチルアセトニカム (*Clostridium saccharoperbutylaceticum*)、クロストリジウム サッカロアセトブチリカム (*Clostridium saccharoacetobutylicum*)、クロストリジウム パスツールアウム (*Clostridium pasteurianum*)、クロストリジウム スポロゲンズ (*Clostridium sporogenes*)、クロストリジウム カダベリス (*Clostridium cadaveris*)、クロストリジウム テタノモルフェウム (*Clostridium tetanomorphum*)、及びラルストニア ユートロファ (*Ralstonia eutropha*) からなる群より選ばれる同一または異なる微生物由来の *thl* 遺伝子、*ctfAB* 遺伝子、*adc* 遺伝子及び *adh* 遺伝子を用いることが好ましい。

[0034] 本発明では、上記(a)～(d)の遺伝子として、クロストリジウム アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) に由来する *THL*、*CTF* 及び *ADC* をコードする各遺伝子、及びクロストリジウム ベーゼリンキー (*Clostridium beijerinckii*) に由来する *ADH* をコードする遺伝子を使用することが最も好ましい。

[0035] 本発明では、(a) アセチル-CoA アセチルトランスフェラーゼ活性を有する酵素をコードする外来性遺伝子として、配列番号13の塩基配列からなるDNA、または配列番号13の塩基配列若しくは配列番号13の塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつアセチル-CoA アセチルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAを用い;

(b) アセトアセチル-CoA:アセテート CoA-トランスフェラーゼ活性を有する酵素をコードする外来性遺伝子として、配列番号14の塩基配列からなるDNA、または配列番号14の塩基配列若しくは配列番号14の塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつアセトアセチル-CoA:アセテート CoA-トランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAを用い;

(c) アセトアセテート デカルボキシラーゼ活性を有する酵素をコードする外来性遺伝子として、配列番号15の塩基配列からなるDNA、または配列番号15の塩基配列若しくは配列番号15の塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつアセトアセテート デカルボキシラーゼ活性を有する

ポリペプチドをコードするDNAを用い;

(d) イソプロパノール デヒドロゲナーゼ活性を有する酵素をコードする外来性遺伝子として、配列番号16の塩基配列からなるDNA、または配列番号16の塩基配列若しくは配列番号16の塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつイソプロパノール デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAを用いるのが好ましい。

[0036] 配列番号13～15の塩基配列のDNAは、クロストリジウム アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) に由来する遺伝子である。また、配列番号13は、*thl*遺伝子の塩基配列であり、配列番号14は、*ctfAB*遺伝子の塩基配列であり、配列番号15は、*adc*遺伝子の塩基配列である。配列番号16の塩基配列のDNAは、クロストリジウム ベージェリンキー (*Clostridium beijerinckii*) に由来する遺伝子であり、*adh*遺伝子の塩基配列である。

[0037] 本発明において「ストリンジントな条件」は、一般的な条件、例えば、J.Sambrookら、*Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)*等に記載された条件を指す。具体的には、完全ハイブリッドの融解温度 ( $T_m$ ) より5～10℃低い温度でハイブリダイゼーションが起こる場合を指す。

[0038] ここで、より好ましい「ストリンジントな条件」とは、90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上の相同性が配列間に存在するときにハイブリダイゼーションが起こることを意味する。このような「ストリンジントな条件」については、J.Sambrookら、*Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)*、特に11.45節”Conditions for Hybridization of Oligonucleotide Probes”に記載されており、ここに記載の条件を使用し得る。

本発明において、塩基配列間の相同性は、計算ソフトGENETYX(登録商標)Ver. 8(ジェネティックス社製)を用いて計算した値である。

[0039] また、本発明においては、例えば、配列番号13で表わされる塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、配列番号13で表わされる塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAと約90%以上の配列相同性を有するものであることが好ましい。より好ましくは、約95%以上、特に好ま

しくは約98%以上の配列相同性を有するものである。

[0040] 種々の生物由来のTHL、CTF、ADC及びADHそれぞれをコードする外来性遺伝子の配列をPCR (polymerase chain reaction) 法により増幅するためのオリゴヌクレオチドプライマーセットとしては、以下のものが挙げられる。このようなプライマーセットとしては、例えば、THLをコードする遺伝子を増幅するための配列番号1及び2の塩基配列で表されるプライマーセット;CTFをコードする遺伝子を増幅するための配列番号3及び4の塩基配列で表されるプライマーセット;ADCをコードする遺伝子を増幅するための配列番号5及び6で表されるプライマーセット;ADHをコードする遺伝子を増幅するための配列番号7及び8で表されるプライマーセットなどが挙げられる。

[0041] PCR法は、公知のPCR装置、例えばサーマルサイクラーなどを利用することができる。PCRのサイクルは、公知の技術にしたがって行なわれてよく、例えば、変性、アニーリング、伸張を1サイクルとし、通常10~100サイクル、好ましくは、約20~50サイクルである。PCRの鑄型としては、上述のイソプロパノール生成経路の酵素活性を示す微生物から単離したDNAを用いて、PCR法によりTHLをコードする遺伝子、CTFをコードする遺伝子、ADCをコードする遺伝子及びADHをコードする遺伝子のcDNAを増幅することができる。PCR法によって得られた遺伝子は、適当なクローニングベクターに導入することができる。クローニング法としては、pGEM-T easy vector system (Promega社製)、TOPO TA-cloning system (Invitrogen社製)、Mighty Cloning Kit (Takara社製)などの商業的に入手可能なPCRクローニングシステムなどを使用することもできる。また、方法の1つの例を実施例で詳記するが、該領域を含むDNA断片を、既知のTHLをコードする遺伝子、CTFをコードする遺伝子、ADCをコードする遺伝子及びADHをコードする遺伝子の塩基配列に基づいて適当に設計された合成プライマーを鑄型として用いたハイブリダイゼーション法により取得することもできる。

[0042] ベクターの構築

次いで、PCR法で得られた遺伝子を含むクローニングベクターを、微生物、例えばエシェリヒア コリ (Escherichia coli) JM109菌株などに導入し、該菌株を形質転換する。この形質転換された菌株を適当な抗生物質 (例えばアンピシリン、クロラムフェニコ

ールなど)を含む培地で培養し、培養物から菌体を回収する。回収された菌体からプラスミドDNAを抽出する。プラスミドDNAの抽出は、公知の技術によって行なうことができ、また市販のプラスミド抽出キットを用いて簡便に抽出することもできる。市販のプラスミド抽出キットとしては、キアクイックプラスミド精製キット(商品名: Qiaquick plasmid purification kit、キアゲン社製)などが挙げられる。この抽出されたプラスミドDNAの塩基配列を決定することにより、THLをコードする遺伝子、CTFをコードする遺伝子、ADCをコードする遺伝子及びADHをコードする遺伝子の配列を確認することができる。DNAの塩基配列は、公知の方法、例えばジオキシヌクレオチド酵素法などにより決定することができる。また、キャピラリー電気泳動システムを用いて、検出には多蛍光技術を使用して塩基配列を決定することもできる。また、DNAシーケンサー、例えばABI PRISM 3730xl DNA Analyzer(アプライドバイオシステム社製)などを使用して決定することもできる。

