

【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28年5月26日(2016.5.26)

【公表番号】特表2015-512644(P2015-512644A)

【公表日】平成27年4月30日(2015.4.30)

【年通号数】公開・登録公報2015-029

【出願番号】特願2015-504687(P2015-504687)

【国際特許分類】

C 1 2 N	1/21	(2006.01)
C 1 2 N	1/19	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 1 2 N	1/15	(2006.01)
C 1 2 N	9/00	(2006.01)
C 1 2 P	5/00	(2006.01)
C 1 2 P	7/04	(2006.01)
C 1 2 N	9/90	(2006.01)
C 1 2 N	9/10	(2006.01)
C 1 2 N	9/02	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	1/19	Z N A
C 1 2 N	5/00	1 0 1
C 1 2 N	15/00	A
C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	9/00	
C 1 2 P	5/00	
C 1 2 P	7/04	
C 1 2 N	9/90	
C 1 2 N	9/10	
C 1 2 N	9/02	

【手続補正書】

【提出日】平成28年3月28日(2016.3.28)

【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】

ホスホエノールビルビン酸カルボキシラーゼ(ppc)ポリペプチドをコードする遺伝子操作されたポリヌクレオチド配列を含む組換え宿主細胞であって、炭素源を含有する培地中で、該ppcポリペプチドを発現するのに有効な条件下で培養された場合に、対応する野生型宿主細胞よりも高い力価、収量または産生能で脂肪酸誘導体組成物を産生する、組換え宿主細胞。

【請求項2】

請求項1記載の組換え宿主細胞を含む、細胞培養物。

【請求項3】

前記培地が脂肪酸誘導体組成物を含む、請求項2記載の細胞培養物。

【請求項4】

前記脂肪酸誘導体組成物が、脂肪酸、脂肪エステル、脂肪アルコール、脂肪アルデヒド、アルカン、末端オレフィン、内部オレフィン、およびケトンからなる群より選択される少なくとも1つの脂肪酸誘導体を含む、請求項3記載の細胞培養物。

【請求項5】

前記脂肪酸誘導体が、

a) C6、C8、C10、C12、C13、C14、C15、C16、C17、もしくはC18脂肪酸誘導体であるか、または

b) C10:1、C12:1、C14:1、C16:1、もしくはC18:1不飽和脂肪酸誘導体である、請求項2記載の細胞培養物。

【請求項6】

前記脂肪酸誘導体組成物が、

a) C8、C10、C12、C14、C16および、C18脂肪酸誘導体のうち1つもしくは複数、

b) 脂肪酸、

c) 脂肪アルデヒド、

d) 脂肪アルコール、

e) 脂肪エステル、

f) アルカン、

g) 末端オレフィン、

h) 内部オレフィン、または

i) ケトン

を含む、請求項3記載の細胞培養物。

【請求項7】

前記脂肪酸誘導体組成物が、前記脂肪アルコールの還元末端からC7～C8の間の炭素鎖における7番目の位置に二重結合を有する脂肪酸誘導体を含む、請求項3記載の細胞培養物。

【請求項8】

前記脂肪酸誘導体組成物が不飽和脂肪酸誘導体を含む、請求項3記載の細胞培養物。

【請求項9】

前記脂肪酸誘導体組成物が飽和脂肪酸誘導体を含む、請求項3記載の細胞培養物。

【請求項10】

前記脂肪酸誘導体組成物が分枝鎖脂肪酸誘導体を含む、請求項3記載の細胞培養物。

【請求項11】

前記組換え宿主細胞が、該組換え宿主細胞と同じ条件下で培養された場合の対応する野生型宿主細胞の力価よりも少なくとも約5%高い力価を有する、請求項2記載の細胞培養物。

【請求項12】

前記組換え宿主細胞が約1g/L～約250g/Lの力価を有する、請求項11記載の細胞培養物。

【請求項13】

前記組換え宿主細胞が約90g/L～約120g/Lの力価を有する、請求項12記載の細胞培養物。

【請求項14】

前記組換え宿主細胞が少なくとも約10%～約40%の収量を有し、好ましくは約25%の収量を有する、請求項2記載の細胞培養物。

【請求項15】

前記産生能が約0.7mg/L/hr～約3g/L/hrの範囲にわたる、請求項2記載の細胞培養物。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0016

