

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-503216

(P2014-503216A)

(43) 公表日 平成26年2月13日 (2014. 2. 13)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 6 4
C 1 2 P 1/02 (2006.01)	C 1 2 P 1/02 Z	4 B O 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 67 頁)

(21) 出願番号	特願2013-547474 (P2013-547474)	(71) 出願人	390023674 イー・アイ・デュポン・ドウ・ヌムール・ アンド・カンパニー E. I. DU PONT DE NEMO URS AND COMPANY アメリカ合衆国、デラウェア州、ウィルミ ントン、マーケット・ストリート 100 7
(86) (22) 出願日	平成23年11月15日 (2011. 11. 15)	(74) 代理人	100127926 弁理士 結田 純次
(85) 翻訳文提出日	平成25年8月9日 (2013. 8. 9)	(74) 代理人	100140132 弁理士 竹林 則幸
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/060788	(72) 発明者	セン・ピョ・ホーン アメリカ合衆国デラウェア州19707. ホッケシン、ピアソンズリッジ9 最終頁に続く
(87) 国際公開番号	W02012/091812		
(87) 国際公開日	平成24年7月5日 (2012. 7. 5)		
(31) 優先権主張番号	61/428, 590		
(32) 優先日	平成22年12月30日 (2010. 12. 30)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 スクロース利用のための、ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) におけるサッカロミセス・セレビシア (*Saccharomyces cerevisiae*)

(57) 【要約】

スクロースインペルターゼ活性があるポリペプチドをコードする外因性ポリヌクレオチドを含む、形質転換されたヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) を本明細書に開示する。さらに、形質転換された *Y. lipolytica*) を使用する方法を開示する。

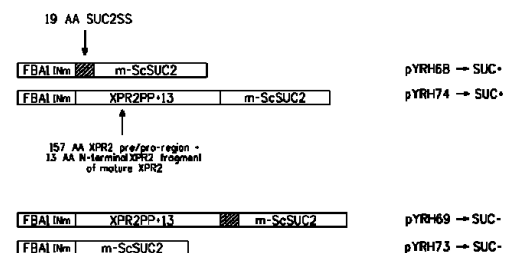


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

スクロースインベルターゼ活性を有するポリペプチドをコードする外因性ポリヌクレオチドを含む、形質転換ヤロウシア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) であって、

(a) 上記ポリペプチドが、成熟スクロースインベルターゼをコードするポリペプチド配列に融合したシグナル配列を含み；かつ

(b) 該シグナル配列が、

(i) Xpr2 プレ/プロ領域および N 末端 Xpr2 断片；および

(ii) スクロースインベルターゼシグナル配列の 2 番目のアミノ酸が任意の疎水性アミノ酸であってよい、スクロースインベルターゼシグナル配列；
からなる群から選択され；かつ

(c) 成熟スクロースインベルターゼをコードする上記ポリペプチド配列が、配列番号 4 と比較すると、CLUSTALW アライメント法に基づいて少なくとも 80% の配列同一性を有する、
上記形質転換ヤロウシア・リポリティカ。

【請求項 2】

スクロースインベルターゼシグナル配列の前記 2 番目のアミノ酸が、ロイシン、フェニルアラニン、イソロイシン、バリン、およびメチオニンからなる群から選択される、請求項 1 に記載の形質転換ヤロウシア・リポリティカ。

【請求項 3】

成熟スクロースインベルターゼをコードする前記ポリペプチド配列が配列番号 4 で示される、請求項 1 に記載の形質転換ヤロウシア・リポリティカ。

【請求項 4】

前記 Xpr2 プレ/プロ領域および N 末端 Xpr2 断片が、ヤロウシア・リポリティカに由来し、かつ前記スクロースインベルターゼシグナル配列が、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) に由来する、請求項 1 に記載の形質転換ヤロウシア・リポリティカ。

【請求項 5】

前記 Xpr2 プレ/プロ領域および N 末端 Xpr2 断片が、

(a) アルカリ細胞外プロテアーゼ前駆体の N 末端 157 個のアミノ酸を含む Xpr2 プレ/プロ領域；および

(b) 成熟アルカリ細胞外プロテアーゼの N 末端 13 個のアミノ酸を含む N 末端 Xpr2 断片

を含む、請求項 4 に記載の形質転換ヤロウシア・リポリティカ。

【請求項 6】

前記 Xpr2 プレ/プロ領域および N 末端 Xpr2 断片が配列番号 10 で示される、請求項 5 に記載の形質転換ヤロウシア・リポリティカ。

【請求項 7】

前記スクロースインベルターゼシグナル配列が配列番号 8 で示される、請求項 4 に記載の形質転換ヤロウシア・リポリティカ。

【請求項 8】

スクロースインベルターゼコード配列に融合したシグナル配列を含む前記ポリペプチドが、配列番号 12 および配列番号 20 からなる群から選択される、請求項 1 に記載の形質転換ヤロウシア・リポリティカ。

【請求項 9】

前記形質転換ヤロウシア・リポリティカが、スクロースを唯一の炭素源とする条件下で増殖することができる、請求項 1 に記載の形質転換ヤロウシア・リポリティカ。

【請求項 10】

前記形質転換ヤロウシア・リポリティカが、少なくとも 1 つの目的の非天然生成物を産

10

20

30

40

50

生することができる、請求項 1 に記載の形質転換ヤロウィア・リポリティカ。

【請求項 1 1】

前記少なくとも 1 つの目的の非天然生成物が、多価不飽和脂肪酸、カロテノイド、アミノ酸、ビタミン、ステロール、フラボノイド、有機酸、ポリオールおよびヒドロキシエステル、キノン誘導化合物、ならびにレスベラトロールからなる群から選択される、請求項 1 0 に記載の形質転換ヤロウィア・リポリティカ。

【請求項 1 2】

前記形質転換ヤロウィア・リポリティカが、少なくとも 8 0 % のスクロースインベルターゼを細胞外に分泌することができ、炭素源として少なくともスクロースを含有する培地中で増殖する、請求項 1 または請求項 1 0 に記載の形質転換ヤロウィア・リポリティカ。

10

【請求項 1 3】

少なくとも 1 つの非天然生成物を生産する方法であって、

a) スクロース；および

b) グルコース；

からなる群から選択される少なくとも 1 つの炭素源を含有する培地中で請求項 1 0 に記載の形質転換ヤロウィア・リポリティカを増殖させ、それによって、少なくとも 1 つの目的の非天然生成物を産生させるステップ、および場合によっては、少なくとも 1 つの目的の非天然生成物を回収するステップ、を含む上記方法。

【請求項 1 4】

前記少なくとも 1 つの目的の非天然生成物が、多価不飽和脂肪酸、カロテノイド、アミノ酸、ビタミン、ステロール、フラボノイド、有機酸、ポリオールおよびヒドロキシエステル、キノン誘導化合物、ならびにレスベラトロールからなる群から選択される、請求項 1 3 に記載の方法。

20

【請求項 1 5】

前記形質転換ヤロウィア・リポリティカが、少なくとも 8 0 % のスクロースインベルターゼを細胞外に分泌することができる、請求項 1 3 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本出願は 2 0 1 0 年 1 2 月 3 0 日に出願された米国仮特許出願第 6 1 / 4 2 8 , 5 9 0 号明細書の利益を主張するものであり、その内容全体を参照によって本明細書に組み込むものとする。

30

【0 0 0 2】

本発明はバイオテクノロジーの分野に入る。より具体的には、本発明は、炭素源としてスクロースを使用する能力を有する形質転換されたヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) に関し、ここで、形質転換された *Y. lipolytica* は、場合によっては、多価不飽和脂肪酸 (「PUFA」) など、目的の非天然生成物を産生するように操作することもできる。

【背景技術】

【0 0 0 3】

ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) などの油性酵母には、それらの唯一の炭素源としてグルコースを使用する天然の能力がある；しかしながら、この基質は必ずしも最もコスト効率の良い炭素源であるとは限らない。グルコースの代わりに炭素源として (単独でも他の炭素源と組み合わせても) 炭素源としてスクロースを使用することは、そのコストから有利となりうる。

40

【0 0 0 4】

Y. lipolytica は、単糖のグルコースおよびフルクトースへのスクロース (二糖) の変換を触媒するインベルターゼをコードする遺伝子を有しないので、炭素源としてスクロースを利用することができない。数人の研究者がこれまでに、インベルターゼ (例えば、サッカロミセス・セレビシア (*Saccharomyce*

50

S. cerevisiae) SUC2 遺伝子) をコードする異種遺伝子にシグナル配列を融合させて、周辺培地に成熟インベルターゼタンパク質を分泌するように酵母を操作している。これにより周辺培地中でスクロースは加水分解されるようになる。

【0005】

Y. リポリティカ (*Y. lipolytica*) から単離された周知のシグナル配列の1つは、誘導性のアルカリ性細胞外プロテアーゼ (「AEP」) のシグナル配列である (特許文献1; 非特許文献1; 非特許文献2)。AEPはY. リポリティカ (*Y. lipolytica*) のXPR2 遺伝子によりコードされる。さらに、天然において細胞外に大量に分泌される。

【0006】

Nicaudら (非特許文献3; 特許文献2) は、Y. リポリティカ (*Y. lipolytica*) XPR2 プロモーターおよびそのシグナル配列とS. セルビシア (*S. cerevisiae*) SUC2 のキメラ発現を報告し、それによりY. リポリティカ (*Y. lipolytica*) にスクロース利用 (SUC⁺) 表現型をもたらした。具体的には、XPR2 から23個のN末端アミノ酸が短縮SUC2に融合された (ここで、短縮は、完全長タンパク質の最初の4個のアミノ酸の除去である)。インベルターゼ活性の約10%が培養液中に観察され (すなわち、細胞外分泌を介して)、一方活性の90%が全細胞を使用して回収される (すなわち、インベルターゼは周辺質に分泌された) ことが報告された。したがって、細胞外スクロース加水分解の効率は比較的低いものであった。

【0007】

Nicaudらが記載した方法論は、炭素源としてスクロースを使用してクエン酸を産生する形質転換体Y. リポリティカ (*Y. lipolytica*) 株を開発する努力において、他研究者により利用されている (非特許文献4~6)。上記のFosterらは、インベルターゼ活性の大多数 (60~70%) は、細胞表面上で見出されるが (すなわち、全細胞において検出される細胞結合性の活性)、インベルターゼの30~40%は、無細胞の培地中で検出されることを報告した; バイオマスからの最大インベルターゼ生成量は、110 U/g 乾燥重量バイオマスであった。ごく最近では、上記のLazarらは、Y. リポリティカ (*Y. lipolytica*) XPR2 プロモーターおよびそのシグナル配列とS. セルビシア (*S. cerevisiae*) SUC2 を含む融合物を2コピー含有するY. リポリティカ (*Y. lipolytica*) 株を同定し、インベルターゼ活性の大部分が細胞と結合し (2568~3736 U/g 細胞)、一方約232~589 U/g が細胞外である (すなわち、活性の5~20%のみが細胞外である) ことを実証した。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】欧州特許第0220864B1号明細書

【特許文献2】欧州特許出願公開第0402226A1号明細書

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Davidow, et al., J. Bacteriol., 169: 4621-4629 (1987)

【非特許文献2】Matoba, et al., Mol. Cell Biol., 8: 4904-4916 (1988)

【非特許文献3】Current Genetics, 16: 253-260 (1989)

【非特許文献4】Wojtatowicz, M., et al., Pol. J. Food Nutr. Sci., 6/47 (4): 49-54 (1997)

【非特許文献5】Forster, A. et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 75: 1409-1417 (2007)

【非特許文献6】Lazar, Z. et al., Bioresour. Technol., 102: 6982-6989 (2011)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

したがって、細胞外インベルターゼ活性を改善するためにY. リポリティカ (Y. lipolytica) を操作することが、炭素源としてスクロースをより良く利用するために望ましい。