[0043] 上記の方法は、遺伝子工学実験の常法に基づいて行なうことができる。種々の微生物のベクターや外来遺伝子の導入及び発現法は、多くの実験書に記載されているので[例えば、Sambrook, J. & Russel, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3<sup>rd</sup> Edition) CSHL Press (2001)、またはAusubel, F. et al. *Current protocols in molecular biology*. Green Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)等]、それらに従ってベクターの選択、遺伝子の導入、及び発現を行なうことができる。

[0044] 広範囲の種類のプロモーターが本発明に使用するのに適している。そのようなプロモーターは、酵母、細菌及び他の細胞供給源を含む多くの公知の供給源から得られ、好気性細菌または通性嫌気性細菌において目的遺伝子の転写を開始させる機能を有する塩基配列であればいかなるものであってもよい。そのようなプロモーターの適当な例としては、例えば、大腸菌及びコリネ型細菌においてはlac、trc、tacプロモーター等を用いることができる。本発明に使用されるプロモーターは、必要に応じて、修飾して、その調節機構を変更することができる。また、目的遺伝子の下流に配置される制御配列下のターミネーターについても、好気性細菌または通性嫌気性細菌においてその遺伝子の転写を終了させる機能を有する塩基配列であれば、いかなるものであってもよい。

[0045] 次に、THLをコードする遺伝子、CTFをコードする遺伝子、ADCをコードする遺伝子及びADHをコードする遺伝子を、前述した好気性細菌または通性嫌気性細菌において、プラスミド上または染色体上で発現させる。例えば、プラスミドを用いて、これらの遺伝子は発現可能な制御配列下に導入される。ここで「制御配列下」とはこれらの遺伝子が、例えば、プロモーター、インデューサー、オペレーター、リボソーム結合部位及び転写ターミネーター等との共同作業により、転写翻訳できることを意味する。このような目的で使用されるプラスミドベクターとしては、好気性細菌または通性嫌気性細菌内で自律複製機能を司る遺伝子を含むものであれば良い。その具体例としては、例えば、大腸菌に用いるプラスミドベクターとしては、pUC18、pUC19、pBR322、pET、pCold、pGEX及びそれらの誘導體などが挙げられる。コリネ型細菌に用いるプラスミドベクターとしては、ブレブバクテリウム ラクトファーメントム (*Brevibacterium lactofermentum*) 2256由来のpAM330 (特開昭58-67699号公報; Miwa, K. et al., Cryptic plasmids in glutamic acid-producing bacteria. *Agric. Biol. Chem.* 48:2901-2903 (1984) 及び Yamaguchi, R. et al., Determination of the complete nucleotide sequence of the *Brevibacterium lactofermentum* plasmid pAM330 and the analysis of its genetic information. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 16:265-267 (1985)); コリネバクテリウム グルタミカム ATCC13058由来のpHM1519 (Miwa, K. et al., Cryptic plasmids in glutamic acid-producing bacteria. *Agric. Biol. Chem.* 48:2901-2903 (1984)) 及び pCRY30 (Kurusu, Y. et al., Identification of plasmid partition function in coryneform bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:759-764 (1991)); コリネバクテリウム グルタミカム T250由来のpCG4 (特開昭57-183799, Katsumata, R. et al., Protoplast transformation of glutamate-producing bacteria with plasmid DNA. *J. Bacteriol.*, 159:306-311 (1984)), pAG1、pAG3、pAG14、pAG50 (特開昭62-166890号公報)、pEK0、pEC5及びpEKEx1 (Eikmanns, B.J. et al., A family of *Corynebacterium glutamicum*/*Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression, and promoter probing. *Gene*, 102:93-98 (1991))、並びにそれらの誘導體などが挙げられる。更には酵母プラスミド (YEp型、YCp型など)、ファージDNAなどが挙げられ、宿主において複製可能である限り、他のいかなるベクターも用いることができる。

。また、ベクターは、種々の制限酵素部位をその内部にもつマルチクローニングサイトを含んでいる、または単一の制限酵素部位を含んでいることが好ましい。

[0046] 本発明の形質転換された好気性細菌または通性嫌気性細菌の創製に使用されるプラスミドベクターは、例えば、クロストリジウム アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) 由来の *thl* 遺伝子、*ctfAB* 遺伝子及び *adc* 遺伝子並びにクロストリジウム ベージェリンキー (*Clostridium beijerinckii*) 由来の *adh* 遺伝子を用いる場合には、塩基配列が確認された該遺伝子を、適当なプロモーター、ターミネーター等の制御配列に連結後、これを上記例示されているいずれかのプラスミドベクターの適当な制限酵素部位に挿入することにより、構築することが出来る。詳細は、実施例に記載している。

[0047] 形質転換

目的遺伝子を含むプラスミドベクターの好気性細菌または通性嫌気性細菌への導入方法としては、例えば塩化カルシウム／塩化ルビジウム法、リン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン介在トランスフェクション、電気穿孔法などの公知の方法で行うことができる。具体的には、例えば大腸菌の場合、塩化カルシウム法や電気穿孔法[例えば、Sambrook, J. & Russel, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3<sup>rd</sup> Edition) CSHL Press (2001)、または Ausubel, F. et al. *Current protocols in molecular biology*. Green Publishing and Wiley Interscience, New York (1987) 等] などやエシエリヒア・コリ JM109 のコンピテントセル (宝酒造株式会社製) を用いる方法を同社プロトコールに従い行うことができる。コリネ型細菌の場合、電気パルス法を、公知の方法 [Kurusu, Y. et al., *Electroporation-transformation system for Coryneform bacteria by auxotrophic complementation*. *Agric. Biol. Chem.* 54:443-447 (1990)] 及び [Vertes A.A. et al., *Presence of mrr- and mcr-like restriction systems in Coryneform bacteria*. *Res. Microbiol.* 144:181-185 (1993)] により行うことができる。

[0048] 上記方法は、遺伝子工学実験の常法に基づいて行うことができる。大腸菌や放線菌等の種々の微生物のベクターの情報や外来遺伝子の導入及び発現法は、多くの実験書に記載されているので (例えば、Sambrook, J., Russel, D.W., *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup> Edition, CSHL Press, 2001; Hopwood, D.A., Bib

b, M.J., Chater, K.F., Bruton, C.J., Kieser, H.M., Lydiate, D.J., Smith, C.P., Ward, J.M., Schrempf, H. Genetic manipulation of *Streptomyces*: A laboratory manual, The John Innes institute, Norwich, UK, 1985等)、それらに従ってベクターの選択、遺伝子の導入及び発現を行うことができる。

