

【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27年3月12日(2015.3.12)

【公表番号】特表2014-526262(P2014-526262A)

【公表日】平成26年10月6日(2014.10.6)

【年通号数】公開・登録公報2014-055

【出願番号】特願2014-530656(P2014-530656)

【国際特許分類】

C 1 2 N	1/15	(2006.01)
C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 1 2 N	15/00	(2006.01)
C 1 2 N	1/13	(2006.01)
C 1 2 N	1/19	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
C 1 2 N	1/21	(2006.01)
C 1 2 P	7/64	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	15/00	A
C 1 2 N	15/00	Z N A
C 1 2 N	1/13	
C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	5/00	1 0 1
C 1 2 N	1/21	
C 1 2 P	7/64	

【手続補正書】

【提出日】平成27年1月19日(2015.1.19)

【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) 増加した量のプロピオニル-C₀Aを生成するために有効な酵素活性を欠如しているか、または量が低下している親微生物細胞において生成するプロピオニル-C₀Aの量に対して、組換え微生物細胞において増加した量のプロピオニル-C₀Aを生成するために有効な前記酵素活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであって、前記ポリペプチドが組換え微生物細胞にとって外来性であるか、または前記ポリヌクレオチドの発現が親微生物細胞におけるポリヌクレオチドの発現と比較して組換え微生物細胞においてモジュレートされているポリヌクレオチド、

(b) 基質としてプロピオニル-C₀Aを利用する-ケトアシル-ACP合成酵素活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、および

(c) 脂肪酸誘導体酵素活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、を含む組換え微生物細胞であって、

組換え微生物細胞が、炭素源の存在下で、(a)、(b)および(c)によるポリヌクレオチドを発現するために有効な条件下で培養したとき、奇数鎖脂肪酸誘導体を含む脂肪酸誘導体組成物を生成し、

脂肪酸誘導体組成物における脂肪酸誘導体の少なくとも 10 % が奇数鎖脂肪酸誘導体である、組換え微生物細胞。

【請求項 2】

脂肪酸誘導体組成物における脂肪酸誘導体の少なくとも 20 % が奇数鎖脂肪酸誘導体である、請求項 1 に記載の組換え微生物細胞。

【請求項 3】

奇数鎖脂肪酸誘導体を少なくとも 100 mg / L 生成する、請求項 1 に記載の組換え微生物細胞。

【請求項 4】

(a) による少なくとも 1 種のポリヌクレオチドの発現が、組換え微生物細胞におけるポリヌクレオチドの過剰発現によってモジュレートされる、請求項 1 に記載の組換え微生物細胞。

【請求項 5】

(a) によるポリヌクレオチドが、

(i) アスパルトキナーゼ活性、ホモセリン脱水素酵素活性、ホモセリンキナーゼ活性、スレオニン合成酵素活性およびスレオニンデアミナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする 1 種または複数のポリヌクレオチド；

(ii) (R)-シトラマル酸合成酵素活性、イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼ活性およびベータ-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素活性を有するポリペプチドをコードする 1 種または複数のポリヌクレオチド；ならびに

(iii) メチルマロニル-CoA ムターゼ活性、メチルマロニル-CoA デカルボキシラーゼ活性およびメチルマロニル-CoA カルボキシ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 1 種または複数のポリヌクレオチド、

からなる群から選択される、請求項 1 に記載の組換え微生物細胞。

【請求項 6】

(i) による 1 種または複数のポリヌクレオチドおよび (ii) による 1 種または複数のポリヌクレオチドを含む、請求項 5 に記載の組換え微生物細胞。

【請求項 7】

基質としてプロピオニル-CoA を利用する -ケトアシル-ACP 合成酵素活性を有するポリペプチドが組換え微生物細胞にとって外来性であり、組換え微生物細胞にとって内在性である -ケトアシル-ACP 合成酵素活性を有するポリペプチドの発現が減衰している、請求項 1 に記載の組換え微生物細胞。

【請求項 8】

(a) 脂肪酸誘導体酵素活性がチオエステラーゼ活性を含み、組換え微生物細胞が奇数鎖脂肪酸を含む脂肪酸組成物を生成し、組成物中の脂肪酸の少なくとも 10 % が奇数鎖脂肪酸である、

