

【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4年8月25日(2022.8.25)

【公開番号】特開2022-93626(P2022-93626A)

【公開日】令和4年6月23日(2022.6.23)

【年通号数】公開公報(特許)2022-113

【出願番号】特願2022-75719(P2022-75719)

【国際特許分類】

C 12 N 15/31(2006.01)

10

C 12 P 7/22(2006.01)

C 12 N 15/53(2006.01)

C 12 N 15/54(2006.01)

C 12 N 15/60(2006.01)

C 12 N 9/02(2006.01)

C 12 N 9/10(2006.01)

C 12 N 9/88(2006.01)

【F I】

C 12 N 15/31

20

C 12 P 7/22 Z N A

C 12 N 15/53

C 12 N 15/54

C 12 N 15/60

C 12 N 9/02

C 12 N 9/10

C 12 N 9/88

【手続補正書】

【提出日】令和4年8月17日(2022.8.17)

【手続補正1】

30

【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】

目的物質の製造方法であって、

以下の工程：目的物質を生産する能力を有する微生物を利用して目的物質を製造すること

を含み、

40

前記微生物が、cysR遺伝子にコードされるタンパク質および／またはcysK遺伝子にコードされるタンパク質の活性が非改変株と比較して増大するように改変されており、

前記微生物が、コリネ型細菌または酵母であり、

前記目的物質が、バニリン酸である、方法。

【請求項2】

前記製造が、炭素源を含有する培地で前記微生物を培養し、前記目的物質を該培地中に生成蓄積させることを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記製造が、前記微生物を利用して前記目的物質の前駆体を該目的物質に変換することを含む、請求項1に記載の方法。

50

**【請求項 4】**

前記変換が、前記前駆体を含有する培地で前記微生物を培養し、前記目的物質を該培地中に生成蓄積させることを含む、請求項 3 に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記変換が、前記微生物の菌体を反応液中の前記前駆体に作用させ、前記目的物質を該反応液中に生成蓄積させることを含む、請求項 3 に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記菌体が、前記微生物の培養液に含まれる菌体、該培養液から回収された菌体、該培養液の処理物に含まれる菌体、該回収された菌体の処理物に含まれる菌体、またはそれらの組み合わせである、請求項 5 に記載の方法。

10

**【請求項 7】**

前記前駆体が、プロトカテク酸である、請求項 3 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 8】**

さらに、前記目的物質を回収することを含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記cysR遺伝子にコードされるタンパク質の活性の増大によりL-システイン生合成酵素の活性が増大しており、

前記 L - システイン生合成酵素が、cysI 遺伝子、cysX 遺伝子、cysH 遺伝子、cysD 遺伝子、cysN 遺伝子、cysY 遺伝子、cysZ 遺伝子、fpr2 遺伝子、cysK 遺伝子、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される遺伝子にコードされる、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

**【請求項 10】**

以下の通りである、請求項 9 に記載の方法：

前記cysI遺伝子が、下記からなる群より選択されるタンパク質をコードする：

( 1 a ) 配列番号 8 9 に示すアミノ酸配列を含むタンパク質；  
 ( 1 b ) 配列番号 8 9 に示すアミノ酸配列において、1 ~ 10 個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、および / または付加を含むアミノ酸配列を含み、且つ、硫黄の利用に関与する機能を有するタンパク質；および  
 ( 1 c ) 配列番号 8 9 に示すアミノ酸配列に対して 90 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、硫黄の利用に関与する機能を有するタンパク質；

30

前記cysX遺伝子が、下記からなる群より選択されるタンパク質をコードする：  
 ( 2 a ) 配列番号 9 1 に示すアミノ酸配列を含むタンパク質；  
 ( 2 b ) 配列番号 9 1 に示すアミノ酸配列において、1 ~ 10 個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、および / または付加を含むアミノ酸配列を含み、且つ、硫黄の利用に関与する機能を有するタンパク質；および  
 ( 2 c ) 配列番号 9 1 に示すアミノ酸配列に対して 90 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、硫黄の利用に関与する機能を有するタンパク質；

前記cysH遺伝子が、下記からなる群より選択されるタンパク質をコードする：

( 3 a ) 配列番号 9 3 に示すアミノ酸配列を含むタンパク質；  
 ( 3 b ) 配列番号 9 3 に示すアミノ酸配列において、1 ~ 10 個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、および / または付加を含むアミノ酸配列を含み、且つ、硫黄の利用に関与する機能を有するタンパク質；および  
 ( 3 c ) 配列番号 9 3 に示すアミノ酸配列に対して 90 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、硫黄の利用に関与する機能を有するタンパク質；

40

前記cysD遺伝子が、下記からなる群より選択されるタンパク質をコードする：

( 4 a ) 配列番号 9 5 に示すアミノ酸配列を含むタンパク質；  
 ( 4 b ) 配列番号 9 5 に示すアミノ酸配列において、1 ~ 10 個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、および / または付加を含むアミノ酸配列を含み、且つ、硫黄の利用に関与する機能を有するタンパク質；および

50

(4c) 配列番号95に示すアミノ酸配列に対して90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、硫黄の利用に関与する機能を有するタンパク質；

前記cysN遺伝子が、下記からなる群より選択されるタンパク質をコードする：

(5a) 配列番号97に示すアミノ酸配列を含むタンパク質；

(5b) 配列番号97に示すアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、および／または付加を含むアミノ酸配列を含み、且つ、硫黄の利用に関与する機能を有するタンパク質；および

(5c) 配列番号97に示すアミノ酸配列に対して90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、硫黄の利用に関与する機能を有するタンパク質；

