

【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11月12日(2020.11.12)

【公表番号】特表2019-528797(P2019-528797A)

【公表日】令和1年10月17日(2019.10.17)

【年通号数】公開・登録公報2019-042

【出願番号】特願2019-539732(P2019-539732)

【国際特許分類】

C 12 N 1/15 (2006.01)

C 12 N 15/31 (2006.01)

C 12 P 21/02 (2006.01)

C 12 N 9/42 (2006.01)

【F I】

C 12 N 1/15

C 12 N 15/31

C 12 N 15/31 Z N A

C 12 P 21/02 C

C 12 N 9/42

【手続補正書】

【提出日】令和2年10月2日(2020.10.2)

【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】

親糸状菌細胞由来の変異糸状菌細胞であって、配列番号6のA c e 3タンパク質に対して約90%の配列同一性を有するA c e 3タンパク質をコードする、導入されたポリヌクレオチドコンストラクトを含み、親細胞と類似の条件下で培養した場合、前記親細胞と比較して、誘導基質の非存在下で目的タンパク質(P O I)を産生する変異細胞。

【請求項2】

前記変異細胞は、前記親細胞と類似の条件下で培養した場合、前記親細胞と比較して、誘導基質の存在下でより多くの量の目的タンパク質(P O I)をさらに産生するか、または前記変異細胞は、異種P O Iをコードする導入されたポリヌクレオチドコンストラクトを含む、請求項1に記載の変異細胞。

【請求項3】

前記P O Iは、内因性P O Iまたは異種P O Iである、請求項1または2に記載の変異細胞。

【請求項4】

前記内因性P O Iは、リグノセルロース分解酵素である、請求項3に記載の変異細胞。

【請求項5】

前記リグノセルロース分解酵素は、(a)セルラーゼ酵素、ヘミセルラーゼ酵素、またはそれらの組み合わせからなる群、または(b)c b h 1、c b h 2、e g l 1、e g l 2、e g l 3、e g l 4、e g l 5、e g l 6、b g l 1、b g l 2、x y n 1、x y n 2、x y n 3、b x l 1、a b f 1、a b f 2、a b f 3、a x e 1、a x e 2、a x e 3、m a n 1、a g l 1、a g l 2、a g l 3、g l r 1、s w o 1、c i p 1およびc i p 2からなる群から選択される、請求項4に記載の変異細胞。

**【請求項 6】**

前記異種 P O I は、 - アミラーゼ、アルカリ - アミラーゼ、 - アミラーゼ、セルラーゼ、デキストラナーゼ、 - グルコシダーゼ、 - ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、ヘミセルラーゼ、ペントサナーゼ、キシラナーゼ、インペルターゼ、ラクターゼ、ナリンガナーゼ、ペクチナーゼ、ブルラナーゼ、酸プロテアーゼ、アルカリプロテアーゼ、プロメライン、中性プロテアーゼ、パパイン、ペプシン、ペプチダーゼ、レンネット、レニン、キモシン、スブチリシン、テルモリシン、アスパラギン酸プロテイナーゼ、トリプシン、リパーゼ、エステラーゼ、ホスホリパーゼ、ホスファターゼ、フィターゼ、アミダーゼ、イミノアシラーゼ、グルタミナーゼ、リゾチーム、ペニシリニアシラーゼ；イソメラーゼ、オキシドレダクターゼ、カタラーゼ、クロロペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、ヒドロキシステロイドヒドロゲナーゼ、ペルオキシダーゼ、リアーゼ、アスパラギン酸 - デカルボキシラーゼ、フマラーゼ、ヒスタダーゼ、トランスフェラーゼ、リガーゼ、アミノペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼ、キチナーゼ、クチナーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ、 - ガラクトシダーゼ、 - ガラクトシダーゼ、 - グルコシダーゼ、ラッカーゼ、マンノシダーゼ、ムタナーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ、リボヌクレアーゼおよびトランスグルタミナーゼからなる群から選択される、請求項 2 または 3 に記載の変異細胞。

**【請求項 7】**

前記ポリヌクレオチドコンストラクトは、前記真菌細胞のゲノムに組み込まれている、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の変異細胞。

**【請求項 8】**

前記ポリヌクレオチドコンストラクトは、前記真菌細胞のゲノムのテロメア部位またはグルコアミラーゼ (g l a 1) 遺伝子座に組み込まれている、請求項 7 に記載の変異細胞。

**【請求項 9】**

前記ポリヌクレオチドコンストラクトは、配列番号 4、配列番号 1 1 または配列番号 1 3 に対して約 9 0 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含むか、または前記コードされた A c e 3 タンパク質は、配列番号 6、配列番号 1 2 または配列番号 1 4 に対して 9 5 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の変異細胞。