【課題を解決するための手段】

【0011】

一実施形態では、本発明は、スクロースインベルターゼ活性を有するポリペプチドをコードする外因性ポリヌクレオチドを含む、形質転換されたヤロウィア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) であって、

a) 前記ポリペプチドが、成熟スクロースインベルターゼをコードするポリペプチド配列に融合したシグナル配列を含み；かつ

b) 前記シグナル配列が、

(i) Xpr2 プレ/プロ領域およびN末端Xpr2 断片；ならびに

(ii) スクロースインベルターゼシグナル配列の2番目のアミノ酸が任意の疎水性アミノ酸になりうるスクロースインベルターゼシグナル配列

からなる群から選択され；かつ

c) 成熟スクロースインベルターゼをコードする前記ポリペプチド配列が、配列番号4 (「m-ScSUC2」) と比較されるとき、CLUSTALWアライメント法に基づいて少なくとも80%の配列同一性を有する

形質転換されたヤロウィア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) に関する。

【0012】

好ましくは、上記のスクロースインベルターゼシグナル配列の2番目のアミノ酸は、ロイシン、フェニルアラニン、イソロイシン、バリン、およびメチオニンからなる群から選択される。

【0013】

第2の実施形態では、成熟スクロースインベルターゼをコードするポリペプチド配列は、配列番号4 (「m-ScSUC2」) で示される。

【0014】

第3の実施形態では、Xpr2 プレ/プロ領域およびN末端Xpr2 断片は、Y. リポリティカ (Y. lipolytica) に由来し、かつ前記スクロースインベルターゼシグナル配列は、サッカロミセス・セレビシア (Saccharomyces cerevisiae) に由来する。好ましくは、Xpr2 プレ/プロ領域およびN末端Xpr2 断片は、

(i) アルカリ性細胞外プロテアーゼ前駆体のN末端157個のアミノ酸を含むXpr2 プレ/プロ領域；および

(ii) 成熟アルカリ性細胞外プロテアーゼのN末端13個のアミノ酸を含むN末端Xpr2 断片を含む。

【0015】

好ましくは、Xpr2 プレ/プロ領域およびN末端Xpr2 断片は、配列番号10 [「XPR2PP+13」] で示される。

【0016】

第4の実施形態では、スクロースインベルターゼシグナル配列は、配列番号8 [「SUC2SS」] で示される。

【0017】

10

20

30

40

50

第5の実施形態では、スクロースインベルターゼのコード配列に融合したシグナル配列を含むポリペプチドは、配列番号12[「S u c 2 S S / m - S c S U C 2」]および配列番号20[「X P R 2 P P + 1 3 / m - S c S U C 2」]からなる群から選択される。

【0018】

第6の実施形態では、形質転換されたY・リポリティカ(Y・l i p o l y t i c a)は、スクロースが唯一の炭素源である条件下で増殖することができる。

【0019】

第7の実施形態では、形質転換されたY・リポリティカ(Y・l i p o l y t i c a)は、目的の少なくとも1つの非天然生成物を産生することができる。好ましくは、目的の少なくとも1つの非天然生成物は、多価不飽和脂肪酸、カロテノイド、アミノ酸、ビタミン、ステロール、フラボノイド、有機酸、ポリオールおよびヒドロキシエステル、キノン誘導体化合物、ならびにリスベラトロールからなる群から選択される。

【0020】

第8の実施形態では、炭素源として少なくともスクロースを含有する培地中で増殖させた、本明細書で発明の形質転換されたY・リポリティカ(Y・l i p o l y t i c a)はいずれも、スクロースインベルターゼの少なくとも80%を細胞外に分泌することができる。

【0021】

第9の実施形態では、本発明は、少なくとも1つの非天然生成物を産生する方法であって、

a) スクロース；および

b) グルコース；

からなる群から選択される少なくとも1つの炭素源を含有する培地中で本発明の形質転換されたY・リポリティカ(Y・l i p o l y t i c a)を増殖させ、それによって、目的の少なくとも1つの非天然生成物を産生させるステップ、および場合によっては、目的の少なくとも1つの非天然生成物を回収するステップを含む方法に関する。

【0022】

好ましくは、目的の少なくとも1つの非天然生成物は、多価不飽和脂肪酸、カロテノイド、アミノ酸、ビタミン、ステロール、フラボノイド、有機酸、ポリオールおよびヒドロキシエステル、キノン誘導体化合物、ならびにリスベラトロールからなる群から選択される。

【0023】

第10の実施形態では、形質転換されたY・リポリティカ(Y・l i p o l y t i c a)は、スクロースインベルターゼの少なくとも80%を細胞外に分泌することができる。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】細胞外インベルターゼ発現コンストラクトであるpYRH68(配列番号13)、pYRH74(配列番号21)、pYRH69(配列番号18)、およびpYRH73(配列番号15)、ならびにこれらのコンストラクトがY・リポリティカ(Y・l i p o l y t i c a)で発現されるときに得られる表現型(すなわち、スクロースを利用する(SUC⁺)またはスクロースを利用しない(SUC⁻)の概略図を示す。

【図2A】サッカロミセス・セレビスシア(S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e)インベルターゼ(「S c S U C 2」)のN末端部分のヌクレオチドおよび翻訳アミノ酸配列を示す。より具体的には、配列番号2のアミノ酸1~32を示す；最初の19個のアミノ酸は、S u c 2 S S(配列番号8)として本明細書で示されるインベルターゼシグナル配列に相当し、枠内に示された残りのアミノ酸は、本明細書でm - S c S U C 2(配列番号4)と命名した成熟インベルターゼタンパク質のN末端を表す。

【図2B】X P R 2遺伝子によりコードされたY・リポリティカ(Y・l i p o l y t i c a)アルカリ性細胞外プロテアーゼの一部のヌクレオチドおよび翻訳アミノ酸配列を示す。具体的には、アルカリ性細胞外プロテアーゼ前駆体(配列番号6)のアミノ酸145

10

20

30

40

50

～ 192 を示す。これらのうち、点線の枠内に示されるアミノ酸 145 ～ 157 は、X p r 2 プレ/プロ領域の C 末端に相当し、アミノ酸 158 ～ 192 は、成熟タンパク質の N 末端 X p r 2 断片に相当する。下線のアミノ酸は、X P R 2 P P + 13 (配列番号 10) と本明細書で称される X p r 2 プレ/プロ領域および N 末端 X p r 2 断片の中に存在する、N 末端 X p r 2 断片の 13 個のアミノ酸に相当する。

【図 3】p Z S U C のプラスミドマップを示す。

【図 4 A】p Y R H 6 8 のプラスミドマップを示す。

【図 4 B】p Y R H 7 0 のプラスミドマップを示す。

【図 5 A】p Y R H 7 3 のプラスミドマップを示す。

【図 5 B】p Y R H 6 9 のプラスミドマップを示す。

10

【図 6】p Y R H 7 4 のプラスミドマップを示す。

【図 7】グルコース培地およびスクロース培地の両方における、Y 4 1 8 4 U + S u c 2 S S / m - S c S U C 2 株および Y 4 1 8 4 株 (対照) の増殖のグラフを示す。

【図 8 A】グルコースを含む培地上での Z 1 9 7 8 U + S u c 2 S S / m - S c S U C 2 株、Z 1 9 7 8 U + 2 _ S u c 2 S S / m - S c S U C 2 株、Z 1 9 7 8 U + X P R 2 P P + 13 / m - S c S U C 2 株、Z 1 9 7 8 U + m - S c S U C 2 株、Z 1 9 7 8 U + X P R 2 P P + 13 / S u c 2 S S / m - S c S U C 2 株、および Z 1 9 7 8 株 (対照) の増殖のグラフを示す。

【図 8 B】スクロースを含む培地上での Z 1 9 7 8 U + S u c 2 S S / m - S c S U C 2 株、Z 1 9 7 8 U + 2 _ S u c 2 S S / m - S c S U C 2 株、Z 1 9 7 8 U + X P R 2 P P + 13 / m - S c S U C 2 株、Z 1 9 7 8 U + m - S c S U C 2 株、Z 1 9 7 8 U + X P R 2 P P + 13 / S u c 2 S S / m - S c S U C 2 株、および Z 1 9 7 8 株 (対照) の増殖のグラフを示す。

20

【図 9】p Z K L 3 - 9 D P 9 N のプラスミドマップを示す。

【 0 0 2 5 】

配列説明

以下の配列は、米国特許法施行規則第 1 . 8 2 1 条～第 1 . 8 2 5 条 (「ヌクレオチド配列および/またはアミノ酸配列開示を含む特許出願の要件 - 配列規則」) に準拠し、世界知的所有権機関 (W I P O) 標準 S T . 2 5 (1 9 9 8) および E P O および P C T の配列表要件 (規則第 5 . 2 条および第 4 9 . 5 条 (a - b i s) 、および実施細則第 2 0 8 条および附属書 C) に一致する。ヌクレオチドおよびアミノ酸配列データのために使用される記号およびフォーマットは、米国特許法施行規則第 1 . 8 2 2 条に記載の規則に準拠する。

30

【 0 0 2 6 】

配列番号 1 ～ 4 1 は、表 1 に記載の遺伝子、タンパク質 (もしくはその一部) 、プライマー、またはプラスミドをコードする O R F である。

【 0 0 2 7 】

【表 1】

表 1. 核酸およびタンパク質の配列番号の概要

説明	核酸 配列番号	タンパク質 配列番号
19 個アミノ酸のシグナル配列を含む、サッカロミセス・セレビシア(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)インベルターゼ (「ScSUC2」)	1 (1599 bp)	2 (532 AA)
19 個アミノ酸のシグナル配列を欠損する、サッカロミセス・セレビシア(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)インベルターゼ (「m-ScSUC2」)	3 (1542 bp)	4 (513 AA)
シグナル配列および 157 個アミノ酸のブレ/プロ領域を含む ヤロウィア・リポリティカ(<i>Yarrowia lipolytica</i>)アルカリ性細胞外プロテアーゼ	5 (1365 bp)	6 (454 AA)
サッカロミセス・セレビシア(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)インベルターゼに由来した改変 Suc2 シグナル配列 (「SUC2SS」)	7 (57 bp)	8 (19 AA)
Y. リポリティカ(<i>Y. lipolytica</i>)に由来した Xpr2 ブレ/プロ領域 および N 末端 Xpr2 断片 (「XPR2PP+13」)	9 (510 bp)	10 (170 AA)
SUC2SS/m-ScSUC2 融合物	11 (1599 bp)	12 (532 AA)
ベクター pYRH68	13 (8743 bp)	--
ベクター pYRH70	14 (11962 bp)	--
ベクター pYRH73	15 (8689 bp)	--
XPR2PP+13/SUC2SS/m-ScSUC2 融合物	16 (2112 bp)	17 (703 AA)
ベクター pYRH69	18 (9256 bp)	--
XPR2PP+13/m-ScSUC2 融合物	19 (2058 bp)	20 (685 AA)
ベクター pYRH74	21 (9202 bp)	--
プラスミド pZSUC	22 (9016 bp)	--
プライマー Sc.SUC2-5' および Sc.SUC2-3'	23, 24	--
プラスミド pZKLY-PP2	25 (11180 bp)	--
プライマー nSC.SUC2-3'	26	--
プライマー YI.XPR2-5' および YI.XPR2-3'	27, 28	--
プラスミド pZKL3-9DP9N	29 (13565 bp)	--
ユーグレナ・グラシリス(<i>Euglena gracilis</i>)に由来した合成変異体デルタ-9 エロンゲース遺伝子 [「EgD9eSL35G」]	30 (777 bp)	31 (258 AA)
ヤロウィア・リポリティカ(<i>Yarrowia lipolytica</i>)デルタ-9 デサチュラーゼ (GenBank 受託番号 XM_501496)	32 (1449 bp)	33 (482 AA)
ヤロウィア・リポリティカ(<i>Yarrowia lipolytica</i>)コリンリン酸シチジルトランスフェラーゼ (GenBank 受託番号 XM_502978)	34 (1101 bp)	35 (366 AA)
プライマー YL427 および YL428	36, 37	--
XPR2 プロモーターおよび 63bp コード領域を含有する <i>Cla</i> I/ <i>Hind</i> III 断片	38 (441 bp)	--
プライマー YL429 および YL430	39, 40	--
短縮 SUC2 遺伝子を含有する <i>Hind</i> III/ <i>Bsi</i> WI 断片	41 (1581 bp)	--

