

【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8月30日(2018.8.30)

【公表番号】特表2017-528125(P2017-528125A)

【公表日】平成29年9月28日(2017.9.28)

【年通号数】公開・登録公報2017-037

【出願番号】特願2017-507841(P2017-507841)

【国際特許分類】

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 P 19/00 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 1/19 Z N A

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/10

C 1 2 P 19/00

C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成30年7月20日(2018.7.20)

【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】

細胞培養物においてステピオールグリコシドを産生することが可能な組み換え宿主細胞であって、

組み換え宿主細胞が、トランスポーターポリペプチドをコードする少なくとも1種の内在性トランスポーター遺伝子、および/または、少なくとも1種の内在性トランスポーター遺伝子の発現を制御する転写因子ポリペプチドをコードする少なくとも1種の内在性転写因子遺伝子の改変された発現を有し、および/または、少なくとも1種の非相同トランスポーター遺伝子を発現する；

ステピオールグリコシドの少なくとも一部が、組み換え宿主細胞から細胞培養物中へ輸送される、

前記組み換え宿主細胞。

【請求項2】

請求項1に記載の組み換え宿主細胞であって、トランスポーターポリペプチドが、ATP-結合カセット(ABC)トランスポーター、主要ファシリテータースーパーファミリー(MFS)トランスポーター、アミノ酸/オーキシンパーミアゼ(AAAP)ファミリートランスポーター、ATPアーゼトランスポーター、硫酸パーミアゼ(SuIP)ファミリートランスポーター、リソソームシステイントランスポーター(LCT)ファミリートランスポーター、Ca²⁺:カチオンアンチポーター(CaCA)ファミリートランスポーター、アミノ酸-ポリアミン-有機カチオン(APC)スーパーファミリートランスポーター、多剤/

オリゴ糖 - 脂質 / 多糖 (MOP) トランスポーター、ZRT / IRT 様タンパク質 (ZIP) 金属トランスポーターファミリートランスポーター、ミトコンドリアタンパク質トランスポーター (MPT) ファミリートランスポーター、電位依存性イオンチャネル (VIC) ファミリートランスポーター、一価カチオン：プロトンアンチポーター 2 (CPA2) ファミリートランスポーター、推定膜透過アミノ酸排出 (putative transmembrane amino acid efflux) トランスポーターのThrEファミリー、オリゴペプチドトランスポーター (OPT) ファミリートランスポーター、K⁺ トランスポーター (Trk) ファミリートランスポーター、胆汁酸：Na⁺ シンポーター (BASS) ファミリートランスポーター、薬物 / 代謝物トランスポーター (DMT) スーパーファミリートランスポーター、ミトコンドリアキャリア (MC) ファミリートランスポーター、オーキシン排出キャリア (AEC) ファミリートランスポーター、アンモニアチャネルトランスポーター (Amt) ファミリートランスポーター、金属イオン (Mn²⁺ - 鉄) トランスポーター (Nramp) ファミリートランスポーター、一過性受容器電位 Ca²⁺ チャネル (TRP-CC) ファミリートランスポーター、ヒ素耐性 3 (ACR3) ファミリートランスポーター、核酸塩基：カチオンシンポーター 1 (NCS1) ファミリートランスポーター、無機リン酸トランスポーター (PiT) ファミリートランスポーター、亜ヒ酸 - アンチモナイト (ArsAB) 排出ファミリートランスポーター、IISPファミリーのトランスポーター (IISP family of transporter)、グリセロール取り込み (GUP) ファミリートランスポーター、金属イオン輸送 (MIT) ファミリートランスポーター、銅輸送 (Ctr) ファミリートランスポーター、またはカチオン拡散ファシリテーター (CDF) ファミリートランスポーターを含む、前記組み換え宿主細胞。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の組み換え宿主細胞であって、改変された発現が、

