

【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1年10月31日(2019.10.31)

【公開番号】特開2019-141083(P2019-141083A)

【公開日】令和1年8月29日(2019.8.29)

【年通号数】公開・登録公報2019-035

【出願番号】特願2019-84119(P2019-84119)

【国際特許分類】

C 1 2 N	9/02	(2006.01)
C 1 2 N	1/15	(2006.01)
C 1 2 N	1/19	(2006.01)
C 1 2 N	1/21	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
C 1 2 P	7/04	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	9/02	Z N A
C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	
C 1 2 P	7/04	

【手続補正書】

【提出日】令和1年9月11日(2019.9.11)

【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-ACPから脂肪アルデヒドへの変換を触媒するバリアントアシル-ACPレダクターゼ(AAR)ポリペプチドであって、

該バリアントAARポリペプチドが、SEQ ID NO: 28に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ

該バリアントAARポリペプチドが、

SEQ ID NO: 28の17位に対応する位置における、V17L、V17N、V17CおよびV17Wからなる群より選択される置換突然変異；

SEQ ID NO: 28の18位に対応する位置における、S18M、S18F、S18Y、S18T、S18L、S18CおよびS18Vからなる群より選択される置換突然変異；

SEQ ID NO: 28の19位に対応する位置における、R19V、R19T、R19I、R19AおよびR19Mからなる群より選択される置換突然変異；

SEQ ID NO: 28の23位に対応する位置における、Y23Nである置換突然変異；

SEQ ID NO: 28の96位に対応する位置における、S96Tである置換突然変異；

SEQ ID NO: 28の274位に対応する位置における、I274Nである置換突然変異；

SEQ ID NO: 28の283位に対応する位置における、E283Kである置換突然変異；ならびに

SEQ ID NO: 28の291位に対応する位置における、M291Vである置換突然変異からなる群より選択される位置における置換突然変異を含む、

前記バリアントAARポリペプチド。

【請求項 2】

SEQ ID NO: 28に対して少なくとも95%の配列同一性を有する、請求項1記載のバリアントAARポリペプチド。

【請求項 3】

SEQ ID NO: 28に対して少なくとも96%の配列同一性を有する、請求項1記載のバリアントAARポリペプチド。

【請求項 4】

SEQ ID NO: 28に対して少なくとも97%の配列同一性を有する、請求項1記載のバリアントAARポリペプチド。

【請求項 5】

SEQ ID NO: 28に対して少なくとも98%の配列同一性を有する、請求項1記載のバリアントAARポリペプチド。

【請求項 6】

SEQ ID NO: 28の18位に対応する位置における置換突然変異が、S18T突然変異である、請求項1~5のいずれか一項記載のバリアントAARポリペプチド。

【請求項 7】

(i) S18T、C63Y、S96T、L177H、A281V ; (ii) S18T、C63Y、S96T、L177H、A281V E284K ;
(iii) S18T、C63Y、S96T、L177H ; (iv) S18T、C63H、S96T、L177H ; S18T、C63Y ; (v) S18T、C63Y、A281V、E283K ; S18T、C63H、L177H ; (vi) S18T、C63H、L65F、L177H ; (vii) S18T、C63H、S96T、L177H、A281V、E283K ; (viii) S18T、C63Y、L65F、S96T、L177H A281V、E283K、M284I ; (ix) S18T、L177H、A281V、E283K ; (x) S18T、L177H、A281V、E283K ;
(xi) S18T、S96T、L177H、E283K ; (xii) S18T、L177H、A281V、E283K ; (xiii) S18T、L177H、A281V、E283K ; (xiv) S18T、C63H、L65F、S96T、L177H、A281V、E283K ; (xv) S18T、C63H、L177H ; (xvi) S18T、L65F、S96T、L177H、A281V ; (xvii) S18T、L178H、A282V、E284K ; S18T、S96T、L177H、E283K ; および(xviii) S18T、L179H、A281V、E283Kからなる群より選択される、請求項6記載のバリアントAARポリペプチド。

【請求項 8】

アシル-ACPから脂肪アルデヒドへの変換を触媒するバリアントアシル-ACPレダクターゼ(AAR)ポリペプチドを含む、組換え細菌細胞であって、

該AARポリペプチドが、SEQ ID NO: 28に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ

該バリアントAARポリペプチドが、

SEQ ID NO: 28の17位に対応する位置における、V17L、V17N、V17CおよびV17Wからなる群より選択される置換突然変異；

SEQ ID NO: 28の18位に対応する位置における、S18M、S18F、S18Y、S18T、S18L、S18CおよびS18Vからなる群より選択される置換突然変異；

