

【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24年2月9日(2012.2.9)

【公表番号】特表2011-505841(P2011-505841A)

【公表日】平成23年3月3日(2011.3.3)

【年通号数】公開・登録公報2011-009

【出願番号】特願2010-538230(P2010-538230)

【国際特許分類】

C 1 2 N	1/21	(2006.01)
C 1 2 N	1/15	(2006.01)
C 1 2 N	1/19	(2006.01)
C 1 2 P	5/02	(2006.01)
C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 1 2 R	1/19	(2006.01)
C 1 2 R	1/125	(2006.01)
C 1 2 R	1/885	(2006.01)
C 1 2 R	1/645	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	1/21	Z N A
C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	
C 1 2 P	5/02	
C 1 2 N	15/00	A
C 1 2 P	5/02	
C 1 2 R	1:19	
C 1 2 P	5/02	
C 1 2 R	1:125	
C 1 2 P	5/02	
C 1 2 R	1:885	
C 1 2 P	5/02	
C 1 2 R	1:645	

【手続補正書】

【提出日】平成23年12月14日(2011.12.14)

【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】

イソブレンの産出能力が増加された組み換え細胞であって、

(a) イソブレンシンターゼポリペプチドであって、非相同核酸によりコードされるイソブレンシンターゼポリペプチド、

(b) イソペンテニル-ジホスフェート デルタ-イソメラーゼ(IDI)ポリペプチド、及び

(c) (i) 1-デオキシキシリース-5-ホスフェートシンターゼ(DXS)ポリペプチド、及び  
/又は

(ii) メバロン酸塩(MVA) 経路ポリペプチド

をコードする核酸の1以上を備え、

- 1 ) 前記細胞が400ナノモル/g<sub>wcm</sub>/hrを超えるイソプレンを産出し、
- 2 ) 前記細胞が細胞培養培地から消費する炭素の0.002モルパーセントを超える量をイソプレンに転換し
- 3 ) 前記細胞が0.1mg/L<sub>broth</sub>/hrを超えるイソプレンの平均容積生産性を有する、及び／又は
- 4 ) 前記細胞が細胞乾燥質量(g<sub>dcm</sub>)当たり少なくとも0.0037グラムのイソプレンを産出する、細胞。

【請求項2】

前記細胞がイソプレンを少なくとも500, 600, 700, 800, 900, 1,000, 1,250, 1,500, 1,750, 2,000, 2,500, 3,000, 4,000, 5,000, 10,000, または12,500ナノモル/g<sub>wcm</sub>/hr産出する、請求項1に記載の細胞。

【請求項3】

前記細胞が400ナノモル/g<sub>wcm</sub>/hrから $2.0 \times 10^5$ ナノモル/g<sub>wcm</sub>/hrのイソプレンを産出する、請求項1に記載の細胞。

【請求項4】

前記イソプレンシンターゼポリペプチドが、植物性イソプレンシンターゼポリペプチドである、請求項1に記載の細胞。

【請求項5】

前記植物性イソプレンシンターゼポリペプチドが、ポプラ(polar)イソプレンシンターゼポリペプチドである、請求項4に記載の細胞。

【請求項6】

前記ポプライソプレンシンターゼポリペプチドが、ポプラ・アルバ(*Populus alba*)、ポプラ・トレムロイデス(*Populus tremuloides*)、ポプラ・ニグラ(*Populus nigra*)、ポプラ・トリコカーパ(*Populus trichocarpa*)、及びポプラ・アルバ×ポプラ・トレムラ(*Populus tremula*)からなる群から選択されるポプラ種に由来する天然由来ポリペプチドである、請求項5に記載の細胞。

【請求項7】

前記植物性イソプレンシンターゼポリペプチドが、クズ(kudzu)イソプレンシンターゼポリペプチドである、請求項4に記載の細胞。

【請求項8】

前記クズ(kudzu)イソプレンシンターゼポリペプチドがブエラリア・モンタナ(*Pueraria montana*)由来の天然由来ポリペプチドである、請求項7に記載の細胞。