【0028】

本明細書に引用されるすべての特許、特許出願、および刊行物は、それら全体を参照により組み込むものとする。

【0029】

本開示では、いくつかの用語および略語を使用する。以下に定義を示す。

「翻訳領域」は「ORF」と略す。

「ポリメラーゼ連鎖反応」は「PCR」と略す。

「米国培養細胞系統保存機関 (American Type Culture Collection)」は「ATCC」と略す。

「多価不飽和脂肪酸 (類)」は「PUFA (類)」と略す。

「トリアシルグリセロール」は「TAG」と略す。

「総脂肪酸」は「TFA」と略す。

「脂肪酸メチルエステル」は「FAME」と略す。

「乾燥細胞重量」は「DCW」と略す。

「重量パーセント」は「重量%」と略す。

【0030】

単数形「a」、「an」、および「the」は、本明細書および添付の特許請求の範囲において使用する場合、文脈上他に明示されない限り、複数への言及を含む。したがって、例えば、「1つの細胞 (a cell)」と言及する場合、1つまたは複数の細胞および当業者に公知の等価物等が含まれる。

【0031】

用語「分泌経路」は、分泌過程において、細胞がタンパク質を細胞外に輸送する経路を指す。一般に、分泌されるタンパク質は、粗面小胞体 [「ER」] に移行し、ゴルジ装置を介して輸送され、次いでエキソサイトーシスの過程で細胞膜と最終的に融合し、それによってタンパク質を放出する小胞に組み込まれる。分泌は、構成的または調節形式で起こりうる。

【0032】

「シグナル配列」(当技術分野では、「プレ」配列領域、「シグナルペプチド」、「ターゲティングシグナル」、「輸送ペプチド」、または「移行シグナル」とも呼ばれる) は、一般に、細胞内部におけるまたは細胞外環境へのポリペプチドの残りの部分の輸送および局在化を指示する短いペプチド配列 (すなわち、ポリペプチドの最もN末端の部分で長さが約3~60個のアミノ酸) である。真核生物での平均長は22.6個のアミノ酸である。シグナル配列は、一般に、膜、例えばER膜を横切る移行を介してタンパク質をその機能部位にターゲティングするための定義されたペプチドモチーフを含む。移行後、続けて、シグナル配列は内因性シグナルペプチターゼにより通常切断される。シグナル配列を含むタンパク質は「プレタンパク質」と呼ばれる。

【0033】

コンセンサス配列は存在しないが、ほとんどすべてのシグナルペプチドは共通の構造、すなわち、短く、正に荷電したアミノ領域 (n-領域) ; 中央の疎水性領域 (h-領域) ; およびシグナルペプチターゼにより切断される部位を含有するより極性な領域 (c-領域) (Nielsen, et al., Protein Engineering, 10: 1-6 (1997)) を有する。

【0034】

用語「プロタンパク質」および「タンパク質前駆体」は、本明細書において互換的に使用し、N末端「プロ」配列領域の切断により改変されうるポリペプチドを指す。通常はエンドプロテアーゼによるこの「プロ」配列領域の除去により、「成熟タンパク質」の形成がもたらされる。この「プロ」配列領域は、種々の翻訳後修飾を促進する原因となることも、成熟タンパク質の適切なフォールディングのための必要条件となることも、またはそれが翻訳後に除去されるまで、成熟タンパク質の活性を阻害するように作用することもある。

【0035】

「プレ/プロタンパク質」は、「プレ/プロ」領域が除去されたときに成熟タンパク質になるものに結合した「プレ/プロ」領域を含有する。「プレ/プロタンパク質」は、「プレ」配列領域（すなわち、N末端シグナル配列）および「プロ」配列領域（すなわち、「プレ」配列とプレ/プロ領域が除去されたときに成熟タンパク質になるものとの間に並置された領域）の両方を含む。

【0036】

用語「インベルターゼ」および「 α -フルクトフラノシダーゼ」は、加水分解反応を介してスクロース（すなわち、アルファ-1、4-グリコシド結合により連結された、アルファ-D-グルコース分子およびベータ-D-フルクトース分子からなる二糖）をグルコースおよびフルクトースに変換する能力を有するタンパク質（EC 3.2.1.26）を指す。サッカロミセス・セレビシア（*Saccharomyces cerevisiae*）では、インベルターゼをコードする遺伝子は *Suc2* である。

10

【0037】

用語「細胞外インベルターゼ」は、微生物細胞が増殖する培地に分泌されるインベルターゼを指す。したがって、細胞外インベルターゼ活性は、典型的には、培地自体のみで測定される。これに対して、「全細胞インベルターゼ」は、細胞外に分泌されないが、その代りに細胞内部の細胞膜周辺腔に分泌されるインベルターゼを指す。典型的には、全細胞インベルターゼ活性は、全細胞のみで測定される。細胞外インベルターゼ活性対全細胞活性の相対量（すなわち、パーセント）は、以下のように決定される： $100 \times \text{培地中のインベルターゼ活性} / [(\text{全細胞のインベルターゼ活性}) + (\text{培地中のインベルターゼ活性})]$ 。

20

【0038】

用語「アルカリ性細胞外プロテアーゼ」または「AEP」は、*Y. lipolytica* の XPR2 遺伝子によりコードされるタンパク質（EC 3.4.21.-）を指す。AEPは、この酵母により分泌される主要な細胞外タンパク質（培地1リットル当たり1グラム超）であり、無細胞培地上清に存在するタンパク質の99%を占める。完全長プロテアーゼのN末端は、成熟タンパク質のプロセッシングおよび分泌に関与する「プレ/プロ」領域を含有する。

【0039】

用語「目的の非天然生成物」は、野生型微生物内で天然には産生されない任意の生成物を指す。典型的には、目的の生成物である異種タンパク質の発現を可能にするために、宿主微生物へ適切な異種遺伝子を導入する組換え手段によって、目的の非天然生成物は産生される。好ましい目的の非天然生成物の非限定例としては、これらに限定されないが、多価不飽和脂肪酸、カロテノイド、アミノ酸、ビタミン、ステロール、フラボノイド、有機酸、ポリオールおよびヒドロキシエステル、キノン誘導体化合物、ならびにリスベラトロールが挙げられる。

30

【0040】

用語「目的の非天然生成物をコードする少なくとも1つの異種遺伝子」は、それが導入される宿主微生物とは異なる起源に由来する遺伝子を指す。異種遺伝子は、宿主微生物における目的の非天然生成物の産生を促進する。一部の 경우에는、中間段階または経路中間体をまったく経ずに、所望する目的の生成物への基質の直接変換を触媒する単一の異種遺伝子のみが、目的の生成物の産生を可能にするために必要となり得る。あるいは、所望する目的の非天然生成物を産生するための一連の反応が起こるように、新しい生合成経路をコードする一連の遺伝子を微生物へ導入することが望ましい場合もある。

40

【0041】

一般に、用語「油性」は、エネルギー源を油の形態で貯蔵する傾向がある生物を指す（Weete, In: *Fungal Lipid Biochemistry*, 2nd Ed., Plenum, 1980）。この過程の間、油性微生物の細胞油含量は一般にシグモイド曲線に従い、脂質濃度は、後期対数増殖期または初期定常増殖期に最大に達するま

50

で増加し、次いで、後期定常期および死滅期の間に徐々に減少する (Yongmanitchai and Ward, Appl. Environ. Microbiol., 57: 419-25 (1991))。本出願の目的のためには、用語「油性」は、油としてそれらの乾燥細胞重量 [「DCW」] の少なくとも約 25% を蓄積することができる微生物を指す。

【0042】

用語「油性酵母」は、油を製造することができる酵母として分類される油性微生物を指す。すなわち、この酵母では、それらの DCW の約 25% を上回る油を蓄積することができる。油性酵母の例としては、これらに限定する意図はないが、以下の属、すなわちヤロウィア属 (Yarrowia)、カンジダ属 (Candida)、ロドトルラ属 (Rhodotorula)、ロドスポリジウム属 (Rhodospiridium)、クリプトコックス属 (Cryptococcus)、トリコスボロン属 (Trichosporon)、およびリポマイセス属 (Lipomyces) が挙げられる。酵母の DCW の約 25% を上回る油を蓄積する能力は、組換え工学の努力を介するものでも、または生物の天然の能力を介するものでもよい。

10

【0043】

用語「炭素源」は、エネルギーを得るために微生物が代謝する炭素を含む栄養素を指す。例えば、野生型 Y. リポリティカ (Y. lipolytica) は、グルコース、フルクトース、グリセロール、酢酸、アルコール、アルカン、脂肪酸、およびトリグリセリドを含む種々の炭素源を使用することができる；しかしながら、それは唯一の炭素源としてスクロースを使用することができない (Barth, G. and C. Gaillardin, FEMS Microbiol. Rev., 19: 219-237 (1997))。これに対して、本発明の組換え Y. リポリティカ (Y. lipolytica) は、唯一の発酵性炭素源として、または他の適切な炭素源と組み合わせてスクロースを使用することができる。

20

【0044】

用語「微生物宿主細胞」および「微生物宿主生物」は、本明細書で互換的に使用し、外来または異種遺伝子を受け入れることができ、それらの遺伝子を発現することができる微生物を指す。「組換え微生物宿主細胞」は、組換え操作された (例えば、微生物宿主細胞が外因性ポリヌクレオチドで形質転換されたように) 微生物宿主細胞を指す。

30

【0045】

本明細書で使用する場合、「単離核酸断片」は、合成、非天然、または改変のヌクレオチド塩基を場合によっては含有する、一本鎖または二本鎖の RNA または DNA のポリマーである。DNA ポリマー形態の単離核酸断片は、cDNA、ゲノム DNA、または合成 DNA の 1 つまたは複数のセグメントから構成されてもよい。

【0046】

アミノ酸またはヌクレオチド配列の「実質的な部分」とは、当業者による配列のマニュアル評価または BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul, S.F., et al., J. Mol. Biol., 215: 403-410 (1993)) などのアルゴリズムを用いる、コンピュータによる自動配列比較および同定のいずれかによって、そのポリペプチドまたは遺伝子を推定的に同定するのに十分なポリペプチドのアミノ酸配列または遺伝子のヌクレオチド配列を含む部分である。一般に、公知のタンパク質または遺伝子に相同なものとしてポリペプチド配列または核酸配列を推定的に同定するためには、10 個以上の連続したアミノ酸配列または 30 個以上のヌクレオチド配列が必要である。さらに、ヌクレオチド配列に関しては、20~30 個の連続したヌクレオチドを含む遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプローブを、遺伝子の同定 (例えば、サザンハイブリダイゼーション) および単離 (例えば、細菌コロニーまたはバクテリオファージブランクのインサイチューハイブリダイゼーション) の配列依存的方法に使用することができる。加えて、プライマーを含む特定の核酸断片を得るために、12~15 個の塩基の短いオリゴヌクレオチドを、ポリメラーゼ連鎖反応 (

40

50

「PCR」)の増幅プライマーとして使用することができる。したがって、ヌクレオチド配列の「実質的な部分」は、その配列を含む核酸断片を特異的に同定および/または単離するのに十分な配列を含む。

【0047】

用語「相補的」は、逆平行の配向で並列したときにワトソン-クリック型塩基対が可能なヌクレオチド塩基の2つの配列間の関係を述べる。例えば、DNAに関して、アデノシンはチミンと塩基対が可能であり、シトシンはグアニンと塩基対が可能である。

【0048】

「コドン縮重」は、コードされたポリペプチドのアミノ酸配列に影響を及ぼすことなく、ヌクレオチド配列の変異を許容する遺伝暗号の性質を指す。当業者は、所与のアミノ酸を指定するヌクレオチドコドンの使用において特定の宿主細胞が示す「コドンバイアス」について十分承知している。したがって、宿主細胞における発現の改善を目的として遺伝子を合成する場合、そのコドン使用頻度が、宿主細胞の好ましいコドン使用頻度に近づくように遺伝子を設計することが望ましい。