[0049] 上記の方法により創製される好気性細菌または通性嫌気性細菌の形質転換体としては、具体的には、エシエリヒア コリ (*Escherichia coli*) JM109/pCRC201 (受託番号FERM BP-10978として、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(日本国茨城県つくば市東1-1-1 中央第6(郵便番号305-8566))に寄託済み。受託日:2007年8月13日)及びエシエリヒア コリ (*Escherichia coli*) JM109/pCRC202 (受託番号FERM BP-10979として、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(日本国茨城県つくば市東1-1-1 中央第6(郵便番号305-8566))に寄託済み。受託日:2007年8月13日)が挙げられる。

さらに、上述と同様の方法により、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属菌においてもイソプロパノール生産能を有する形質転換体の創製が可能である。

[0050] 本発明の形質転換体は、イソプロパノール生産性を向上させるために、解糖系の流量の増加、イソプロパノール浸透圧または有機酸に対する耐性の増加、及び副生物(目的とする生成産物以外の炭素含有分子を意味する)生産の減少、からなる群から選択された特徴の一つまたはそれ以上を生じる遺伝子修飾をさらに含むことができる。そのような遺伝子修飾は、具体的には、外来性遺伝子の過剰発現及び/または内在性遺伝子の不活化、古典的突然変異誘起、スクリーニング及び/または目的変異体の選別等を行なうことにより導入することができる。

[0051] また、形質転換体は、紫外線、エックス線または薬品等を用いる人工的な変異導入方法により変異しうるが、このように得られるどのような変異株であっても本発明の目的とするイソプロパノール生産能を有するかぎり、本発明の形質転換された微生物として使用することができる。

[0052] かくして創製された本発明の好気性細菌または通性嫌気性細菌の形質転換体(以下、単に形質転換体という)は、微生物の培養に通常使用される培地を用いて培養すればよい。この培地としては、通常、炭素源、窒素源、無機塩類及びその他の栄養

物質等を含有する天然培地または合成培地等を用いることができる。

- [0053] 炭素源としては、例えばグルコース、フルクトース、スクロース、マンノース、マルトース、マンニトール、キシロース、ガラクトース、澱粉、糖蜜、ソルビトールまたはグリセリン等の糖質及び糖アルコール；酢酸、クエン酸、乳酸、フマル酸、マレイン酸またはグルコン酸等の有機酸；エタノール等のアルコール等が挙げられる。また、所望によりノルマルパラフィン等の炭化水素等も用いることができる。炭素源は、1種単独で使用してもよく、また2種以上を混合して使用してもよい。これら炭素源の培地における濃度は通常約0.1～10% (wt)、好ましくは約0.5～5% (wt)である。
- [0054] 窒素源としては、窒素化合物、例えば塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、酢酸アンモニウム等の無機もしくは有機アンモニウム化合物、尿素、アンモニア水、硝酸ナトリウムまたは硝酸カリウム等が挙げられるが、これらに限定されない。また、コーンステープリカー、肉エキス、ペプトン、NZ-アミン、蛋白質加水分解物またはアミノ酸等の含窒素有機化合物等も使用可能である。窒素源は、1種単独で使用してもよく、また2種以上を混合して使用してもよい。窒素源の培地濃度は、使用する窒素化合物によっても異なるが、通常約0.1～10% (wt)、好ましくは約0.5～5% (wt)である。
- [0055] 無機塩類としては、例えばリン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硝酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸亜鉛、硫酸コバルトまたは炭酸カルシウム等が挙げられる。これら無機塩は、1種単独で使用してもよく、また2種以上を混合して使用してもよい。無機塩類の培地濃度は、使用する無機塩によっても異なるが、通常約0.01～1.0% (wt)、好ましくは約0.05～0.5% (wt)である。
- [0056] 栄養物質としては、例えば肉エキス、ペプトン、ポリペプトン、酵母エキス、乾燥酵母、コーンステープリカー、脱脂粉乳、脱脂大豆塩酸加水分解物または動植物若しくは微生物菌体のエキスやそれらの分解物等が挙げられる。栄養物質の培地濃度は、使用する栄養物質によっても異なるが、通常約0.1～10% (wt)、好ましくは約0.5～5% (wt)である。さらに、必要に応じて、ビタミン類を添加することもできる。ビタミン類としては、例えば、ビオチン、チアミン(ビタミンB1)、ピリドキシン(ビタミンB6)、パントテン酸、イノシトール、ニコチン酸等が挙げられる。

[0057] 培地のpHは約5～8が好ましい。

好ましい微生物培養培地としては、大腸菌用培地として、LB(Luria-Bertani)培地、SD8培地、NZYM培地、TB(Terrific Broth)培地、SOB培地、2×YT培地、M9培地等が、コリネ型細菌用培地として、A培地[Inui, M. et al., Metabolic analysis of *Corynebacterium glutamicum* during lactate and succinate productions under oxygen deprivation conditions. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 7:182-196 (2004)]、BT培地[Omumasaba, C.A. et al., *Corynebacterium glutamicum* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoforms with opposite, ATP-dependent regulation. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 8:91-103 (2004)]等が挙げられる。

[0058] 培養温度は、約15～45℃、好ましくは約25～40℃とすればよく、培養時間は、約1～7日間、好ましくは約1～3日間とすればよい。

次いで、形質転換体の培養菌体を回収する。上記の如くして得られる培養物から培養菌体を回収分離する方法としては、特に限定されず、例えば遠心分離や膜分離等の公知の方法を用いることができる。

[0059] 回収された培養菌体に対して処理を加え、得られる菌体処理物を次工程に用いてもよい。前記菌体処理物としては、培養菌体に何らかの処理が加えられたものであればよく、例えば、菌体をアクリルアミドまたはカラギーナン等で固定化した固定化菌体等が挙げられる。

#### [0060] (II) イソプロパノールの製造方法

上記の如くして得られる培養物から回収分離された形質転換体の培養菌体またはその菌体処理物は、好気条件下または嫌気条件下の反応培地でのイソプロパノール生成反応に供せられる。上記の形質転換体を糖類を含有する培地(反応培地)中で培養する工程と、培養物からイソプロパノールを回収する工程とを含むイソプロパノールの製造方法も、本発明の1つである。

イソプロパノール生成方式は、回分式、流加式、連続式いずれの生成方式も可能である。

[0061] 反応培地(反応液)には、イソプロパノールの原料となる有機炭素源(例えば、糖類等)が含まれていればよい。有機炭素源としては、本発明の形質転換体が生化学反

応に利用できる物質であればよい。

具体的には、糖類としては、グルコース、キシロース、アラビノース、ガラクトース、フルクトースもしくはマンノースなどの単糖類；セロビオース、ショ糖、ラクトース、もしくはマルトースなどの二糖類；またはデキストリンもしくは可溶性澱粉などの多糖類などが挙げられる。特に、 $C_6$ 糖や $C_5$ 糖などの単糖類が好ましいが、コリネ型細菌にはキシロース、アラビノース等の $C_5$ 単糖類を資化できない場合もある。そのような場合には、それらの単糖を資化できる機能を細菌に付与すればよい。なお、本発明においては、2種以上の糖の混合糖を用いることもできる。

