

【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 M V A 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 (i i) イソプレ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 M V A 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 M V A 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 (i i) ポリプ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】

ホスホクテトラ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】

ホスホクテトラ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・ロングム (*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 acetobutylicum*)、ノストック・パンクチホルム (*Nostoc punctiforme*)、ロードシュードモナス・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 aquatilis*)、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】

ホスホクテトラ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・ロングム (*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 acetobutylicum*) 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】

イソプレニ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ニ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】

前記イソプレニ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】

前記イソプレニンターゼポリペプチドが、プエラリア・モンタナ (*Pueraria montana*) 又はプエラリア・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・セレビスエ (*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、 α -ファルネセン (farnesene)、 β -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、 α -ピネン、サビネン、 β -テルピネン、テルピンデン (terpinene) 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に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、ホスホトランスアセチラーゼ遺伝子の活性が増加す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 3】

イソプレンの生産量が、ホスホケトラ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 1 0 % 増加している、請求項 3 に記載の細胞。

【請求項 2 6】

イソプレレン産生法であって、(a) イソプレ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) イソプレレンを産生させる工程、を含む、方法。

【請求項 2 7】

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 2 8】

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。