(b) 脂肪酸誘導体酵素活性がエステル合成酵素活性を含み、組換え微生物細胞が奇数鎖脂肪エステルを含む脂肪エステル組成物を生成し、組成物中の脂肪エステルの少なくとも 10 % が奇数鎖脂肪エステルである、

(c) 脂肪酸誘導体酵素活性が脂肪アルデヒド生合成活性を含み、組換え微生物細胞が奇数鎖脂肪アルデヒドを含む脂肪アルデヒド組成物を生成し、組成物中の脂肪アルデヒドの少なくとも 10 % が奇数鎖脂肪アルデヒドである、

(d) 脂肪酸誘導体酵素活性が脂肪アルコール生合成活性を含み、組換え微生物細胞が奇数鎖脂肪アルコールを含む脂肪アルコール組成物を生成し、組成物中の脂肪アルコールの少なくとも 10 % が奇数鎖脂肪アルコールである、または

(e) 脂肪酸誘導体酵素活性が炭化水素生合成活性を含み、組換え微生物細胞が偶数鎖炭化水素を含む炭化水素組成物を生成し、組成物中の炭化水素の少なくとも 10 % が偶数鎖炭化水素である、

請求項 1 に記載の組換え微生物細胞。

【請求項 9】

請求項 1 に記載の組換え微生物細胞を含む細胞培養物。

【請求項 1 0】

奇数鎖脂肪酸誘導体を含む脂肪酸誘導体組成物の作製方法であって、

請求項 1 に記載の組換え微生物細胞を得ること、

炭素源を含有する培養培地中で、(a)、(b)および(c)によるポリヌクレオチドを発現し、奇数鎖脂肪酸誘導体を含む脂肪酸誘導体組成物を生成するために有効な条件下で組換え微生物細胞を培養することであって、組成物中の脂肪酸誘導体の少なくとも 10 % が奇数鎖脂肪酸誘導体であること、および

任意に、培養培地から奇数鎖脂肪酸誘導体組成物を回収すること、
を含む方法。

【請求項 1 1】

組換え微生物細胞が、

- (1) チオエステラーゼ活性を有するポリペプチド；
- (2) デカルボキシラーゼ活性を有するポリペプチド；
- (3) カルボン酸レダクターゼ活性を有するポリペプチド；
- (4) アルコール脱水素酵素活性を有するポリペプチド (EC 1.1.1.1)；
- (5) アルデヒドデカルボニラーゼ活性を有するポリペプチド (EC 4.1.99.5)；
- (6) アシル-CoA レダクターゼ活性を有するポリペプチド (EC 1.2.1.50)；
- (7) アシル-ACP レダクターゼ活性を有するポリペプチド；
- (8) エステル合成酵素活性を有するポリペプチド (EC 3.1.1.67)；
- (9) OleA 活性を有するポリペプチド；および
- (10) OleCD または OleBCD 活性を有するポリペプチド、

からなる群から選択される脂肪酸誘導体酵素活性を有するポリペプチドをコードする 1 種または複数のポリヌクレオチドを発現し、

組換え微生物細胞が、奇数鎖脂肪酸、奇数鎖脂肪エステル、奇数鎖脂肪アルデヒド、奇数鎖脂肪アルコール、偶数鎖アルカン、偶数鎖アルケン、偶数鎖末端オレフィン、偶数鎖内部オレフィンまたはさらに偶数鎖ケトンの 1 種または複数を含む組成物を生成する、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 2】

親微生物細胞によって生成されるよりも高い力価または高い割合の奇数鎖脂肪酸誘導体を生成する組換え微生物細胞の作製方法であって、

基質としてプロピオニル-CoA を利用する - ケトアシル-ACP 合成酵素活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよび脂肪酸誘導体酵素活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む親微生物細胞を得ること、および

同じ条件下で培養したとき、親微生物細胞によって生成されるプロピオニル-CoA の量よりも多量のプロピオニル-CoA を生成する、または生成することができる組換え微生物細胞を得るために親微生物細胞を操作すること、を含み、

組換え微生物細胞が炭素源の存在下で、ポリヌクレオチドを発現するために有効な条件下で培養したとき、同じ条件下で培養した親微生物細胞によって生成される奇数鎖脂肪酸誘導体の力価または割合に対してより高い力価または高い割合の奇数鎖脂肪酸誘導体を生成する方法。

