

【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30年4月5日(2018.4.5)

【公表番号】特表2017-506078(P2017-506078A)

【公表日】平成29年3月2日(2017.3.2)

【年通号数】公開・登録公報2017-009

【出願番号】特願2016-553501(P2016-553501)

【国際特許分類】

C 1 2 N	1/21	(2006.01)
C 1 2 N	1/13	(2006.01)
C 1 2 N	1/15	(2006.01)
C 1 2 N	1/19	(2006.01)
C 1 2 P	5/00	(2006.01)
C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 1 2 N	15/00	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	1/13	
C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	
C 1 2 P	5/00	
C 1 2 N	15/00	A
C 1 2 N	15/00	Z N A

【手続補正書】

【提出日】平成30年2月20日(2018.2.20)

【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】

イソプレンを産生できる組換え細胞であって、

(i) 1つまたは複数のアセチル化タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸であって、前記細胞が前記核酸の発現および/または前記アセチル化タンパク質の活性が調節されるように修飾されている、核酸；

(ii) 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；および

(iii) イソプレンシンターゼ活性を有するポリペプチドをコードする異種核酸を含んでなり、適切な培地中の前記組換え細胞の培養がイソプレンの生産を提供する、組換え細胞。

【請求項2】

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、

(i) 1つまたは複数のアセチル化タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸であって、前記細胞が前記核酸の発現および/または前記アセチル化タンパク質の活性が調節されるように修飾されている、核酸；および

(ii) 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、適切な培地中の前記組換え細胞の培養が前記イソプレノイド前駆体の生産を提供する、組換え細胞。

【請求項 3】

イソプレノイドを產生できる組換え細胞であつて、

(i) 1 つまたは複数のアセチル化タンパク質をコードする 1 つまたは複数の核酸であつて、前記細胞が前記核酸の発現および／または前記アセチル化タンパク質の活性が調節されるように修飾されている、核酸；

(i i) 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；および

(i i i) ポリプレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードする異種核酸を含んでなり、適切な培地中の前記組換え細胞の培養が前記イソプレノイドの生産を提供する、組換え細胞。

【請求項 4】

前記 1 つまたは複数のアセチル化タンパク質の活性が、減衰、欠失、または増大するように調節される、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】

前記アセチル化タンパク質が、アセチルトランスフェラーゼである、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の組換え細胞。

【請求項 6】

前記アセチルトランスフェラーゼが、Y f i Q ペプチド、P a t ペプチド、およびA c u A ペプチドからなる群から選択される、請求項 5 に記載の組換え細胞。

【請求項 7】

前記アセチル化タンパク質が、デアセチラーゼである、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の組換え細胞。

【請求項 8】

前記デアセチラーゼが、C o b B ペプチドおよびS r t N ペプチドからなる群から選択される、請求項 7 に記載の組換え細胞。

【請求項 9】

前記 Y f i Q ポリペプチドの活性が、Y f i Q ポリペプチドをコードする遺伝子発現の低下、減衰、または欠失によって調節される、請求項 6 に記載の組換え細胞。

【請求項 10】

前記 C o b B ポリペプチドの活性が、C o b B ポリペプチドをコードする遺伝子発現の増大によって調節される、請求項 8 に記載の組換え細胞。

【請求項 11】

前記イソブレンシンターゼ活性を有するポリペプチドが、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) 交配種に由来するポリペプチドである、請求項 1 および 4 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 12】

前記 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；(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 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の組換え細胞。

【請求項 13】

前記組換え細胞が、

(a) ホスホケトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする 1 つまたは複数の異種核酸；

(b) 1つまたは複数の1-デオキシ-D-キシリロース-5-リン酸(DXP)経路ポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸；

(c) 1つまたは複数のペントースリン酸経路タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸であって、前記細胞が、ペントースリン酸経路タンパク質をコードする核酸の発現および／またはペントースリン酸経路タンパク質の活性が調節されるように修飾されており、かつ前記ペントースリン酸経路タンパク質が、トランスケトラーゼ(tktA)、トランスマルドラーゼ(talB)、リブロース-5-リン酸-エピメラーゼ(rpe)、リボース-5-リン酸エピメラーゼ(rpiA)およびホスホフルクトキナーゼ(pfka)からなる群から任意的に選択される、1つまたは複数の核酸；