(a) トランスポーターポリペプチドをコードする少なくとも 1 種の内在性トランスポーター遺伝子および / または転写因子ポリペプチドをコードする少なくとも 1 種の内在性転写因子遺伝子の過剰発現；

(b) トランスポーターポリペプチドをコードする少なくとも 1 種の内在性トランスポーター遺伝子および / または転写因子ポリペプチドをコードする少なくとも 1 種の内在性遺伝子の欠失；または

(c) トランスポーターポリペプチドをコードする少なくとも 1 種の内在性トランスポーター遺伝子および / または少なくとも 1 種のトランスポーター遺伝子の発現を制御する転写因子ポリペプチドをコードする少なくとも 1 種の内在性転写因子遺伝子の発現または活性の増加または減少、または、当該少なくとも 1 種の内在性トランスポーター遺伝子および当該少なくとも 1 種の内在性転写因子遺伝子の両方の発現または活性の、対応する未改変の組み換え宿主細胞において観察される発現または活性のレベルよりも少なくとも 5% 以上の増加または少なくとも 5% 以下の減少

を含む、前記組み換え宿主細胞。

【請求項 4】

内在性トランスポーターポリペプチドが、配列番号 13 ~ 34 および 36 ~ 147 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列と少なくとも 90% の配列同一性を有するポリペプチドを含み、および、内在性転写因子ポリペプチドが、配列番号 35 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 90% の配列同一性を有するポリペプチドを含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の組み換え宿主細胞。

【請求項 5】

改変された発現が、配列番号 22、26、30、38、42、44、48、56、68、69、79、82、88、94、95、102、112、121、126、127、129、132、146、または 147 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 90% の配列同一性を有するトランスポーターポリペプチドをコードするトランスポーター遺伝子の過剰発現を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の組み換え宿主細胞。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の組み換え宿主細胞であって、

- (a) スクローストランスポーター (SUC1) ポリペプチドおよびスクロース合成酵素 (SUS1) ポリペプチドをコードする 1 種以上の遺伝子；
- (b) ファルネシルニリン酸 (FPP) およびイソペンテニルニリン酸 (IPP) からゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) を合成することが可能なポリペプチドをコードする遺伝子、ここで、当該ポリペプチドは、配列番号 149 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 70% の配列同一性を有するポリペプチドを含む；
- (c) GGPP から ent-コパリルニリン酸を合成することが可能なポリペプチドをコードする遺伝子、ここで、当該ポリペプチドは、配列番号 150 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 70% の配列同一性を有するポリペプチドを含む；
- (d) ent-コパリルピロリン酸から ent-カウレンを合成することが可能なポリペプチドをコードする遺伝子、ここで、当該ポリペプチドは、配列番号 152 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 70% の配列同一性を有するポリペプチドを含む；
- (e) ent-カウレンから ent-カウレン酸を合成することが可能なポリペプチドをコードする遺伝子、ここで、当該ポリペプチドは、配列番号 151 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 70% の配列同一性を有するポリペプチドを含む；
- (f) ent-カウレン酸からステビオールを合成することが可能なポリペプチドをコードする遺伝子、ここで当該ポリペプチドは、配列番号 154 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 70% の配列同一性を有するポリペプチドを含む；
- (g) シトクローム P450 複合体を還元することが可能なポリペプチドをコードする遺伝子、ここで、当該ポリペプチドは、配列番号 153 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 70% の配列同一性または配列番号 155 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 65% の配列同一性を有するポリペプチドを含む；
- (h) ステビオールまたはステビオールグリコシドをその C-13 ヒドロキシル基でグリコシル化することが可能なポリペプチドをコードする遺伝子、ここで、当該ポリペプチドは、配列番号 156 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 55% の配列同一性を有するポリペプチドを含む；
- (i) ステビオールグリコシドの 13-O-グルコース、19-O-グルコース、または 13-O-グルコースおよび 19-O-グルコースの両方の C3' のベータ 1, 3 グリコシル化が可能なポリペプチドをコードする遺伝子、ここで、当該ポリペプチドは、配列番号 158 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 50% の配列同一性を有するポリペプチドを含む；
- (j) ステビオールまたはステビオールグリコシドをその C-19 カルボキシル基でグリコシル化することが可能なポリペプチドをコードする遺伝子、ここで当該ポリペプチドは、配列番号 157 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 55% の配列同一性を有するポリペプチドを含む；および/または
- (k) ステビオールグリコシドの 13-O-グルコース、19-O-グルコース、または 13-O-グルコースおよび 19-O-グルコースの両方の C2' のベータ 1, 2 グリコシル化が可能なポリペプチドをコードする遺伝子、ここで、当該ポリペプチドは、配列番号 159 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 90% の配列同一性または配列番号 148 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 65% の配列同一性を有するポリペプチドを含む；
- をさらに含み、
- ここで、項目 (a) ~ (k) の少なくとも 1 種の遺伝子が組み換え遺伝子であり；およびここで、ステビオールグリコシドが、レバウジオシド A、レバウジオシド B、レバウジオシド D および/またはレバウジオシド M、またはその異性体である、
- 前記組み換え宿主細胞。