[0062] より好ましくは、有機化合物の生成反応に用いられる反応培地は、形質転換体またはその処理物がその代謝機能を維持するために必要な成分、即ち、各種糖類等の炭素源；蛋白質合成に必要な窒素源；その他リン、カリウムまたはナトリウム等の塩類；さらに鉄、マンガンまたはカルシウム等の微量金属塩を含む。これらの添加量は所要反応時間、目的有機化合物生産物の種類または用いられる形質転換体の種類等により適宜定めることが出来る。用いる形質転換体によっては特定のビタミン類の添加が好ましい場合もある。炭素源、窒素源、無機塩類、ビタミン、微量金属塩は、公知のもの、例えば増殖培養工程につき例示したものをを用いることができる。

培地のpHは、通常約6～8が好ましい。

形質転換体またはその菌体処理物と糖類との反応は、本発明の形質転換体またはその菌体処理物が活動できる温度条件下で行なわれることが好ましく、形質転換体またはその菌体処理物の種類などにより適宜選択することができる。通常、約25～35℃とすればよい。

[0063] 最後に、上述のようにして反応培地で生成したイソプロパノールを採取する。その方法はバイオプロセスで用いられる公知の方法を用いることが出来る。そのような公知の方法として、イソプロパノール生成液の蒸留法、膜透過法、有機溶媒抽出法等があり、反応液組成や副生物等に応じてその分離精製採取法は適宜定めることが出来る。

[0064] 本発明はまた、前記の条件下における反応により糖類等よりイソプロパノールを生産するのに著しい改善を有する組換えイソプロパノール生産形質転換体を提供する

。

## 実施例

[0065] 以下、本発明を実施例により詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

[0066] 実施例1 (エシェリヒア コリ(Escherichia coli) IM109/pCRC201及びエシェリヒア コリ(Escherichia coli) IM109/pCRC202の創製)

### (1) イソプロパノール生産遺伝子群のクローニング

クロストリジウム属細菌におけるイソプロパノール生合成経路(アセチル-CoAからイソプロパノール)は、アセチル-CoA アセチルトランスフェラーゼ(Acetyl-CoA acetyltransferase)、アセトアセチル-CoA:アセテートCoA-トランスフェラーゼ(Acetoacetyl CoA:acetate CoA transferase)、アセトアセテート デカルボキシラーゼ(Acetoacetate decarboxylase)、及びイソプロパノール デヒドロゲナーゼ(Isopropanol dehydrogenase)の4ステップ(4つの酵素)により構成されている。これらの4種の酵素をコードする遺伝子を以下のPCR法により増幅した。

[0067] クロストリジウム アセトブチリカム(Clostridium acetobutylicum) ATCC824株の染色体及びプラスミドDNA(American Type Culture Collection(ATCC)より入手; ATCC 824D-5)を鋳型とし、アセチル-CoAアセチルトランスフェラーゼ遺伝子(thl)、アセトアセチル-CoA:アセテートCoA-トランスフェラーゼ遺伝子(ctfAB)、及びアセトアセテート デカルボキシラーゼ遺伝子(adc)をそれぞれプライマー1及び2(配列番号1及び2)、プライマー3及び4(配列番号3及び4)、プライマー5及び6(配列番号5及び6)を用いPCRにより増幅した。PCRは、GeneAmp PCR System 9700(アプライドバイオシステム社製)を用い、PCR反応1(94°C 30秒、58°C 30秒、72°C 1.5分、30サイクル; 鋳型DNA 10ng、反応液、dNTP 0.2mM、Prime Star DNA polymerase(TAKARA社製)2U、5× Prime Star buffer 6µl、及びプライマー各0.2µM、最終液量30µl)の条件で行った。上記で増幅した反応液3µlを用いて0.8%アガロースゲルにより電気泳動を行い、thl遺伝子の場合約1.2kb、ctfAB遺伝子の場合約1.3kb、adc遺伝子の場合約0.7kbのDNA断片が検出できた。増幅されたDNA断片は、Minelute PCR Purification Kit(キアゲン社製)を用い精製した。

[0068] クロストリジウム ベージェリンキー (*Clostridium beijerinckii*) NRRL B593株は、Reinforced clostridial 培地 (Difco社製) により30°C、嫌気条件下培養した。培養16時間後、5mlの培養液を遠心分離 (微量高速冷却遠心機MX-301、トミー精工社製、5000rpm、10min) し、沈殿した菌体を染色体DNAの抽出に供した。染色体DNAの抽出は、以下の手順で行った。すなわち、菌体を0.3mlのTESS buffer [25mM Tris-HCl (pH 8.0)、5mM EDTA、50mM NaCl、25% Sucrose] に懸濁し、これに0.3mlのリゾチーム溶液 (100mg/ml) を添加し、氷上で30min静置した。次に2%ドデシル硫酸ナトリウム溶液を0.6ml、及び10mg/ml Proteinase K (Sigma社製) 溶液40  $\mu$ lを添加し、50°Cで保温した。2時間後、これに等量のフェノール・クロロホルム溶液を加え、室温で10分攪拌した。この溶液を、遠心分離 (12000rpm、10分) し、上静液を回収した。これに120  $\mu$ lの3M酢酸ナトリウム溶液及び720  $\mu$ lのイソプロパノールを加えた。これをよく混合した後、遠心分離 (15000rpm、10分) により染色体DNAを沈殿させ、上静液を除き、分離された染色体DNAを70%エタノール溶液1mlにより洗浄した。再度遠心分離 (15000rpm、10分) を行い、染色体DNAを回収した。室温下、10分放置することで染色体DNAを乾燥させた後、100  $\mu$ lのTE (10mM Tris-HCl、0.5mM EDTA) に溶解させた。イソプロパノール デヒドロゲナーゼ遺伝子 (*adh*) は、クロストリジウム ベージェリンキー (*Clostridium beijerinckii*) NRRL B593株の染色体DNAを鋳型とし、プライマー7及び8 (配列番号7及び8) を用い、上述のPCR反応1の条件により増幅した。増幅した反応液3  $\mu$ lを用いて0.8%アガロースゲルにより電気泳動を行ったところ、*adh* 遺伝子を含む約1.1kbのDNA断片が検出できた。増幅されたDNA断片は、Minelute PCR Purification Kitを用い精製した。

[0069] 遺伝子発現プロモーター (*tac promoter*) を得る為に、pKK223-3 (ファルマシア社製) を鋳型とし、プライマー9及び10 (配列番号9及び10) を用い、上述のPCR反応1の条件により*tac promoter* を含む約0.2kbのDNA断片を増幅した。反応終了後、増幅されたDNA断片は、Minelute PCR Purification Kit (キアゲン社製) を用い精製した。