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0016】

本開示のもう1つの局面は、組換え宿主細胞を作製する方法であって、組換え宿主細胞を、細胞が、1つまたは複数のポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド配列を特定の培養条件下で発現するように遺伝子工学的に作製する段階を含み、ポリヌクレオチド配列が特異的酵素活性を有する1つまたは複数のポリペプチドをコードする、方法を提供する。

[本発明1001]

3-ヒドロキシデカノイル-[acp]デヒドラターゼ (E.C. 4.2.1.60) 活性； -ケトアシル-ACPシンターゼI (E.C. 2.3.1.41) 活性； -ケトアシル-ACPシンターゼII (E.C. 2.3.1.179) 活性； [acp]S-マロニルトランスフェラーゼ{マロニル-CoA-ACPトランスアシラーゼ} (E.C. 2.3.1.39) 活性； 3-オキソアシル-{ -ケトアシル}-ACPレダクターゼ (E.C. 1.1.1.100) 活性； -ケトアシル-ACPシンターゼIII (E.C. 2.3.1.180) 活性； エノイル-ACPレダクターゼ (NADH) (E.C. 1.3.1.9) 活性； エノイル-ACPレダクターゼ (NADPH) (E.C. 1.3.1.10) 活性； 3-ヒドロキシ-アシル-[acp]デヒドラターゼ (E.C. 4.2.1.59) 活性； およびtrans-2,cis-3-デセノイル-ACPイソメラーゼ (E.C. 5.3.3.14) 活性からなる群より選択される活性を有する1つまたは複数のポリペプチドをコードする遺伝子操作されたポリヌクレオチド配列を含む組換え宿主細胞であって、炭素源を含有する培地内で、該ポリヌクレオチドを発現するのに有効な条件下で培養された場合に、対応する野生型宿主細胞よりも高い力価、収量または産生能で脂肪酸誘導体組成物を産生する、組換え宿主細胞。

[本発明1002]

前記ポリペプチドが前記活性を有する少なくとも1つの他のポリペプチドと組み合わせて発現された場合に、脂肪酸誘導体組成物をより高い力価、収量または産生能で産生する、本発明1001の組換え宿主細胞。

[本発明1003]

前記ポリペプチドが前記活性を有する少なくとも5種の他のポリペプチドと組み合わせて発現された場合に、脂肪酸誘導体組成物をより高い力価、収量または産生能で産生する、本発明1001の組換え宿主細胞。

[本発明1004]

trans-2,cis-3-デセノイル-ACPイソメラーゼ活性がfabAまたはfabMである、本発明1001の組換え宿主細胞。

[本発明1005]

-ケトアシル-ACPシンターゼIIがfabFである、本発明1001の組換え宿主細胞。

[本発明1006]

マロニル-CoA-ACPトランスアシラーゼがfabDである、本発明1001の組換え宿主細胞。

[本発明1007]

-ケトアシル-ACPシンターゼIがfabFまたはfabBである、本発明1001の組換え宿主細胞。

[本発明1008]

-ケトアシル-ACPレダクターゼがfabGである、本発明1001の組換え宿主細胞。

[本発明1009]

-ケトアシル-ACPシンターゼIIIがfabHである、本発明1001の組換え宿主細胞。

[本発明1010]

エノイル-ACPレダクターゼがfabIまたはfabLまたはfabVまたはfabKである、本発明1001の組換え宿主細胞。

[本発明1011]

3-ヒドロキシ-アシル-[acp]デヒドラターゼがfabAまたはfabZである、本発明1001の組換え宿主細胞。

[本発明1012]

trans-2-エノイル-ACPレダクターゼIIがfabKである、本発明1001の組換え宿主細胞。

[本発明1013]

前記ポリペプチドが、fabA、fabB、fabD、fabF、fabG、fabH、fabI、fabL、fabV、fabZ、fabM、およびfabKからなる群より選択される、本発明1001の組換え宿主細胞。

[本発明1014]