【請求項 1 3】

親微生物細胞を操作する工程が、

- (a) アスパルトキナーゼ活性、ホモセリン脱水素酵素活性、ホモセリンキナーゼ活性、スレオニン合成酵素活性およびスレオニンデアミナーゼ活性を有するポリペプチド；
- (b) (R)-シトラマル酸合成酵素活性、イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼ活性およびベータ-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素活性を有するポリペプチド；ならびに
- (c) メチルマロニル-CoA ムターゼ活性、メチルマロニル-CoA デカルボキシラ

ーゼ活性またはメチルマロニル - C o A カルボキシトランスフェラーゼ活性のどちらかおより適宜メチルマロニル - C o A エピメラーゼ活性を有するポリペプチド、からなる群から選択されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを発現するために親微生物細胞を操作することを含み、

(a)、(b)または(c)による少なくとも 1 種のポリペプチドが親微生物細胞に対して外来性であるか、または(a)、(b)または(c)による少なくとも 1 種のポリヌクレオチドの発現が、親微生物細胞におけるポリヌクレオチドの発現と比較して、組換え微生物細胞においてモジュレートされている、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

組換え微生物細胞が、基質としてプロピオニル - C o A を利用する - ケトアシル - A C P 合成酵素活性を有するポリペプチドをコードする外来性ポリヌクレオチドを発現するように操作されており、 - ケトアシル - A C P 合成酵素活性を有するポリペプチドをコードする内在性ポリヌクレオチドの発現が減衰している、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 5】

微生物細胞によって生成される奇数鎖脂肪酸誘導体の力価または割合を増加させる方法であって、

脂肪酸誘導体を生成する親微生物細胞を得ること、および

同じ条件下で培養したとき、親微生物細胞によって生成されるプロピオニル - C o A の量よりも多量のプロピオニル - C o A を生成する、または生成することができる組換え微生物細胞を得るために親微生物細胞を操作すること、を含み、

組換え微生物細胞が、炭素源の存在下で、組換え微生物細胞においてプロピオニル - C o A および脂肪酸誘導体を生成するために有効な条件下で培養したとき、同じ条件下で培養した親微生物細胞によって生成される奇数鎖脂肪酸誘導体の力価または割合に対してより高い力価または高い割合の奇数鎖脂肪酸誘導体を生成する方法。

【請求項 1 6】

請求項 1 0 に記載の方法によって生成される脂肪酸誘導体組成物。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 5 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 5 1】

[本発明1001]

(a) 増加した量のプロピオニル - C o A を生成するために有効な酵素活性を欠如しているか、または量が低下している親微生物細胞において生成するプロピオニル - C o A の量に対して、組換え微生物細胞において増加した量のプロピオニル - C o A を生成するために有効な前記酵素活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであって、前記ポリペプチドが組換え微生物細胞にとって外来性であるか、または前記ポリヌクレオチドの発現が親微生物細胞におけるポリヌクレオチドの発現と比較して組換え微生物細胞においてモジュレートされているポリヌクレオチド、

(b) 基質としてプロピオニル - C o A を利用する - ケトアシル - A C P 合成酵素活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、および

(c) 脂肪酸誘導体酵素活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、を含む組換え微生物細胞であって、

組換え微生物細胞が、炭素源の存在下で、(a)、(b)および(c)によるポリヌクレオチドを発現するために有効な条件下で培養したとき、奇数鎖脂肪酸誘導体を含む脂肪酸誘導体組成物を生成し、

脂肪酸誘導体組成物における脂肪酸誘導体の少なくとも 10 % が奇数鎖脂肪酸誘導体である、組換え微生物細胞。

[本発明1002]

脂肪酸誘導体組成物における脂肪酸誘導体の少なくとも20%が奇数鎖脂肪酸誘導体である、本発明1001の組換え微生物細胞。

[本発明1003]

奇数鎖脂肪酸誘導体を少なくとも100m g / L生成する、本発明1001の組換え微生物細胞。

[本発明1004]

(a)による少なくとも1種のポリヌクレオチドの発現が、組換え微生物細胞におけるポリヌクレオチドの過剰発現によってモジュレートされる、本発明1001の組換え微生物細胞。

[本発明1005]

