

【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24年3月8日(2012.3.8)

【公表番号】特表2010-516271(P2010-516271A)

【公表日】平成22年5月20日(2010.5.20)

【年通号数】公開・登録公報2010-020

【出願番号】特願2009-546822(P2009-546822)

【国際特許分類】

C 12 N 9/10 (2006.01)

C 12 N 15/09 (2006.01)

C 12 N 1/21 (2006.01)

【F I】

C 12 N 9/10 Z N A

C 12 N 15/00 A

C 12 N 1/21

【手続補正書】

【提出日】平成24年1月20日(2012.1.20)

【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】

(i) バチルス・リケニフォルミス細胞を提供するステップと、  
 (ii) 脂質アシルトランスフェラーゼをコードする異種ヌクレオチド配列でバチルス・リケニフォルミス細胞を形質転換するステップと、  
 (iii) プロモーター配列の制御下で前記細胞において脂質アシルトランスフェラーゼを発現させるステップと  
 を含む、脂質アシルトランスフェラーゼの製造方法。

【請求項2】

プロモーター配列が、脂質アシルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列と天然には結合しない、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

脂質アシルトランスフェラーゼ酵素をコードするヌクレオチド配列が以下のヌクレオチド配列のいずれか1つである、請求項1又は2に記載の方法。

- (a) 配列番号49で示されるヌクレオチド配列；
- (b) 配列番号36で示されるヌクレオチド配列；
- (c) 配列番号38で示されるヌクレオチド配列；
- (d) 配列番号39で示されるヌクレオチド配列；
- (e) 配列番号42で示されるヌクレオチド配列；
- (f) 配列番号44で示されるヌクレオチド配列；
- (g) 配列番号46で示されるヌクレオチド配列；
- (h) 配列番号48で示されるヌクレオチド配列；
- (i) 配列番号50で示されるヌクレオチド配列；
- (j) 配列番号51で示されるヌクレオチド配列；
- (k) 配列番号52で示されるヌクレオチド配列；
- (l) 配列番号53で示されるヌクレオチド配列；

(m) 配列番号54で示されるヌクレオチド配列；  
 (n) 配列番号55で示されるヌクレオチド配列；  
 (o) 配列番号56で示されるヌクレオチド配列；  
 (p) 配列番号57で示されるヌクレオチド配列；  
 (q) 配列番号58で示されるヌクレオチド配列；  
 (r) 配列番号59で示されるヌクレオチド配列；  
 (s) 配列番号60で示されるヌクレオチド配列；  
 (t) 配列番号61で示されるヌクレオチド配列；  
 (u) 配列番号62で示されるヌクレオチド配列；  
 (v) 配列番号63で示されるヌクレオチド配列；及び  
 (w) 配列番号36、配列番号38、配列番号39、配列番号42、配列番号44、配列番号46、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号54、配列番号55、配列番号56、配列番号57、配列番号58、配列番号59、配列番号60、配列番号61、配列番号62又は配列番号63で示されるいづれか1つの配列と70%以上の同一性を有するヌクレオチド配列；

## 【請求項4】

脂質アシルトランスフェラーゼ酵素をコードするヌクレオチド配列が、配列番号36、配列番号38、配列番号39、配列番号42、配列番号44、配列番号46、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号54、配列番号55、配列番号56、配列番号57、配列番号58、配列番号59、配列番号60、配列番号61、配列番号62又は配列番号63で示されるいづれか1つの配列と75%以上の同一性を有するヌクレオチド配列である、請求項1又は2に記載の方法。

## 【請求項5】

脂質アシルトランスフェラーゼをコードする異種ヌクレオチド配列に、シグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列が作動可能に連結されている、請求項1～4のいづれかに記載の方法。

## 【請求項6】

脂質アシルトランスフェラーゼを単離／回収する追加のステップを含む、請求項1～5のいづれかに記載の方法。

## 【請求項7】

プロモーター配列が宿主細胞と同種である、請求項1～6のいづれかに記載の方法。

## 【請求項8】

プロモーター配列が、-アミラーゼプロモーター配列、プロテアーゼプロモーター配列、サブチリシンプロモーター配列、グルタミン酸特異的プロテアーゼプロモーター配列及びレバンスクラーゼプロモーター配列からなる群から選択される、請求項1～7のいづれかに記載の方法。

