

【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】令和6年5月7日(2024.5.7)

【国際公開番号】WO2021/230222

【出願番号】特願2021-529758(P2021-529758)

【国際特許分類】

C 1 2 N 1/21(2006.01)

C 1 2 P 1/04(2006.01)

C 1 2 P 7/40(2006.01)

C 1 2 N 15/09(2006.01)

10

【F I】

C 1 2 N 1/21 Z N A

C 1 2 P 1/04 Z

C 1 2 P 7/40

C 1 2 N 15/09 Z

【手続補正書】

【提出日】令和6年4月23日(2024.4.23)

【手続補正1】

20

【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】

野生型 Y e e X タンパク質またはそのホモログのアミノ酸配列において1～数個のアミノ酸が置換、挿入および/または欠失した変異型 Y e e X タンパク質またはそのホモログを発現可能な遺伝子を含み、かつ、C o A トランスフェラーゼをコードする遺伝子を導入した、遺伝子改変微生物。

30

【請求項2】

前記変異型 Y e e X タンパク質またはそのホモログが、配列番号1のアミノ酸配列においてアミノ酸残基74～100に相当する領域の1～数個のアミノ酸が置換、挿入および/または欠失した変異型 Y e e X タンパク質またはそのホモログである、請求項1に記載の遺伝子改変微生物。

【請求項3】

前記変異型 Y e e X タンパク質またはそのホモログが、配列番号1のアミノ酸配列において84番目に相当するアラニンが他のアミノ酸に置換した変異を有する変異型 Y e e X タンパク質またはそのホモログである、請求項1または2に記載の遺伝子改変微生物。

【請求項4】

40

前記変異型 Y e e X タンパク質またはそのホモログを発現可能な遺伝子をゲノム上に有する、請求項1～3のいずれかに記載の遺伝子改変微生物。

【請求項5】

ゲノム上の野生型 Y e e X タンパク質またはそのホモログを発現可能な遺伝子が、前記変異型 Y e e X タンパク質またはそのホモログを発現可能な遺伝子に変異または置換した、請求項4に記載の遺伝子改変微生物。

【請求項6】

前記変異型 Y e e X タンパク質またはそのホモログが、配列番号1のアミノ酸配列において84番目に相当するアラニンがバリンに置換した変異を有する、請求項1～5のいずれかに記載の遺伝子改変微生物。

50

【請求項 7】

前記微生物が有機酸生産能を有する、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の遺伝子改変微生物。

【請求項 8】

前記微生物が、*Serratia* 属、*Escherichia* 属、*Actinobacillus* 属、*Basfia* 属、*Pseudomonas* 属、*Hafnia* 属、*Acinetobacter* 属、*Shimwellia* 属または *Aerobacter* 属に属する微生物である、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の遺伝子改変微生物。

【請求項 9】

請求項 7 または 8 に記載の遺伝子改変微生物を、炭素源を発酵原料として含む培地にて培養することを含む、有機酸の製造方法。 10

【請求項 10】

前記有機酸が、コハク酸、酢酸、3 - ヒドロキシアジピン酸、 - ヒドロムコン酸および / またはアジピン酸である、請求項 9 に記載の有機酸の製造方法。

【請求項 11】

配列番号 1 のアミノ酸配列において 8 4 番目に相当するアラニンが他のアミノ酸に置換した変異を有する変異型 Y e e X タンパク質またはそのホモログを発現可能な遺伝子を含む、遺伝子改変微生物。

【請求項 12】

前記変異型 Y e e X タンパク質またはそのホモログが、配列番号 1 のアミノ酸配列において 8 4 番目に相当するアラニンがバリンに置換した変異を有する、請求項 11 に記載の遺伝子改変微生物。 20

【請求項 13】

前記微生物が有機酸生産能を有する、請求項 11 または 12 に記載の遺伝子改変微生物。

【請求項 14】

請求項 13 に記載の遺伝子改変微生物を、炭素源を発酵原料として含む培地にて培養することを含む、有機酸の製造方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0009 30

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0009】

具体的には、本発明は次の (1) ~ (10) から構成される。

(1) 野生型 Y e e X タンパク質またはそのホモログのアミノ酸配列において 1 ~ 数個のアミノ酸が置換、挿入および / または欠失した変異型 Y e e X タンパク質またはそのホモログを発現可能な遺伝子を含み、かつ、C o A トランスフェラーゼをコードする遺伝子を導入した、遺伝子改変微生物。

(2) 前記変異型 Y e e X タンパク質またはそのホモログが、配列番号 1 のアミノ酸配列においてアミノ酸残基 7 4 ~ 1 0 0 に相当する領域の 1 ~ 数個のアミノ酸が置換、挿入および / または欠失した変異型 Y e e X タンパク質またはそのホモログである、(1) に記載の遺伝子改変微生物。 40

(3) 前記変異型 Y e e X タンパク質またはそのホモログが、配列番号 1 のアミノ酸配列において 8 4 番目に相当するアラニンが他のアミノ酸に置換した変異を有する変異型 Y e e X タンパク質またはそのホモログである、(1) または (2) に記載の遺伝子改変微生物。