(a)によるポリヌクレオチドが、

(i)アスパルトキナーゼ活性、ホモセリン脱水素酵素活性、ホモセリンキナーゼ活性、スレオニン合成酵素活性およびスレオニンデアミナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする1種または複数のポリヌクレオチド；

(ii)(R)-シトラマル酸合成酵素活性、イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼ活性およびベータ-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素活性を有するポリペプチドをコードする1種または複数のポリヌクレオチド；ならびに

(iii)メチルマロニル-CoAムターゼ活性、メチルマロニル-CoAカルボキシラーゼ活性およびメチルマロニル-CoAカルボキシ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1種または複数のポリヌクレオチド、からなる群から選択される、本発明1001の組換え微生物細胞。

[本発明1006]

(i)による1種または複数のポリヌクレオチドおよび(ii)による1種または複数のポリヌクレオチドを含む、本発明1005の組換え微生物細胞。

[本発明1007]

基質としてプロピオニル-CoAを利用する-ケトアシル-ACP合成酵素活性を有するポリペプチドが組換え微生物細胞にとって外来性であり、組換え微生物細胞にとって内在性である-ケトアシル-ACP合成酵素活性を有するポリペプチドの発現が減衰している、本発明1001の組換え微生物細胞。

[本発明1008]

脂肪酸誘導体酵素活性がチオエステラーゼ活性を含み、組換え微生物細胞が奇数鎖脂肪酸を含む脂肪酸組成物を生成し、組成物中の脂肪酸の少なくとも10%が奇数鎖脂肪酸である、本発明1001の組換え微生物細胞。

[本発明1009]

脂肪酸誘導体酵素活性がエステル合成酵素活性を含み、組換え微生物細胞が奇数鎖脂肪エステルを含む脂肪エステル組成物を生成し、組成物中の脂肪エステルの少なくとも10%が奇数鎖脂肪エステルである、本発明1001の組換え微生物細胞。

[本発明1010]

脂肪酸誘導体酵素活性が脂肪アルデヒド生合成活性を含み、組換え微生物細胞が奇数鎖脂肪アルデヒドを含む脂肪アルデヒド組成物を生成し、組成物中の脂肪アルデヒドの少なくとも10%が奇数鎖脂肪アルデヒドである、本発明1001の組換え微生物細胞。

[本発明1011]

脂肪酸誘導体酵素活性が脂肪アルコール生合成活性を含み、組換え微生物細胞が奇数鎖脂肪アルコールを含む脂肪アルコール組成物を生成し、組成物中の脂肪アルコールの少なくとも10%が奇数鎖脂肪アルコールである、本発明1001の組換え微生物細胞。

[本発明1012]

脂肪酸誘導体酵素活性が炭化水素生合成活性を含み、組換え微生物細胞が偶数鎖炭化水素を含む炭化水素組成物を生成し、組成物中の炭化水素の少なくとも10%が偶数鎖炭化水素である、本発明1001の組換え微生物細胞。

[本発明1013]

本発明1001の組換え微生物細胞を含む細胞培養物。

[本発明1014]

奇数鎖脂肪酸誘導体を含む脂肪酸誘導体組成物の作製方法であって、

本発明1001の組換え微生物細胞を得ること、

炭素源を含有する培養培地中で、(a)、(b)および(c)によるポリヌクレオチドを発現し、奇数鎖脂肪酸誘導体を含む脂肪酸誘導体組成物を生成するために有効な条件下で組換え微生物細胞を培養することであって、組成物中の脂肪酸誘導体の少なくとも10%が奇数鎖脂肪酸誘導体であること、および

任意に、培養培地から奇数鎖脂肪酸誘導体組成物を回収すること、
を含む方法。

[本発明1015]

組換え微生物細胞が、

- (1) チオエステラーゼ活性を有するポリペプチド；
- (2) デカルボキシラーゼ活性を有するポリペプチド；
- (3) カルボン酸レダクターゼ活性を有するポリペプチド；
- (4) アルコール脱水素酵素活性を有するポリペプチド (EC 1.1.1.1)；
- (5) アルデヒドデカルボニラーゼ活性を有するポリペプチド (EC 4.1.99.5)；
- (6) アシル-CoA-レダクターゼ活性を有するポリペプチド (EC 1.2.1.50)；
- (7) アシル-ACPレダクターゼ活性を有するポリペプチド；
- (8) エステル合成酵素活性を有するポリペプチド (EC 3.1.1.67)；
- (9) OleA活性を有するポリペプチド；および
- (10) OleCDまたはOleBCD活性を有するポリペプチド、