[0070] 上述のPCR反応1により得られた約1.3kbの*ctfAB* 遺伝子を含むDNA断片、約0

. 7kbのadc遺伝子を含むDNA断片及び約1.1kbのadh遺伝子を含むDNA断片それぞれとtac promoterとの連結は、以下の手順で行った。すなわち、上記3種のDNA断片のいずれか及びtac promoterを含むDNA断片をそれぞれ約100ngずつ混合し、これにdNTP 0.2mM、Prime Star DNA polymerase (TAKARA社製) 2U及び5×Prime Star buffer 6 $\mu$ lを加えて最終液量30 $\mu$ lとなるように各試薬を混合した。この反応液を、PCR反応2(94 $^{\circ}$ C 30秒、52 $^{\circ}$ C 30秒、72 $^{\circ}$ C 1.5分、30サイクル)の条件でGeneAmp PCR System 9700を用い、反応させた。反応終了後、tac promoterと各遺伝子(ctfAB、adc、及びadhのいずれか)とを連結したDNA断片を得るために、該反応液0.5 $\mu$ lを鋳型とし、それぞれプライマー4及び9(配列番号4及び9)、プライマー6及び11(配列番号6及び11)、プライマー8及び12(配列番号8及び12)を用い、上述のPCR反応1の条件に従いPCRにより増幅した。増幅した反応液3 $\mu$ lを用いて0.8%アガロースゲルにより電気泳動を行ったところ、tac promoterにctfAB遺伝子が連結した約1.5kbのDNA断片(Ptac-ctfAB)、tac promoterにadc遺伝子が連結した約0.9kbのDNA断片(Ptac-adc)、及びtac promoterにadh遺伝子が連結した約1.3kbのDNA断片(Ptac-adh)が検出できた。これらのDNA断片を、アガロースゲル電気泳動により分離し、Minelute Gel Extraction Kit(キアゲン社製)を用いてゲルから回収した。

[0071] 上述のtac promoterを連結していない約1.2kbのthl DNA断片、tac promoterを連結した約1.5kbのPtac-ctfAB、約0.9kbのPtac-adc及び約1.3kbのPtac-adhを含むDNA断片それぞれをpGEM-Tベクター(Promega社製)に取扱説明書に従い連結し、塩化カルシウム法[*Journal of Molecular Biology*, 53, 159 (1970)]によりエシェリヒア コリJM109を形質転換し、アンピシリン50 $\mu$ g/mlを含むLB寒天培地(ポリペプトン10g、イーストエキストラクト 5g、NaCl 5g及び寒天15gを蒸留水1Lに溶解)に塗布した。各々培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素でそれぞれ切断することにより、挿入断片を確認した。さらに該挿入断片を、シーケンスすることで目的のDNA配列の構築を確認した。thl遺伝子(配列番号13)、ctfAB遺伝子(配列番号14)、adc遺伝子(配列番号15)、またはadh遺伝子(配列番号16)を含むプラスミドを、それぞれ

pGEM-thl、pGEM-Ptac-ctfAB、pGEM-Ptac-adc、及びpGEM-Ptac-adhと命名した。尚、DNAシーケンサーとしてはABI PRISM3100 (Applied Biosystems社製)を用い、シーケンス反応はABI PRISM Cycle sequencing Kit (Applied Biosystems社製)を用いて行った。このようにして調製したプラスミドpGEM-thl、pGEM-Ptac-ctfAB、pGEM-Ptac-adc及びpGEM-Ptac-adhを、それぞれ制限酵素EcoRI及びBamHI、BamHI及びSphI、SphI及びSmaI、SmaI及びHindIIIを用いて切断後、アガロースゲル電気泳動により分離し、Minelute Gel Extraction Kit(キアゲン社製)を用いてゲルから回収することにより、tac promoterを連結していないthl遺伝子を含む約1.2kbのEcoRI-BamHI DNA断片と、tac promoterを連結したPtac-ctfAB遺伝子を含む約1.5kbのBamHI-SphI DNA断片、Ptac-adc遺伝子を含む約0.9kbのSphI-SmaI DNA断片及びPtac-adh遺伝子を含む約1.3kbのSmaI-HindIII DNA断片をそれぞれ取得した。

[0072] (2) 発現ベクターpCRC200の構築

遺伝子発現ベクターpCRC200の調製は、以下の手順に従って行った。すなわち、pKK223-3を鋳型とし、プライマー13及び14(配列番号17及び18)を用い、上記(1)項のPCR反応1の条件によりtac promoter-rrnB terminator領域を含むDNA断片を増幅した。次に大腸菌ベクターpCRB1 [Nakata, K. et al. Vectors for the genetics engineering of corynebacteria; in Saha, B.C.(ed.): Fermentation Biotechnology, ACS Symposium Series 862. Washington, American Chemical Society, pp. 175-191(2003)]をEcoRIにより消化し、これをDNA Blunting Kit (TAKARA社製)により取扱説明書に従ってDNA末端を平滑し、セルフライゲーションさせた。次に得られたプラスミドをHindIIIにより消化し、これを同様にDNA Blunting KitによりDNA末端を平滑し、セルフライゲーションさせた。こうして得られたプラスミドを、SacI及びSphIにより消化し、同様にtac promoter-rrnB terminator領域を含むDNA断片をSacI及びSphIにより消化した後、これら2つのDNA断片をDNA ligation kit (TAKARA社製)により取扱説明書に従ってライゲーション反応を行った。該反応液を用い、塩化カルシウム法によりエシェリヒア コリJM109を形質転換し、クロラムフェニコール50  $\mu$ g/mlを含むLB寒天培地(ポリペプトン10g、イーストエキストラクト 5g、NaCl 5g及び寒天15

gを蒸留水1Lに溶解)に塗布した。該培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドDNAを抽出し、該プラスミドを制限酵素でそれぞれ切断することにより、挿入断片を確認した。目的の遺伝子断片を含むプラスミドをpCRC200(配列番号19)と命名した。

[0073] (3) 発現プラスミドpCRC201及びpCRC202の構築とエシェリヒア コリ(Escherichia coli) JM109/pCRC201及びエシェリヒア コリ(Escherichia coli) JM109/pCRC202の創製

上記(1)項で取得したtac promoterを連結していないthl遺伝子を含む約1.2kb EcoRI-BamHI DNA断片、tac promoterを連結したPtac-ctfAB遺伝子を含む約1.5kb BamHI-SphI DNA断片、Ptac-adc遺伝子を含む約0.9kb SphI-SmaI DNA断片及びPtac-adh遺伝子を含む約1.3kb SmaI-HindIII DNA断片をそれぞれ100ngと、予めEcoRI及びHindIIIにより消化したpKK223-3 10ngとをすべて混合し、DNA ligation kitによりライゲーション反応を行った。この反応により、thl遺伝子にもtac promoterが連結されることになる。尚、pKK223-3は、エシェリヒア コリ内でのコピー数が15~20であるpBR322由来の複製オリジンを有している[Sambrook, J. et al. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)]。このライゲーション液を用いて塩化カルシウムの方法によりエシェリヒア コリ(Escherichia coli) JM109を形質転換し、目的の遺伝子断片を含むプラスミドDNAを保持した大腸菌株を選抜することで、プラスミドpCRC201を得た(図1、配列番号20)。このプラスミドを保持した形質転換株エシェリヒア コリ(Escherichia coli) JM109/pCRC201は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(日本国茨城県つくば市東1-1-1 中央第6(郵便番号305-8566))に寄託されている(受託日:2007年8月13日、受託番号:FERM BP-10978)。