【請求項 7】

項目 (a) ~ (k) の少なくとも 1 種の遺伝子が、組み換え宿主細胞における発現のためにコドン最適化されている、請求項 6 に記載の組み換え宿主細胞。

【請求項 8】

植物細胞、哺乳動物細胞、昆虫細胞、真菌細胞、または細菌細胞である、請求項 1 ~ 7

のいずれか一項に記載の組み換え宿主細胞。

【請求項 9】

ヤロウイア・リポティカ (*Yarrowia lipolytica*) 細胞である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の組み換え宿主細胞。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の組み換え宿主細胞を、1 種以上の遺伝子が発現される条件下で培養培地において培養することを含む、細胞培養物においてステピオールグリコシドを産生する方法であって、

少なくとも 1 種の内在性トランスポーター遺伝子、少なくとも 1 種の内在性トランスポーター遺伝子の発現を制御する少なくとも 1 種の内在性転写因子遺伝子、または両方が発現される；

培養することが、1 種以上の遺伝子の発現を誘導すること、または、1 種以上の遺伝子を恒常的に発現することを含む；

ステピオールグリコシドが組み換え宿主細胞によって産生される；および

ステピオールグリコシドが、レバウジオシド A、レバウジオシド B、レバウジオシド D および / またはレバウジオシド M、またはその異性体である、

前記方法。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の方法であって、

(a) レバウジオシド A が、ステピオールまたはステピオールグリコシドをその C - 13 ヒドロキシル基でグリコシル化することが可能なポリペプチド；ステピオールグリコシドの 13 - O - グルコース、19 - O - グルコース、または 13 - O - グルコースおよび 19 - O - グルコースの両方の C 3 ' のベータ 1, 3 グリコシル化が可能なポリペプチド；ステピオールまたはステピオールグリコシドをその C - 19 カルボキシル基でグリコシル化することが可能なポリペプチド；およびステピオールグリコシドの 13 - O - グルコース、19 - O - グルコース、または 13 - O - グルコースおよび 19 - O - グルコースの両方の C 2 ' のベータ 1, 2 グリコシル化が可能なポリペプチドを発現する組み換え宿主細胞において産生される；

(b) レバウジオシド B が、ステピオールまたはステピオールグリコシドをその C - 13 ヒドロキシル基でグリコシル化することが可能なポリペプチド；ステピオールグリコシドの 13 - O - グルコース、19 - O - グルコース、または 13 - O - グルコースおよび 19 - O - グルコースの両方の C 3 ' のベータ 1, 3 グリコシル化が可能なポリペプチド；およびステピオールグリコシドの 13 - O - グルコース、19 - O - グルコース、または 13 - O - グルコースおよび 19 - O - グルコースの両方の C 2 ' のベータ 1, 2 グリコシル化が可能なポリペプチドを発現する組み換え宿主細胞において産生される；

