

【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9月17日(2015.9.17)

【公表番号】特表2014-528705(P2014-528705A)

【公表日】平成26年10月30日(2014.10.30)

【年通号数】公開・登録公報2014-060

【出願番号】特願2014-524145(P2014-524145)

【国際特許分類】

C 1 2 N	1/13	(2006.01)
C 1 2 N	15/09	(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 P	5/02	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	1/13	Z N A
C 1 2 N	15/00	A
C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	
C 1 2 P	5/02	

【手続補正書】

【提出日】平成27年7月27日(2015.7.27)

【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】

イソブレンを生産することができる組み換え微生物であって、マロニルC₀A及びアセチルC₀AからアセトアセチルC₀Aを合成することができるポリペプチドをコードしている1つ以上の核酸、並びに

a. イソブレンシンターゼポリペプチドであって、異種核酸によりコードされるイソブレンシンターゼポリペプチド、及び

b. メバロン酸(MVA)経路の1つ以上のポリペプチド

をコードしている1つ以上の核酸を含み、

前記組み換え微生物を適切な培地で培養することで、前記ポリペプチドの生産及びイソブレンの合成が提供される、組み換え微生物。

【請求項2】

マロニルC₀A及びアセチルC₀AからアセトアセチルC₀Aを合成することができるポリペプチドをコードしている前記1つ以上の核酸が、アセトアセチルC₀Aシンターゼ遺伝子である、請求項1に記載の組み換え微生物。

【請求項3】

前記アセトアセチルC₀Aシンターゼ遺伝子が、配列番号1のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードしている、又は配列番号1のアミノ酸配列に対して80%以上同一であるアミノ酸配列を有し、かつマロニルC₀A及びアセチルC₀AからアセトアセチルC₀Aを合成する機能を有するタンパク質をコードしている、請求項2に記載の組み換え微生物

物。

【請求項 4】

前記イソブレンシンターゼポリペプチドが、植物のイソブレンシンターゼポリペプチドであるか、又はその変異体である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の組み換え微生物。

【請求項 5】

前記イソブ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*) 由来のポリペプチド、又はウラジロハコヤナギ (*Populus alba*) とヤマナラシ (*Populus tremula*) の交雑種由来のポリペプチド、又はそれらの変異体由来のポリペプチドである、請求項 4 に記載の組み換え微生物。

【請求項 6】

前記イソブレンシンターゼポリペプチドが、プエラリア・モンタナ (*Pueraria montana*) 又はクズ (*Pueraria lobata*)、アメリカヤマナラシ (*Populus tremuloides*)、ウラジロハコヤナギ (*Populus alba*)、セイヨウハコヤナギ (*Populus nigra*)、及びコットンウッド (*Populus trichocarpa*)、又はそれらの変異体からなる群から選択される、請求項 5 に記載の組み換え微生物。

【請求項 7】

(b) の MVA 経路の 1 つ以上のポリペプチドをコードしている前記 1 つ以上の核酸が異種核酸である、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の組み換え微生物。

【請求項 8】

(b) の MVA 経路の 1 つ以上のポリペプチドをコードしている前記 1 つ以上の核酸が、内在性核酸のコピーである、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の組み換え微生物。

【請求項 9】

MVA 経路の前記 1 つ以上のポリペプチドが、(a) アセトアセチル CoA とアセチル CoA を縮合させて HMG - CoA を生成する酵素；(b) HMG - CoA をメバロン酸に変換する酵素；(c) メバロン酸を 5 - ホスホメバロン酸へとリン酸化する酵素；(d) 5 - ホスホメバロン酸を 5 - ジホスホメバロン酸に変換する酵素；及び(e) 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 ~ 8 のいずれか一項に記載の組み換え微生物。

【請求項 10】

イソペンテニル - ジホスフェート - イソメラーゼ (IDH) のポリペプチドをコードしている 1 つ以上の核酸を更に含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の組み換え微生物。

【請求項 11】

1 - デオキシ - D - キシリロース - 5 - リン酸 (DXP) 経路の 1 つ以上のポリペプチドをコードしている 1 つ以上の核酸を更に含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の組み換え微生物。

【請求項 12】

DXP 経路の 1 つ以上のポリペプチドをコードしている前記 1 つ以上の核酸が異種核酸である、請求項 11 に記載の組み換え微生物。

【請求項 13】

DXP 経路の 1 つ以上のポリペプチドをコードしている前記 1 つ以上の核酸が内在性核酸のコピーである、請求項 11 に記載の組み換え微生物。

【請求項 14】

前記 DXP 経路のポリペプチドが DXS である、請求項 13 に記載の組み換え微生物。

【請求項 15】

前記 1 つ以上の異種核酸が、誘導型プロモーター又は構成型プロモーター下に配置される、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の組み換え微生物。