## 【請求項9】

プロモーター配列が、-アミラーゼプロモーター配列である、請求項1～8のいづれかに記載の方法。

## 【請求項10】

脂質アシルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列が、GDS×モチーフ及び／又はGANDYモチーフを含む脂質アシルトランスフェラーゼをコードする、請求項1～9のいづれかに記載の方法。

## 【請求項11】

脂質アシルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列が、アシルトランスフェラーゼ活性を有し、且つアミノ酸配列モチーフGDX(Xは、アミノ酸残基L、A、V、I、F、Y、H、Q、T、N、M及びSの1又は複数である)を含む酵素である脂質アシルトランスフェラーゼをコードする、請求項1～10のいづれかに記載の方法。

## 【請求項12】

脂質アシルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列が、1又は複数の以下の属、即ち、アエロモナス、ストレプトマイセス、サッカロミセス、ラクトコッカス、マイコバクテリウム、ストレプトコッカス、ラクトバチルス、デスルフィトバクテリウム、バチルス、カンピロバクター、ビブリオナシエ、キシレラ、スルホロブス、アスペルギルス、シゾサッカロミセス、リステリア、ナイセリア、メソリゾビウム、ラルストニア、ザントモナス及びカンジダに属する生物から得ることができる脂質アシルトランスフェラーゼをコードする、請求項1～11のいずれかに記載の方法。

【請求項13】

脂質アシルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列が、アエロモナス属に属する生物から得ることができる脂質アシルトランスフェラーゼをコードする、請求項1～12のいずれかに記載の方法。

【請求項14】

脂質アシルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列が、配列番号35で示されるアエロモナス・ヒドロフィラ脂質アシルトランスフェラーゼのアミノ酸配列のN-80に対応する位置にアスパラギン酸残基を含む脂質アシルトランスフェラーゼをコードする、請求項1～13のいずれかに記載の方法。

【請求項15】

脂質アシルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列が、配列番号16で示されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列と少なくとも75%の相同性を有するアミノ酸配列を含む脂質アシルトランスフェラーゼをコードする、請求項1～14のいずれかに記載の方法。

【請求項16】

脂質アシルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列が、配列番号16で示されるアミノ酸配列を含む脂質アシルトランスフェラーゼをコードする、請求項1～15のいずれかに記載の方法。

【請求項17】

異種の脂質アシルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列を含むバチルス・リケニフォルミス宿主細胞。

【請求項18】

脂質アシルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列が、GDS×モチーフ及び/又はGANDYモチーフを含む脂質アシルトランスフェラーゼをコードする、請求項17に記載の宿主細胞。

【請求項19】

脂質アシルトランスフェラーゼ酵素をコードするヌクレオチド配列が以下のヌクレオチド配列のいずれか1つである、請求項17又は18に記載の宿主細胞。

- (a) 配列番号49で示されるヌクレオチド配列；
- (b) 配列番号36で示されるヌクレオチド配列；
- (c) 配列番号38で示されるヌクレオチド配列；
- (d) 配列番号39で示されるヌクレオチド配列；
- (e) 配列番号42で示されるヌクレオチド配列；
- (f) 配列番号44で示されるヌクレオチド配列；
- (g) 配列番号46で示されるヌクレオチド配列；
- (h) 配列番号48で示されるヌクレオチド配列；
- (i) 配列番号50で示されるヌクレオチド配列；
- (j) 配列番号51で示されるヌクレオチド配列；
- (k) 配列番号52で示されるヌクレオチド配列；
- (l) 配列番号53で示されるヌクレオチド配列；
- (m) 配列番号54で示されるヌクレオチド配列；
- (n) 配列番号55で示されるヌクレオチド配列；
- (o) 配列番号56で示されるヌクレオチド配列；