【0049】

「合成遺伝子」は、当業者に公知の手順を用いて、化学的に合成されるオリゴヌクレオチドビルディングブロックから組み立てることができる。これらのビルディングブロックを連結しアニールして遺伝子セグメントを形成した後、酵素的に組み立てて遺伝子全体を構築する。したがって、宿主細胞のコドンバイアスを反映するヌクレオチド配列の最適化に基づいて、最適な遺伝子発現のための遺伝子を構築することができる。当業者は、宿主が好むコドンの方向へコドン使用をバイアスすると、遺伝子発現が成功する可能性が高まることを認識している。好ましいコドンは、配列情報が利用可能である宿主細胞に由来する遺伝子の調査に基づいて決定することができる。例えば、Y.リポリティカ(Y. lipolytica)のコドン使用プロフィールは、参照によって本明細書に組み込まれる米国特許第7,125,672号明細書に提供されている。

【0050】

「遺伝子」は、特定のタンパク質を発現する核酸断片を指し、コード領域のみを指すことも、またはコード配列の前(5'非コード配列)およびコード配列の後(3'非コード配列)に調節配列を含むこともある。「天然遺伝子」は、それ自体の調節配列を有する、天然に見出される遺伝子を指す。「キメラ遺伝子」は、天然では一緒に見出されないことがない制御配列およびコード配列を含む、天然遺伝子ではない任意の遺伝子を指す。したがって、キメラ遺伝子は、異なる供給源に由来する調節配列およびコード配列を含むことも、または同じ供給源に由来するが、天然に見出される様式とは異なる様式で配置された調節配列およびコード配列を含むこともある。「内因性遺伝子」は、生物ゲノム内のその天然位置にある天然遺伝子を指す。「外来」遺伝子(または「外因性」遺伝子)は、遺伝子移入により宿主生物に導入される遺伝子を指す。外来遺伝子は、非天然生物に挿入された天然遺伝子、天然宿主内の新たな位置に導入された天然遺伝子、またはキメラ遺伝子を含むことができる。「導入遺伝子」は、形質転換手順によりゲノムに導入された遺伝子である。「コドン最適化遺伝子」は、そのコドン使用頻度が宿主細胞の好ましいコドン使用頻度を模倣するように設計された遺伝子である。

【0051】

「コード配列」は、特定のアミノ酸配列をコードするDNA配列を指す。

【0052】

「適切な調節配列」は、コード配列の上流(5'非コード配列)、内部、または下流(3'非コード配列)に位置し、転写、RNAのプロセッシングもしくは安定性、または関連コード配列の翻訳に影響を及ぼすヌクレオチド配列を指す。調節配列としては、プロモーター、エンハンサー、サイレンサー、5'非翻訳リーダー配列(例えば、転写開始部位と翻訳開始コドンの間)、イントロン、ポリアデニル化認識配列、RNAプロセッシング部位、エフェクター結合部位、およびステムループ構造を挙げることができる。

【0053】

10

20

30

40

50

「プロモーター」は、コード配列または機能RNAの発現を制御することができるDNA配列を指す。一般に、コード配列はプロモーター配列の3'側に位置する。プロモーターは、その全体が天然遺伝子に由来すること、または天然に見出される様々なプロモーターに由来した様々なエレメントから構成されていること、または合成DNAセグメントをさらに含んでいることもある。異なる組織もしくは細胞型において、または異なる発生段階で、または異なる環境もしくは生理学的条件にตอบสนองして、異なるプロモーターが遺伝子の発現を指示しうることを当業者は理解している。ほとんどの細胞型でほとんど常に遺伝子の発現を誘導するプロモーターは、「構成的プロモーター」と一般に呼ばれる。ほとんどの場合で、調節配列の正確な境界が完全には画定されていないので、様々な長さのDNA断片が同一のプロモーター活性を示しうることもまた認識されている。

10

【0054】

用語「3'非コード配列」および「転写ターミネーター」は、本明細書で互換的に使用し、コード配列の3'側下流に位置するDNA配列を指す。これには、ポリアデニル化認識配列およびmRNAプロセッシングまたは遺伝子発現に影響を及ぼすことができる調節配列をコードする他の配列が含まれる。ポリアデニル化シグナルは、mRNA前駆体の3'末端へのポリアデニル酸トラクトの付加に影響を及ぼすことを通常特徴とする。3'領域は、転写、RNAのプロセッシングもしくは安定性、または関連コード配列の翻訳に影響を及ぼすことができる。

【0055】

用語「作動可能に連結される」は、一方の機能が他方の機能に影響を及ぼすように、単一核酸断片上で核酸配列が関連していることを指す。例えば、プロモーターがそのコード配列の発現に影響を及ぼすことができる場合、そのプロモーターはコード配列に作動可能に連結されている。すなわち、そのコード配列はそのプロモーターの転写制御下にある。コード配列は、センス方向またはアンチセンス方向で調節配列に作動可能に連結することができる。

20

【0056】

本明細書で使用する用語「発現」は、センス(mRNA)またはアンチセンスRNAの転写および安定な蓄積を指す。発現はまた、mRNAのポリペプチドへの翻訳を指すこともある。

【0057】

「形質転換」は、宿主生物への核酸分子の移入を指す。核酸分子は、自律的に複製するプラスミドであってもよく、宿主生物のゲノムに組み込まれてもよい。形質転換された核酸断片を含有する宿主生物は、「トランスジェニック」もしくは「組換え」もしくは「形質転換された」生物、または「形質転換体」と呼ばれる。

30

【0058】

「安定な形質転換」は、遺伝学的に安定な遺伝をもたらす、核および細胞小器官のゲノムを含む、宿主生物のゲノムへの核酸断片の移入を指す(すなわち、この核酸断片は「安定に組み込まれる」)。これに対して、「一時的な形質転換」は、組込みまたは安定な遺伝を伴わない遺伝子発現をもたらす、宿主生物の核またはDNA含有細胞小器官への核酸断片の移入を指す。

40

【0059】

用語「プラスミド」および「ベクター」は、細胞の中心的代謝の一部ではない遺伝子を運ぶことが多く、通常は環状二本鎖DNA断片の形態をとる染色体外エレメントを指す。このようなエレメントは、任意の供給源に由来する一本鎖または二本鎖のDNAまたはRNAの自己複製配列、ゲノム組込み配列、ファージ、またはヌクレオチド配列であってもよく、かつ線状であっても環状であってもよい。そこでは、いくつかのヌクレオチド配列が連結または組み換えられて、細胞に発現カセットを導入することができるユニークな構成になっている。

【0060】

用語「発現カセット」は、選択された遺伝子のコード配列と、選択された遺伝子生成物

50

の発現に必要とされる、コード配列の前（5'非コード配列）および後（3'非コード配列）の調節配列とを含むDNAの断片を指す。したがって、発現カセットは、典型的には、1)プロモーター配列、2)コード配列（すなわち、翻訳領域[「ORF」]）、および3)真核生物ではポリアデニル化部位を通常含有する3'非翻訳領域（すなわち、ターミネーター）から構成される。発現カセットは、クローニングおよび形質転換を容易にするためにベクター内に通常含まれる。それぞれの宿主のために適正な調節配列を使用する限り、種々の発現カセットを、細菌、酵母、植物、および哺乳類の細胞を含む種々の生物に形質転換することができる。

【0061】

用語「配列分析ソフトウェア」は、ヌクレオチド配列またはアミノ酸配列の解析に有用な任意のコンピュータアルゴリズムまたはソフトウェアプログラムを指す。「配列分析ソフトウェア」は市販のものでも、独自に開発されたものでもよい。典型的な配列分析ソフトウェアとしては、これらに限定されないが、1)GCGプログラムスイート(Wisc Consin Package Version 9.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI); 2)BLASTP、BLASTN、BLASTX (Altschul et al., J. Mol. Biol., 215: 403-410 (1990)); 3)DNASTAR (DNASTAR, Inc. Madison, WI); 4)Sequencher (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI); および5)スミス-ウォーターマンアルゴリズムを組み込んだFASTAプログラム(W. R. Pearson, Comput. Methods Genome Res., [Proc. Int. Symp.] (1994), Meeting Date 1992, 111-20. Editor(s): Suhai, Sandor. Plenum: New York, NY)が挙げられる。本出願の文脈内では、配列分析ソフトウェアを分析に使用する場合は、別段の定めがない限り、分析の結果は、参照プログラムの「デフォルト値」に基づくものであることを理解されたい。本明細書で使用する「デフォルト値」は、ソフトウェアを最初に初期化したときに、初めにロードされる値またはパラメーターの任意のセットを意味する。

【0062】

核酸配列またはポリペプチド配列の文脈における「配列同一性」または「同一性」は、指定された比較ウィンドウにわたって最大の一致を得るようにアライメントすると同じになる、2つの配列内の核酸塩基またはアミノ酸残基を指す。したがって、「配列同一性パーセント」または「パーセント同一性」は、比較ウィンドウにわたって最適にアライメントされた2つの配列を比較して決定される値を指し、比較ウィンドウ内のポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列の一部は、2つの配列の最適アライメントのために、参照配列（付加または欠失を含まない）との比較で付加または欠失（すなわちギャップ）を含んでもよい。パーセントは、両方の配列内で同一の核酸塩基またはアミノ酸残基が存在する位置の数を判定してマッチした位置の数を得て、比較ウィンドウ内の位置の総数でマッチした位置の数を除し、配列同一性パーセントを得るためにその結果に100を乗じることにより計算することができる。

【0063】

「パーセント同一性」および「パーセント類似性」を決定する方法は、一般に入手できるコンピュータプログラムの中に成文化されている。パーセント同一性およびパーセント類似性は、これらに限定されないが、1)Computational Molecular Biology (Lesk, A. M., Ed.) Oxford University: NY (1988); 2)Biocomputing: Informatics and Genome Projects (Smith, D. W., Ed.) Academic: NY (1993); 3)Computer Analysis of Sequence Data, Part I (Griffin, A. M., and Griffin, H. G., Eds.) Humana: NJ (1994); 4)Sequence Analysis in Molecular Biology (von Heinje,

G., Ed.) Academic (1987); および 5) Sequence Analysis Primer (Gribskov, M. and Devereux, J., Eds.) Stockton: NY (1991) を含む、公知の方法によって容易に計算することができる。

【0064】

配列アラインメントおよびパーセント同一性またはパーセント類似性の計算は、相同配列を検出するように設計された種々の比較法を使用して求めることができる。

【0065】

配列の多重アライメントは、(Higgins and Sharp, CABIOS, 5:151-153 (1989); Higgins, D.G. et al., Comput. Appl. Biosci., 8:189-191 (1992) により記載され)、上記 MegAlign (商標) (バージョン 8.0.2) プログラムに見出される、「ClustalV アライメント法」および「Clustal アライメントW法」を含む、いくつかの種類のアルゴリズムを包含する「Clustal アライメント法」を使用して実施することができる。いずれかの Clustal プログラムを用いて配列アラインメントをした後、プログラム中の「配列距離」表を見ることにより、「パーセント同一性」を得ることができる。

【0066】

本明細書で使用する標準の組換え DNA および分子クローニングの手法は、当技術分野で周知であり、Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1989) (これ以降「Maniatis」); Silhavy, T.J., Brennan, M.L. and Enquist, L.W., Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1984); および Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, published by Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience, Hoboken, NJ (1987) により記載されている。

【0067】

Y. リポリティカ (Y. lipolytica) は、炭素源としてスクロースを使用するように組換え操作することができる。これには、グルコースおよびフルクトースへのスクロースの変換を触媒するインペルターゼをコードする遺伝子を発現するように生物を操作することが含まれた。しかしながら、スクロースは酵母が増殖する培地中に存在するので、細胞内インペルターゼによる加水分解に先だってスクロースを細胞内に輸送する必要がある、または培地中のスクロースを、その後細胞に輸送することができるグルコースおよびフルクトースに加水分解できる細胞外にインペルターゼを発現すべきである。インペルターゼが周辺培地中、細胞外に分泌されるように、シグナル配列を異種インペルターゼ遺伝子に融合することが好ましい。