(c) レバウジオシド D が、ステピオールまたはステピオールグリコシドをその C - 13 ヒドロキシル基でグリコシル化することが可能なポリペプチド；ステピオールグリコシドの 13 - O - グルコース、19 - O - グルコース、または 13 - O - グルコースおよび 19 - O - グルコースの両方の C 3 ' のベータ 1, 3 グリコシル化が可能なポリペプチド；ステピオールまたはステピオールグリコシドをその C - 19 カルボキシル基でグリコシル化することが可能なポリペプチド；およびステピオールグリコシドの 13 - O - グルコース、19 - O - グルコース、または 13 - O - グルコースおよび 19 - O - グルコースの両方の C 2 ' のベータ 1, 2 グリコシル化が可能なポリペプチドを発現する組み換え宿主細胞において産生される；および / または

(d) レバウジオシド M が、ステピオールまたはステピオールグリコシドをその C - 13 ヒドロキシル基でグリコシル化することが可能なポリペプチド；ステピオールグリコシドの 13 - O - グルコース、19 - O - グルコース、または 13 - O - グルコースおよび 19 - O - グルコースの両方の C 3 ' のベータ 1, 3 グリコシル化が可能なポリペプチド；ステピオールまたはステピオールグリコシドをその C - 19 カルボキシル基でグリコシル化することが可能なポリペプチド；およびステピオールグリコシドの 13 - O - グルコー

ス、19-O-グルコース、または13-O-グルコースおよび19-O-グルコースの両方のC2'のベータ1,2グリコシル化が可能なポリペプチドを発現する組み換え宿主細胞において産生される、

前記方法。

【請求項12】

ステピオールグリコシドが、少なくとも500mg/Lの細胞培養物の濃度で産生される、請求項10または11に記載の方法。

【請求項13】

ステピオールグリコシドの産生またはステピオールグリコシドの細胞培養培地中への輸送を増加させる方法であって、トランスポーターポリペプチドをコードする少なくとも1種の内在性トランスポーター遺伝子、少なくとも1種の内在性トランスポーター遺伝子の発現を制御する転写因子ポリペプチドをコードする少なくとも1種の内在性転写因子遺伝子、または両方が発現される条件下で、培養培地において請求項1~9のいずれか一項に記載の組み換え宿主細胞を培養することを含み、ここで、ステピオールグリコシドが、レバウジオシドA、レバウジオシドB、レバウジオシドDおよび/またはレバウジオシドM、またはその異性体である、前記方法。

【請求項14】

レバウジオシドMを、単独でまたは少なくとも1種の他のステピオールグリコシドとともに、細胞培養物から単離することをさらに含む、請求項10~13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

請求項14に記載の方法であって、単離するステップが、細胞培養物の固相から細胞培養物の液相を分離して、レバウジオシドMを単独でまたは少なくとも1種の他のステピオールグリコシドとともに含む上清を得ること、および
(a) 上清を1種以上の吸着樹脂に接触させて、レバウジオシドMの少なくとも一部を単独でまたは少なくとも1種の他のステピオールグリコシドとともに得ること；または
(b) 上清を1種以上のイオン交換または逆相クロマトグラフィーカラムに接触させて、レバウジオシドMの少なくとも一部を単独でまたは少なくとも1種の他のステピオールグリコシドとともに得ること；または
(c) レバウジオシドMを単独でまたは少なくとも1種の他のステピオールグリコシドとともに結晶化または抽出すること；
これによって、レバウジオシドMを単独でまたは少なくとも1種の他のステピオールグリコシドとともに単離することを含む、前記方法。

【請求項16】

レバウジオシドMを単独でまたは少なくとも1種の他のステピオールグリコシドとともに含むステピオールグリコシド組成物を細胞培養物から回収することをさらに含む、請求項10~13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

