

【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29年6月8日 (2017.6.8)

【公表番号】特表2016-519577(P2016-519577A)

【公表日】平成28年7月7日 (2016.7.7)

【年通号数】公開・登録公報2016-040

【出願番号】特願2016-507665(P2016-507665)

【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 5/10 (2006.01)

C 1 2 P 5/02 (2006.01)

C 1 2 N 9/88 (2006.01)

C 1 2 Q 1/527 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 Q 1/04 (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 5/10

C 1 2 P 5/02

C 1 2 N 9/88

C 1 2 Q 1/527

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 Q 1/04

【手続補正書】

【提出日】平成29年4月10日 (2017.4.10)

【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】

ホスホケトラゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、前記組換え細胞がホスホケトラゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、前記ポリペプチドが配列番号 8 と少なくとも 65 % の配列同一性を含んでなる、組換え細胞。

【請求項 2】

ホスホケトラゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、前記組換え細胞が、(i) ホスホケトラゼ活性を有して配列番号 8 と少なくとも 65 % の配列同一性を含んでなるポリペプチドをコードする異種核酸配列、および (i i) 完全 M V A 経路の 1 つまたは複数のポリペプチドをコードする 1 つまたは複数の核酸を含んでなり、(i) のホスホケトラゼ活性を有する前記ポリペプチドを含んでなる前記組換え細胞が、(a) グルコース上の細胞増殖、(b) キシロース上の細胞増殖、(c) 細胞内アセチルリン酸の産生、または (d) グルコース - 6 - リン酸上の細胞増殖のパラメータの 1 つまた

は複数で、1.0を超える性能指標値を有する、組換え細胞。

【請求項3】

ホスホケトラゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、前記組換え細胞が、(i)ホスホケトラゼ活性を有して配列番号8と少なくとも65%の配列同一性を含んでなるポリペプチドをコードする異種核酸配列、および(ii)完全MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸を含んでなり、(i)のホスホケトラゼ活性を有する前記ポリペプチドが、(a)タンパク質溶解度、(b)タンパク質発現、または(c)フルクトース-6-リン酸(F6P)比活性のパラメータの1つまたは複数で、1.0を超える性能指標値を有する、組換え細胞。

【請求項4】

前記ポリペプチドが、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、または配列番号31の1つまたは複数と少なくとも90%の配列同一性を含んでなる、請求項1～3のいずれか一項に記載の組換え細胞。

【請求項5】

ホスホケトラゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、前記組換え細胞が、ホスホケトラゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなり、前記ポリペプチドが、配列番号11と少なくとも65%の配列同一性を含んでなる、組換え細胞。

【請求項6】

ホスホケトラゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、前記組換え細胞が、(i)ホスホケトラゼ活性を有して配列番号11と少なくとも65%の配列同一性を含んでなるポリペプチドをコードする異種核酸配列、および(ii)完全MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸を含んでなり、(i)のホスホケトラゼ活性を有する前記ポリペプチドを含んでなる前記組換え細胞が、(a)グルコース上の細胞増殖、(b)キシロース上の細胞増殖、(c)細胞内アセチルリン酸の産生、または(d)グルコース-6-リン酸上の細胞増殖のパラメータの1つまたは複数で、1.0を超える性能指標値を有する、組換え細胞。

【請求項7】

ホスホケトラゼ経路を通過する炭素流を増大できる組換え細胞であって、前記組換え細胞が、(i)ホスホケトラゼ活性を有して配列番号11と少なくとも65%の配列同一性を含んでなるポリペプチドをコードする異種核酸配列、および(ii)完全MVA経路の1つまたは複数のポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸を含んでなり、(i)のホスホケトラゼ活性を有する前記ポリペプチドが、(a)タンパク質溶解度、(b)タンパク質発現、または(c)フルクトース-6-リン酸(F6P)比活性のパラメータの1つまたは複数で、1.0を超える性能指標値を有する、組換え細胞。