**【請求項 10】**

配列番号 6、配列番号 1 2 または配列番号 1 4 に対して、約 9 0 % の配列同一性を有する A c e 3 タンパク質をコードするポリヌクレオチド O R F 。

**【請求項 11】**

誘導基質の非存在下、トリコデルマ属 (T r i c h o d e r m a) 種の真菌細胞中で、内因性の目的タンパク質を產生する方法であって、

(i) 5' から 3' の方向に、(a) プロモーターを含む第 1 の核酸配列、および (b) 前記第 1 の核酸配列に作動可能に連結した第 2 の核酸配列 (前記第 2 の核酸配列は、配列番号 6 に対して約 9 0 % の配列同一性を有する A c e 3 タンパク質をコードし、最後の 4 つの C 末端アミノ酸として「L y s - A l a - S e r - A s p」を含む)、または (c) 前記第 1 の核酸配列に作動可能に連結した第 2 の核酸配列 (前記第 2 の核酸配列は、配列番号 1 2 に対して約 9 0 % の配列同一性を有する A c e 3 タンパク質をコードする) を含むポリヌクレオチドコンストラクトを前記真菌細胞に導入する工程と、  
(i i) 真菌細胞の増殖およびタンパク質の產生に好適な条件下 (このような好適な増殖条件は誘導基質を含まない) で工程 (i) の前記細胞を発酵させる工程とを含む方法。

**【請求項 12】**

誘導基質の非存在下、トリコデルマ属 (T r i c h o d e r m a) 種の真菌細胞中で、異種の目的タンパク質を產生する方法であって、

(i) 5' から 3' の方向に、(a) 構成的プロモーターを含む第 1 の核酸配列、および

(b) 前記第1の核酸配列に作動可能に連結した第2の核酸配列(前記第2の核酸配列は、配列番号6に対して約90%の配列同一性を有するA c e 3タンパク質をコードし、最後の4つのC末端アミノ酸として「L y s - A l a - S e r - A s p」を含む)、または(c)前記第1の核酸配列に作動可能に連結した第2の核酸配列(前記第2の核酸配列は、配列番号12に対して約90%の配列同一性を有するA c e 3タンパク質をコードする)を含むポリヌクレオチドコンストラクトを前記真菌細胞に導入する工程と、(i i)真菌細胞の増殖およびタンパク質の産生に好適な条件下(このような好適な増殖条件は誘導基質を含まない)で工程(i)の前記細胞を発酵させる工程とを含む方法。

【請求項13】

(a) 前記真菌細胞は、異種P O Iをコードする、導入されたポリヌクレオチドコンストラクトを含み、前記コンストラクトは、工程(i)の前、工程(i)の間、または工程(i)の後に前記真菌細胞に導入され；  
 (b) 前記異種P O Iをコードする前記ポリヌクレオチドコンストラクトは、セルロース誘導性遺伝子プロモーターの制御下で発現され；および/または  
 (c) 前記異種P O Iは、-アミラーゼ、アルカリ-アミラーゼ、-アミラーゼ、セルラーゼ、デキストラナーゼ、-グルコシダーゼ、-ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、ヘミセルラーゼ、ペントサナーゼ、キシラナーゼ、インペルターゼ、ラクターゼ、ナリンガナーゼ、ペクチナーゼ、フルラナーゼ、酸プロテアーゼ、アルカリプロテアーゼ、プロメライン、中性プロテアーゼ、パパイン、ペプシン、ペプチダーゼ、レンネット、レニン、キモシン、スブチリシン、テルモリシン、アスパラギン酸プロテイナーゼ、トリプシン、リパーゼ、エステラーゼ、ホスホリパーゼ、ホスファターゼ、フィターゼ、アミダーゼ、イミノアシラーゼ、グルタミナーゼ、リゾチーム、ペニシリンアシラーゼ；イソメラーゼ、オキシドレダクターゼ、カタラーゼ、クロロペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、ヒドロキシステロイドヒドロゲナーゼ、ペルオキシダーゼ、リアーゼ、アスパラギン酸-デカルボキシラーゼ、フマラーゼ、ヒスタダーゼ、トランスフェラーゼ、リガーゼ、アミノペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼ、キチナーゼ、クチナーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ、-ガラクトシダーゼ、-ガラクトシダーゼ、-グルコシダーゼ、ラッカーゼ、マンノシダーゼ、ムタナーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ、リボヌクレアーゼおよびトランスグルタミナーゼからなる群から選択される、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