( p ) 配列番号 5 7 で示されるヌクレオチド配列；  
 ( q ) 配列番号 5 8 で示されるヌクレオチド配列；  
 ( r ) 配列番号 5 9 で示されるヌクレオチド配列；  
 ( s ) 配列番号 6 0 で示されるヌクレオチド配列；  
 ( t ) 配列番号 6 1 で示されるヌクレオチド配列；  
 ( u ) 配列番号 6 2 で示されるヌクレオチド配列；  
 ( v ) 配列番号 6 3 で示されるヌクレオチド配列；及び  
 ( w ) 配列番号 3 6 、配列番号 3 8 、配列番号 3 9 、配列番号 4 2 、配列番号 4 4 、配列番号 4 6 、配列番号 4 8 、配列番号 4 9 、配列番号 5 0 、配列番号 5 1 、配列番号 5 2 、配列番号 5 3 、配列番号 5 4 、配列番号 5 5 、配列番号 5 6 、配列番号 5 7 、配列番号 5 8 、配列番号 5 9 、配列番号 6 0 、配列番号 6 1 、配列番号 6 2 又は配列番号 6 3 で示されるいづれか 1 つの配列と 7 0 % 以上の同一性を有するヌクレオチド配列；

## 【請求項 2 0】

脂質アシルトランスフェラーゼ酵素をコードするヌクレオチド配列が、配列番号 3 6 、配列番号 3 8 、配列番号 3 9 、配列番号 4 2 、配列番号 4 4 、配列番号 4 6 、配列番号 4 8 、配列番号 4 9 、配列番号 5 0 、配列番号 5 1 、配列番号 5 2 、配列番号 5 3 、配列番号 5 4 、配列番号 5 5 、配列番号 5 6 、配列番号 5 7 、配列番号 5 8 、配列番号 5 9 、配列番号 6 0 、配列番号 6 1 、配列番号 6 2 又は配列番号 6 3 で示されるいづれか 1 つの配列と 7 5 % 以上の同一性を有するヌクレオチド配列である、請求項 1 7 又は 1 8 に記載の宿主細胞。

## 【請求項 2 1】

脂質アシルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列が、アシルトランスフェラーゼ活性を有し、且つアミノ酸配列モチーフ G D S X ( X は、アミノ酸残基 L 、 A 、 V 、 I 、 F 、 Y 、 H 、 Q 、 T 、 N 、 M 及び S の 1 又は複数である ) を含む酵素である脂質アシルトランスフェラーゼをコードする、請求項 1 7 ~ 2 0 のいづれかに記載の宿主細胞。

## 【請求項 2 2】

脂質アシルトランスフェラーゼが、1 又は複数の以下の属、即ち、アエロモナス、ストレプトマイセス、サッカロミセス、ラクトコッカス、マイコバクテリウム、ストレプトコッカス、ラクトバチルス、デスルフィトバクテリウム、バチルス、カンピロバクター、ビブリオナシエ、キシレラ、スルホロブス、アスペルギルス、シゾサッカロミセス、リスティア、ナイセリア、メソリゾビウム、ラルストニア、ザントモナス及びカンジダに属する生物から得ることができる、請求項 1 7 ~ 2 1 のいづれかに記載の宿主細胞。

## 【請求項 2 3】

脂質アシルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列が、アエロモナス属に属する生物から得ることができる脂質アシルトランスフェラーゼをコードする、請求項 1 7 ~ 2 2 のいづれかに記載の宿主細胞。

## 【請求項 2 4】

脂質アシルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列が、配列番号 3 5 で示されるアエロモナス・ヒドロフィラ脂質アシルトランスフェラーゼのアミノ酸配列の N - 8 0 に対応する位置にアスパラギン酸残基を含む脂質アシルトランスフェラーゼをコードする、請求項 1 7 ~ 2 3 のいづれかに記載の宿主細胞。

## 【請求項 2 5】

脂質アシルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列が、配列番号 1 6 で示されるアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列と 7 5 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列を含む脂質アシルトランスフェラーゼをコードする、請求項 1 7 ~ 2 4 のいづれかに記載の宿主細胞。

## 【請求項 2 6】

脂質アシルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列が、配列番号 1 6 で示されるアミノ酸配列を含む脂質アシルトランスフェラーゼをコードする、請求項 1 7 ~ 2 5 のいづれかに記載の宿主細胞。