【0068】

グルコースおよびフルクトースへのスクロースの変換を触媒する機能的インペルターゼ (EC 3.2.1.26; 「 α -フルクトフラノシダーゼ」とも呼ばれる) の発現により、サッカロミセス・セレビシア (Saccharomyces cerevisiae) はスクロースを発酵させる。S. セレビシア (S. cerevisiae) の同じ SUC2 対立遺伝子から発現されるインペルターゼには2つの形態、すなわちグルコース抑制により調節される分泌型グリコシル化形態および構成的に産生する細胞内非グリコシル化形態がある。これらの2つの形態間の差は、分泌型グリコシル化インペルターゼの合成に必要な 5' - シグナル配列の有無に起因する。このシグナル配列は、インペルターゼタン

パク質の最初の19個のアミノ酸として定義されている(Perlman, D., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 79: 781-785 (1982); Carlson and Botstein, Cell, 28(1): 145-54 (1982); Taussig and Carlson, Nucleic Acids Res., 11: 1943-54 (1983))。

【0069】

したがって、完全長S.セルビスシア(S. cerevisiae) SUC2 [「ScSUC2」] 遺伝子(配列番号1)は、グリコシル化形態でS.セルビスシア(S. cerevisiae)の周辺質に分泌される、532個のアミノ酸の完全長インベルターゼ(配列番号2)をコードする、長さが1599個のヌクレオチドである。これに対して、「成熟」ScSUC2 遺伝子[「m-ScSUC2」]は、配列番号1のヌクレオチド1~57によりコードされた、アミノ酸長が19個の5'シグナル配列を欠損しており、したがって、細胞内非グリコシル化形態のm-ScSUC2は、配列番号3(配列番号1のヌクレオチド58~1599に相当する)として示される、1542bpのヌクレオチド配列によりコードされ、この配列が翻訳されて、513個のアミノ酸の短縮m-ScSUC2タンパク質(配列番号4)が生成する。

10

【0070】

細胞の膜を介して分泌されるタンパク質は、一般に、「プレ」タンパク質として細胞内で生成される。その形態では、タンパク質は、その分泌および局在化をおそらく支援するが、分泌過程の間に分泌型「成熟」タンパク質から最終的に切断される付加的な「シグナル」ポリペプチド配列に融合している。プレタンパク質のシグナルペプチドは、ある種の類似性を共有するものの、それらの一次構造は相当異なっている。これは、それぞれのタンパク質が、細胞膜を介して特定のそのタンパク質が移行するのに特によく適したシグナル配列と共に進化してきたことを示唆する。

20

【0071】

上記のように、Y.リポリティカ(Y. lipolytica)は、培地中に大量のAEPを天然に分泌する。配列番号6(長さが454個のアミノ酸)の完全長Y.リポリティカ(Y. lipolytica) AEPは、1365bpのXPR2 遺伝子(配列番号5)によりコードされる。このプロテアーゼのN末端157個のアミノ酸残基は、成熟タンパク質のプロセッシングおよび分泌に関与するシグナル配列およびプレ/プロ領域を含有する。

30

【0072】

詳細な研究により、AEPは、プレプロI - プロII - プロIIIのN末端領域を伴って合成されることが示され、AEPの4つの異なる前駆体が検出された。アミノ酸位置1~13は、分泌に関与するシグナル配列を含有し、その後の位置14~33には、典型的なジペプチジルアミノペプチターゼ認識部位である一連の-Xaa-Ala-および-Xaa-Pro-がある。アミノ酸位置54または60は、プロIおよびプロIIの領域間の切断部位と思われるが、位置129または131は、プロIIおよびプロIIIの領域間の別の切断部位である。最後に配列番号6のアミノ酸位置157は、プロIIIおよび成熟AEPの間の切断部位である(Matoba, S. et al., Mol. Cell Biol., 8(11): 4904-4916 (1988); 米国特許第4,937,189号明細書および欧州特許第0220864B1号明細書も参照のこと)。アミノ酸1~157に相当するプレ/プロ領域は、タンパク質フォールディング、効率的な分泌、早期活性化の防止等に関与することが示唆されている; プレ/プロ領域が切断されないと、AEPタンパク質は機能的にならない。

40

【0073】

Xpr2プレプロ領域は、Y.リポリティカ(Y. lipolytica)における種々の異種タンパク質の分泌に使用されてきた; しかしながら、タンパク質分泌のためのXpr2プレプロ領域の使用では、様々な結果が得られている(Madzak, C., et al., Microbiology, 145(1): 75-87 (1999))。不満

50

足なタンパク質発現の理由としては、不完全なタンパク質プロセッシング (Park, C. S., et al., J. Biol. Chem., 272: 6876 - 6881 (1997); Park, C. S., et al., Appl. Biochem. Biotechnol., 87: 1 - 15 (2000); Swennen, D., et al., Microbiology, 148: 41 - 50 (2002)) および細胞外発現の欠如 (Hamsa, P. V. and B. B. Chattoo, Gene, 143: 165 - 70 (1994); Tharaud, C., et al., Gene, 121: 111 - 119 (1992)) が挙げられる。したがって、プロ配列は、異種タンパク質の分泌には必要がない可能性またはむしろ有害である可能性が示唆された (Madzak, C., et al., J. Biotechnol., 109: 63 - 81 (2004); Park, et al., J. Biol. Chem. (上記); Tharaud, C., et al., (上記))。これは、Tabuchi, M. ら (J. Bacteriol., 179: 4179 - 4189 (1997)) により示され、そこではカルボキシペプチダーゼ Y (CPY) のプレプロ領域がシゾサッカロミセス・ボンベ (Schizosaccharomyces pombe) 由来の Suc2 の分泌に効果がなかった。

10

20

30

40

50

【0074】

ScSuc2 シグナル配列 (配列番号 1 のヌクレオチド 1 ~ 57 [すなわち、ScSUC2 のアミノ酸 1 ~ 19] に相当する) を発現するコンストラクトに PciI 制限酵素部位を導入するために、アミノ酸位置 2 を変異させた。その結果、野生型 Leu2 残基が Phe2 (別の疎水性残基) に変異し、それにより ScSuc2 の分泌過程に影響を及ぼさずに、シグナル配列の疎水性が維持された (Kaiser, C. A., et al., Science, 235: 312 - 317 (1987))。したがって、本発明の適切な ScSuc2 シグナル配列の 1 つ (すなわち「Suc2SS」) を、配列番号 7 および 8 として本明細書に示す。

【0075】

Xpr2 プレ/プロ領域を含むコンストラクトは、配列番号 10 のアミノ酸 1 ~ 170 をコードするように設計した。Xpr2 プレ/プロ領域は、配列番号 6 のアミノ酸 1 ~ 57 のみを包含するとして本明細書に記載したが、融合物連結部の不正確なプロセッシングが推定上の二次構造によるものとあらかじめ留意されていたので (Park, C. S., et al., J. Biol. Chem., 272: 6876 - 6881 (1997))、Lys156 - Arg157 切断部位に Xpr6 エンドペプチダーゼが確実に到達するように、プレ/プロ領域の後に、プロテアーゼの追加の 13 個のアミノ酸 (すなわち、N 末端 Xpr2 断片) を「リンカー」として含めた。したがって、本発明の適切な Xpr2 プレ/プロ領域および N 末端 Xpr2 断片の 1 つ (すなわち「XPR2PP+13」) を、配列番号 9 および 10 として本明細書に示す。

【0076】

下記の表 2 に要約し、図 1 に示す発現カセットについて、形質転換された Y. リポリティカ (Y. lipolytica) におけるインベルターゼ発現を評価した。より具体的には、発現プラスミド pYRH68 は、成熟 SUC2 をコードする遺伝子 (すなわち、配列番号 3; 「m-ScSUC2」) に融合した Suc2SS シグナル配列を含み、発現プラスミド pYRH70 は、配列番号 3 に融合した Suc2SS シグナル配列を 2 コピー含み、発現プラスミド pYRH69 は、配列番号 3 に融合した Xpr2 プレ/プロ領域および N 末端 Xpr2 断片と Suc2SS シグナル配列の両方を含み、発現プラスミド pYRH73 は、配列番号 3 のみを含み (かつ Xpr2 プレ/プロ領域および N 末端 Xpr2 断片も、分泌に関与するシグナル配列としての Suc2SS シグナル配列も含まない)、そして発現プラスミド pYRH74 は、配列番号 3 に融合した Xpr2 プレ/プロ領域および N 末端 Xpr2 断片を含んだ。「FBAINmプロモーター領域」 (すなわち、fba1 遺伝子 [米国特許第 7,202,356 号明細書] によりコードされたフルクトース二リン酸アルドラーゼ酵素 (E.C. 4.1.2.13) の「ATG」翻訳開始コドンの前の 5' 側上流にある非翻訳領域に由来) を、インベルターゼ遺伝子コンストラクトに機能

的に連結した。

【 0 0 7 7 】

【 表 2 】

表 2. ヤロウィア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)細胞外インベルターゼ発現カセットの概要

シグナル配列	Xpr2 プレ/プロ領域 および N 末端 Xpr2 断片 ならびに/または SUC2 シグナル配列/成熟 SUC2 の配列番号	プラスミドコンストラクト (配列番号; 図番号)	形質転換された <i>Y.リポリティカ</i> (<i>Y.lipolytica</i>)の 表現型
Suc2SS (配列番号 8)	配列番号 11 および 12	pYRH68 (配列番号 13; 図 3A)	SUC+
Suc2SS (配列番号 8)	配列番号 11 および 12	pYRH70 (配列番号 14; 図 3B)	SUC+
XPR2PP+13 および Suc2SS (配列番号 10 および配列番号 8)	配列番号 16 および 17	pYRH69 (配列番号 18; 図 4B)	SUC-
--	配列番号 3 および 4	pYRH73 (配列番号 15; 図 4A)	SUC-
XPR2PP+13 (配列番号 10)	配列番号 19 および 20	pYRH74 (配列番号 18; 図 5)	SUC+

10

20

【 0 0 7 8 】

上記プラスミドコンストラクトのそれぞれを発現する *Y.リポリティカ* (*Y. lipolytica*) 形質転換体を、スクロースを唯一の炭素源とする培地上で増殖させた。成熟 SUC2 (ScSuc2 [すなわち、配列番号 2] をコードする完全長遺伝子に事実上相当する) をコードする遺伝子に融合した Suc2SS シグナル配列 (すなわち、pYRH68 および pYRH70) または成熟 SUC2 をコードする遺伝子に融合した Xpr2 プレ/プロ領域および N 末端 Xpr2 断片 (すなわち、pYRH74) を発現する形質転換体のみがインベルターゼを発現した、すなわち、SUC+ 表現型であった。したがって、これは、それらの融合物が *Y.リポリティカ* (*Y. lipolytica*) に ScSUC2 の機能的な発現をもたらすことを示す。

30

【 0 0 7 9 】

一態様では、本発明は、スクロースインベルターゼ活性を有するポリペプチドをコードする外因性ポリヌクレオチドを含む、形質転換された *Y.リポリティカ* (*Y. lipolytica*) であって、

(a) 前記ポリペプチドが、成熟スクロースインベルターゼをコードするポリペプチド配列に融合したシグナル配列を含み; かつ

(b) 前記シグナル配列が、

(i) Xpr2 プレ/プロ領域および N 末端 Xpr2 断片; および

40

(ii) スクロースインベルターゼシグナル配列の 2 番目のアミノ酸が任意の疎水性アミノ酸であってよい、スクロースインベルターゼシグナル配列からなる群から選択され; かつ

(c) 成熟スクロースインベルターゼをコードする前記ポリペプチド配列が、配列番号 4 (「m-ScSUC2」) と比較されるとき、CLUSTALW アライメント法に基づく少なくとも 80% の配列同一性を有する