(a) 前記ポリヌクレオチドコンストラクトは、前記第2の核酸の3'に作動可能に連結した第3の核酸配列を含み、前記第3の核酸配列は天然のa c e 3ターミネーター配列を含み；  
 (b) 前記ポリヌクレオチドコンストラクトは、前記真菌細胞のゲノムに組み込まれ；  
 (c) 前記ポリヌクレオチドコンストラクトは、前記真菌細胞のゲノムのテロメア部位に組み込まれ；  
 (d) 前記ポリヌクレオチドコンストラクトは、前記真菌細胞のゲノムのグルコアミラーゼ(g 1 a 1)遺伝子座に組み込まれ；  
 (e) 前記ポリヌクレオチドコンストラクトは、配列番号4、配列番号11または配列番号13に対して約90%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含み；  
 (f) 前記コードされたA c e 3タンパク質は、配列番号6、配列番号12または配列番号14に対して95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み；  
 (g) 前記プロモーターは、r e v 3プロモーター(配列番号15)、b x 1プロモーター(配列番号16)、t k 1 1プロモーター(配列番号17)、P I D 1 0 4 2 9 5プロモーター(配列番号18)、d 1 d 1プロモーター(配列番号19)、x y n 4プロモーター(配列番号20)、P I D 7 2 5 2 6プロモーター(配列番号21)、a x e 1プロモーター(配列番号22)、h x k 1プロモーター(配列番号23)、d i c 1プロモーター(配列番号24)、o p tプロモーター(配列番号25)、g u t 1プロモーター(配

列番号 2 6 ) および p k i 1 プロモーター ( 配列番号 2 7 ) からなる群から選択される、請求項 1 1 または 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 5 】

誘導基質の非存在下、内因性タンパク質の産生を増加させるために、トリコデルマ・リーゼイ ( *Trichoderma reesei* ) 株を遺伝子的に改変する方法であって、

( i ) 配列番号 3 の A c e 3 - S タンパク質、配列番号 8 の A c e 3 - S C タンパク質、または配列番号 1 0 の A c e 3 - L C タンパク質をコードする a c e 3 遺伝子のゲノムコピーを含む T . リーゼイ ( *T . reesei* ) 株をスクリーニングし、同定する工程 ( 前記同定された T . リーゼイ ( *T . reesei* ) 株は、配列番号 6 の A c e 3 - L タンパク質、配列番号 1 4 の A c e 3 - L N タンパク質、または配列番号 1 2 の A c e 3 - E L タンパク質をコードする a c e 3 遺伝子のゲノムコピーを含まない ) と、

( i i ) 工程 ( i ) で同定された前記 T . リーゼイ ( *T . reesei* ) 株に、 5 ' から 3 ' の方向に、 ( a ) プロモーターを含む第 1 の核酸配列、および ( b ) 前記第 1 の核酸配列に作動可能に連結した第 2 の核酸配列を含むポリヌクレオチドコンストラクトを導入する工程 ( 前記第 2 の核酸配列は、配列番号 6 に対して約 9 0 % の配列同一性を有する A c e 3 タンパク質をコードし、最後の 4 つの C 末端アミノ酸として「 L y s - A l a - S e r - A s p 」を含む、または前記第 2 の核酸配列は、配列番号 1 2 に対して約 9 0 % の配列同一性を有する A c e - 3 タンパク質をコードする ) と、

( i i i ) 真菌細胞の増殖およびタンパク質産生に好適な条件下 ( このような好適な増殖条件は誘導基質を含まない ) で前記工程 ( i i ) の細胞を発酵させる工程とを含む方法。

【請求項 1 6 】

親糸状菌細胞に由来する変異糸状菌細胞であって、代替プロモーターで置換された天然の a c e 3 遺伝子プロモーターを含み、親細胞と類似の条件下で培養した場合、前記親細胞と比較して、誘導基質の非存在下でより多くの量の目的タンパク質 ( P O I ) を産生する変異細胞。

【請求項 1 7 】

前記代替プロモーターは、トリコデルマ・リーゼイ ( *Trichoderma reesei* ) プロモーターである、請求項 1 6 に記載の変異細胞。

【請求項 1 8 】

前記代替プロモーターは、 r e v 3 プロモーター ( 配列番号 1 5 ) 、 b x 1 プロモーター ( 配列番号 1 6 ) 、 t k 1 1 プロモーター ( 配列番号 1 7 、 P I D 1 0 4 2 9 5 プロモーター ( 配列番号 1 8 ) 、 d l d 1 プロモーター ( 配列番号 1 9 ) 、 x y n 4 プロモーター ( 配列番号 2 0 ) 、 P I D 7 2 5 2 6 プロモーター ( 配列番号 2 1 ) 、 a x e 1 プロモーター ( 配列番号 2 2 ) 、 h x k 1 プロモーター ( 配列番号 2 3 ) 、 d i c 1 プロモーター ( 配列番号 2 4 ) 、 o p t プロモーター ( 配列番号 2 5 ) 、 g u t 1 プロモーター ( 配列番号 2 6 ) および p k i 1 プロモーター ( 配列番号 2 7 ) からなる群から選択されるプロモーターである、請求項 1 7 に記載の変異細胞。