【請求項9】

前記(b)におけるIDIポリペプチドをコードする核酸が非相同核酸である、請求項1に記載の細胞。

【請求項10】

前記IDIポリペプチドが酵母IDIポリペプチドである、請求項9に記載の細胞。

【請求項11】

前記(b)におけるIDIポリペプチドをコードする非相同核酸が、IDIポリペプチドをコードする内因性核酸のコピーである、請求項9に記載の細胞。

【請求項12】

前記(c)におけるDXSポリペプチドをコードする核酸が非相同核酸である、請求項1に記載の細胞。

【請求項13】

前記(c)におけるDXSポリペプチドをコードする非相同核酸が、DXSポリペプチドをコードする内因性核酸のコピーである、請求項12に記載の細胞。

【請求項14】

前記(c)における1以上のMVA経路ポリペプチドをコードする非相同核酸を1以上有する、請求項1に記載の細胞。

【請求項15】

前記（c）における1以上のMVA経路ポリペプチドをコードする核酸の少なくとも1が内因性核酸のコピーである、請求項1に記載の細胞。

【請求項 16】

1以上の核酸が、1，2，3，4またはそれ以上のMVA経路ポリペプチドをコードする、請求項1に記載の細胞。

【請求項 17】

前記 1 以上の核酸が全てのMVA経路のポリペプチドをコードする、請求項 1 に記載の細胞。

【請求項 18】

前記 1 以上の核酸が下流MVA経路のポリペプチドをコードする、請求項 1 に記載の細胞。

【請求項 19】

前記（a）、（b）、（c）のいずれかのポリペプチドをコードする1以上の核酸の内  
少なくとも1が過剰発現される、請求項1に記載の細胞。

## 【請求項 20】

前記過剰発現された核酸がマルチコピープラスミド中にクローン化される、請求項19に記載の細胞。

## 【請求項 21】

前記過剰発現された核酸が、誘導プロモータまたは構築プロモータの下に置かれる、請求項 19 に記載の細胞。

## 【請求項 22】

前記細胞が、植物性細胞、細菌細胞、藻類細胞、酵母細胞、及び菌類細胞から成る群から選択される、請求項 1 に記載の細胞。

### 【請求項 2 3】

前記細胞が、グラム陽性細菌細胞またはグラム陰性細菌細胞である、請求項 22 に記載の細胞。

【請求項 24】

前記細菌細胞が、大腸菌(*E. coli*)、パントエア・シトレア(*Pantoea citrea*)、バシラス・スブチリス(*Bacillus subtilis*)、B. リケニホルミス(*licheniformis*)、B. レンタス(*lentus*)、B. ブレビス(*brevis*)、B. ステアロサーモフィラス(*stearothermophilus*)、B. アルカロフィラス(*alkalophilus*)、B. アミロリケファシエンス(*amylolyticus*)、B. クラウシー(*clausii*)、B. ハロデュランス(*halodurans*)、B. メガテリウム(*megaterium*)、B. コーギュランス(*coagulans*)、B. サーキュランス(*circulans*)、B. ロータス(*lautus*)、及びB. チューリングンシス(*thuringiensis*)、ストレプトミセス・アルバス(*Streptomyces albus*)、ストレプトミセス・リビダンス(*lividans*)、ストレプトミセス・コエリカラ(*coelicolor*)、またはストレプトミセス・グリセウス(*griseus*)、シュードモナス(*Pseudomonas*)属、及びシュードモナス・アルカリゲンス(*alcaligenes*)細胞から成る群から選択される、請求項23に記載の細胞。

【請求項 25】

前記（a）、（b）または（c）のポリペプチドをコードする1以上の核酸の内の少なくとも1がベクター上にある、請求項1に記載の細胞。

## 【請求項 2 6】

前記( a )、( b )または( c )のポリペプチドをコードする 1 以上の核酸の内の少なくとも 1 が前記細胞の染色体に組み込まれている、請求項 1 に記載の細胞。

【請求項27】

## 前記細胞が、

(c)(i) DXSポリペプチド、及び  
(ii) 1以上のMVA経路ポリペプチド

をコードする核酸を1以上備える、請求項1に記載の細胞。

【請求項 28】

前記細胞が、

(c) (i) DXSポリペプチド、及び

(ii) 全てのMVA経路のポリペプチド

をコードする核酸を1以上備える、請求項27に記載の細胞。

**【請求項29】**

前記細胞が、

(c) (i) DXSポリペプチド、及び

(ii) 下流MVA経路のポリペプチド

をコードする核酸を1以上備える、請求項27に記載の細胞。

**【請求項30】**

イソプレンを産出する方法であって、

(a) 請求項1に記載の組み換え細胞を、イソプレン産出に適した培養条件下で培養する工程であって、前記細胞が

(i) 400ナノモル/g<sub>wcm</sub>/hrを超えるイソプレンを産出し、

(ii) 前記細胞が細胞培養培地から消費する炭素の0.002モルパーセントを超える量をイソプレンに転換させ、

(iii) 0.1mg/L<sub>broth</sub>/hrを超えるイソプレンの平均容積生産性を有する、及び/又は

(iv) 前記細胞が細胞乾燥質量(g<sub>dcm</sub>)当たり少なくとも0.0037グラムのイソプレンを産出する、工程と、

(b) イソプレンを産出する工程とを含む方法。

**【請求項31】**

さらにイソプレンを回収する工程を含む、請求項30に記載の方法。

**【請求項32】**

前記細胞がイソプレンを少なくとも500, 600, 700, 800, 900, 1,000, 1,250, 1,500, 1,750, 2,000, 2,500, 3,000, 4,000, 5,000, 10,000, または12,500ナノモル/g<sub>wcm</sub>/hr産出する、請求項30に記載の方法。

**【請求項33】**

前記細胞が400ナノモル/g<sub>wcm</sub>/hrから2.0×10<sup>5</sup>ナノモル/g<sub>wcm</sub>/hrのイソプレンを産出する、請求項30に記載の方法。