【請求項 16】

前記 1 つ以上の異種核酸が、1 つ以上のマルチコピープラスミドにクローン化される、

請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の組み換え微生物。

【請求項 17】

前記 1 つ以上の異種核酸が、細胞の染色体に組み込まれる、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の組み換え微生物。

【請求項 18】

前記微生物が、バクテリア細胞、藻類細胞、真菌細胞又は酵母細胞である、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の組み換え微生物。

【請求項 19】

前記微生物がバクテリア細胞である、請求項 18 に記載の組み換え微生物。

【請求項 20】

前記バクテリア細胞がグラム陽性バクテリア細胞、又はグラム陰性バクテリア細胞である、請求項 19 に記載のバクテリア細胞。

【請求項 21】

前記バクテリア細胞が、大腸菌 (*E. coli*)、*L. アシドフィルス* (*L. acidophilus*)、*コリネバクテリウム属* (*Corynebacterium* sp.)、*P. シトレア* (*P. citrea*)、枯草菌 (*B. subtilis*)、*B. リケニフォルミス* (*B. licheniformis*)、*B. レンタス* (*B. lentus*)、*B. ブレビス* (*B. brevis*)、*B. ステアロサーモフィルス* (*B. stearothermophilus*)、*B. アルカロフィルス* (*B. alkalophilus*)、*B. アミロリケファシエンス* (*B. amylolyticus*)、*B. クラウシイ* (*B. clausii*)、*B. ハロデュランス* (*B. halodurans*)、*B. メガテリウム* (*B. megaterium*)、*B. コアギュランス* (*B. coagulans*)、*B. サーキュランス* (*B. circulans*)、*B. ロータス* (*B. lautus*)、*B. チューリングエンシス* (*B. thuringiensis*)、*S. アルバス* (*S. albus*)、*S. リビダンス* (*S. lividans*)、*S. セリカラー* (*S. coelicolor*)、*S. グリセウス* (*S. griseus*)、*シュードモナス属* (*Pseudomonas* sp.)、及び *P. アルカリゲネス* (*P. alcaligenes*) 細胞からなる群から選択される、請求項 20 に記載のバクテリア細胞。

【請求項 22】

前記バクテリア細胞が大腸菌 (*E. coli*) 細胞である、請求項 21 に記載のバクテリア細胞。

【請求項 23】

前記バクテリア細胞が *L. アシドフィルス* (*L. acidophilus*) 細胞である、請求項 21 に記載のバクテリア細胞。

【請求項 24】

前記バクテリア細胞がコリネバクテリウム属 (*Corynebacterium* sp.) 細胞である、請求項 21 に記載のバクテリア細胞。

【請求項 25】

前記微生物が藻類細胞である、請求項 18 に記載の組み換え微生物。

【請求項 26】

前記藻類細胞が、緑藻類、紅藻類、灰色藻類、クロララクニオン藻類 (*chlorarachniophytes*)、ミドリムシ類 (*euglenids*)、クロミスタ類 (*chromista*)、又は渦鞭毛藻類からなる群から選択される、請求項 25 に記載の藻類細胞。

【請求項 27】

前記微生物が真菌細胞である、請求項 18 に記載の組み換え微生物。

【請求項 28】

前記真菌細胞が糸状菌である、請求項 27 に記載の真菌細胞。

【請求項 29】

前記微生物が酵母細胞である、請求項 18 に記載の組み換え微生物。

【請求項 30】

前記酵母細胞が、サッカロミセス属 (*Saccharomyces* sp.)、シゾサッカロミセス属 (*S. cerevisiae* sp.)、ピキア属 (*Pichia* sp.)、又はカンジダ属 (*Candida* sp.) からなる群から選択される、請求項 29 に記載の酵母細胞。

【請求項 3 1】

前記酵母細胞が、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 細胞である、請求項3 0に記載の酵母細胞。

【請求項 3 2】

イソプレンの生産方法であって、

- a . 請求項 1 ~ 3 1 のいずれか一項に記載の組み換え微生物を培養する工程と、
- b . イソプレンを生産させる工程と

を含む方法。

【請求項 3 3】

前記組み換え微生物により生産された前記イソプレンを回収する工程を更に含む、請求項3 2に記載の方法。