[0074] 上記のプラスミドpCRC201をEcoRI及びSmaIで消化し、thl遺伝子、Ptac-ctfAB遺伝子、及びPtac-adc遺伝子を含む約3.6kbのEcoRI-SmaI DNA断片を調製した。次に得られたDNA断片を、予めEcoRI及びSmaIにより消化した上記(2)項で構築のpCRC200に連結し、プラスミドpCACを得た。この構築により、thl遺

伝子にもtac promoterが連結されることになる。尚、pCRC200は、エシェリヒア コリ内でのコピー数が500～700であるpUCベクター由来の複製オリジンを有している〔Sambrook, J. et al. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)〕。次にpGEM-Ptac-adh (配列番号16)を含むプラスミドを鋳型とし、プライマー12及び15 (配列番号21)を用いて上記(1)項のPCR反応条件1によりSalI認識配列を付加したPtac-adh遺伝子を増幅した。この結果得られた該反応液を、Minelute PCR Purification Kit (キアゲン社製)を用い精製し、該DNA断片をpGEM-Tベクター (Promega社製)に取扱説明書に従い連結しプラスミドpGEM-Ptac-adhsを得た。こうして調製したプラスミドを、SmaI及びSalIにより消化し、Ptac-adh遺伝子を含む約1.3kbのDNA断片を調製した。このDNA断片を、予めSmaI及びSalIにより消化したpCACに連結し、プラスミドpCRC202を得た(図2、配列番号22)。このプラスミドを大腸菌JM109株へ導入し、形質転換株エシェリヒア コリ (Escherichia coli) JM109/pCRC202株を得た。この形質転換株は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(日本国茨城県つくば市東1-1-1 中央第6(郵便番号305-8566))に寄託されている(受託日:2007年8月13日、受託番号:FERM BP-10979)。

[0075] 実施例2 (形質転換株エシェリヒア・コリJM109/pCRC201によるイソプロパノールの生産)

エシェリヒア コリJM109/pCRC201をアンピシリン200  $\mu$ g/mlを含むLB液体培地(ポリペプトン10g、イーストエキストラクト 5g及びNaCl 5gを蒸留水1Lに溶解)により37°Cで、約16時間振とう培養した。この培養液500  $\mu$ lを、アンピシリン200  $\mu$ g/mlを含む50mlのSD8培地[NH<sub>4</sub>Cl 7g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 7.5g、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7.5g、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.85g、MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.17g、イーストエキストラクト 10g、グルコース 20g、及びtrace elements 0.8ml(FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 40g、MnSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O 10g、Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> 28.3g、CoCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O 4g、ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 2g、Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O 2g、CuCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 1g及びH<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.5gを1Lの5M HClに溶解)を含む1Lの水溶液]に植菌した。培養は、500ml容量のバツフル付三角フラスコを用い、37°Cで振とう培養により行った。グルコースは、培地に適宜追加された。培養液中のイソプロパノールは、Sunpak-A 50/80 Thermon-1000(2.1m×3.2mm I

. D.、信和化工社製)を装着したガスクロマトグラフGC-14B(島津製作所社製)により分析した。分析条件は、窒素35ml/min、水素60kPa、空気60kPa、インジェクション温度200°C、FID検出器温度200°Cであり、カラム温度制御条件は、130°Cで13分保持後、昇温速度10°C/minで160°Cまで上昇させた。所定時間培養後、培養液を遠心分離(15000rpm、5min)し、得られた上清液をガスクロマトグラフによりイソプロパノール生成量を分析した。

エシェリヒア コリ(*Escherichia coli*) JM109/pCRC201を培養開始から24時間後及び48時間後の反応液を遠心分離(4°C、15,000×g、10分)し、得られた上清液を用いてガスクロマトグラフィーによりイソプロパノールを分析したところ、イソプロパノールが14mM(24時間後)及び11mM(48時間後)生成していた。

#### [0076] 比較例1

実施例2で使用したエシェリヒア コリ(*Escherichia coli*) JM109/pCRC201に代えて、エシェリヒア コリ JM109を用い、LB培地及びSD8培地にアンピシリンを添加しないこと以外は、実施例2と同様の条件、方法にてイソプロパノール生産実験を行った。

その結果、エシェリヒア コリ JM109は、イソプロパノールを生成しなかった。実施例2の結果との比較において、エシェリヒア コリ(*Escherichia coli*) JM109/pCRC201は、イソプロパノール生成能を有することが明らかとなった。

#### [0077] 実施例3 (形質転換株エシェリヒア・コリ JM109/pCRC202によるイソプロパノールの生産)

実施例2で使用したエシェリヒア コリ(*Escherichia coli*) JM109/pCRC201に代えて、エシェリヒア コリ(*Escherichia coli*) JM109/pCRC202を用いたこと以外は、実施例2と同様の条件、方法にてイソプロパノール生産実験を行った。

エシェリヒア コリ(*Escherichia coli*) JM109/pCRC202を培養開始から24時間後及び48時間後の反応液を遠心分離(4°C、15,000×g、10分)し、得られた上清液を用いてガスクロマトグラフィーによりイソプロパノールを分析したところ、イソプロパノールが75mM(24時間後)及び162mM(48時間後)生成していた。

実施例2のエシェリヒア コリ(*Escherichia coli*) JM109/pCRC201の結果との比較において、エシェリヒア コリ(*Escherichia coli*) JM109/pCRC202は、より高いイソプロパノール

ル生成能を有することが明らかとなった。

#### 産業上の利用可能性

[0078] 本発明の形質転換体は、糖類から極めて効率よくイソプロパノールを生産することができるため有用である。

本発明により、再生可能資源を原料とした効率的なイソプロパノール生産が可能となり、石油資源原料に依存しないイソプロパノール工業生産プロセスの新規な構築が可能となる。