【請求項8】

前記ポリペプチドが、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号45、または配列番号46のいずれか1つと少なくとも90%の配列同一性を含んでなる、請求項5～7のいずれか一項に記載の組換え細胞。

【請求項9】

前記組換え細胞を適切な培地中で培養するステップが、エリスロース-4-リン酸の細胞内量、グリセルアルデヒド-3-リン酸の細胞内量、またはリン酸の細胞内量の1つまたは複数を増大させる、請求項1～8のいずれか一項に記載の組換え細胞。

【請求項10】

ホスホケトラゼ活性を有する前記ポリペプチドが、(a)キシロース-5-リン酸からグリセルアルデヒド-3-リン酸およびアセチルリン酸を合成できる、または(b)フルクトース-6-リン酸からエリスロース-4-リン酸およびアセチルリン酸を合成で

きる、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の組換え細胞。

【請求項 1 1】

完全 M V A 経路の 1 つまたは複数のポリペプチドが、(a) 2 分子のアセチル C o A を縮合してアセトアセチル C o A を形成する酵素；(b) アセトアセチル C o A とアセチル C o A を縮合して H M G - C o A を形成する酵素（例えば H M G シンターゼ）；(c) H M G - C o A をメバロン酸に変換する酵素；(d) メバロン酸をメバロン酸 5 - リン酸にリン酸化する酵素；(e) メバロン酸 5 - リン酸をメバロン酸 5 - ピロリン酸に変換する酵素；および (f) メバロン酸 5 - ピロリン酸をイソペンテニルピロリン酸に変換する酵素から選択される、請求項 2 ~ 4 および 6 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の組換え細胞。

【請求項 1 2】

イソプレンを産生できる組換え細胞であって、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の組換え細胞が、イソプレシンターゼポリペプチドをコードする異種核酸をさらに含んでなり、適切な培地中の前記組換え細胞の培養が、(a) イソペン率または (b) イソペン比生産性のパラメータの 1 つまたは複数で 1 . 0 を超える性能指標値である、イソプレンの生産を提供する、組換え細胞。

【請求項 1 3】

前記イソプレシンターゼポリペプチドが、クズ属 (*P u e r a r i a*) またはポプラ属 (*P o p u l u s*) または雑種ウラジロハコヤナギ (*P o p u l u s a l b a*) × ヤマナラシ (*P o p u l u s t r e m u l a*) からのポリペプチドである、請求項 1 2 に記載の組換え細胞。

【請求項 1 4】

前記組換え細胞が、1 つまたは複数の 1 - デオキシ - D - キシルロース - 5 - リン酸 (D X P) 経路ポリペプチドをコードする 1 つまたは複数の核酸をさらに含んでなる、請求項 1 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の組換え細胞。

【請求項 1 5】

イソプレノイド前駆体を産生できる組換え細胞であって、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の組換え細胞が適切な培地中で培養されて、前記イソプレノイド前駆体を産生する、組換え細胞。

【請求項 1 6】

イソプレノイドを産生できる組換え細胞であって、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の組換え細胞が、ピロリン酸ポリプレニルシンターゼポリペプチドをコードする異種核酸をさらに含んでなり、適切な培地中の組換え細胞の培養がイソプレノイドの生産を提供する、組換え細胞。

【請求項 1 7】

アセチル C o A 由来代謝産物を産生できる組換え細胞であって、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の組換え細胞を適切な培地中で培養するステップが、アセチル C o A 由来代謝産物の生産を提供する、組換え細胞。

【請求項 1 8】

核酸が、誘導性プロモーターまたは構成的プロモーターの下に置かれ、および、任意に、(i) 1 つまたは複数のマルチコピープラスミドにクローン化され、または (i i) 細胞染色体に組み込まれる、

請求項 1 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の組換え細胞。

【請求項 1 9】

前記組換え細胞が、グラム陽性細菌細胞、グラム陰性細菌細胞、真菌細胞、糸状菌細胞、藻類細胞または酵母細胞である、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の組換え細胞。

