

【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27年11月26日(2015.11.26)

【公表番号】特表2014-531904(P2014-531904A)

【公表日】平成26年12月4日(2014.12.4)

【年通号数】公開・登録公報2014-066

【出願番号】特願2014-534810(P2014-534810)

【国際特許分類】

| | | |
|---------|-------|-----------|
| C 1 2 N | 1/21 | (2006.01) |
| C 1 2 N | 1/15 | (2006.01) |
| C 1 2 N | 1/19 | (2006.01) |
| C 1 2 N | 15/09 | (2006.01) |
| C 1 2 P | 7/42 | (2006.01) |
| C 1 2 P | 5/02 | (2006.01) |

【F I】

| | | |
|---------|-------|-------|
| C 1 2 N | 1/21 | Z N A |
| C 1 2 N | 1/15 | |
| C 1 2 N | 1/19 | |
| C 1 2 N | 15/00 | A |
| C 1 2 P | 7/42 | |
| C 1 2 P | 5/02 | |

【手続補正書】

【提出日】平成27年10月5日(2015.10.5)

【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】

イソプレンを産生することのできる組換え細胞であって、ホスホケトライゼ活性を有するポリペプチドをコードしている1種以上の異種核酸と、(i)完全なMVA経路の1種以上のポリペプチドをコードしている1種以上の核酸、及び(ii)イソプレンシンターゼポリペプチドをコードしている異種核酸と、を含み、好適な培地で前記組換え細胞を培養することにより、イソプレンの産生が得られる、組換え細胞。

【請求項2】

イソプレノイド前駆体を産生することのできる組換え細胞であって、ホスホケトライゼ活性を有するポリペプチドをコードしている1種以上の異種核酸と、完全なMVA経路の1種以上のポリペプチドをコードしている1種以上の核酸とを含み、好適な培地で前記組換え細胞を培養することによりイソプレノイド前駆体の産生が得られる、組換え細胞。

【請求項3】

イソプレノイドを産生することのできる組換え細胞であって、ホスホケトライゼ活性を有するポリペプチドをコードしている1種以上の異種核酸と、(i)完全なMVA経路の1種以上のポリペプチドをコードしている1種以上の核酸及び(ii)ポリブレニルピロリン酸シンターゼポリペプチドをコードしている異種核酸とを含み、好適な培地で前記組換え細胞を培養することにより、イソプレノイドの産生が得られる、組換え細胞。

【請求項4】

ホスホケトライゼ活性を有するポリペプチドをコードしている前記1種以上の異種核酸

が、キシリロース5-リン酸からグリセルアルデヒド3-リン酸及びアセチルリン酸を合成することができる、請求項1～3のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項5】

ホスホケトラーーゼ活性を有するポリペプチドをコードしている前記1種以上の異種核酸が、フルクトース6-リン酸からエリスロース4-リン酸及びアセチルリン酸を合成することができる、請求項1～3のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項6】

ホスホケトラーーゼ活性を有するポリペプチドをコードしている前記異種核酸が、ビフィドバクテリウム・ロンゴム (*Bifidobacterium longum*)、エンテロコッカス・ガリニアラム (*Enterococcus gallinarum*)、クロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutilicum*)、ノストック・パンクチホールム (*Nostoc punctiforme*)、ロードショードモナス・パルストリス (*Rhodopseudomonas palustris*)、パントエア (*Pantoea*)、ムチラギニバクター・パルジス (*Mucilaginibacter paludis*)、サーモビフィダ・フスカ (*Thermobifida fusca*)、ビフィドバクテリウム・ブレビ (*Bifidobacterium breve*)、ラーネラ・アクアティリス (*Rahnella aquatili*)、ビフィドバクテリウム・アニマリス (*Bifidobacterium animalis*)、ガードネレラ・バギナリス (*Gardnerella vaginalis*)、ストレプトマイセス・アベルミティリス (*Streptomyces avermitilis*)、ラクトバチルス・プランタラム (*Lactobacillus plantarum*)、及びラクトバチルス・ロイテリ (*Lactobacillus reuteri*) からなる群から選択される、請求項1～3のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項7】

ホスホケトラーーゼ活性を有するポリペプチドをコードしている前記異種核酸が、ビフィドバクテリウム・ロンゴム (*Bifidobacterium longum*)、エンテロコッカス・ガリニアラム (*Enterococcus gallinarum*)、及びクロストリジウム・アセトブチリカム (*Clostridium acetobutilicum*) からなる群から選択される、請求項1～3のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項8】

イソプレンシンターゼポリペプチドをコードしている前記異種核酸が植物のイソプレンシンターゼポリペプチドである、請求項1に記載の細胞。

【請求項9】

前記イソプレンシンターゼポリペプチドが、クズ属 (*Pueraria*) 又はハコヤナギ属 (*Populus*)、又はウラジロハコヤナギとヤマナラシの交雑種 (*Populus alba x Populus tremula*) 由来のポリペプチドである、請求項1に記載の細胞。