(4) 前記変異型 Y e e X タンパク質またはそのホモログを発現可能な遺伝子をゲノム上に有する、(1) ~ (3) のいずれかに記載の遺伝子改変微生物。

(5) ゲノム上の野生型 Y e e X タンパク質またはそのホモログを発現可能な遺伝子が、前記変異型 Y e e X タンパク質またはそのホモログを発現可能な遺伝子に変異または置換 50

した、(4)に記載の遺伝子改変微生物。

(6)前記変異型 Y e e X タンパク質またはそのホモログが、配列番号1のアミノ酸配列において84番目に相当するアラニンがバリンに置換した変異を有する、(1)~(5)のいずれかに記載の遺伝子改変微生物。

(7)前記微生物が有機酸生産能を有する、(1)~(6)のいずれかに記載の遺伝子改変微生物。

(8)前記微生物が、S e r r a t i a 属、E s c h e r i c h i a 属、A c t i n o b a c i l l u s 属、B a s f i a 属、P s e u d o m o n a s 属、H a f n i a 属、A c i n e t o b a c t e r 属、S h i m w e l l i a 属または A e r o b a c t e r 属に属する微生物である、(1)~(7)のいずれかに記載の遺伝子改変微生物。

(9)(7)または(8)に記載の遺伝子改変微生物を、炭素源を発酵原料として含む培地にて培養することを含む、有機酸の製造方法。

(10)前記有機酸が、コハク酸、酢酸、3-ヒドロキシアジピン酸、-ヒドロムコン酸および/またはアジピン酸である、(9)に記載の有機酸の製造方法。

(11)配列番号1のアミノ酸配列において84番目に相当するアラニンが他のアミノ酸に置換した変異を有する変異型 Y e e X タンパク質またはそのホモログを発現可能な遺伝子を含む、遺伝子改変微生物。

(12)前記変異型 Y e e X タンパク質またはそのホモログが、配列番号1のアミノ酸配列において84番目に相当するアラニンがバリンに置換した変異を有する、(11)に記載の遺伝子改変微生物。

(13)前記微生物が有機酸生産能を有する、(11)または(12)に記載の遺伝子改変微生物。

(14)(13)に記載の遺伝子改変微生物を、炭素源を発酵原料として含む培地にて培養することを含む、有機酸の製造方法。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0026

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0026】

本発明の遺伝子改変微生物にて変異型 Y e e X タンパク質またはそのホモログを発現させる方法は特に限定されず、公知の手法による、内在の Y e e X タンパク質またはそのホモログをコードする遺伝子への変異の導入、微生物内で自律複製可能な発現ベクターを利用した変異型 Y e e X タンパク質またはそのホモログをコードする遺伝子の導入、微生物のゲノム上への相同組換え等の手法を用いた変異型 Y e e X タンパク質またはそのホモログをコードする遺伝子の導入、または内在の Y e e X タンパク質またはそのホモログをコードする遺伝子の、変異型 Y e e X タンパク質またはそのホモログをコードする遺伝子への置換などの方法が具体例として挙げられるが、本発明の遺伝子改変型微生物では、微生物内で自律複製可能な発現ベクターに当該遺伝子を組み込み微生物に導入する方法、または内在の Y e e X タンパク質またはそのホモログをコードする遺伝子への変異の導入や、微生物のゲノム上への相同組換え等の手法を用いて変異型 Y e e X タンパク質またはそのホモログをコードする遺伝子を微生物のゲノムに導入することにより、変異型 Y e e X タンパク質またはそのホモログをコードする遺伝子を宿主微生物のゲノム上に置換する方法が好ましい。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0054

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0054】

前記遺伝子改変微生物の培養物中に、有機酸が回収可能な量まで生産された後、生産された当該生産物を回収することができる。生産された当該生産物の回収、例えば単離は、蓄積量が適度に高まった時点で培養を停止し、その培養物から、発酵生産物を採取する一般的な方法に準じて行うことができる。具体的には、遠心分離、ろ過などにより菌体を分離したのち、カラムクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、活性炭処理、結晶化、膜分離、蒸溜などにより、当該生産物を培養物から単離することができる。より具体的には、当該生産物の塩に酸性分を添加して析出物を回収する方法、培養物を逆浸透膜やエバポレーターなどを用いた濃縮操作により水を除去して当該生産物の濃度を高めた後、蒸溜操作により回収、または冷却結晶化や断熱結晶化により当該生産物および/または当該生産物の塩の結晶を析出させ、遠心分離やろ過などにより当該生産物および/または当該生産物の塩の結晶を得る方法、培養物にアルコールを添加して当該生産物をエステルとした後、蒸溜操作により当該生産物のエステルを回収後、加水分解により当該生産物を得る方法などを挙げることが出来るがこれらに限定されるものではない。また、これらの回収方法は生成物の物性などにより適当に選択して最適化することができる。

10

20

30

40

50