前記ポリペプチドが、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) 由来のFabA (NP_460041) ; 大腸菌 (*Escherichia coli*) 由来のFabB (NP_416826) ; ネズミチフス菌由来のFabD (NP_460164) ; ネズミチフス菌由来のFabG (NP_460165) ; ネズミチフス菌由来のFabH (NP_460163) ; ネズミチフス菌由来のFabZ (NP_459232) ; ストレプトコッカス・ミュータンス (*Streptococcus mutans*) 由来のFabM (AAN59379) ; 肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 由来のFabK (AAF98273) ; コレラ菌 (*Vibrio cholera*) 由来のFabV (YP_001217283) ; クロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutylicum*) 由来のFabF (NP_350156) ; 枯草菌亜種サブチリス168株 (*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* s tr. 168) 由来のFabI (NP_389054) ; 枯草菌亜種サブチリス168株由来のFabL (NP_388745) ; アシネットバクター属種ADP1 (*Acinetobacter* sp. ADP1) 由来のFabI (YP_047630) ; マリノバクター・アクアエオレイVT8 (*Marinobacter aquaeoli* VT8) 由来のFabI (YP_95813) ; ロドコッカス・オパクスB4 (*Rhodococcus opacus* B4) 由来のFabI (YP_002784194) ; アシネットバクター属種ADP1由来のFabH (YP_046731) ; マリノバクター・アクアエオレイVT8由来のFabH (YP_958649) ; およびロドコッカス・オパクスB4由来のFabH (YP_00278448) からなる群より選択される、本発明1001の組換え宿主細胞。

[本発明1015]

前記遺伝子操作されたポリヌクレオチド配列によってコードされる前記ポリペプチドが外来性である、本発明1001の組換え宿主細胞。

[本発明1016]

アシルキャリアータンパク質 (ACP) をコードする遺伝子操作されたポリヌクレオチド配列をさらに含む、本発明1001の組換え宿主細胞。

[本発明1017]

ACPが前記力価、収量または産生能をさらに増大させる、本発明1016の組換え宿主細胞。

[本発明1018]

ACPポリペプチドをコードする遺伝子操作されたポリヌクレオチド配列を含む組換え宿主細胞であって、炭素源を含有する培地内で、該ACPポリペプチドを発現するのに有効な条件下で培養された場合に、対応する野生型宿主細胞よりも高い力価、収量または産生能で脂肪酸誘導体組成物を產生する、組換え宿主細胞。

[本発明1019]

ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ (E.C. 2.7.8.7) 活性を有するポリペプチドをコードする組換えポリヌクレオチドをさらに含む、本発明1018の組換え宿主細胞。

[本発明1020]

前記ポリヌクレオチドがsfp遺伝子をコードする、本発明1019の組換え宿主細胞。

[本発明1021]

accABCD活性 (E.C. 6.4.1.2) を有するポリペプチドをコードする組換えポリヌクレオチドをさらに含む、本発明1001または1018の組換え宿主細胞。

[本発明1022]

ACPが、前記組換え宿主細胞において発現される末端経路酵素 (terminal pathway enzyme) と同じ生物に由来する、本発明1001または1018の組換え宿主細胞。

[本発明1023]

ACPが外来性である、本発明1018の組換え宿主細胞。

[本発明1024]

トランスポゾンを含む遺伝子操作されたポリヌクレオチド配列を含む組換え宿主細胞であって、yijP遺伝子への該トランスポゾンの挿入が、該yijP遺伝子に隣接する第2の遺伝

子に影響を及ぼし、該第2の遺伝子が、アップレギュレートまたはダウンレギュレートされるポリヌクレオチドをコードし、かつ、該アップレギュレートまたはダウンレギュレートされるポリヌクレオチドが、炭素源を含有する培地中で、該ポリペプチドを発現させるのに有効な条件下で該宿主細胞を培養した場合に、脂肪酸誘導体組成物の產生に影響を及ぼすポリペプチドをコードする、組換え宿主細胞。

[本発明1025]

yijP遺伝子への前記トランスポゾンの挿入が前記yijP遺伝子またはそのポリヌクレオチドの不活性化をもたらし、これにより該yijP遺伝子に隣接する第2の遺伝子が影響を受け、該第2の遺伝子が、炭素源を含有する培地中で、該ポリペプチドを発現させるのに有効な条件下で前記宿主細胞を培養した場合に、脂肪酸誘導体組成物の產生に影響を及ぼすポリペプチドをコードする、本発明1024の組換え宿主細胞。

[本発明1026]