形質転換された *Y.リポリティカ* (*Y. lipolytica*) に関する。

【 0 0 8 0 】

好ましい実施形態では、本発明の形質転換された *Y.リポリティカ* (*Y. lipolytica*) は、炭素源として少なくともスクロースを含有する培地中で増殖させると、ス

50

クロースインベルターゼの少なくとも80%を細胞外に分泌することができる(細胞内[または周辺質]のインベルターゼ活性は、全インベルターゼ活性の20%以下である)。より好ましくは、細胞外インベルターゼ活性は、全インベルターゼ活性の少なくとも81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%である。

【0081】

上記に記載のように、配列番号4として本明細書に示す「成熟」ScSUC2タンパク質[「m-ScSUC2」]は、配列番号1のヌクレオチド1~57によりコードされる、19個のアミノ酸長の5'シグナル配列を欠如している。好ましくは、成熟スクロースインベルターゼをコードするポリペプチド配列は、配列番号4(「m-ScSUC2」)で示される。代替実施形態では、成熟スクロースインベルターゼは、配列番号4と比較されるとき、CLUSTALWアライメント法に基づく少なくとも80%の配列同一性を有する、すなわち、配列番号4と比較されるとき、このポリペプチドは少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有しうる。

【0082】

一実施形態では、Y.リポリティカ(Y. lipolytica)における発現のために、配列番号4をコドン最適化することが望ましいことがある。これは、Y.リポリティカ(Y. lipolytica)のコドン使用プロファイルに関する以前の決定、好まれるコドンの同定、および「ATG」開始コドン周辺のコンセンサス配列の決定(米国特許第7,238,482号明細書を参照のこと)に基づいて可能である。

【0083】

別の実施形態では、表14(実施例8)のインベルターゼ配列またはそれらの一部を本発明で 사용할 ことができる。あるいは、これらのいずれも、配列分析ソフトウェアを使用して、同種または他種のインベルターゼホモログを探索するために使用することができる。一般に、このようなコンピュータソフトウェアは、種々の置換、欠失、およびその他の改変に対して相同性の程度を割り当てることにより、類似配列をマッチさせる。低複雑性フィルターおよび以下のパラメーター:期待値=10、マトリックス=Blosum 62(Altschul, et al., Nucleic Acids Res., 25:3389-3402(1997))を用いるBLASTPアライメント法などのソフトウェアアルゴリズムの使用は、核酸配列またはタンパク質配列のデータベースに対して、表14の任意のインベルターゼタンパク質を比較し、それによって好ましい生物の範囲内で類似の公知配列を同定するための手段として周知である。

【0084】

公知配列のデータベースを詳細に検索するためのソフトウェアアルゴリズムの使用は、表14に記載のものなど、公的に入手可能なインベルターゼ配列に対して比較的低いパーセント同一性を有するホモログの単離に特に適している。公的に利用可能なインベルターゼ配列に対して少なくとも約80%~85%同一であるインベルターゼホモログの単離は比較的容易であると予測できる。さらに、少なくとも約85%~90%同一の配列は、単離に特に適しており、少なくとも約90%~95%同一の配列は、最も容易に単離されよう。

【0085】

一部のインベルターゼホモログは、インベルターゼ酵素にユニークなモチーフの使用によっても単離されている。モチーフは、タンパク質ホモログファミリーのアライメントされた配列が高度に保存されていることにより同定される。ユニークな「サイン」としてのモチーフにより、新しく決定された配列が以前に同定されたタンパク質ファミリーに属するものか否かを決定することができる。これらのモチーフは、新規インベルターゼ遺伝子を迅速に同定するための診断ツールとして有用である。

【0086】

本明細書または公開文献に記載されているインベルターゼの任意の核酸断片または同定された任意のホモログを使用して、同種または他種由来のホモログタンパク質をコードする遺伝子を単離することができる。配列依存プロトコルを用いるホモログ遺伝子の単離は当技術分野で周知である。配列依存プロトコルの例としては、これらに限定されないが、1) 核酸ハイブリダイゼーション法；2) ポリメラーゼ連鎖反応[「PCR」](米国特許第4,683,202号明細書)、リガーゼ連鎖反応[「LCR」](Tabor, S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 82:1074(1985))、または鎖置換増幅[「SDA」](Walker, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 89:392(1992))などの核酸増幅技術の種々の使用により例示されるDNAおよびRNA増幅法；ならびに3) 相補性によるライブラリ構築およびスクリーニングの方法が挙げられる。

10

【0087】

本発明の形質転換されたY.リポリティカ(Y. lipolytica)は、スクロースインベルターゼ活性を有するポリペプチドをコードする外因性ポリヌクレオチドであって、このポリペプチドが、成熟スクロースインベルターゼをコードする外因性ポリヌクレオチドに融合したシグナル配列を含み、前記シグナル配列が、1) Xpr2プレ/プロ領域およびN末端Xpr2断片、ならびに2) 2番目のアミノ酸が任意の疎水性アミノ酸であってよい、スクロースインベルターゼシグナル配列からなる群から選択される外因性ポリヌクレオチドを含む。

20

【0088】

Xpr2プレ/プロ領域およびN末端Xpr2断片を含むシグナル配列に関して、当業者は、アルカリ性細胞外プロテアーゼ(EC 3.4.21.-)をコードする適切なXPR2遺伝子を分析して、成熟タンパク質をコードする配列に対してプレ/プロ領域をコードする配列を同定することができよう。例えば、SignalP 4.0サーバー(Center for Biological Sequence Analysis, Department of Systems Biology, Technical University of Denmark, DK-2800 Lyngby, Denmark)は、種々の生物に由来するアミノ酸配列におけるシグナルペプチド切断部位の存在および位置を予測するのに有用である(Nielsen, H., et al., Protein Engineering, 10:1-6(1997); Petersen, T. N., et al., Nature Methods, 8:785-786(2011))。この同定に続いて、完全長Xpr2プレ/プロ領域および成熟Xpr2タンパク質(すなわち、AEP)の追加のN末端断片をコードする適切な配列を単離することが容易に可能である。

30

【0089】

このN末端Xpr2断片は、プレ/プロ領域と成熟タンパク質の間の切断部位にXpr6エンドペプチダーゼが確実に到達するように、少なくとも成熟プロテアーゼのほぼアミノ酸1~10から最大で成熟プロテアーゼのほぼアミノ酸1~25をコードする(ただし、N末端断片の正確な長さは、利用した各XPR2遺伝子ごとに実験的に決定される必要がある)。

40

【0090】

より好ましくは、成熟プロテアーゼのN末端Xpr2断片は、成熟プロテアーゼのアミノ酸1~11、アミノ酸1~12、アミノ酸1~13、アミノ酸1~14、アミノ酸1~15、アミノ酸1~16、アミノ酸1~17、アミノ酸1~18、アミノ酸1~19、アミノ酸1~20、アミノ酸1~21、アミノ酸1~22、アミノ酸1~23、または成熟プロテアーゼのアミノ酸1~24をコードすることになる。

【0091】

Y.リポリティカ(Y. lipolytica)由来のXpr2プレ/プロ領域およびN末端Xpr2断片は、Xpr2プレ/プロ領域の少なくとも157個のアミノ酸(すな

50

わち、配列番号6のアミノ酸1～157)および成熟プロテアーゼをコードする追加のN末端Xpr2断片(すなわち、配列番号6のアミノ酸158～167、またはアミノ酸158～168、またはアミノ酸158～169、またはアミノ酸158～170、またはアミノ酸158～171、またはアミノ酸158～172、またはアミノ酸158～173、またはアミノ酸158～174、またはアミノ酸158～175、またはアミノ酸158～176、またはアミノ酸158～177、またはアミノ酸158～178、またはアミノ酸158～179、またはアミノ酸158～180、またはアミノ酸158～181、またはアミノ酸158～182)を含むことになる。

【0092】

好ましいXpr2プレ/プロ領域およびN末端Xpr2断片(すなわち、配列番号10で示す「XPR2PP+13」)は、配列番号6のアミノ酸1～170を含み、この断片は、Xpr6エンドペプチダーゼがLys156-Arg157切断部位に確実に到達するように、Xpr2プレ/プロ領域の後に追加の13個のアミノ酸(すなわち、成熟プロテアーゼのアミノ酸1～13)を含むものに相当した。したがって、Xpr2プレ/プロ領域およびN末端Xpr2断片は、

(a) AEP前駆体のN末端157個のアミノ酸を含むXpr2プレ/プロ領域;および

(b) 成熟AEPのN末端13個のアミノ酸を含むN末端Xpr2断片を含む。

【0093】

Y・リポリティカ(Y・lipolytica)に形質転換することができる、スクロースインベルターゼ活性を有するポリヌクレチドをコードする好ましい外因性ポリヌクレオチドの1つは、配列番号4(「m-ScSUC2」)の成熟スクロースインベルターゼに融合した、配列番号10のXpr2プレ/プロ領域およびN末端Xpr2断片のシグナル配列を含むもので、それによって、配列番号19として示されるヌクレオチド配列を有し、配列番号20のタンパク質をコードするXPR2PP+13/m-ScSUC2融合物が生成する。

【0094】

スクロースインベルターゼ活性を有するポリペプチドをコードし、成熟スクロースインベルターゼをコードするポリペプチドに融合したシグナル配列を含む外因性ポリヌクレオチドを含む、形質転換されたY・リポリティカ(Y・lipolytica)は、スクロースインベルターゼシグナル配列の2番目のアミノ酸が任意の疎水性アミノ酸であってよいスクロースインベルターゼシグナル配列を代替的に利用することができる。

【0095】

当業者は、上記と同様の方法論を利用して、成熟インベルターゼタンパク質をコードする配列に対するインベルターゼシグナル配列をコードする配列を同定することができよう。いったん同定されれば、本明細書に記載のように、インベルターゼシグナル配列を単離して、スクロースインベルターゼ活性を有する融合ポリペプチドを構築することが容易に可能になる。明確さのために、スクロースインベルターゼシグナル配列および成熟スクロースインベルターゼを、単一種から単離することができ(それによって、その種の完全長インベルターゼプレタンパク質と事実上同等である)、あるいはスクロースインベルターゼシグナル配列を種「A」から単離し、成熟スクロースインベルターゼを種「B」から単離することができる。スクロースインベルターゼシグナル配列の2番目のアミノ酸は、任意の疎水性アミノ酸、例えば、ロイシン、フェニルアラニン、イソロイシン、バリン、またはメチオニンであってよい。

【0096】

インベルターゼシグナルペプチドを調べるこれまでの幾つかの研究では、本質的にランダムなアミノ酸配列の少なくとも20%が、少なくとも部分的に、インベルターゼの排出シグナルとして機能しうることが示されてきた。排出シグナルの機能は、シグナルペプチドの定義された構造または長さではなく疎水性と関連する(例えば、Kaiser et

10

20

30

40

50

al., Science, 235:312-317 (1987); Kaiser and Botstein, Mol. Cell. Biol., 6:2382-2391 (1986)を参照のこと)。さらに、天然のScSUC2シグナル配列と成熟ScSUC2との間の連結部配列は、シグナルペプチドの適切な切断にとって重要であることが知られている。例えば、配列番号2の残基Ala19がValに変異すると、ScSUC2は不完全になる(Schauer et al., J. Cell Biol., 100:1664-1075 (1985))。SUC2シグナル配列の改変に関するさらなる情報については、Ngseeら(Mol. Cell. Biol., 9:3400-3410 (1989))を参照されたい。

【0097】

一実施形態では、スクロースインベルターゼシグナル配列はサッカロミセス(Saccharomyces)属の生物に由来するものであってよい。より好ましくは、スクロースインベルターゼシグナル配列は、例えば、配列番号8[「Suc2SS」]で示されるスクロースインベルターゼシグナル配列など、サッカロミセス・セレビシア(Saccharomyces cerevisiae)から単離される。配列番号8の2番目のアミノ酸を代替の疎水性アミノ酸に置換することができ(すなわち、Phe2をLeu2、Ile2、Val2、またはMet2に変異させることができる)、それによってインベルターゼの分泌過程に影響を及ぼさず、シグナル配列の疎水性を維持することができる。より具体的には、本明細書において、形質転換されたY.リポリティカ(Y. lipolytica)で使用されるスクロースインベルターゼシグナル配列は、分泌活性が実質的に維持される限り、配列番号8と比較されるとき、少なくとも51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有することができる(例えば、Kaiser and Botstein, Mol. Cell. Biol., 6:2382-2391 (1986)を参照のこと)。