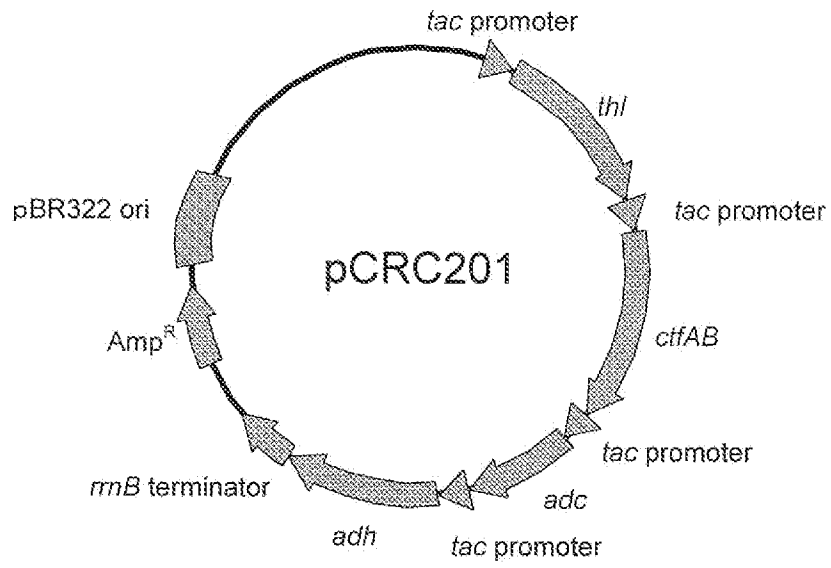
## 請求の範囲

- [1] 以下の(a)～(d)の遺伝子を好気性細菌または通性嫌気性細菌に導入したことを特徴とする、イソプロパノール生産能を有する形質転換体。
- (a) アセチル-CoA アセチルトランスフェラーゼ (Acetyl-CoA acetyltransferase) 活性を有する酵素をコードする外来性遺伝子
- (b) アセトアセチル-CoA:アセテート CoA-トランスフェラーゼ (Acetoacetyl CoA:acetate CoA transferase) 活性を有する酵素をコードする外来性遺伝子
- (c) アセトアセテート デカルボキシラーゼ (Acetoacetate decarboxylase) 活性を有する酵素をコードする外来性遺伝子
- (d) イソプロパノール デヒドロゲナーゼ (Isopropanol dehydrogenase) 活性を有する酵素をコードする外来性遺伝子
- [2] (a) アセチル-CoA アセチルトランスフェラーゼ活性を有する酵素をコードする外来性遺伝子として、配列番号13の塩基配列からなるDNA、または配列番号13の塩基配列若しくは配列番号13の塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件でハイブリダイズし、かつアセチル-CoA アセチルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAを用い;
- (b) アセトアセチル-CoA:アセテート CoA-トランスフェラーゼ活性を有する酵素をコードする外来性遺伝子として、配列番号14の塩基配列からなるDNA、または配列番号14の塩基配列若しくは配列番号14の塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件でハイブリダイズし、かつアセトアセチル-CoA:アセテート CoA-トランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAを用い;
- (c) アセトアセテート デカルボキシラーゼ活性を有する酵素をコードする外来性遺伝子として、配列番号15の塩基配列からなるDNA、または配列番号15の塩基配列若しくは配列番号15の塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件でハイブリダイズし、かつアセトアセテート デカルボキシラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAを用い;
- (d) イソプロパノール デヒドロゲナーゼ活性を有する酵素をコードする外来性遺伝子として、配列番号16の塩基配列からなるDNA、または配列番号16の塩基配列若

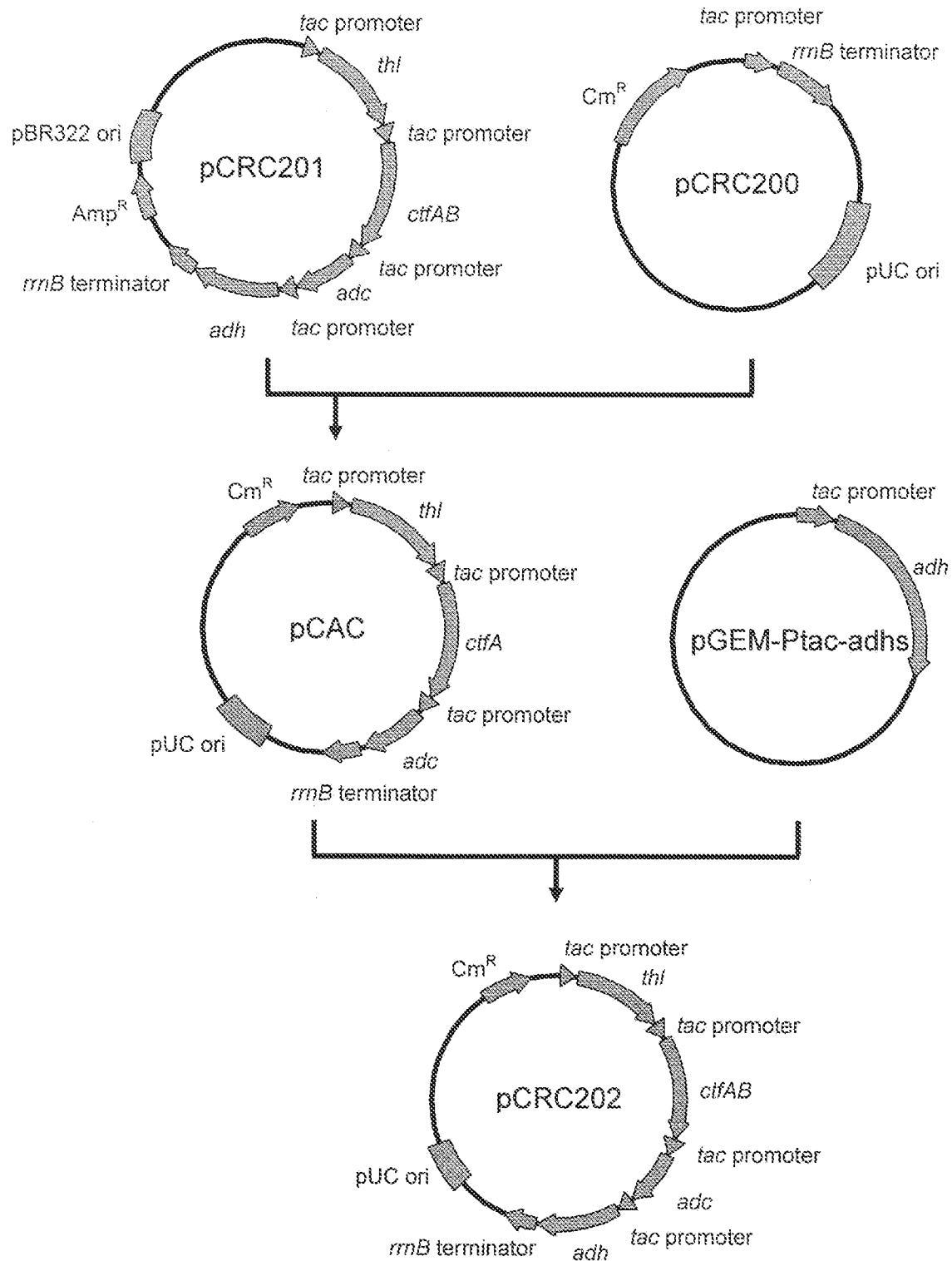
しくは配列番号16の塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつイソプロパノール デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAを用いる請求の範囲1記載の形質転換体。

