

【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29年12月28日 (2017.12.28)

【公表番号】特表2017-500879(P2017-500879A)

【公表日】平成29年1月12日 (2017.1.12)

【年通号数】公開・登録公報2017-002

【出願番号】特願2016-544103(P2016-544103)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 9/50 (2006.01)

C 1 2 P 21/02 (2006.01)

C 1 2 N 9/99 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 1/21 Z N A

C 1 2 N 9/50

C 1 2 P 21/02 C

C 1 2 N 9/99

【手続補正書】

【提出日】平成29年11月17日 (2017.11.17)

【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】

グラム陽性菌細胞からの目的のタンパク質の発現を増加させる方法であって、

a) 目的のタンパク質を産生可能な改変グラム陽性菌細胞を得る工程であって、前記改変グラム陽性菌細胞は、y k f オペロンの y k f A 遺伝子における少なくとも 1 つの遺伝子改変を含む、工程と、

b) 前記改変グラム陽性菌細胞によって前記目的のタンパク質が発現するような条件下で前記改変グラム陽性菌細胞を培養する工程であって、前記改変グラム陽性菌細胞における前記目的のタンパク質の発現は、本質的に同一の培養条件下で増殖させた対応する非改変グラム陽性菌細胞における前記目的のタンパク質の発現と比較して増加する、工程と、を含む、方法。

【請求項 2】

前記改変グラム陽性菌細胞は、バチルス種 (Bacillus sp.) 株である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記改変グラム陽性菌細胞は、本質的に同一の培養条件下で増殖させた対応する非改変グラム陽性菌細胞における Y k f A タンパク質の活性と比較して、活性が変化した Y k f A タンパク質を有し、ここで、前記活性の変化は、活性の増加又は減少であり得る、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記 y k f A 遺伝子は、配列番号 1 と少なくとも 60 % 同一である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記遺伝子改変は、配列番号 2 のアミノ酸 2 5 2 又は 2 5 3 に対応する位置のアミノ酸における改変をもたらす、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記遺伝子改変は、配列番号 2 のアミノ酸 2 5 2 及び 2 5 3 に対応する位置のアミノ酸における改変をもたらす、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

前記遺伝子改変は、配列番号 2 のアミノ酸 2 5 2 に対応する位置のアミノ酸における P から L への改変をもたらす、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 8】

前記遺伝子改変は、配列番号 2 のアミノ酸 2 5 3 に対応する位置のアミノ酸における V から L への改変をもたらす、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 9】

前記遺伝子改変は、配列番号 2 の、アミノ酸 2 5 2 に対応する位置のアミノ酸における P から L への改変及びアミノ酸 2 5 3 に対応する位置のアミノ酸における V から L への改変をもたらす、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 10】

前記目的のタンパク質は、酵素である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記目的のタンパク質は、プロテアーゼである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

前記目的のタンパク質を回収する工程を更に含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

改変グラム陽性菌細胞であって、前記改変グラム陽性菌細胞は、本質的に同一の培養条件下で増殖させた対応する非改変グラム陽性菌細胞と比較して、y k f オペロンの y k f A 遺伝子における少なくとも 1 つの遺伝子改変を含む、改変グラム陽性菌細胞。

【請求項 14】

前記改変グラム陽性菌細胞は、パチルス種株である、請求項 13 に記載の改変細胞。

【請求項 15】

前記改変グラム陽性菌細胞は、本質的に同一の培養条件下で増殖させた対応する非改変グラム陽性菌細胞における Y k f A タンパク質の活性と比較して、活性が変化した Y k f A タンパク質を有し、ここで、前記活性の変化は、活性の増加又は減少であり得る、請求項 13 に記載の改変細胞。

