

【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 1 2 N 15/31(2006.01)

10

C 1 2 P 7/22(2006.01)

C 1 2 N 15/53(2006.01)

C 1 2 N 15/54(2006.01)

C 1 2 N 15/60(2006.01)

C 1 2 N 9/02(2006.01)

C 1 2 N 9/10(2006.01)

C 1 2 N 9/88(2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/31

C 1 2 P 7/22

Z N A

20

C 1 2 N 15/53

C 1 2 N 15/54

C 1 2 N 15/60

C 1 2 N 9/02

C 1 2 N 9/10

C 1 2 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、パニリン酸である、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 89 に示すアミノ酸配列を含むタンパク質；
- (1 b) 配列番号 89 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、硫黄の利用に關与する機能を有するタンパク質；および
- (1 c) 配列番号 89 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、硫黄の利用に關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 91 に示すアミノ酸配列を含むタンパク質；
- (2 b) 配列番号 91 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、硫黄の利用に關与する機能を有するタンパク質；および
- (2 c) 配列番号 91 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、硫黄の利用に關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 93 に示すアミノ酸配列を含むタンパク質；
- (3 b) 配列番号 93 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、硫黄の利用に關与する機能を有するタンパク質；および
- (3 c) 配列番号 93 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、硫黄の利用に關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 95 に示すアミノ酸配列を含むタンパク質；
- (4 b) 配列番号 95 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、硫黄の利用に關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、硫黄の利用に關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、硫黄の利用に關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、硫黄の利用に關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：

10

(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、硫黄の利用に關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、硫黄の利用に關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、硫黄の利用に關与する機能を有するタンパク質；および

20

(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、硫黄の利用に關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、硫黄の利用に關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、硫黄の利用に關与する機能を有するタンパク質；

30

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。

40

【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；

50

( 9 b ) 配列番号 1 0 5 に示すアミノ酸配列において、1 ~ 1 0 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 - システイン生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

( 9 c ) 配列番号 1 0 5 に示すアミノ酸配列に対して 9 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、且つ、L - システイン生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 :

( 1 0 a ) 配列番号 1 4 1 に示すアミノ酸配列を含むタンパク質 ;

( 1 0 b ) 配列番号 1 4 1 に示すアミノ酸配列において、1 ~ 1 0 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

( 1 0 c ) 配列番号 1 4 1 に示すアミノ酸配列に対して 9 0 % 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。

10

#### 【請求項 1 4】

前記微生物が、コリネ型細菌である、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

#### 【請求項 1 5】

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 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

#### 【請求項 1 6】

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 1 5 に記載の方法。

20

#### 【請求項 1 7】

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 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

#### 【請求項 1 8】

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 - ヘプツロソク酸 - 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 1 7 に記載の方法。

30

#### 【請求項 1 9】

前記微生物が、さらに、ホスホパンテテイン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 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

#### 【請求項 2 0】

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 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

#### 【請求項 2 1】

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、プロトカテク酸 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 2 0 に記載の方法。

40

#### 【請求項 2 2】

バニリンの製造方法であって、

請求項 1 ~ 2 1 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 2 3】

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 2 2 に記載の方法。

50

**【請求項 24】**

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 23 に記載の方法。

10

20

30

40

50