からなる群から選択される脂肪酸誘導体酵素活性を有するポリペプチドをコードする1種または複数のポリヌクレオチドを発現し、

組換え微生物細胞が、奇数鎖脂肪酸、奇数鎖脂肪エステル、奇数鎖脂肪アルデヒド、奇数鎖脂肪アルコール、偶数鎖アルカン、偶数鎖アルケン、偶数鎖末端オレフィン、偶数鎖内部オレフィンまたはさらに偶数鎖ケトンの1種または複数を含む組成物を生成する、本発明1014の方法。

[本発明1016]

親微生物細胞によって生成されるよりも高い力価または高い割合の奇数鎖脂肪酸誘導体を生成する組換え微生物細胞の作製方法であって、

基質としてプロピオニル-CoAを利用する - ケトアシル-ACP合成酵素活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよび脂肪酸誘導体酵素活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む親微生物細胞を得ること、および

同じ条件下で培養したとき、親微生物細胞によって生成されるプロピオニル-CoAの量よりも多量のプロピオニル-CoAを生成する、または生成することができる組換え微生物細胞を得るために親微生物細胞を操作すること、を含み、

組換え微生物細胞が炭素源の存在下で、ポリヌクレオチドを発現するために有効な条件下で培養したとき、同じ条件下で培養した親微生物細胞によって生成される奇数鎖脂肪酸誘導体の力価または割合に対してより高い力価または高い割合の奇数鎖脂肪酸誘導体を生成する方法。

[本発明1017]

親微生物細胞を操作する工程が、

- (a) アスパルトキナーゼ活性、ホモセリン脱水素酵素活性、ホモセリンキナーゼ活性、スレオニン合成酵素活性およびスレオニンデアミナーゼ活性を有するポリペプチド；
- (b) (R)-シトラマル酸合成酵素活性、イソプロピルリンゴ酸イソメラーゼ活性およびベータ-イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素活性を有するポリペプチド；ならびに
- (c) メチルマロニル-CoAムターゼ活性、メチルマロニル-CoAデカルボキシラーゼ活性またはメチルマロニル-CoAカルボキシトランスフェラーゼ活性のどちらかおよび適宜メチルマロニル-CoAエピメラーゼ活性を有するポリペプチド、

からなる群から選択されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを発現するために親微生物細胞を操作することを含み、

(a)、(b)または(c)による少なくとも1種のポリペプチドが親微生物細胞に対して外來性であるか、または(a)、(b)または(c)による少なくとも1種のポリヌクレオチドの発現が、親微生物細胞におけるポリヌクレオチドの発現と比較して、組換え微生物細胞においてモジュレートされている、本発明1016の方法。

[本発明1018]

組換え微生物細胞が、基質としてプロピオニル-C_oAを利用する-ケトアシル-ACP合成酵素活性を有するポリペプチドをコードする外來性ポリヌクレオチドを発現するように操作されており、-ケトアシル-ACP合成酵素活性を有するポリペプチドをコードする内在性ポリヌクレオチドの発現が減衰している、本発明1016の方法。

[本発明1019]

微生物細胞によって生成される奇数鎖脂肪酸誘導体の力価または割合を増加させる方法であって、

脂肪酸誘導体を生成する親微生物細胞を得ること、および

同じ条件下で培養したとき、親微生物細胞によって生成されるプロピオニル-C_oAの量よりも多量のプロピオニル-C_oAを生成する、または生成することができる組換え微生物細胞を得るために親微生物細胞を操作すること、を含み、

組換え微生物細胞が、炭素源の存在下で、組換え微生物細胞においてプロピオニル-C_oAおよび脂肪酸誘導体を生成するために有効な条件下で培養したとき、同じ条件下で培養した親微生物細胞によって生成される奇数鎖脂肪酸誘導体の力価または割合に対してより高い力価または高い割合の奇数鎖脂肪酸誘導体を生成する方法。

[本発明1020]

本発明1014の方法によって生成される脂肪酸誘導体組成物。

本発明のこれらおよび他の目的および特性は、添付の図面と併せて以下の詳細な説明を読むとより完全に明らかとなろう。