【請求項 16】

前記 y k f A 遺伝子は、配列番号 1 と少なくとも 60 % 同一である、請求項 13 に記載の改変細胞。

【請求項 17】

前記遺伝子改変は、配列番号 2 のアミノ酸 2 5 2 又は 2 5 3 に対応する位置のアミノ酸における改変をもたらす、請求項 13 に記載の改変細胞。

【請求項 18】

前記遺伝子改変は、配列番号 2 のアミノ酸 2 5 2 及び 2 5 3 に対応する位置のアミノ酸における改変をもたらす、請求項 13 に記載の改変細胞。

【請求項 19】

前記遺伝子改変は、配列番号 2 のアミノ酸 2 5 2 に対応する位置のアミノ酸における P から L への改変をもたらす、請求項 13 に記載の改変細胞。

【請求項 20】

前記遺伝子改変は、配列番号 2 のアミノ酸 2 5 3 に対応する位置のアミノ酸における V から L への改変をもたらす、請求項 13 に記載の改変細胞。

【請求項 21】

前記遺伝子改変は、配列番号 2 の、アミノ酸 2 5 2 に対応する位置のアミノ酸における

P から L への改変及びアミノ酸 2 5 3 に対応する位置のアミノ酸における V から L への改変をもたらす、請求項 1 3 に記載の改変細胞。

【請求項 2 2】

前記改変細胞は、目的のタンパク質を発現する、請求項 1 3 に記載の改変細胞。

【請求項 2 3】

前記目的のタンパク質は、酵素である、請求項 2 2 に記載の改変細胞。

【請求項 2 4】

前記目的のタンパク質は、プロテアーゼである、請求項 2 2 に記載の改変細胞。

【請求項 2 5】

y k f A 遺伝子由来の変異体配列を含むポリヌクレオチドであって、
前記変異体配列は、
少なくとも 1 5 ヌクレオチドの長さであり、
配列番号 1 の全て又は一部と少なくとも 6 0 % 同一であり、
少なくとも 1 つの遺伝子改変を含み、ここで、該遺伝子変化は、配列番号 2 のアミノ酸 2 5 2 及び / 又は 2 5 3 に対応する位置のアミノ酸における改変をもたらす、
ポリヌクレオチド。

【請求項 2 6】

前記遺伝子改変は、配列番号 2 のアミノ酸 2 5 2 又は 2 5 3 に対応する位置のアミノ酸における改変をもたらす、請求項 2 5 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 2 7】

前記遺伝子改変は、配列番号 2 のアミノ酸 2 5 2 及び 2 5 3 に対応する位置のアミノ酸における改変をもたらす、請求項 2 5 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 2 8】

前記遺伝子改変は、配列番号 2 のアミノ酸 2 5 2 に対応する位置のアミノ酸における P から L への改変をもたらす、請求項 2 5 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 2 9】

前記遺伝子改変は、配列番号 2 のアミノ酸 2 5 3 に対応する位置のアミノ酸における V から L への改変をもたらす、請求項 2 5 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 3 0】

前記遺伝子改変は、配列番号 2 の、アミノ酸 2 5 2 に対応する位置のアミノ酸における P から L への改変及びアミノ酸 2 5 3 に対応する位置のアミノ酸における V から L への改変をもたらす、請求項 2 5 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 3 1】

請求項 2 5 に記載のポリヌクレオチド配列を含むベクター。

【請求項 3 2】

前記ベクターは、グラム陽性菌細胞への形質転換の際、相同組換えによって、前記ポリヌクレオチド配列における前記少なくとも 1 つの変異を前記グラム陽性菌細胞の y k f オペロンにおける対応する位置に導入するように設計された標的化ベクターである、請求項 3 1 に記載のベクター。

【請求項 3 3】

グラム陽性菌細胞における目的のタンパク質の発現を増大させる方法であって、
a) 請求項 3 1 に記載のベクターで親グラム陽性菌細胞を形質転換させる工程と、
b) 改変グラム陽性菌細胞を作製するために、前記ベクターと、前記親グラム陽性菌細胞の y k f オペロンにおける対応する領域とを相同組換えさせる工程と、
c) 前記目的のタンパク質の発現に好適な条件下で前記改変グラム陽性菌細胞を増殖させる工程であって、該改変グラム陽性菌細胞における前記目的のタンパク質の産生は、前記形質転換工程前の前記グラム陽性菌細胞と比較して増加する工程と、
を含む方法。