(d) 1つまたは複数の酢酸循環タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸であって、前記細胞が、酢酸循環タンパク質をコードする核酸の発現、および／または酢酸循環タンパク質の活性が調節されるように修飾されており、かつ前記酢酸循環タンパク質が、アセチル補酵素Aシンセターゼ(acs)、酢酸キナーゼ(ackA)、およびホスホトランスマルチラーゼ(pta)からなる群から任意的に選択される、1つまたは複数の核酸； および

(e) sfcA、maeB、pdhR、aceE、aceF、lpdA、glta、acs、pta、ackA、actP、pfkA、rpe、rpiA、tktA、talB、pgl、edd、およびedaからなる群から選択される1つまたは複数のタンパク質をコードする1つまたは複数の核酸であって、前記細胞が核酸の発現および／またはタンパク質の活性が調節されるように修飾されている、1つまたは複数の核酸

のうちの1つまたは複数をさらに含んでなる、請求項1～12のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項14】

前記1つまたは複数のアセチル化タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸、MV 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、イソプレンシンターゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸、ポリブレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードする核酸、ホスホケトラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸、1つまたは複数のペントースリン酸経路タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸、1つまたは複数の酢酸循環タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸、または請求項13(e)に記載の1つまたは複数のタンパク質をコードする1つまたは複数の核酸が、

(a) 誘導性プロモーターまたは構成的プロモーター下に置かれる；

(b) 1つまたは複数のマルチコピープラスミドにクローニングされる；または

(c) 前記細胞の染色体に組み込まれる、

請求項1～13のいずれか一項に記載の組換え細胞。

【請求項15】

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1～14のいずれか一項に記載の組換え細胞。

【請求項16】

前記イソプレン生産が、アセチル化タンパク質をコードする核酸の発現および／またはアセチル化タンパク質の活性が調節されるように修飾されていない組換え細胞と比較して増大される、請求項1および4～15のいずれか一項に記載の組換え細胞。

【請求項17】

前記イソプレン生産の増大が、(i)力価、(ii)瞬間収率、(iii)累積収率、(iv)イソプレン対二酸化炭素比、(v)比生産性、または(vi)細胞生産性指数の増大を含んでなる、イソプレン生産が少なくとも5%増大される、請求項16に記載の組換え細胞。

【請求項18】

(a) 請求項1および4～17のいずれか一項に記載の組換え細胞をイソプレンの生成に適した条件下で培養するステップと、(b)イソプレンを生産するステップと、任意的

にさらに(c)イソプレンを回収するステップとを含んでなる、イソプレンを生産する方法。

【請求項19】

前記イソプレノイド前駆体が、メバロン酸(MVA)、ジメチルアリルニリン酸(DMAPP)、およびイソペンテニルピロリン酸 IPP)からなる群から選択される、請求項2~10および12~18のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項20】

前記イソプレノイド前駆体の生産が、アセチル化タンパク質をコードする核酸の発現および/またはアセチル化タンパク質の活性が調節されるように修飾されていない組換え細胞と比較して増大される、請求項2~10および12~19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前駆体の生産の増大が、(i)力価、(ii)瞬間収率、(iii)累積収率、(iv)比生産性、または(v)細胞生産性指数の増大を含んでなる、イソプレノイド前駆体の生産が少なくとも5%増大される、請求項20に記載の組換え細胞。

【請求項22】

(a)請求項2~10および12~21のいずれか一項に記載の組換え細胞を、イソプレノイド前駆体の生成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、さらに任意的に(c)イソプレノイド前駆体を回収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23】

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、パトコウロール、-ピネン、サビネン、-テルピネン、テルピネン、およびバレンセンからなる群から選択される、請求項3~10および12~22のいずれか一項に記載の組換え細胞。

【請求項24】

前記イソプレノイドの生産が、アセチル化タンパク質をコードする核酸の発現および/またはアセチル化タンパク質の活性が調節されるように修飾されていない組換え細胞と比較して増大される、請求項3~10および12~23のいずれか一項に記載の組換え細胞。

【請求項25】

前記イソプレノイド生産の増大が、(i)力価、(ii)瞬間収率、(iii)累積収率、(iv)比生産性、または(v)細胞生産性指数の増大を含んでなる、イソプレノイド生産が少なくとも5%増大される、請求項24に記載の組換え細胞。

【請求項26】

(a)請求項3~10および12~25のいずれか一項に記載の組換え細胞を、イソプレノイドの生成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、さらに任意的に(c)イソプレノイドを回収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。