

【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 2 年 7 月 27 日 (2020.7.27)

【公開番号】特開 2020-247 (P2020-247A)

【公開日】令和 2 年 1 月 9 日 (2020.1.9)

【年通号数】公開・登録公報 2020-001

【出願番号】特願 2019-154479 (P2019-154479)

【国際特許分類】

C 1 2 P 13/04 (2006.01)

C 1 2 N 9/00 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 15/52 (2006.01)

【F I】

C 1 2 P 13/04 Z N A

C 1 2 N 9/00

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 15/52 Z

【手続補正書】

【提出日】令和 2 年 6 月 1 日 (2020.6.1)

【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】

アシルアミノ酸を合成する少なくとも 1 つの操作されたペプチドシンターゼを発現するように操作された *Bacillus subtilis* 細胞であって、前記操作されたペプチドシンターゼは、前記合成されたアシルアミノ酸を前記操作されたペプチドシンターゼから放出し、前記操作されたペプチドシンターゼは、(i) アデニル化 (A) ドメイン、チオール化 (T) ドメインおよび縮合 (C) ドメインを含む単一のペプチドシンターゼドメインであるかまたはこれを含み、かつ、(ii) チオエステラーゼドメインおよびレダクターゼドメインを欠く、操作された *Bacillus subtilis* 細胞。

【請求項 2】

前記操作されたペプチドシンターゼが、リポペプチドを合成するペプチドシンターゼ中に見出されるような脂肪酸をアミノ酸に連結する単一のペプチドシンターゼドメインであるかまたはこれを含む、請求項 1 に記載の操作された *Bacillus subtilis* 細胞。

【請求項 3】

アシルアミノ酸組成物が、顕著な成分としてアシルアミノ酸を含み、そのアミノ酸部分がグリシンおよびグルタミン酸からなる群から選択されるアミノ酸由来であり、かつそのアシル部分が、ミリスチン酸およびラウリン酸からなる群から選択される脂肪酸由来である、請求項 1 または 2 に記載の操作された *Bacillus subtilis* 細胞。

【請求項 4】

前記単一のペプチドシンターゼドメインが、サーファクチン (srf) シンターゼのモジュール 1 である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の操作された *Bacillus subtilis* 細胞。

【請求項 5】

前記 s r f シンテターゼが s r f A A である、請求項 4 に記載の操作された B a c i l l u s s u b t i l i s 細胞。

【請求項 6】

前記単一のペプチドシンテターゼドメインが、マイコスブチリンシンテターゼのモジュール 1 である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の操作された B a c i l l u s s u b t i l i s 細胞。

【請求項 7】

前記マイコスブチリンシンテターゼが、M y c A であるかまたはこれを含む、請求項 6 に記載の操作された B a c i l l u s s u b t i l i s 細胞。

【請求項 8】

前記単一のペプチドシンテターゼドメインが、ダプトマイシンシンテターゼのモジュール 1 である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の操作された B a c i l l u s s u b t i l i s 細胞。

【請求項 9】

前記ダプトマイシンシンテターゼが、d p t A 1 であるかまたはこれを含む、請求項 8 に記載の操作された B a c i l l u s s u b t i l i s 細胞。

【請求項 10】

前記操作されたペプチドシンテターゼが、2, 4 - ジアミノ酪酸、(2 S) - 2, 3 - ジアミノ酪酸、2, 3 - ジアミノプロピオン酸、オルニチンおよびリジンからなる群から選択されるアミノ酸をアシル化する、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の操作された B a c i l l u s s u b t i l i s 細胞。

【請求項 11】

前記細胞が、内因性の - ケト酸デヒドロゲナーゼの活性を欠く、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の操作された B a c i l l u s s u b t i l i s 細胞。

【請求項 12】

前記細胞が、前記 - ケト酸デヒドロゲナーゼの少なくとも 1 つ以上の機能的サブユニットを欠くように操作される、請求項 11 に記載の操作された B a c i l l u s s u b t i l i s 細胞。

【請求項 13】

前記細胞が、前記 - ケト酸デヒドロゲナーゼの E 1 サブユニットおよび E 1 サブユニットをそれぞれコードする b k d A A 遺伝子および b k d A B 遺伝子を欠失するように操作される、請求項 12 に記載の操作された B a c i l l u s s u b t i l i s 細胞。

【請求項 14】

アシルアミノ酸組成物を作製する方法であって、アシルアミノ酸組成物が作製されるために十分な条件下および時間の間、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の操作された B a c i l l u s s u b t i l i s 細胞を培養するステップを含む、方法。