第2の遺伝子またはそのポリヌクレオチドが、ppc、yijO、frwD、pfIC、pfIDまたはargEからなる群より選択される、本発明1024の組換え宿主細胞。

[本発明1027]

ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ(ppc)ポリペプチドをコードする遺伝子操作されたポリヌクレオチド配列を含む組換え宿主細胞であって、炭素源を含有する培地中で、該ppcポリペプチドを発現するのに有効な条件下で培養された場合に、対応する野生型宿主細胞よりも高い力価、収量または產生能で脂肪酸誘導体組成物を產生する、組換え宿主細胞。

[本発明1028]

本発明1001～1027のいずれかの組換え宿主細胞を含む、細胞培養物。

[本発明1029]

前記培地が脂肪酸誘導体組成物を含む、本発明1028の細胞培養物。

[本発明1030]

前記脂肪酸誘導体組成物が、脂肪酸、脂肪エステル、脂肪アルコール、脂肪アルデヒド、アルカン、末端オレフィン、内部オレフィン、およびケトンからなる群より選択される少なくとも1つの脂肪酸誘導体を含む、本発明1029の細胞培養物。

[本発明1031]

前記脂肪酸誘導体が、C6、C8、C10、C12、C13、C14、C15、C16、C17、またはC18脂肪酸誘導体である、本発明1028の細胞培養物。

[本発明1032]

前記脂肪酸誘導体が、C10:1、C12:1、C14:1、C16:1、またはC18:1不飽和脂肪酸誘導体である、本発明1028の細胞培養物。

[本発明1033]

前記脂肪酸誘導体組成物が、C8、C10、C12、C14、C16および、C18脂肪酸誘導体のうち1つまたは複数を含む、本発明1029の細胞培養物。

[本発明1034]

前記脂肪酸誘導体組成物が脂肪酸を含む、本発明1029の細胞培養物。

[本発明1035]

前記脂肪酸誘導体組成物が脂肪アルデヒドを含む、本発明1029の細胞培養物。

[本発明1036]

前記脂肪酸誘導体組成物が脂肪アルコールを含む、本発明1029の細胞培養物。

[本発明1037]

前記脂肪酸誘導体組成物が脂肪エステルを含む、本発明1029の細胞培養物。

[本発明1038]

前記脂肪酸誘導体組成物がアルカンを含む、本発明1029の細胞培養物。

[本発明1039]

前記脂肪酸誘導体組成物が末端オレフィンを含む、本発明1029の細胞培養物。

[本発明1040]

前記脂肪酸誘導体組成物が内部オレフィンを含む、本発明1029の細胞培養物。

[本発明1041]

前記脂肪酸誘導体組成物がケトンを含む、本発明1029の細胞培養物。

[本発明1042]

前記脂肪酸誘導体組成物が、前記脂肪アルコールの還元末端からC7～C8の間の炭素鎖における7番目の位置に二重結合を有する脂肪酸誘導体を含む、本発明1029の細胞培養物。

[本発明1043]

前記脂肪酸誘導体組成物が不飽和脂肪酸誘導体を含む、本発明1029の細胞培養物。

[本発明1044]

前記脂肪酸誘導体組成物が飽和脂肪酸誘導体を含む、本発明1029の細胞培養物。

[本発明1045]

前記脂肪酸誘導体組成物が分枝鎖脂肪酸誘導体を含む、本発明1029の細胞培養物。

[本発明1046]

前記組換え宿主細胞が、該組換え宿主細胞と同じ条件下で培養された場合の対応する野生型宿主細胞の力価よりも少なくとも約5%高い力価を有する、本発明1028の細胞培養物。

[本発明1047]

前記組換え宿主細胞が約1g/L～約250g/Lの力価を有する、本発明1046の細胞培養物。

[本発明1048]

前記組換え宿主細胞が約90g/L～約120g/Lの力価を有する、本発明1047の細胞培養物。

[本発明1049]

前記組換え宿主細胞が少なくとも約10%～約40%の収量を有する、本発明1028の細胞培養物。

[本発明1050]

約25%の収量を有する、本発明1049の組換え宿主細胞。

[本発明1051]

産生能が約0.7mg/L/hr～約3g/L/hrの範囲にわたる、本発明1028の細胞培養物。