【請求項 2 0】

前記組換え細胞が、コリネバクテリウム属 (*C o r y n e b a c t e r i a*) 、バチルス・サブチリス (*B a c i l l u s s u b t i l i s*) 、ストレプトミセス・リビダンス (*S t r e p t o m y c e s l i v i d a n s*) 、ストレプトミセス・コエリカラー (*S t r e p t o m y c e s c o e l i c o l o r*) 、ストレプトミセス・グリセウス

(*Streptomyces griseus*)、大腸菌(*Escherichia coli*)、パントエア・シトレア(*Pantoea citrea*)、トリコデルマ・リーゼイ(*Trichoderma reesei*)、アスペルギルス・オリゼ(*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)、サッカロミセス・セレビスエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、およびヤロウィア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)からなる群から選択される、請求項1～19のいずれか一項に記載の組換え細胞。

【請求項21】

前記イソプレノイドが、モノテルペン、ジテルペン、トリテルペン、テトラテルペン、セキテルペン(*sekiterpene*)、およびポリテルペンからなる群から選択される、請求項16に記載の組換え細胞。

【請求項22】

前記イソプレノイドが、アビエタジエン、アモルファジエン、カレン、-ファルネセン、-ファルネセン、ファルネソール、ゲラニオール、ゲラニルゲラニオール、リナロール、リモネン、ミルセン、ネロリドール、オシメン、パチョロール、-ピネン、サビネン、-テルピネン、テルピンデン、およびパレンセンからなる群から選択される、請求項16に記載の組換え細胞。

【請求項23】

前記アセチルC o A由来代謝産物が、ポリケチド、ポリヒドロキシ酪酸、脂肪アルコール、および脂肪酸からなる群から選択される、請求項17に記載の組換え細胞。

【請求項24】

前記アセチルC o A由来代謝産物が、グルタミン酸、グルタミン、アスパラギン酸、アスパラギン、プロリン、アルギニン、メチオニン、スレオニン、システイン、コハク酸、リジン、ロイシン、アセトン、イソプロパノール、イソブテン、プロペン、およびイソロイシンからなる群から選択される、請求項17に記載の組換え細胞。

【請求項25】

(a) 請求項12に記載の組換え細胞をイソブレンを生産するのに適した条件下で培養するステップと、(b) イソブレンを生産するステップとを含んでなる、イソブレンを生産する方法。

【請求項26】

(a) 請求項15に記載の組換え細胞をイソプレノイド前駆体を生産するのに適した条件下で培養するステップと、(b) イソプレノイド前駆体を生産するステップとを含んでなる、イソプレノイド前駆体を生産する方法。

【請求項27】

(a) 請求項16に記載の組換え細胞をイソプレノイドを生産するのに適した条件下で培養するステップと、(b) イソプレノイドを生産するステップとを含んでなる、イソプレノイドを生産する方法。

【請求項28】

(a) 請求項17に記載の組換え細胞をアセチルC o A由来代謝産物を生産するのに適した条件下で培養するステップと、(b) アセチルC o A由来代謝産物を生産するステップとを含んでなる、アセチルC o A由来代謝産物を生産する方法。

【請求項29】

(a) 前記ポリペプチドをコードする異種核酸配列を含んでなる組換え細胞を培養するステップであって、グルコースまたはキシロースを炭素源とする培養条件下で前記組換え細胞にトランスケトラーゼ活性(*tktAB*)欠陥がある、ステップと；(b) 前記組換え細胞の細胞増殖を評価するステップと、(c) 細胞増殖の存在に基づいて、前記ポリペプチドの生体内ホスホケトラーゼ活性を検出するステップとを含んでなる、ポリペプチドの生体内ホスホケトラーゼ活性を組換え細胞内で検出する方法。

【請求項30】

請求項29に記載の方法によって検出される、ホスホケトラーゼ活性がある単離された

ポリペプチド。