【0098】

Y.リポリティカ(Y. lipolytica)への形質転換を目的とする、スクロースインベルターゼ活性を有するポリヌクレチドをコードする好ましい外因性ポリヌクレオチドの1つは、配列番号4(「m-ScSUC2」)の成熟スクロースインベルターゼに融合した、配列番号8のスクロースインベルターゼシグナル配列を含むもので、それによって、配列番号11として示されるヌクレオチド配列を有し、配列番号12のタンパク質をコードするSuc2SS/m-ScSUC2融合物が生成する。

【0099】

配列番号12のSuc2SS/m-ScSUC2融合物は、例えば、Suc2SSシグナル配列が配列番号2のアミノ酸1~19に相当し、m-ScSUC2がアミノ酸20~532に相当する以上、配列番号2(アミノ酸2の変異を例外として)で示される完全長インベルターゼプレタンパク質に事実上同等であると認識されるべきである。したがって、例えば、スクロースインベルターゼ活性を有するポリペプチドは、配列番号2に対して少なくとも80%の配列同一性(CLUSTRALWアライメント法に基づいて)を有することができる。ただし、このポリペプチドは、配列番号2と比較されるとき、少なくとも81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有することがより好ましい。

【0100】

当業者は、1)DNA分子、プラスミド等の高分子の構築、操作、および単離のための特定の条件および手順; 2)組換えDNA断片および組換え発現コンストラクトの生成; ならびに3)クローンのスクリーニングおよび単離を記載する標準の資料教材を承知して

10

20

30

40

50

いる。Maniatis、Silhavy、およびAusubelを参照されたい。

【0101】

一般に、コンストラクトに含む配列の選択は、所望の発現産物、宿主細胞の性質、および非形質転換細胞に対して形質転換細胞を分離する提案された手段に依存する。典型的には、ベクターは、少なくとも1つの発現カセット、選択可能マーカー、自律複製または染色体組込みを可能にする配列を含有する。適切な発現カセットは、典型的には、プロモーター、選択遺伝子のコード配列、およびターミネーターを含む（すなわち、キメラ遺伝子）。両方の制御領域は形質転換された宿主細胞の遺伝子に由来することが好ましい。

【0102】

Y・リポリティカ（Y・lipolytica）由来の転写および翻訳領域が具体的には有用であるが、実際は、スクロースインペルターゼ活性があるポリペプチドをコードするORFの発現を指示することができるいずれのプロモーター（すなわち、天然、合成、またはキメラ）も適切であろう。発現の実行は誘導様式であっても構成様式であってもよい。誘導発現は、目的の遺伝子に作動可能に連結された調節可能プロモーターの活性を誘導することにより達成することができ、一方構成的発現は、目的の遺伝子に作動可能に連結された構成的プロモーターの使用により達成することができる。

10

【0103】

ターミネーターは、プロモーターが得られた遺伝子の3'領域に由来しても異なる遺伝子に由来してもよい。多数のターミネーターが公知であり、それらが由来した属および種が同じおよび異なるいずれの場合にも、利用に際して種々の宿主で十分に機能する。ターミネーターは、通常、何らかの特定の性質のためではなく便宜上で選択されることが多い。好ましくは、ターミネーターは酵母遺伝子由来である。当業者はターミネーターを設計および合成するために入手可能な情報を利用することができるので、ターミネーターは合成であってもよい。ターミネーターは不必要なこともあるが、高度に好ましいものである。

20

【0104】

限定を意図するものではないが、組換えY・リポリティカ（Y・lipolytica）で使用される好ましいプロモーターおよびターミネーターは、米国特許出願公開第2009-0093543-A1号明細書、米国特許出願公開第2010-0068789-A1号明細書、米国特許出願公開第2011-0059496-A1号明細書、米国仮特許出願第61/469,933号明細書（代理人整理番号（Attorney Docket Number）CL4736USPRV、2011年3月31日に出願）、米国仮特許出願第61/470,539号明細書（代理人整理番号CL5380USPRV、2011年4月1日に出願）、米国仮特許出願第61/471,736号明細書（代理人整理番号CL5381USPRV、2011年4月5日に出願）、および米国仮特許出願第61/472,742号明細書（代理人整理番号CL5382USPRV、2011年4月7日に出願）に教示のものであり、これらそれぞれの開示は、参照により本明細書に組み込むものとする。より具体的には、好ましいプロモーターとして、GPD、GPDIN、GPM、GPM/FBAIN、FBA、FBAIN、FBAINm、GPAT、YAT1、EXP1、DGAT2、EL1、ALK2、およびSPS19が挙げられる。

30

40

【0105】

多くの特殊化した発現ベクターが高い発現率を得るために作製されている。そのようなベクターは、転写、RNA安定性、翻訳、タンパク質の安定性および局在、ならびに宿主細胞からの分泌を統制する幾つかの性質を調整することにより作製される。これらの性質には、関係する転写プロモーター配列およびターミネーター配列の性質；クローン化遺伝子のコピー数（ここでは、追加のコピーは単一発現コンストラクト内にクローニングされてもよく、かつ/または追加のコピーは、プラスミドコピー数の増加によりもしくはゲノムへのクローン化遺伝子の多重組込みにより宿主細胞に導入されてもよい）；遺伝子がプラスミド担持であるか、または宿主細胞ゲノムに組み込まれるか；宿主生物におけるタンパク質の翻訳および正確なフォールディングの効率；宿主細胞内でのクローン化遺伝子の

50

mRNAおよびタンパク質の固有の安定性；ならびに宿主細胞の好ましいコドン使用頻度に近い頻度でのクローン化遺伝子内のコドン使用が含まれる。

【0106】

Y.リポリティカ(Y. lipolytica)での発現に適したDNAカセット(例えば、プロモーター、スクロースインベルターゼ活性を有するポリペプチドをコードするORF、およびターミネーターを含むキメラ遺伝子を含む)がいったん得られれば、宿主細胞において自律複製が可能なプラスミドベクターに配置するか、またはキメラ遺伝子を含むDNA断片をゲノムに直接組み込む。発現カセットの組み込みは、Y.リポリティカ(Y. lipolytica)ゲノム内でランダムに起こさせてもよく、または特定の遺伝子座との組換えを目的とするのに十分な宿主ゲノムとの相同領域を含むコンストラクトを使用することにより標的設定してもよい。コンストラクトの標的を内因性遺伝子座にする場合、転写および翻訳の制御領域の全部または一部を内因性遺伝子座から得ることができる。

10

【0107】

目的のキメラスクロースインベルターゼ遺伝子を含むコンストラクトを、任意の標準手法によりY.リポリティカ(Y. lipolytica)に導入することができる。これらの手法には、形質転換(例えば酢酸リチウム形質転換[Methods in Enzymology, 194:186-187(1991)]、遺伝子銃衝撃(bolistic impact)、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、または目的遺伝子を宿主細胞に導入する他の任意の方法が含まれる。Y.リポリティカ(Y. lipolytica)に適用可能なより具体的な教示として、米国特許第4,880,741号明細書および米国特許第5,071,764号明細書、ならびにChen, D.C.ら(Appl. Microbiol. Biotechnol., 48(2):232-235(1997))が挙げられる。好ましくは、Y.リポリティカ(Y. lipolytica)宿主細胞の形質転換では、宿主ゲノムへの線状DNA断片の組み込みが推奨される。高レベルの遺伝子発現が望ましい場合には、ゲノム内の複数の位置に組み込むことが具体的には有用となりうる。好ましい遺伝子座は、米国特許出願公開第2009-0093543-A1号明細書に教示のものを含む。

20

【0108】

用語「形質転換された」、「形質転換体」、および「組換え」は、本明細書において互換的に使用する。形質転換された宿主は、発現コンストラクトの少なくとも1つのコピーを有し、発現カセットがゲノムに組み込まれて増幅されるか否か、または複数のコピー数を有する染色体外エレメント上に存在するか否かに応じて2つ以上を有することになる。形質転換された宿主細胞は、導入コンストラクト上に含有されるマーカーに対する選択により同定することができる。あるいは、多くの形質転換手法が多くのDNA分子を宿主細胞に導入するので、別個のマーカーコンストラクトを所望のコンストラクトと同時に形質転換することができる。典型的には、形質転換された宿主は、選択培地上での増殖能力に対して選択され、選択培地は、抗生物質が組み込まれていることも、または栄養素(例えば、スクロース)もしくは増殖因子など、形質転換されていない宿主の増殖に必要な要素が欠損していることもある。導入されたマーカー遺伝子は、抗生物質抵抗性を付与するか、または必須増殖因子もしくは酵素をコードし、そのため形質転換された宿主で発現されたとき選択培地上での増殖を可能にする。発現されたマーカータンパク質を直接的または間接的に検出することができる場合も、形質転換された宿主の選択が可能になる。さらなる選択手法については、米国特許第7,238,482号明細書、米国特許第7,259,255号明細書、および国際公開第2006/052870号パンフレットに記載されている。

30

40

【0109】

Y.リポリティカ(Y. lipolytica)における組み込みDNA断片の安定性は、個々の形質転換体、受容株、および使用されるターゲティングプラットフォームに依存する。したがって、特定の組換え微生物宿主の複数の形質転換体を、所望の発現レベルお

50

よびパターンを示す株を得るためにスクリーニングすべきである。DNAプロットのサザン解析 (Southern, J. Mol. Biol., 98:503 (1975))、mRNA発現のノザン解析 (Kroczeck, J. Chromatogr. Biomed. Appl., 618 (1-2):133-145 (1993))、タンパク質発現のウエスタン解析、表現型解析、またはGC分析が適切なスクリーニング方法である。

【0110】

任意のY.リポリティカ (Y. lipolytica) を、本発明による、成熟スクロースインベルターゼをコードする適切なポリペプチド配列で形質転換して、炭素源としてスクロースを利用することができる形質転換された株を生成することができる米国培養細胞系統保存機関 (American Type Culture Collection) [「ATCC」] を通して得ることができる、容易に入手可能なY.リポリティカ (Y. lipolytica) 株の例としては、例えば、#8661、#8662、#9773、#15586、#16617、#16618、#18942、#18943、#18944、#18945、#20114、#20177、#20182、#20225、#20226、#20228、#20327、#20255、#20287、#20297、#20315、#20320、#20324、#20336、#20341、#20346、#20348、#20363、#20364、#20372、#20373、#20383、#20390、#20400、#20460、#20461、#20462、#20496、#20510、#20628、#20774、#20775、#20776、#20777、#20778、#20779、#20780、#20781、#20794、#20795、#20875、#20241、#20422、#20423、#32338、#32339、#32340、#32341、#34342、#32343、#32935、#34017、#34018、#34088、#34922、#38295、#42281、#44601、#46025、#46026、#46027、#46028、#46067、#46068、#46069、#46070、#46330、#46482、#46483、#46484、#60594、#62385、#64042、#74234、#76598、#76861、#76862、#76982、#90716、#90811、#90812、#90813、#90814、#90903、#90904、#90905、#96028、#201241、#201242、#201243、#201244、#201245、#201246、#201247、#201249または#201847が挙げられる。同様に、Herman J. Phaff Yeast Culture Collection, University of California Davis (Davis, CA) から、Y.リポリティカ (Y. lipolytica) の以下の株を入手することができる：Y.リポリティカ (Y. lipolytica) 49-14、Y.リポリティカ (Y. lipolytica) 49-49、Y.リポリティカ (Y. lipolytica) 50-140、Y.リポリティカ (Y. lipolytica) 50-46、Y.リポリティカ (Y. lipolytica) 50-47、Y.リポリティカ (Y. lipolytica) 51-30、Y.リポリティカ (Y. lipolytica) 60-26、Y.リポリティカ (Y. lipolytica) 70-17、Y.リポリティカ (Y. lipolytica) 70-18、Y.リポリティカ (Y. lipolytica) 70-19、Y.リポリティカ (Y. lipolytica) 70-20、Y.リポリティカ (Y. lipolytica) 74-78、Y.リポリティカ (Y. lipolytica) 74-87、Y.リポリティカ (Y. lipolytica) 74-88、Y.リポリティカ (Y. lipolytica) 74-89、Y.リポリティカ (Y. lipolytica) 76-72、Y.リポリティカ (Y. lipolytica) 76-93、Y.リポリティカ (Y. lipolytica) 77-12T、およびY.リポリティカ (Y. lipolytica) 77-17。あるいは、Laboratoire de Microbiologie et Genetique Moleculaire of Dr. Jean-Marc Nicaud, INRA Centre de Grignon, France から、例えば

