

【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28年2月12日(2016.2.12)

【公表番号】特表2015-510392(P2015-510392A)

【公表日】平成27年4月9日(2015.4.9)

【年通号数】公開・登録公報2015-023

【出願番号】特願2014-548993(P2014-548993)

【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 N	1/13	(2006.01)
C 1 2 P	5/02	(2006.01)
C 1 2 N	15/09	(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 N	1/13	
C 1 2 P	5/02	
C 1 2 N	15/00	A

【手続補正書】

【提出日】平成27年12月18日(2015.12.18)

【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】

イソブレンを産生することのできる組換え細胞であって、該細胞は低減された機能活性を有するi s p A遺伝子と、

(a)異種核酸によりコードされるイソブレン合成酵素ポリペプチドをコードしている1種以上の核酸；及び

(b)メバロン酸(MVA)経路の1種以上のポリペプチドをコードしている1種以上の核酸とを含み、

前記組み換え細胞を適切な培地で培養することで、前記ポリペプチドの生産及びイソブレンの合成が提供される、組み換え細胞。

【請求項2】

前記i s p A遺伝子の機能活性が、

a. i s p A遺伝子を欠失させること；

b. i s p A遺伝子の発現を低減させること；

c. i s p Aタンパク質の活性を低減させること；

d. i s p Aタンパク質の発現を低減させること；又は

e. i s p Aの発現を一時的に調節すること、により低減される、請求項1に記載の組み換え細胞。

【請求項3】

i s p A遺伝子の発現が、(a)弱いプロモーターの調節下にi s p A遺伝子を配置す

ること、(b)自己調節型プロモーターの調節下にi s p A遺伝子を配置すること、又は(c)転写抑制因子H r c A、により低減される、請求項2に記載の組み換え細胞。

【請求項4】

i s p Aタンパク質活性が、(a)翻訳によりi s p Aタンパク質をタンパク質分解性のタグと融合させること、(b)アンチセンスRNAを使用すること、(c)i s p AのmRNA分子中に存在するリボソーム結合部位に1つ以上の変異を導入すること、(d)内在性i s p A遺伝子が、内在性i s p A遺伝子によりコードされるポリペプチドのKmと比較してD M A P Pに関しKmが増加しているポリペプチドをコードしている遺伝子により置き換えられること、または(e)内在性i s p A遺伝子が、異なる最適温度を含む別の遺伝子により置き換えられること、により低減される、請求項2に記載の組み換え細胞。

【請求項5】

イソプレン合成酵素ポリペプチドが、植物のイソプレン合成酵素ポリペプチド又はこれらの変異体である、請求項1～4のいずれか一項に記載の組み換え細胞。

【請求項6】

前記イソプレン合成酵素ポリペプチドが、クズ属(*Pueraria*)又はハコヤナギ属(*Populus*)由来のポリペプチド、又はウラジロハコヤナギ(*Populus alba*)×ヤマナラシ(*Populus tremula*)などの交雑種由来のポリペプチド、又はそれらの変異体由来のポリペプチドである、請求項5に記載の細胞。

【請求項7】

前記イソプレン合成酵素ポリペプチドが、ブエラリア・モンタナ(*Pueraria montana*)、クズ(*Pueraria lobata*)、アメリカヤマナラシ(*Populus tremuloides*)、ウラジロハコヤナギ(*Populus alba*)、セイヨウハコヤナギ(*Populus nigra*)、及びコットンウッド(*Populus trichocarpa*)、又はそれらの変異体からなる群から選択される、請求項6に記載の組み換え細胞。

【請求項8】

前記植物のイソプレン合成酵素ポリペプチドが、クズ(*kudzu*)イソプレン合成酵素ポリペプチド又はそれらの変異体、又はユーカリプタス(*Eucalyptus*)イソプレン合成酵素ポリペプチド又はそれらの変異体である、請求項5に記載の組み換え細胞。

【請求項9】

(b)の、M V A経路の1種以上のポリペプチドをコードしている前記1種以上の核酸が、異種核酸である、請求項1～8のいずれか一項に記載の組み換え細胞。

【請求項10】

前記細胞が含むM V A経路のポリペプチドをコードしている1種以上の核酸が、(a)上流M V A経路に由来するものであり、上流M V A経路の核酸が、A A - C o Aチオラーゼ又はアセトアセチル - C o A合成酵素、H M G - C o A合成酵素及びH M G - C o Aレダクターゼの核酸からなる群から選択される、(b)前記下流M V A経路に由来するものであり、前記下流M V A経路の核酸が、M V K、P M K及びM V D核酸からなる群から選択される、または(c)完全なM V A経路の、M V A経路のポリペプチドをコードしている1種以上の核酸を含む、請求項9に記載の組み換え細胞。

