

【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19日(2011.5.19)

【公表番号】特表2011-510611(P2011-510611A)  
 【公表日】平成23年4月7日(2011.4.7)  
 【年通号数】公開・登録公報2011-014  
 【出願番号】特願2009-549282(P2009-549282)  
 【国際特許分類】

C 1 2 N 1/21 (2006.01)  
 C 1 2 N 1/19 (2006.01)  
 C 1 2 N 15/09 (2006.01)  
 C 1 2 P 7/06 (2006.01)  
 C 1 2 P 7/16 (2006.01)  
 C 1 0 L 1/02 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 1/21 Z N A  
 C 1 2 N 1/19  
 C 1 2 N 15/00 A  
 C 1 2 P 7/06  
 C 1 2 P 7/16  
 C 1 0 L 1/02

【手続補正書】  
 【提出日】平成23年1月26日(2011.1.26)  
 【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】

- (a) イソブタノール、
- (b) 1-ブタノール、
- (c) 2-メチル1-ブタノール、
- (d) 1-プロパノール、
- (e) 3-メチル1-ブタノール、及び
- (f) 2-フェニルエタノール

から成る群より選択されるアルコールを生成する組換え微生物であって、

a) 前記アルコールが2-ケト酸中間体から生成され、且つ該2-ケト酸中間体が2-ケト酸デカルボキシラーゼ及びアルコールデヒドロゲナーゼにより前記アルコールに変換され、及び、

b) 前記組換え微生物が、

- (i) アセチル-CoAからエタノールへの変換の触媒作用、
- (ii) ピルビン酸から乳酸への変換の触媒作用、
- (iii) ピルビン酸からエタノールへの変換の触媒作用、
- (iv) フマル酸からコハク酸への変換の触媒作用、
- (v) アセチル-CoA及びリン酸からCoA及びアセチルホスフェートへの変換の触媒作用、
- (vi) アセチル-CoA及びギ酸からCoA及びピルビン酸への変換の触媒作用、
- (vii) アセチル-CoAのアセチル基と3-メチル-2-オキシブタノエート(2-オキシイソバ

レレート)との縮合の触媒作用、

(viii) 2-イソプロピルリンゴ酸と3-イソプロピルリンゴ酸との間の異性化の触媒作用

(ix)  $\alpha$ -ケト酸から分岐鎖アミノ酸への変換の触媒作用、

(x) Phe、Tyr、Asp又はLeuの合成の触媒作用、

(xi) ピルビン酸からアセチル-CoAへの変換の触媒作用、

(xii) 分岐鎖アミノ酸の生成の触媒作用、

(xiii) トレオニンからの  $\alpha$ -ケト酪酸の生成の触媒作用、

(xiv) メチオニン生合成の最初のステップの触媒作用、または

(xv) トレオニンの異化の触媒作用

を有する酵素をコードする1つ以上の遺伝子の活性または発現の低下を有する、前記組換え微生物。

【請求項2】

請求項1に記載の組換え微生物であって、前記2-ケト酸中間体が2-ケトイソ吉草酸であり、且つ該微生物がイソブタノールを生成し、親の微生物と比較して、

a) アセト乳酸シンターゼ；

b) アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ；

c) ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ；

d) 2-ケト酸デカルボキシラーゼ；および

e) アルコールデヒドロゲナーゼ

の発現または活性の増大を有する、前記組換え微生物。

【請求項3】

前記微生物が親の微生物と比較して低下したエタノール生成能を有する、請求項2に記載の組換え微生物。

【請求項4】

前記組換え微生物がアセチル-CoAからエタノールへの変換の低下または阻害を有する、請求項3に記載の組換え微生物。

【請求項5】

前記組換え微生物がエタノールデヒドロゲナーゼの発現または活性の低下を有し、それによってエタノール生成能が低下した、請求項4に記載の組換え微生物。

【請求項6】

前記2-ケト酸デカルボキシラーゼが、Aro10、Thi3、KivdおよびKdcA、上記のいずれかの相同体または変異体、ならびに上記のいずれかと少なくとも60%の同一性を有し、且つ2-ケト酸デカルボキシラーゼ活性を有するポリペプチドから成る群より選択される、請求項2～5のいずれか1項に記載の組換え微生物。

【請求項7】

前記2-ケト酸デカルボキシラーゼが、aro10、thi3、kivd、kdcA、上記のいずれかの相同体もしくは変異体、またはその断片から成る群より選択される核酸と少なくとも60%の同一性を有するポリヌクレオチドによりコードされ、且つ該ポリヌクレオチドが2-ケト酸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、請求項6に記載の組換え微生物。