前記cysY遺伝子が、下記からなる群より選択されるタンパク質をコードする：

(6a) 配列番号99に示すアミノ酸配列を含むタンパク質；

(6b) 配列番号99に示すアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、および／または付加を含むアミノ酸配列を含み、且つ、硫黄の利用に関与する機能を有するタンパク質；および

(6c) 配列番号99に示すアミノ酸配列に対して90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、硫黄の利用に関与する機能を有するタンパク質；

前記cysZ遺伝子が、下記からなる群より選択されるタンパク質をコードする：

(7a) 配列番号101に示すアミノ酸配列を含むタンパク質；

(7b) 配列番号101に示すアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、および／または付加を含むアミノ酸配列を含み、且つ、硫黄の利用に関与する機能を有するタンパク質；および

(7c) 配列番号101に示すアミノ酸配列に対して90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、硫黄の利用に関与する機能を有するタンパク質；

前記fpr2遺伝子が、下記からなる群より選択されるタンパク質をコードする：

(8a) 配列番号103に示すアミノ酸配列を含むタンパク質；

(8b) 配列番号103に示すアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、および／または付加を含むアミノ酸配列を含み、且つ、硫黄の利用に関与する機能を有するタンパク質；および

(8c) 配列番号103に示すアミノ酸配列に対して90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、硫黄の利用に関与する機能を有するタンパク質；

前記cysK遺伝子が、下記からなる群より選択されるタンパク質をコードする：

(10a) 配列番号141に示すアミノ酸配列を含むタンパク質；

(10b) 配列番号141に示すアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、および／または付加を含むアミノ酸配列を含み、且つ、O-アセチルセリン（チオール）リアーゼ活性を有するタンパク質；および

(10c) 配列番号141に示すアミノ酸配列に対して90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、O-アセチルセリン（チオール）リアーゼ活性を有するタンパク質。

### 【請求項11】

前記cysR遺伝子にコードされるタンパク質および／または前記cysK遺伝子にコードされるタンパク質の活性が、cysR遺伝子および／またはcysK遺伝子の発現を増大させることにより増大した、請求項1～10のいずれか1項に記載の方法。

### 【請求項12】

前記cysR遺伝子および／または前記cysK遺伝子の発現が、それぞれ、該遺伝子のコピー数を増大させること、および／または該遺伝子の発現調節配列を改変することによって増大した、請求項11に記載の方法。

### 【請求項13】

以下の通りである、請求項1～12のいずれか1項に記載の方法：

前記cysR遺伝子が、下記からなる群より選択されるタンパク質をコードする：

(9a) 配列番号105に示すアミノ酸配列を含むタンパク質；

10

20

30

40

50

(9b) 配列番号105に示すアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、および／または付加を含むアミノ酸配列を含み、且つ、L-システイン合成酵素をコードする遺伝子の発現を正に制御する機能を有するタンパク質；および  
 (9c) 配列番号105に示すアミノ酸配列に対して90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、L-システイン合成酵素をコードする遺伝子の発現を正に制御する機能を有するタンパク質；

前記cysK遺伝子が、下記からなる群より選択されるタンパク質をコードする：

(10a) 配列番号141に示すアミノ酸配列を含むタンパク質；

(10b) 配列番号141に示すアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、および／または付加を含むアミノ酸配列を含み、且つ、O-アセチルセリン（チオール）リアーゼ活性を有するタンパク質；および 10

(10c) 配列番号141に示すアミノ酸配列に対して90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、O-アセチルセリン（チオール）リアーゼ活性を有するタンパク質。

#### 【請求項14】

前記微生物が、コリネ型細菌である、請求項1～13のいずれか1項に記載の方法。

#### 【請求項15】

前記微生物が、コリネバクテリウム（*Corynebacterium*）属細菌である、請求項1～14のいずれか1項に記載の方法。 20

#### 【請求項16】

前記微生物が、コリネバクテリウム・グルタミカム（*Corynebacterium glutamicum*）である、請求項15に記載の方法。 20

#### 【請求項17】

前記微生物が、さらに、前記目的物質の生合成に関与する酵素の活性が非改変株と比較して増大するように改変されている、請求項1～16のいずれか1項に記載の方法。 20

#### 【請求項18】

前記目的物質の生合成に関与する酵素が、3-デオキシ-D-アラビノ-ヘプツロソニ酸-7-リン酸シンターゼ、3-デヒドロキナ酸シンターゼ、3-デヒドロキナ酸デヒドラターゼ、3-デヒドロシキミ酸デヒドラターゼ、O-メチルトランスフェラーゼ、芳香族アルデヒドオキシドレダクターゼ、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項17に記載の方法。 30

#### 【請求項19】

前記微生物が、さらに、ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼの活性が非改変株と比較して増大するように改変されている、請求項1～18のいずれか1項に記載の方法。 30

#### 【請求項20】

前記微生物が、さらに、前記目的物質以外の物質の副生に関与する酵素の活性が非改変株と比較して低下するように改変されている、請求項1～19のいずれか1項に記載の方法。 30

#### 【請求項21】

前記目的物質以外の物質の副生に関与する酵素が、バニリン酸デメチラーゼ、プロトカク酸3,4-ジオキシゲナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、シキミ酸デヒドロゲナーゼ、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項20に記載の方法。 40

#### 【請求項22】

バニリンの製造方法であって、

請求項1～21のいずれか1項に記載の方法によりバニリン酸を製造すること；および前記バニリン酸をバニリンに変換すること  
を含む、方法。

#### 【請求項23】

前記微生物が、コリネバクテリウム（*Corynebacterium*）属細菌である、請求項22に記載の方法。 50

**【請求項 2 4】**

前記微生物が、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) である、請求項 2 3 に記載の方法。

10

20

30

40

50