【請求項 15】

前記アシルアミノ酸組成物を特定のアシルアミノ酸について富化するステップと；
前記富化されたアシルアミノ酸組成物を、少なくとも 1 つの他の成分と組み合わせ、ある生成物を生成するステップと
をさらに含む、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

アシルアミノ酸組成物を作製する方法であって、アシルアミノ酸組成物が作製されるために十分な条件下および時間の間、請求項 11 ~ 13 のいずれか一項に記載の操作された B a c i l l u s s u b t i l i s 細胞を培養するステップを含む、方法。

【請求項 17】

前記培養するステップが、アシルアミノ酸を合成し、かつ、内因性の - ケト酸デヒドロゲナーゼの活性を保持する B a c i l l u s s u b t i l i s 細胞によって生成されるアシルアミノ酸組成物と比較して、C 14 の分岐脂肪酸テールの長さを有するアシルアミ

ノ酸が富化されたアシルアミノ酸組成物を生成させるために、イソ酪酸の存在下で前記操作された細胞を培養することを含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記培養するステップが、アシルアミノ酸を合成し、かつ、内因性の β -ケト酸デヒドロゲナーゼの活性を保持する *Bacillus subtilis* 細胞によって生成されるアシルアミノ酸組成物と比較して、奇数のアンテイソ型分岐脂肪酸テールを有するアシルアミノ酸が富化されたアシルアミノ酸組成物を生成するのに十分な濃度の 2 - メチル酪酸の存在下で前記操作された細胞を培養することを含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 19】

前記培養するステップが、アシルアミノ酸を合成し、かつ、内因性の β -ケト酸デヒドロゲナーゼの活性を保持する *Bacillus subtilis* 細胞によって生成されるアシルアミノ酸組成物と比較して、偶数の非分岐脂肪酸テールを有するアシルアミノ酸が富化されたアシルアミノ酸組成物を生成するのに十分な濃度の 2 - メチル酪酸の存在下で前記操作された細胞を培養することを含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 20】

前記培養するステップが、アシルアミノ酸を合成し、かつ、内因性の β -ケト酸デヒドロゲナーゼの活性を保持する *Bacillus subtilis* 細胞によって生成されるアシルアミノ酸組成物と比較して、奇数のイソ型分岐脂肪酸テールを有するアシルアミノ酸が富化されたアシルアミノ酸組成物を生成するのに十分な濃度のイソ吉草酸の存在下で前記操作された細胞を培養することを含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 21】

前記培養するステップが、アシルアミノ酸を合成し、かつ、内因性の β -ケト酸デヒドロゲナーゼの活性を保持する *Bacillus subtilis* 細胞によって生成されるアシルアミノ酸組成物と比較して、偶数の非分岐脂肪酸テールを有するアシルアミノ酸が富化されたアシルアミノ酸組成物を生成するのに十分な濃度のイソ吉草酸の存在下で前記操作された細胞を培養することを含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 22】

前記アシルアミノ酸組成物内のアシルアミノ酸を切断して、遊離脂肪酸およびアミノ酸を生成するステップをさらに含む、請求項 16 ~ 21 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

前記切断するステップが、前記アシルアミノ酸組成物をアシラーゼと接触させることを含む、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の操作された *Bacillus subtilis* 細胞を、

前記ペプチドシンテターゼポリペプチドのアミノ酸基質；および

前記ペプチドシンテターゼポリペプチドのアシル部分基質

と接触させるステップを含む方法であって、

前記接触させるステップが、アシルアミノ酸が生成されるように、前記操作されたペプチドシンテターゼポリペプチドが、前記アシル部分基質からのアシル部分を前記アミノ酸に共有結合的に連結するのに十分な条件下および時間の間、実施され、生成された前記アシルアミノ酸が、前記操作されたペプチドシンテターゼポリペプチドから放出される、方法。

【請求項 25】

請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の操作された *Bacillus subtilis* 細胞によって生成されるアシルアミノ酸組成物であって、アシルアミノ酸と、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の操作された *Bacillus subtilis* 細胞とを含む、組成物。

【請求項 26】

前記組成物中のアシルアミノ酸の実質的に全てが同じアミノ酸成分を含む、請求項 25 に

記載の組成物。

【請求項 27】

前記組成物中のアシルアミノ酸が異なるアシル部分を含む、請求項 25 または 26 に記載の組成物。