

【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 5 年 6 月 27 日(2023.6.27)

【国際公開番号】WO2020/257707

【公表番号】特表 2022-537214(P2022-537214A)

【公表日】令和 4 年 8 月 24 日(2022.8.24)

【年通号数】公開公報(特許)2022-155

【出願番号】特願 2021-576258(P2021-576258)

【国際特許分類】

10

C 1 2 N 15/53(2006.01)

C 1 2 N 1/15(2006.01)

C 1 2 N 1/19(2006.01)

C 1 2 N 1/21(2006.01)

C 1 2 N 5/10(2006.01)

C 1 2 N 9/06(2006.01)

C 1 2 N 15/60(2006.01)

C 1 2 N 9/88(2006.01)

C 1 2 N 9/04(2006.01)

C 1 2 P 7/04(2006.01)

20

C 1 2 N 15/63(2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/53 Z N A

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 9/06 B

C 1 2 N 15/60

C 1 2 N 9/88

30

C 1 2 N 9/04 E

C 1 2 P 7/04

C 1 2 N 15/63 Z

【手続補正書】

【提出日】令和 5 年 6 月 19 日(2023.6.19)

【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

40

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ロイシンデヒドロゲナーゼ(L e u D H)酵素をコードする異種ポリヌクレオチドを含む宿主細胞であって、ここで該 L e u D H 酵素が、配列番号 2、4、6、8、10、および 12 から選択された配列に対して少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列を含む、宿主細胞。

【請求項 2】

L e u D H 酵素が以下：

a) 配列番号 27 の残基 13 に対応する残基における V；

50

- b) 配列番号 27 の残基 16 に対応する残基における W ;
- c) 配列番号 27 の残基 42 に対応する残基における Q ;
- d) 配列番号 27 の残基 43 に対応する残基における T、Y、F、E、または W ;
- e) 配列番号 27 の残基 44 に対応する残基における I、H、K、または Y ;
- f) 配列番号 27 の残基 67 に対応する残基における T、E、A、S、または K ;
- g) 配列番号 27 の残基 71 に対応する残基における K ;
- h) 配列番号 27 の残基 73 に対応する残基における S ;
- i) 配列番号 27 の残基 76 に対応する残基における R、H、Y、S、K、または W ;
- j) 配列番号 27 の残基 92 に対応する残基における Y ;
- k) 配列番号 27 の残基 93 に対応する残基における H ;
- l) 配列番号 27 の残基 95 に対応する残基における G ;
- m) 配列番号 27 の残基 100 に対応する残基における G ;
- n) 配列番号 27 の残基 105 に対応する残基における C ;
- o) 配列番号 27 の残基 111 に対応する残基における G ;
- p) 配列番号 27 の残基 113 に対応する残基における M ;
- q) 配列番号 27 の残基 115 に対応する残基における N または V ;
- r) 配列番号 27 の残基 116 に対応する残基における R、N、または W ;
- s) 配列番号 27 の残基 120 に対応する残基における A ;
- t) 配列番号 27 の残基 122 に対応する残基における D ;
- u) 配列番号 27 の残基 136 に対応する残基における E ;
- v) 配列番号 27 の残基 140 に対応する残基における D ;
- w) 配列番号 27 の残基 141 に対応する残基における M ;
- x) 配列番号 27 の残基 160 に対応する残基における S ;
- y) 配列番号 27 の残基 185 に対応する残基における F ;
- z) 配列番号 27 の残基 196 に対応する残基における N ;
- a a) 配列番号 27 の残基 228 に対応する残基における Y ;
- b b) 配列番号 27 の残基 248 に対応する残基における M ;
- c c) 配列番号 27 の残基 256 に対応する残基における C ;
- d d) 配列番号 27 の残基 293 に対応する残基における Q または C ;
- e e) 配列番号 27 の残基 296 に対応する残基における K または N ;
- f f) 配列番号 27 の残基 297 に対応する残基における R、Q、または K ;
- g g) 配列番号 27 の残基 300 に対応する残基における C または D ;
- h h) 配列番号 27 の残基 302 に対応する残基における T または S ;
- i i) 配列番号 27 の残基 305 に対応する残基における C ;
- j j) 配列番号 27 の残基 319 に対応する残基における F ; および / または
- k k) 配列番号 27 の残基 330 に対応する残基における M、

10

20

30

を含む、任意にはここで該 L e u D H 酵素は (a) ~ (k k) の全てを含む、請求項 1 に記載の宿主細胞。

【請求項 3】

宿主細胞が、植物細胞、藻類細胞、酵母細胞、細菌細胞、または動物細胞である、請求項 1 または 2 に記載の宿主細胞。

40

【請求項 4】

宿主細胞が細菌細胞である、任意にはここで該細菌細胞が、E . c o l i 細胞、または B a c i l l u s 細胞である、請求項 3 に記載の宿主細胞。

【請求項 5】

宿主細胞が、分岐鎖アミノ酸輸送系 2 キャリアタンパク質 (B r n Q) をコードする異種ポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の宿主細胞。

【請求項 6】

B r n Q タンパク質が、配列番号 35 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90 % 同一である、請求項 5 に記載の宿主細胞。

50

【請求項 7】

宿主細胞が、K i v D 酵素をコードする異種ポリヌクレオチドおよび / または A d h 酵素をコードする異種ポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の宿主細胞。

【請求項 8】

宿主細胞が、ロイシンからイソペンタノールを産生できる、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の宿主細胞。

【請求項 9】

宿主細胞が、配列番号 27 の配列を含むコントロール L e u D H 酵素をコードする異種ポリヌクレオチド、配列番号 29 の配列を含むコントロール K i v D 酵素をコードする異種ポリヌクレオチド、配列番号 31 の配列を含むコントロール A d h 酵素をコードする異種ポリヌクレオチド、および配列番号 35 の配列を含むコントロール B r n Q タンパク質をコードする異種ポリヌクレオチド、を含むコントロール宿主細胞と比較して、少なくとも 2 倍以上のロイシンを消費する、請求項 8 に記載の宿主細胞。

10

【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の宿主細胞を培養する工程を含む方法。

【請求項 11】

ロイシンからイソペンタノールを生産するための方法であって、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の宿主細胞を培養する工程を含む、方法。

【請求項 12】

L e u D H 酵素が、配列番号 2 に対して少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の宿主細胞。

20

【請求項 13】

L e u D H 酵素が配列番号 2 を含む、請求項 12 に記載の宿主細胞。

【請求項 14】

配列番号 1、3、5、7、9 および 11 から選択された核酸配列に対して少なくとも 90 % 同一である配列を含む非天然核酸。

【請求項 15】

請求項 14 に記載の非天然核酸を含むベクター。

30

40

50