- [3] 好気性細菌または通性嫌気性細菌が、エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) である請求の範囲1記載の形質転換体。
- [4] (a) アセチル-CoA アセチルトランスフェラーゼ活性を有する酵素をコードする外来性遺伝子、(b) アセトアセチル-CoA:アセテート CoA-トランスフェラーゼ活性を有する酵素をコードする外来性遺伝子、(c) アセトアセテート デカルボキシラーゼ活性を有する酵素をコードする外来性遺伝子、及び(d) イソプロパノール デヒドロゲナーゼ活性を有する酵素をコードする外来性遺伝子のそれぞれとして、クロストリジウム ベーージェリンキー (*Clostridium beijerinckii*)、クロストリジウム オウランティブチリカム (*Clostridium aurantibutyricum*)、クロストリジウム アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*)、クロストリジウム サッカロペルブチルアセトニカム (*Clostridium saccharoperbutylaceticum*)、クロストリジウム サッカロアセトブチリカム (*Clostridium saccharoacetobutylicum*)、クロストリジウム パスツールアウム (*Clostridium pasteurianum*)、クロストリジウム スポロゲンズ (*Clostridium sporogenes*)、クロストリジウム カダベリス (*Clostridium cadaveris*)、クロストリジウム テタノモルフェウム (*Clostridium tetanomorphum*)、及びラルストニア ユートロファ (*Ralstonia eutropha*) からなる群より選ばれる同一または異なる微生物由来の *thl* 遺伝子、*ctfAB* 遺伝子、*adc* 遺伝子及び *adh* 遺伝子を用いる請求の範囲1記載の形質転換体。
- [5] 形質転換体が、エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) JM109/pCRC201 (受託番号 FERM BP-10978) またはエシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) JM109/pCRC202 (受託番号 FERM BP-10979) である請求の範囲1記載の形質転換体。
- [6] 請求の範囲1~5のいずれか一項記載の形質転換体を糖類を含有する培地中で培養する工程と、培養物からイソプロパノールを回収する工程とを含むイソプロパノールの製造方法。

[図1]



[図2]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/065355

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N1/21(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P7/04(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N1/21, C12N1/15, C12N1/19, C12N5/10, C12N15/09, C12P7/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2008
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2008	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2008

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CA(STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BERMEJO, L.L. et al., Expression of Clostridium acetobutylicum ATCC 824 genes in Escherichia coli for acetone production and acetate detoxification. Appl Environ Microbiol. (1998) Vol.64, pp.1079-1085	1-6
Y	ISMAIEL, A.A. et al., Purification and characterization of a primary-secondary alcohol dehydrogenase from two strains of Clostridium beijerinckii. J Bacteriol. (1993) Vol.175, pp.5097-5105	1-6
Y	MITCHELL, W.J. et al., Physiology of Carbohydrate to Solvent Conversion by Clostridia. Advances in Microbial Physiology (1997) Vol.39, pp.31-130	1-6

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
20 November, 2008 (20.11.08)

Date of mailing of the international search report  
02 December, 2008 (02.12.08)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/065355

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	STIM-HERNDON, K.P. et al., Characterization of an acetyl-CoA C-acetyltransferase (thiolase) gene from <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824. <i>Gene</i> . (1995) Vol.154, pp.81-85	1-6
Y	PETERSEN, D.J. et al., Sequence and arrangement of genes encoding enzymes of the acetone-production pathway of <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC824. <i>Gene</i> . (1993) Vol.123 pp.93-97	1-6
Y	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accession No. AF157307, < <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&amp;id=60592972">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&amp;id=60592972</a> > 09-MAR-2005 uploaded, TOTH, J. et al., Definition: <i>Clostridium beijerinckii</i> strain NRRL B593 putative transcription activator (stc), NADP-dependent alcohol dehydrogenase (adh), and putative electron-transfer protein (hydG) genes, complete cds; and putative glutamate synthase small subunit (gltD) gene, partial cds. [retrieved on 2008.11.19]	1-6
P,X	HANAI, T. et al., Engineered synthetic pathway for isopropanol production in <i>Escherichia coli</i> . <i>Appl Environ Microbiol</i> . (2007 Dec) Vol.73, pp.7814-7818 (Epub 2007 Oct)	1-6
P,X	JOJIMA, T. et al., Production of isopropanol by metabolically engineered <i>Escherichia coli</i> . <i>Appl Microbiol Biotechnol</i> . (2008 Jan) Vol.77, pp.1219-1224 (Epub 2007 Nov)	1-6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N1/21(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P7/04(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N1/21, C12N1/15, C12N1/19, C12N5/10, C12N15/09, C12P7/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2008年
日本国実用新案登録公報	1996-2008年
日本国登録実用新案公報	1994-2008年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CA(STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	BERMEJO, L.L. et al., Expression of Clostridium acetobutylicum ATCC 824 genes in Escherichia coli for acetone production and acetate detoxification. Appl Environ Microbiol. (1998) Vol.64, pp.1079-1085	1-6
Y	ISMAIEL, A.A. et al., Purification and characterization of a primary-secondary alcohol dehydrogenase from two strains of Clostridium beijerinckii. J Bacteriol. (1993) Vol.175, pp.5097-5105	1-6

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの  
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20. 11. 2008

国際調査報告の発送日

02. 12. 2008

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)  
 郵便番号100-8915  
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

六笠 紀子

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B

3845

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	MITCHELL, W.J. et al., Physiology of Carbohydrate to Solvent Conversion by Clostridia. Advances in Microbial Physiology (1997) Vol.39, pp.31-130	1-6
Y	STIM-HERNDON, K.P. et al., Characterization of an acetyl-CoA C-acetyltransferase (thiolase) gene from Clostridium acetobutylicum ATCC 824. Gene. (1995) Vol.154, pp.81-85	1-6
Y	PETERSEN, D.J. et al., Sequence and arrangement of genes encoding enzymes of the acetone-production pathway of Clostridium acetobutylicum ATCC824. Gene. (1993) Vol.123 pp.93-97	1-6
Y	Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accession No. AF157307, < <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&amp;id=60592972">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&amp;id=60592972</a> > 09-MAR-2005 uploaded, TOTH, J. et al., Definition: Clostridium beijerinckii strain NRRL B593 putative transcription activator (stc), NADP-dependent alcohol dehydrogenase (adh), and putative electron-transfer protein (hydG) genes, complete cds; and putative glutamate synthase small subunit (gltD) gene, partial cds. [retrieved on 2008.11.19]	1-6
P,X	HANAI, T. et al., Engineered synthetic pathway for isopropanol production in Escherichia coli. Appl Environ Microbiol. (2007 Dec) Vol.73, pp.7814-7818 (Epub 2007 Oct)	1-6
P,X	JOJIMA, T. et al., Production of isopropanol by metabolically engineered Escherichia coli. Appl Microbiol Biotechnol. (2008 Jan) Vol.77, pp.1219-1224 (Epub 2007 Nov)	1-6