**【請求項34】**

前記細胞が植物性イソプレンシンターゼポリペプチドを備える、請求項30に記載の方法。

**【請求項35】**

前記植物性イソプレンシンターゼポリペプチドが、ポプライソプレンシンターゼポリペプチドである、請求項34に記載の方法。

**【請求項36】**

前記ポプライソプレンシンターゼポリペプチドが、ポプラ・アルバ(Populus alba)、ポプラ・トレムロイデス(Populus tremuloides)、ポプラ・ニグラ(Populus nigra)、ポプラ・トリコカーパ(Populus trichocarpa)、及びポプラ・アルバ×ポプラ・トレムラ(Populus tremula)からなる群から選択されるポプラ種に由来する天然由来ポリペプチドである、請求項35に記載の方法。

**【請求項37】**

前記植物性イソプレンシンターゼポリペプチドが、クズ(kudzu)イソプレンシンターゼポリペプチドである、請求項34に記載の方法。

**【請求項38】**

前記クズ(kudzu)イソプレンシンターゼポリペプチドがプエラリア・モンタナ(Pueraria montana)由来の天然由来ポリペプチドである、請求項37に記載の方法。

**【請求項39】**

前記細胞がIDIポリペプチドをコードする非相同核酸を備える、請求項30に記載の方法。

**【請求項40】**

前記IDIポリペプチドが酵母IDIポリペプチドである、請求項39に記載の方法。

**【請求項41】**

前記IDIポリペプチドをコードする非相同核酸が、IDIポリペプチドをコードする内因性核酸のコピーである、請求項39に記載の方法。

**【請求項42】**

前記細胞がDXSポリペプチドをコードする非相同核酸を備える、請求項30に記載の方法

。

**【請求項43】**

前記DXSポリペプチドをコードする非相同核酸が、DXSポリペプチドをコードする内因性核酸のコピーである、請求項42に記載の方法。

**【請求項44】**

前記細胞が、1以上のMVA経路ポリペプチドをコードする非相同核酸を1、2、3、4またはそれ以上備える、請求項30に記載の方法。

**【請求項45】**

前記細胞が、全てのMVA経路のポリペプチドをコードする非相同核酸を1以上備える、請求項30に記載の方法。

**【請求項46】**

前記細胞が、1以上の下流MVA経路のポリペプチドをコードする非相同核酸を1以上備える、請求項30に記載の方法。

**【請求項47】**

前記細胞が、ポリペプチドをコードする核酸の少なくとも1を過剰発現する、請求項30に記載の方法。

**【請求項48】**

前記過剰発現された核酸がマルチコピープラスミド中にクローン化される、請求項47に記載の方法。

**【請求項49】**

前記過剰発現された核酸が、誘導プロモータまたは構築プロモータの制御下に置かれる、請求項47に記載の方法。

**【請求項50】**

前記細胞が、植物性細胞、細菌細胞、藻類細胞、酵母細胞、及び菌類細胞から成る群から選択される、請求項30に記載の方法。

**【請求項51】**

前記細胞が、グラム陽性細菌細胞またはグラム陰性細菌細胞である、請求項50に記載の方法。

**【請求項52】**

前記細菌細胞が、大腸菌(*E. coli*)、パントエア・シトレア(*Pantoea citrea*)、バシラス・スブチリス(*Bacillus subtilis*)、B. リケニホルミス(*licheniformis*)、B. レンタス(*lentus*)、B. ブレビス(*brevis*)、B. ステアロサー・モフィラス(*stearothermophilus*)、B. アルカロフィラス(*alkalophilus*)、B. アミロリケファシエンス(*amyloliquefaciens*)、B. クラウシー(*clausii*)、B. ハロデュランス(*halodurans*)、B. メガテリウム(*megaterium*)、B. コーギュランス(*coagulans*)、B. サーキュランス(*circulans*)、B. ロータス(*lautus*)、及びB. チューリングエンシス(*thuringiensis*)、ストレプトミセス・アルバス(*Streptomyces albus*)、ストレプトミセス・リビダンス(*lividans*)、ストレプトミセス・コエリカラ(*coelicolor*)、またはストレプトミセス・グリセウス(*griseus*)、シュードモナス(*Pseudomonas*)属、及びシュードモナス・アルカリゲンス(*alcaligenes*)細胞から成る群から選択される、請求項51に記載の方法。

**【請求項53】**

前記細胞が少なくとも1のポリペプチドをコードする核酸を備え、前記核酸がベクター上有る、請求項30に記載の方法。

**【請求項54】**

前記細胞がポリペプチドをコードする少なくとも1の核酸を備え、前記核酸が前記細胞の染色体に組み込まれている、請求項30に記載の細胞方法。

**【請求項55】**

前記細胞が、DXSポリペプチド、及び1以上のMVA経路ポリペプチドをコードする核酸を1以上備える、請求項30に記載の方法。

**【請求項56】**

前記細胞が、DXSポリペプチド、及び全てのMVA経路のポリペプチドをコードする核酸を1以上備える、請求項55に記載の方法。

**【請求項57】**

前記細胞が、DXSポリペプチド、及び下流MVA経路のポリペプチドをコードする核酸を1以上備える、請求項55に記載の方法。