【請求項11】

前記細胞が、イソペンテニル - ジホスフェート - イソメラーゼ(IDI)のポリペプチドをコードしている1種以上の核酸を更に含む、請求項1に記載の細胞。

【請求項12】

1 - デオキシキシリロース - 5 - ホスフェート合成酵素(D X S)ポリペプチドを更に含む、請求項1～11のいずれか一項に記載の組み換え細胞。

【請求項13】

前記D X Sポリペプチドをコードしている1種以上の核酸が、(a)D X Sポリペプチドをコードしている異種核酸である、または(b)D X Sポリペプチドをコードしている内在性の核酸のコピーである、請求項12に記載の組み換え細胞。

**【請求項 1 4】**

前記 1 種以上の異種核酸が、誘導型プロモーター又は常時発現型プロモーター下に配置される、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の組み換え細胞。

**【請求項 1 5】**

前記 1 種以上の異種核酸が、マルチコピープラスミドにクローン化される、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の組み換え細胞。

**【請求項 1 6】**

前記 1 種以上の異種核酸が、前記細胞の染色体に組み込まれる、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の組み換え細胞。

**【請求項 1 7】**

前記細胞が細菌、藻類、真菌又は酵母細胞である、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の組み換え細胞。

**【請求項 1 8】**

前記組み換え細胞が、細菌細胞であり、前記細菌細胞がグラム陽性細菌細胞又はグラム陰性細菌細胞である、請求項 1 7 に記載の組み換え細胞。

**【請求項 1 9】**

前記細菌細胞が、大腸菌 (*E. coli*)、パントエア・シトレア (*P. citrea*)、バチルス・スブチリス (*B. subtilis*)、バチルス・リケニフォルミス (*B. licheniformis*)、バチルス・レンタス (*B. lentus*)、バチルス・ブレビス (*B. brevis*)、バチルス・ステアロサーモフィルス (*B. stearothermophilus*)、バチルス・アルカロフィルス (*B. alkophilus*)、バチルス・アミロリケファシエンス (*B. amyloliquefaciens*)、バチルス・クラウシイ (*B. clausii*)、バチルス・ハロドュランス (*B. halodurans*)、バチルス・メガテリウム (*B. megaterium*)、バチルス・コアギュランス (*B. coagulans*)、バチルス・サーキュランス (*B. circulans*)、バチルス・ロータス (*B. lautus*)、バチルス・チューリングエンシス (*B. thuringiensis*)、ストレプトマイセス・アルバス (*S. albus*)、ストレプトミセス・リビダンス (*S. lividans*)、ストレプトマイセス・セリカラー (*S. coelicolor*)、ストレプトマイセス・グリセウス (*S. griseus*)、シュードモナス (*Pseudomonas* sp.)、及びシュードモナス・アルカリゲネス (*P. alcaligenes*) 細胞からなる群から選択される、請求項 1 8 に記載の細菌細胞。

**【請求項 2 0】**

前記細胞が藻類細胞である、請求項 1 7 に記載の組み換え細胞。

**【請求項 2 1】**

前記藻類細胞が、緑藻類、紅藻類、灰色藻類、クロララクニオン藻類、ミドリムシ類、クロミスタ類、又は渦鞭毛藻類からなる群から選択される、請求項 2 0 に記載の藻類細胞。

**【請求項 2 2】**

前記細胞が真菌細胞であり、任意で前記真菌細胞が糸状菌である請求項 1 7 に記載の組み換え細胞。

**【請求項 2 3】**

前記細胞が酵母細胞である、請求項 1 7 に記載の組み換え細胞。

**【請求項 2 4】**

前記酵母細胞が、酵母菌 (*Saccharomyces* sp.)、シゾサッカロマイセス (*Schizosaccharomyces* sp.)、ピキア (*Pichia* sp.)、又はカンジダ (*Candida* sp.) からなる群から選択される、請求項 2 3 に記載の酵母細胞。

**【請求項 2 5】**

前記酵母細胞がサッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) である、請求項 2 4 に記載の酵母細胞。

**【請求項 2 6】**

更にケトフォスフォラーゼ活性を有するポリポリペプチドを含む請求項 1 ~ 2 5 のいずれか一項に記載の組み換え細胞。

**【請求項 27】**

請求項1～26のいずれか一項に記載の細胞を含む組成物。

**【請求項 28】**

(a) 請求項1～26のいずれか一項の組み換え細胞を、イソプレン合成をもたらすのに好適な条件下で培養する工程；並びに (b) イソプレンを産生させる工程、を含む、イソプレン産生方法。

**【請求項 29】**

前記組み換え細胞により産生された前記イソプレンを回収する工程を更に含む、請求項28に記載の方法。