

【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4年7月22日(2022.7.22)

【国際公開番号】WO2021/100642

【出願番号】特願2021-558358(P2021-558358)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/29(2006.01)

C 1 2 N 1/13(2006.01)

C 1 2 P 21/02(2006.01)

10

【F I】

C 1 2 N 15/29 Z N A

C 1 2 N 1/13

C 1 2 P 21/02 C

【手続補正書】

【提出日】令和4年5月17日(2022.5.17)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0002

20

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0002】

化石燃料に依存せず、かつ環境低負荷な物質生産方式が、化学工業から農水畜産業に至る幅広い産業分野で求められている。微生物を用いた物質生産は常温常圧の環境下で行うことができ、かつ近年の遺伝子操作技術の発展に伴い幅広い化合物種を生産できるようになったことから、上記の要求を満たす生産系として注目されている。その中で、シアノバクテリア及び藻類などの光合成微生物は、光をエネルギー源として空気中の二酸化炭素(CO₂)を炭素原料として利用できるため、カーボンニュートラルな次世代の物質生産系として特に期待が持たれている。

30

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0006

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0006】

【非特許文献1】Jason Dexter and Pengcheng Fu, "Metabolic engineering of cyanobacteria for ethanol production", Energy & Environmental Science, Royal Society of Chemistry, 2009, Vol.2, pp.857-864

【非特許文献2】Shota Atsumi et al., "Direct photosynthetic recycling of carbon dioxide to isobutyraldehyde", Nature Biotechnology, Nature Publishing Group, 2009, Vol.27, pp.1177-1180

40

【非特許文献3】Jie Zhou et al., "Discovery of a super-strong promoter enable efficient production of heterologous proteins in cyanobacteria", Scientific Reports, Nature Research, 2014, Vol.4, Article No.4500

【非特許文献4】Andrew H. Ng et al., "Fine-Tuning of Photoautotrophic Synechocystis sp. Strain PCC 6803", Applied and Environmental Microbiology, American Society for Microbiology, 2015, Vol.81, pp.6857-6863

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

50

【補正対象項目名】 0 0 1 1

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 0 1 1 】

【図 1】 図 1 は、シアノバクテリアの細胞表層を模式的に示した図である。

【図 2】 図 2 は、実施例 1 及び比較例 1 の改変シアノバクテリアの培養上清中のタンパク質量 (n = 3、エラーバー = S D) を示すグラフである。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 0 1 6

10

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 0 1 6 】

しかしながら、上述した従来技術では、タンパク質が PCC6803 株の菌体内で産生されたタンパク質を回収するために、PCC6803 株の菌体を破碎する必要がある。そのため、タンパク質の生産に手間がかかる。また、菌体内には様々な物質が存在するため、それらの物質を除去して、目的のタンパク質を生成することが必要となる場合がある。そのため、タンパク質の回収率が低くなる。また、タンパク質の生産の度に、新たな菌株を準備する必要があるため、手間がかかり、生産コストも嵩む。このように、上述した従来技術では、シアノバクテリアを用いたタンパク質の生産効率は未だ低いレベルであり、より生産効

20

【手続補正 5】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 0 4 7

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 0 4 7 】

本実施の形態に係る改変シアノバクテリアの親微生物となる、外膜 5 のタンパク質透過性を向上させる前のシアノバクテリア (以下、親シアノバクテリアという) の種類は、特に制限はなく、あらゆる種類のシアノバクテリアであってもよい。例えば、親シアノバクテリアは、*Synechocystis* 属、*Synechococcus* 属、*Anabaena* 属、又は、*Thermosynechococcus* 属であってもよく、中でも、*Synechocystis* sp. PCC 6803、*Synechococcus* sp. PCC 7942、又は、*Thermosynechococcus elongatus* BP-1 であってもよい。

30

【手続補正 6】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 0 4 9

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 0 4 9 】

本実施の形態では、シアノバクテリアの外膜 5 に発現させる有機物チャネルタンパク質 18 は、葉緑体由来の外膜チャネルタンパク質であってもよい。当該有機物チャネルタンパク質 18 は、例えば、灰色藻 *Cyanophora paradoxa* (以下、*C. paradoxa* ともいう) の CppS (配列番号 1) 又は CppF (配列番号 2) などであってもよい。また、有機物チャネルタンパク質 18 は、CppS 又は CppF とアミノ酸配列が 50 % 以上同一であるタンパク質であってもよい。なお、CppS 又は CppF とアミノ酸配列が 50 % 以上同一であるタンパク質は、葉緑体由来のタンパク質に限られず、例えば、細菌などの微生物由来の CppS 又は CppF の類似タンパク質であってもよい。

40

【手続補正 7】

【補正対象書類名】 明細書

50

【補正対象項目名】 0 0 7 5

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 0 7 5 】

まず、LY07株の染色体DNAを鋳型とし、表1に記載のプライマーpsbA1-Fw（配列番号13）及びtetR-Rv（配列番号14）のセット、並びにtetR-Fw（配列番号15）及びpsbA1-Rv（配列番号16）のセットを用いてPCR法により増幅してtetR遺伝子と、遺伝子導入の目印となるスペクチノマイシン耐性マーカー遺伝子（SpcR）を得た。なお、LY07株ではこれらが染色体上のpsbA1遺伝子中に挿入されて存在しているため、上記プライマーを用いてPCR法により増幅すると、tetR遺伝子の5'末端側にpsbA1遺伝子の上流側断片が連結した形で増幅され、SpcRの3'末端側にpsbA1遺伝子の下流側断片が連結した形で増幅される。次に、tetR遺伝子とSpcRの混合溶液を鋳型とし、表1に記載のプライマーpsbA1-Fw（配列番号13）及びpsbA1-Rv（配列番号14）を用いてPCR法により増幅することにより、5'末端側から、psbA1遺伝子上流側断片、TetR、SpcR、psbA1遺伝子下流側断片が順に連結した遺伝子カセット（psbA1::tetRカセット）を得た。In-Fusion PCRクローニング法（登録商標）を用いて、psbA1::tetRカセットをpUC19プラスミドに挿入し、pUC19-tetRプラスミドを得た。

10

【手続補正8】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 0 8 3

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 0 8 3 】

結果を図2に示す。図2は、実施例1及び比較例1の改変シアノバクテリアの培養上清中のタンパク質量（ $n = 3$ 、エラーバー = SD）を示すグラフである。

20

【手続補正9】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 0 8 5

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 0 8 5 】

データの記載を省略するが、培養液の吸光度（730nm）を測定し、菌体乾燥重量1gあたりの分泌タンパク質量（mg protein/g cell dry weight）を算出したところ、実施例1の条件で培養したSynechocystis cppS tetR株の菌体乾燥重量1gあたりの分泌タンパク質量（mg protein/g cell dry weight）は、比較例1の条件で培養したSynechocystis cppS tetR株と比較して、約36倍向上していた。

30

40

50