SEQ ID NO: 28の19位に対応する位置における、R19V、R19T、R19I、R19AおよびR19Mからなる群より選択される置換突然変異；

SEQ ID NO: 28の23位に対応する位置における、Y23Nである置換突然変異；

SEQ ID NO: 28の96位に対応する位置における、S96Tである置換突然変異；

SEQ ID NO: 28の274位に対応する位置における、I274Nである置換突然変異；

SEQ ID NO: 28の283位に対応する位置における、E283Kである置換突然変異；ならびに

SEQ ID NO: 28の291位に対応する位置における、M291Vである置換突然変異からなる群より選択される位置における置換突然変異を含み、

該バリアントAARポリペプチドの発現が、該組換え細菌細胞によって產生される脂肪アルコールの力値を、SEQ ID NO: 28に記載のアミノ酸配列を有するAARポリペプチドを発現する細菌細胞によって產生される脂肪アルコールの力値と比較して増大させる、前記組換え細菌細胞。

【請求項 9】

SEQ ID NO: 28に記載のアミノ酸配列を有するAARポリペプチドを発現する細菌細胞と比較して、C14アルコールの比率の増加を生じる、請求項8記載の組換え細菌細胞。

【請求項 10】

バリアントAARポリペプチドが、SEQ ID NO : 28に対して少なくとも95%の配列同一性を有する、請求項8または9記載の組換え細菌細胞。

【請求項 11】

バリアントAARポリペプチドが、SEQ ID NO : 28に対して少なくとも96%の配列同一性を有する、請求項8または9記載の組換え細菌細胞。

【請求項 12】

バリアントAARポリペプチドが、SEQ ID NO : 28に対して少なくとも97%の配列同一性を有する、請求項8または9記載の組換え細菌細胞。

【請求項 13】

バリアントAARポリペプチドが、SEQ ID NO : 28に対して少なくとも98%の配列同一性を有する、請求項8または9記載の組換え細菌細胞。

【請求項 14】

SEQ ID NO: 28の18位に対応する位置におけるバリアントAARポリペプチドの置換突然変異が、S18T突然変異である、請求項8～13のいずれか一項記載の組換え細菌細胞。

【請求項 15】

バリアントAARポリペプチドが、(i) S18T、C63Y、S96T、L177H、A281V ; (ii) S18T、C63Y、S96T、L177H、A281V E284K ; (iii) S18T、C63Y、S96T、L177H ; (iv) S18T、C63H、S96T、L177H ; S18T、C63Y ; (v) S18T、C63Y、A281V、E283K ; S18T、C63H、L177H ; (vi) S18T、C63H、L65F、L177H ; (vii) S18T、C63H、S96T、L177H、A281V、E283K ; (viii) S18T、C63Y、L65F、S96T、L177H A281V、E283K、M284I ; (ix) S18T、L177H、A281V、E283K ; (x) S18T、L177H、A281V、E283K ; (xi) S18T、S96T、L177H、E283K ; (xii) S18T、L177H、A281V、E283K ; (xiii) S18T、L177H、A281V、E283K ; (xiv) S18T、C63H、L65F、S96T、L177H、A281V、E283K ; (xv) S18T、C63H、L177H ; (xvi) S18T、L65F、S96T、L177H、A281V ; (xvii) S18T、L178H、A282V、E284K ; S18T、S96T、L177H、E283K ; および(xviii) S18T、L179H、A281V、E283Kからなる群より選択される、請求項14記載の組換え細菌細胞。

【請求項 16】

アシル-ACPから脂肪アルデヒドへの変換を触媒するバリアントアシル-ACPレダクターゼ(AAR)ポリペプチドを含む組換え細菌細胞を培養する段階を含む、脂肪アルコールを生産する方法であって、

該バリアントAARポリペプチドが、SEQ ID NO : 28に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ

該バリアントAARポリペプチドが、

SEQ ID NO : 28の17位に対応する位置における、V17L、V17N、V17CおよびV17Wからなる群より選択される置換突然変異；

SEQ ID NO: 28の18位に対応する位置における、S18M、S18F、S18Y、S18T、S18L、S18CおよびS18Vからなる群より選択される置換突然変異；

SEQ ID NO: 28の19位に対応する位置における、R19V、R19T、R19I、R19AおよびR19Mからなる群より選択される置換突然変異；

SEQ ID NO: 28の23位に対応する位置における、Y23Nである置換突然変異；

SEQ ID NO: 28の96位に対応する位置における、S96Tである置換突然変異；

SEQ ID NO: 28の274位に対応する位置における、I274Nである置換突然変異；

SEQ ID NO: 28の283位に対応する位置における、E283Kである置換突然変異；ならびに

SEQ ID NO: 28の291位に対応する位置における、M291Vである置換突然変異からなる群より選択される位置における置換突然変異を含む、前記方法。

【請求項 17】

組換え細菌細胞が、外因性のアルコールデヒドロゲナーゼをさらに発現する、請求項16記載の方法。

【請求項 18】

脂肪アルコールがC14アルコールである、請求項16または17記載の方法。

【請求項 19】

脂肪アルコールを単離する段階をさらに含む、請求項16～18のいずれか一項記載の方法。
。