

【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】

C 12N 15/53(2006.01)

C 12N 1/15(2006.01)

C 12N 1/19(2006.01)

C 12N 1/21(2006.01)

C 12N 5/10(2006.01)

C 12N 9/06(2006.01)

C 12N 15/60(2006.01)

C 12N 9/88(2006.01)

C 12N 9/04(2006.01)

C 12P 7/04(2006.01)

C 12N 15/63(2006.01)

10

20

30

40

40

【F I】

C 12N 15/53 Z N A

C 12N 1/15

C 12N 1/19

C 12N 1/21

C 12N 5/10

C 12N 9/06 B

C 12N 15/60

C 12N 9/88

C 12N 9/04 E

C 12P 7/04

C 12N 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

【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 2 7 の残基 1 6 に対応する残基における W ;
 - c) 配列番号 2 7 の残基 4 2 に対応する残基における Q ;
 - d) 配列番号 2 7 の残基 4 3 に対応する残基における T、Y、F、E、または W ;
 - e) 配列番号 2 7 の残基 4 4 に対応する残基における I、H、K、または Y ;
 - f) 配列番号 2 7 の残基 6 7 に対応する残基における T、E、A、S、または K ;
 - g) 配列番号 2 7 の残基 7 1 に対応する残基における K ;
 - h) 配列番号 2 7 の残基 7 3 に対応する残基における S ;
 - i) 配列番号 2 7 の残基 7 6 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 2 7 の残基 9 2 に対応する残基における Y ;
 - k) 配列番号 2 7 の残基 9 3 に対応する残基における H ;
 - l) 配列番号 2 7 の残基 9 5 に対応する残基における G ;
 - m) 配列番号 2 7 の残基 1 0 0 に対応する残基における G ;
 - n) 配列番号 2 7 の残基 1 0 5 に対応する残基における C ;
 - o) 配列番号 2 7 の残基 1 1 1 に対応する残基における G ;
 - p) 配列番号 2 7 の残基 1 1 3 に対応する残基における M ;
 - q) 配列番号 2 7 の残基 1 1 5 に対応する残基における N または V ;
 - r) 配列番号 2 7 の残基 1 1 6 に対応する残基における R、N、または W ;
 - s) 配列番号 2 7 の残基 1 2 0 に対応する残基における A ;
 - t) 配列番号 2 7 の残基 1 2 2 に対応する残基における D ;
 - u) 配列番号 2 7 の残基 1 3 6 に対応する残基における E ;
 - v) 配列番号 2 7 の残基 1 4 0 に対応する残基における D ;
 - w) 配列番号 2 7 の残基 1 4 1 に対応する残基における M ;
 - x) 配列番号 2 7 の残基 1 6 0 に対応する残基における S ;
 - y) 配列番号 2 7 の残基 1 8 5 に対応する残基における F ;
 - z) 配列番号 2 7 の残基 1 9 6 に対応する残基における N ;
 - a a) 配列番号 2 7 の残基 2 2 8 に対応する残基における Y ;
 - b b) 配列番号 2 7 の残基 2 4 8 に対応する残基における M ;
 - c c) 配列番号 2 7 の残基 2 5 6 に対応する残基における C ;
 - d d) 配列番号 2 7 の残基 2 9 3 に対応する残基における Q または C ;
 - e e) 配列番号 2 7 の残基 2 9 6 に対応する残基における K または N ;
 - f f) 配列番号 2 7 の残基 2 9 7 に対応する残基における R、Q、または K ;
 - g g) 配列番号 2 7 の残基 3 0 0 に対応する残基における C または D ;
 - h h) 配列番号 2 7 の残基 3 0 2 に対応する残基における T または S ;
 - i i) 配列番号 2 7 の残基 3 0 5 に対応する残基における C ;
 - j j) 配列番号 2 7 の残基 3 1 9 に対応する残基における F ; および / または
 - k k) 配列番号 2 7 の残基 3 3 0 に対応する残基における M 、
- 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。

【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 3 5 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 0 % 同一である、請求項 5 に記載の宿主細胞。

10

20

30

40

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。

20

【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。

【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