【請求項10】

前記イソプレンシンターゼポリペプチドが、ブエラリア・モンタナ (*Pueraria montana*) 又はブエラリア・ロバタ (*Pueraria lobata*)、ヤマナラシ (*Populus tremuloides*)、ウラジロハコヤナギ (*Populus alba*)、ポプラ・ニグラ (*Populus nigra*)、及びポプラ・トリコカルパ (*Populus trichocarpa*) からなる群から選択される、請求項1に記載の細胞。

【請求項11】

前記完全なMVA経路の1種以上のポリペプチドが、(a)2分子のアセチルCoAを縮合させてアセトアセチルCoAを生成する酵素；(b)アセトアセチル-CoAをアセチル-CoAと縮合させてHMG-CoAを生成する酵素(例えば、HMGシンターゼ)；(c)HMG-CoAをメバロン酸に変換する酵素；(d)メバロン酸をメバロン酸5-リン酸にリン酸化する酵素；(e)メバロン酸5-リン酸を5-ジホスホメバロン酸に変換する酵素；及び(f)5-ジホスホメバロン酸をイソペンテニルピロリン酸に変換する酵素から選択される、請求項1～3のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項12】

前記組換え細胞が、1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸(DXP)経路の1種以上のポリペプチドをコードしている1種以上の核酸を更に含む、請求項11に記載の細胞。

【請求項 1 3】

前記 1 種以上の核酸が、誘導型プロモータ又は構成型プロモータ下に配置される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 1 4】

前記 1 種以上の核酸が、1 つ以上の多コピープラスミドにクローニングされる、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 1 5】

前記 1 種以上の核酸が、前記細胞の染色体に組み込まれる、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 1 6】

前記組換え細胞が、グラム陽性菌細胞、グラム陰性菌細胞、真菌細胞、糸状菌細胞、藻類細胞、又は酵母細胞である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 1 7】

前記組換え細胞が、バチルス・スブチリス (*Bacillus subtilis*)、ストレプトマイセス・リビダンス (*Streptomyces lividans*)、ストレプトマイセス・セリカラー (*Streptomyces coelicolor*)、ストレプトマイセス・グリセウス (*Streptomyces griseus*)、大腸菌 (*Escherichia coli*)、パントエア・シトレア (*Pantoea citrea*)、トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*)、アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、及びヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) からなる群から選択される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 1 8】

前記イソプレノイドが、モノテルペン、ジテルペン、トリテルペン、テトラテルペン、セスキテルペン (sesquiterpene) 及びポリテルペンからなる群から選択される、請求項 3 に記載の細胞。

【請求項 1 9】

前記イソプレノイドが、セスキテルペンである、請求項 3 に記載の細胞。

【請求項 2 0】

前記イソプレノイドが、アビエタジエン、アモルファジエン、カレン、- ファルネセン (*farnesene*)、- ファルネセン、ファルネソール、ゲラニオール、ゲラニルゲラニオール、リナロール、リモネン、ミルセン、ネロリドール、オシメン、パチョロール、- ピネン、サビネン、- テルピネン、テルピンデン (*terpinidine*) 及びバレンセンからなる群から選択される、請求項 3 に記載の細胞。

【請求項 2 1】

前記組換え細胞が、酢酸キナーゼ遺伝子の発現が減少するよう又は酢酸キナーゼ遺伝子を欠失させるように、更に遺伝子操作されている、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 2 2】

前記組換え細胞が、ホスホトランスマセチラーゼ遺伝子の活性が増加するよう更に遺伝子操作されている、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 2 3】

イソプレンの生産量が、ホスホケトラーーゼ活性を有するポリペプチドをコードしている 1 種以上の異種核酸を含まない細胞と比較して、少なくとも 5 % 又は少なくとも 10 % 増加している、請求項 1 に記載の細胞。

【請求項 2 4】

イソプレノイド前駆体の生産量が、ホスホケトラーーゼ活性を有するポリペプチドをコードしている 1 種以上の異種核酸を含まない細胞と比較して、少なくとも 5 % 又は少なくとも 10 % 増加している、請求項 2 に記載の細胞。

【請求項 2 5】

イソプレノイドの生産量が、ホスホケトラーーゼ活性を有するポリペプチドをコードして

いる 1 種以上の異種核酸を含まない細胞と比較して、少なくとも 5 % 又は少なくとも 10 % 増加している、請求項 3 に記載の細胞。

【請求項 26】

イソプレン産生法であって、(a)イソプレン産生に好適な条件下で請求項 1 に記載の組換え細胞を培養する工程、及び(b)イソプレンを産生させる工程、を含む、方法。

【請求項 27】

イソプレノイド前駆体の産生法であって、(a)イソプレノイド前駆体の産生に好適な条件下で請求項 2 に記載の組換え細胞を培養する工程、及び(b)イソプレノイド前駆体を産生させる工程、を含む、方法。

【請求項 28】

イソプレノイドの産生法であって、(a)イソプレノイドの産生に好適な条件下で請求項 3 に記載の組換え細胞を培養する工程、及び(b)イソプレノイドを産生させる工程、を含む、方法。