【請求項8】

前記2-ケト酸デカルボキシラーゼがkivd遺伝子またはその相同体に由来するポリヌクレオチドによりコードされる、請求項7に記載の組換え微生物。

【請求項9】

前記アルコールデヒドロゲナーゼが、Adh3、Adh4、Adh5、Adh6、Sfa1、上記のいずれかの相同体または変異体、および上記のいずれかと少なくとも60%の同一性を有し、且つアルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドから成る群より選択される、請求項2～8のいずれか1項に記載の組換え生物。

【請求項10】

前記アルコールデヒドロゲナーゼが、adh3、adh4、adh5、adh6、sfa1遺伝子および上記のいずれかの相同体から成る群より選択される核酸と少なくとも60%の同一性を有するポリヌクレオチドによりコードされ、且つ該ポリヌクレオチドが2-アルコールデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードする、請求項9に記載の組換え微生物。

【請求項11】

請求項1に記載の組換え微生物であって、前記2-ケト酸中間体が2-ケトイソ吉草酸であり、且つ該微生物が1-ブタノールを生成し、親の微生物と比較して、

- a) 2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ；
- b) -イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ；
- c) イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼ；および
- d) トレオニンデヒドラターゼ

の発現または活性の増大を有する、前記組換え微生物。

【請求項12】

請求項1に記載の組換え微生物であって、前記2-ケト酸中間体が2-ケト-3-メチル-吉草酸であり、且つ該微生物が2-メチル1-ブタノールを生成し、親の微生物と比較して、

- a) トレオニンデヒドラターゼ；
- b) アセトヒドロキシ酸シンターゼ；
- c) アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ；
- d) ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ；
- e) 2-ケト酸デカルボキシラーゼ；および
- f) アルコールデヒドロゲナーゼ

から選択される1つ以上の遺伝子の発現または活性の増大を有する、前記組換え微生物。

【請求項13】

請求項1に記載の組換え微生物であって、前記2-ケト酸中間体が2-ケト酪酸であり、且つ該微生物が1-プロパノールを生成し、親の微生物と比較して、

- a) -イソプロピルリンゴ酸シンターゼ；
- b) -イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ；
- c) イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼ；および
- d) トレオニンデヒドラターゼ

から選択される1つ以上の遺伝子の発現または活性の増大を有する、前記組換え微生物。

【請求項14】

請求項1に記載の組換え微生物であって、前記2-ケト酸中間体が2-ケト-4-メチル-ペンタノエートであり、且つ該微生物が3-メチル1-ブタノールを生成し、親の微生物と比較して、

- a) アセト乳酸シンターゼ；
- b) アセトヒドロキシ酸イソメロレダクターゼ；
- c) ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ；
- d) 2-イソプロピルリンゴ酸シンターゼ；
- e) イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼ；
- f) -イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ；
- g) 2-ケト酸デカルボキシラーゼ；および
- h) アルコールデヒドロゲナーゼ

から選択される1つ以上の遺伝子の発現または活性の増大を有する、前記組換え微生物。

【請求項15】

請求項1に記載の組換え微生物であって、前記2-ケト酸中間体がフェニルピルビン酸であり、且つ該微生物が2-フェニルエタノールを生成し、親の微生物と比較して、

- a) コリスミ酸ムターゼP/プレフェン酸デヒドラターゼ；
- b) コリスミ酸ムターゼT/プレフェン酸デヒドロゲナーゼ；
- c) 2-ケト酸デカルボキシラーゼ；および
- d) アルコールデヒドロゲナーゼ

から選択される1つ以上の遺伝子の発現または活性の増大を有する、前記組換え微生物。

【請求項16】

前記微生物が、コリネバクテリウム属、ラクトバチルス属、ラクトコッカス属、サルモネラ属、エンテロバクター属、エンテロコッカス属、シアノバクテリア属、エルウィニア属、パンテア属、モルガネラ属、ベクトバクテリウム属、プロテウス属、セラチア属、シゲラ属、クレブシエラ属、シトロバクター属、サッカロマイセス属、デッケラ属、クリベロマイセス属およびピキア属より選択される、請求項1～15のいずれか1項に記載の組換え微生物。

【請求項17】

アルコールを生成する方法であって、

- a) 請求項1～16のいずれか1項に記載の組換え微生物を提供すること；
  - b) 適切な基質の存在下で、且つ該基質からアルコールへの変換にとって適切な条件下でa)に記載の微生物を培養すること；および、
  - c) アルコールを実質的に精製すること、
- を含む、前記方法。

【請求項18】

前記アルコールが、イソブタノール、1-ブタノール、2-メチル1-ブタノール、1-プロパノール、3-メチル1-ブタノールおよび2-フェニルエタノールから成る群より選択される、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

前記基質がブドウ糖を含み、且つ前記アルコールがイソブタノールを含む、請求項17に記載の方法。