**【請求項 27】**

異種の脂質アシルトランスフェラーゼの製造におけるバチルス・リケニフォルミス宿主細胞の使用。

**【請求項 28】**

バチルス・サブチリス宿主細胞での発現と比べて発現が増加する、請求項27に記載の使用。

**【請求項 29】**

バチルス・リケニフォルミスと同種のプロモーター配列に作動可能に連結された脂質アシルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクター。

**【請求項 30】**

脂質アシルトランスフェラーゼ酵素をコードするヌクレオチド配列が以下のヌクレオチド配列のいずれか1つである、請求項29に記載の発現ベクター。

- (a) 配列番号49で示されるヌクレオチド配列；
- (b) 配列番号36で示されるヌクレオチド配列；
- (c) 配列番号38で示されるヌクレオチド配列；
- (d) 配列番号39で示されるヌクレオチド配列；
- (e) 配列番号42で示されるヌクレオチド配列；
- (f) 配列番号44で示されるヌクレオチド配列；
- (g) 配列番号46で示されるヌクレオチド配列；
- (h) 配列番号48で示されるヌクレオチド配列；
- (i) 配列番号50で示されるヌクレオチド配列；
- (j) 配列番号51で示されるヌクレオチド配列；
- (k) 配列番号52で示されるヌクレオチド配列；
- (l) 配列番号53で示されるヌクレオチド配列；
- (m) 配列番号54で示されるヌクレオチド配列；
- (n) 配列番号55で示されるヌクレオチド配列；
- (o) 配列番号56で示されるヌクレオチド配列；
- (p) 配列番号57で示されるヌクレオチド配列；
- (q) 配列番号58で示されるヌクレオチド配列；
- (r) 配列番号59で示されるヌクレオチド配列；
- (s) 配列番号60で示されるヌクレオチド配列；
- (t) 配列番号61で示されるヌクレオチド配列；
- (u) 配列番号62で示されるヌクレオチド配列；
- (v) 配列番号63で示されるヌクレオチド配列；及び
- (w) 配列番号36、配列番号38、配列番号39、配列番号42、配列番号44、配列番号46、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号54、配列番号55、配列番号56、配列番号57、配列番号58、配列番号59、配列番号60、配列番号61、配列番号62又は配列番号63で示されるいずれか1つの配列と70%以上の同一性を有するヌクレオチド配列；

**【請求項 31】**

プロモーターが、脂質アシルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列と天然には結合しない、請求項29又は30に記載の発現ベクター。

**【請求項 32】**

シグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列が、脂質アシルトランスフェラーゼをコードする異種ヌクレオチド配列に作動可能に連結されている、請求項29～31のいずれかに記載の発現ベクター。

**【請求項 33】**

プロモーター配列が、-アミラーゼプロモーター配列、プロテアーゼプロモーター配列、サブチリシンプロモーター配列、グルタミン酸特異的プロテアーゼプロモーター配列及びレバンスクラーゼプロモーター配列からなる群から選択される、請求項29～32の

いずれかに記載の発現ベクター。

【請求項 3 4】

プロモーター配列が - アミラーゼプロモーター配列である、請求項 2 9 ~ 3 3 のいずれかに記載の発現ベクター。

【請求項 3 5】

( i ) バチルス・サブチリス以外のバチルス細胞を提供するステップと、  
( ii ) 脂質アシルトランスフェラーゼをコードする異種ヌクレオチド配列で、バチルス・サブチリス以外のバチルス細胞を形質転換するステップと、  
( iii ) プロモーター配列の制御下で前記細胞において脂質アシルトランスフェラーゼを発現させるステップと  
を含む、脂質アシルトランスフェラーゼの製造方法。

【請求項 3 6】

請求項 1 ~ 1 6 、及び 3 5 のいずれかに記載の方法により得られる脂質アシルトランスフェラーゼ。

【請求項 3 7】

異種の脂質アシルトランスフェラーゼをコードするヌクレオチド配列を含む、バチルス・サブチリス以外の細胞であるバチルス宿主細胞。

【請求項 3 8】

異種の脂質アシルトランスフェラーゼの製造における、バチルス・サブチリス以外のバチルス宿主細胞の使用。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2010516271000001.app