回収されたステピオールグリコシド組成物が、ステビア植物のステピオールグリコシド組成物に対して、レバウジオシドMを豊富に含み、および、植物由来のステビア抽出物から得られるステピオールグリコシド組成物に対して、ステビア植物由来成分の低減されたレベルを有する、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

組み換え宿主細胞が、ある時間ある温度で発酵槽において培養され、当該温度および時間が、ステピオールグリコシド組成物の産生を促進する、請求項10~13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

請求項1~9のいずれか一項に記載の組み換え宿主細胞を含む細胞培養物であって、
(a) 組み換え宿主細胞によって産生されたステピオールグリコシド；

(b) グルコース、フルクトース、スクロース、キシロース、ラムノース、ウリジンニリン酸 (UDP) - グルコース、UDP - ラムノース、UDP - キシロース、および / または N - アセチル - グルコサミン ; および

(c) 微量金属、ビタミン、塩、YNB、および / またはアミノ酸を含む補助栄養素 ; をさらに含み、ここで、ステビオールグリコシドが、少なくとも 1 mg / リットルの細胞培養物の濃度で存在する、前記細胞培養物。

【請求項 20】

請求項 13 ~ 18 のいずれか一項に記載の方法によって産生されたステビオールグリコシド。

【請求項 21】

請求項 20 に記載のステビオールグリコシドを含む、甘味料組成物。

【請求項 22】

請求項 21 に記載の甘味料組成物を含む、食品。

【請求項 23】

請求項 21 に記載の甘味料組成物を含む、飲料または飲料濃縮物。

【請求項 24】

レバウジオシド A が、ステビオールまたはステビオールグリコシドをその C - 13 ヒドロキシル基でグリコシル化することが可能なポリペプチド ; ステビオールグリコシドの 13 - O - グルコース、19 - O - グルコース、または 13 - O - グルコースおよび 19 - O - グルコースの両方の C 3 ' のベータ 1, 3 グリコシル化が可能なポリペプチド ; ステビオールまたはステビオールグリコシドをその C - 19 カルボキシル基でグリコシル化することが可能なポリペプチド ; およびステビオールグリコシドの 13 - O - グルコース、19 - O - グルコース、または 13 - O - グルコースおよび 19 - O - グルコースの両方の C 2 ' のベータ 1, 2 グリコシル化が可能なポリペプチドを発現する組み換え宿主細胞において産生される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 25】

レバウジオシド D が、ステビオールまたはステビオールグリコシドをその C - 13 ヒドロキシル基でグリコシル化することが可能なポリペプチド ; ステビオールグリコシドの 13 - O - グルコース、19 - O - グルコース、または 13 - O - グルコースおよび 19 - O - グルコースの両方の C 3 ' のベータ 1, 3 グリコシル化が可能なポリペプチド ; ステビオールまたはステビオールグリコシドをその C - 19 カルボキシル基でグリコシル化することが可能なポリペプチド ; およびステビオールグリコシドの 13 - O - グルコース、19 - O - グルコース、または 13 - O - グルコースおよび 19 - O - グルコースの両方の C 2 ' のベータ 1, 2 グリコシル化が可能なポリペプチドを発現する組み換え宿主細胞において産生される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 26】

レバウジオシド M が、ステビオールまたはステビオールグリコシドをその C - 13 ヒドロキシル基でグリコシル化することが可能なポリペプチド ; ステビオールグリコシドの 13 - O - グルコース、19 - O - グルコース、または 13 - O - グルコースおよび 19 - O - グルコースの両方の C 3 ' のベータ 1, 3 グリコシル化が可能なポリペプチド ; ステビオールまたはステビオールグリコシドをその C - 19 カルボキシル基でグリコシル化することが可能なポリペプチド ; およびステビオールグリコシドの 13 - O - グルコース、19 - O - グルコース、または 13 - O - グルコースおよび 19 - O - グルコースの両方の C 2 ' のベータ 1, 2 グリコシル化が可能なポリペプチドを発現する組み換え宿主細胞において産生される、請求項 10 に記載の方法。