10

20

30

40

50

、*Y. lipolytica* (JMY798 (Mlickova, K. et al., Appl. Environ. Microbiol., 70(7): 3918-24 (2004)), *Y. lipolytica* JMY399 (Barth, G., and C. Gaillardin. In, Nonconventional Yeasts In Biotechnology; Wolf, W.K., Ed.; Springer-Verlag: Berlin, Germany, 1996; pp 313-388) および *Y. lipolytica* (JMY154 (Wang, H. J., et al., J. Bacteriol., 181(17): 5140-8 (1999))) を含む株を入手することができる。

【0111】

Y. lipolytica 宿主細胞は油性、すなわち、油の合成および蓄積ができることが好ましく、そこでは、総油含有量は、乾燥細胞重量 [「DCW」] の約 25% 超、より好ましくは DCW の約 30% 超、および最も好ましくは DCW の約 40% 超含むことができる。一実施形態では、ATCC 番号 20362、ATCC 番号 8862、ATCC 番号 18944、ATCC 番号 76982、および / または LGAM S(7)1 (Papanikolaou S., and Aggelis G., Bioresour. Technol., 82(1): 43-9 (2002)) として指定される *Y. lipolytica* 株が具体的に適している。

【0112】

本発明はまた、スクロースインベルターゼ活性があるポリペプチド (前記ポリペプチドは、成熟スクロースインベルターゼをコードするポリペプチド配列に融合したシグナル配列を含む) をコードする外因性ポリヌクレオチドを含む、形質転換された *Y. lipolytica* であって、さらに、目的の少なくとも 1 つの非天然生成物を産生することができる形質転換された *Y. lipolytica*) に関する。炭素源としてスクロース (またはその混合物) を使用して、形質転換された *Y. lipolytica* を増殖させる場合、目的のこの少なくとも 1 つの非天然生成物を産生させることが好ましい。*Y. lipolytica* を異種遺伝子で形質転換する順序は重要ではない。そのような形質転換はまた、同時であってもよい。

【0113】

目的の適切な非天然生成物の例としては、これは本明細書において限定することを意図するものではないが、例えば、多価不飽和脂肪酸、カロテノイド、アミノ酸、ビタミン、ステロール、フラボノイド、有機酸、ポリオールおよびヒドロキシエステル、キノン誘導体化合物、ならびにリスベラトロールが挙げられる。

【0114】

「多価不飽和脂肪酸」 (または「PUFA」) (特にオメガ - 3 およびオメガ - 6 PUFA) に関連した健康有益性は、十分実証されている。より具体的には、PUFA は、本明細書では、少なくとも 18 個の炭素原子および 2 つ以上の二重結合を有する脂肪酸を指す。用語「脂肪酸」は、より長い鎖長の酸およびより短い鎖長の酸の両方が知られているが、約 $C_{12} \sim C_{22}$ の種々の鎖長の長鎖脂肪酸 (アルカン酸) を指す。主な鎖長は $C_{16} \sim C_{22}$ の間である。脂肪酸の構造は「X:Y」の単純な表記法で表し、ここで、X は、特定の脂肪酸における炭素 [「C」] 原子の総数、Y は二重結合の数である。

【0115】

「飽和脂肪酸」対「不飽和脂肪酸」、「一価不飽和脂肪酸」対「多価不飽和脂肪酸」 [「PUFA」]、および「オメガ - 6 脂肪酸」 [「n - 6」] 対「オメガ - 3 脂肪酸」 [「n - 3」] の間の差異に関するさらなる詳細は、参照によって本明細書に組み込む米国特許第 7,238,482 号明細書に提供されている。米国特許出願公開第 2009-0093543-A 1 号明細書 (表 3) には、オメガ - 3 およびオメガ - 6 PUFA とそれらの前駆体の化学名および一般名、ならびに一般に使用される略語について詳細にまとめられている。

10

20

30

40

50

【0116】

しかしながら、PUFA例の一部として、これらに限定されないが、リノール酸[「LA」、18:2 - 6]、ガンマ-リノレン酸[「GLA」、18:3 - 6]、エイコサジエン酸[「EDA」、20:2 - 6]、ジホモ-ガンマ-リノレン酸[「GLA」、20:3 - 6]、アラキドン酸[「ARA」、20:4 - 6]、ドコサテトラエン酸[「DTA」、22:4 - 6]、ドコサペンタエン酸[「DPA_n-6」、22:5 - 6]、アルファ-リノレン酸[「ALA」、18:3 - 3]、ステアリドン酸[「STA」、18:4 - 3]、エイコサトリエン酸[「ETA」、20:3 - 3]、エイコサテトラエン酸[「ETRA」、20:4 - 3]、エイコサペンタエン酸[「EPA」、20:5 - 3]、ドコサペンタエン酸[「DPA_n-3」、22:5 - 3]、およびドコサヘキサエン酸[「DHA」、22:6 - 3]が挙げられる。

10

【0117】

PUFA産生のためのY.リポリティカ(Y. lipolytica)株の操作に向けて、多大な努力が捧げられてきた。例えば、米国特許第7,238,482号明細書では、酵母におけるオメガ-6およびオメガ-3脂肪酸産生の実現可能性が実証された。米国特許第7,932,077号明細書では、総脂肪酸の28.1%のEPAの組換え産生が実証された；米国特許第7,588,931号明細書では、総脂肪酸の14%のARAの組換え産生が実証された；米国特許第7,550,286号明細書では、総脂肪酸の5%のDHAの組換え産生が実証された；そして米国特許出願公開第2009-0093543-A1号明細書では、EPA産生のために最適化された組換え株が記載され、総脂肪酸の最大55.6%のEPAの産生が実証された。米国特許出願公開第2010-0317072-A1号明細書では、TFAの最大50%のEPAを含み、かつTFAの重量パーセントとして測定されたEPAとTFAの重量パーセントとして測定されたリノール酸との比が少なくとも3.1である微生物油を産生する、さらに最適化された組換えY.リポリティカ(Y. lipolytica)株について記載されている。形質転換体のY.リポリティカ(Y. lipolytica)は、PUFA産生を目的とした、デサチュラーゼ(すなわち、デルタ-12デサチュラーゼ、デルタ-6デサチュラーゼ、デルタ-8デサチュラーゼ、デルタ-5デサチュラーゼ、デルタ-17デサチュラーゼ、デルタ-15デサチュラーゼ、デルタ-9デサチュラーゼ、デルタ-4デサチュラーゼ)遺伝子とエロンゲース(すなわち、C₁₄/C₁₆エロンゲース、C₁₆/C₁₈エロンゲース、C₁₈/C₂₀エロンゲース、C₂₀/C₂₂エロンゲース、およびデルタ-9エロンゲース)遺伝子との種々の組合せを発現する。しかしながら、これらの方法すべてにおいて、PUFA産生は炭素源としてグルコースを使用して増殖させた油性酵母を使用して実証された。

20

30

【0118】

表3に、デサチュラーゼとエロンゲースの種々の組合せを有する、上記に引用の参考文献に記載された特定のY.リポリティカ(Y. lipolytica)株の一部について情報を提供する。ただし、特定の株および産生される特定のPUFAが、本明細書の発明を限定するものでは決してないことは認識されるべきである。

【0119】

40

【表 3】

表 3. オメガ-3/オメガ-6 PUFA を産生するために操作された代表的な *Y. lipolytica* 株の脂質プロフィール

株	参考文献	ATCC 寄託番号	脂肪酸含量(総脂肪酸のパーセント[%]として)													TFAs % DCW	
			16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3 (ALA)	GLA	20:2 (EDA)	DGLA	ARA	ETA	EPA	DPA	DHA	
pDMW208	米国特許第 7,465,564 号 明細書		11.9	8.6	1.5	24.4	17.8	0	25.9	--	--	--	--	--	--	--	--
pDMW208D62		--	16.2	1.5	0.1	17.8	22.2	0	34	--	--	--	--	--	--	--	--
M4	米国特許第 7 ,932,077 号 明細書	--	15	4	2	5	27	0	35	--	8	0	0	0	--	--	--
Y2034	米国特許第 7,588,931 号 明細書	--	13.1	8.1	1.7	7.4	14.8	0	25.2	--	8.3	11.2	--	--	--	--	--
Y2047		PTA-7186	15.9	6.6	0.7	8.9	16.6	0	29.7	--	0	10.9	--	--	--	--	--
Y2214		--	7.9	15.3	0	13.7	37.5	0	0	--	7.9	14	--	--	--	--	--
EU		--	19	10.3	2.3	15.8	12	0	18.7	--	5.7	0.2	3	10.3	--	--	36
Y2072	米国特許第 7,932,077 号 明細書	--	7.6	4.1	2.2	16.8	13.9	0	27.8	--	3.7	1.7	2.2	15	--	--	--
Y2102		--	9	3	3.5	5.6	18.6	0	29.6	--	3.8	2.8	2.3	18.4	--	--	--
Y2095		--	13	0	2.6	5.1	16	0	29.1	--	3.1	1.9	2.7	19.3	--	--	--
Y2090		--	6	1	6.1	7.7	12.6	0	26.4	--	6.7	2.4	3.6	26.6	--	--	22.9
Y2096		PTA-7184	8.1	1	6.3	8.5	11.5	0	25	--	5.8	2.1	2.5	28.1	--	--	20.8
Y2201		PTA-7185	11	16.1	0.7	18.4	27	0	--	3.3	3.3	1	3.8	9	--	--	--
Y3000	米国特許第 7,550,286 号 明細書	PTA-7187	5.9	1.2	5.5	7.7	11.7		30.1	--	2.6	1.2	1.2	4.7	18.3	5.6	--
Y4001	米国特許 出願公開第 2009- 0093543- A1 号明細書	--	4.3	4.4	3.9	35.9	23	0	--	23.8	0	0	0	--	--	--	--
Y4036		--	7.7	3.6	1.1	14.2	32.6	0	--	15.6	18.2	0	0	--	--	--	--
Y4070		--	8	5.3	3.5	14.6	42.1	0	--	6.7	2.4	11.9	--	--	--	--	--
Y4086		--	3.3	2.2	4.6	26.3	27.9	6.9	--	7.6	1	0	2	9.8	--	--	28.6
Y4128		PTA-8614	6.6	4	2	8.8	19	2.1	--	4.1	3.2	0	5.7	42.1	--	--	18.3
Y4158		--	3.2	1.2	2.7	14.5	30.4	5.3	--	6.2	3.1	0.3	3.4	20.5	--	--	27.3
Y4184		--	3.1	1.5	1.8	8.7	31.5	4.9	--	5.6	2.9	0.6	2.4	28.9	--	--	23.9
Y4259		--	4.4	1.4	1.5	3.9	19.7	2.1	--	3.5	1.9	0.6	1.8	46.1	--	--	23.7
Y4305		--	2.8	0.7	1.3	4.9	17.6	2.3	--	3.4	2	0.6	1.7	53.2	--	--	27.5

【表 4】

Y4127	国際公開第 2008/07336 7号 パンフレット	PTA-8802	4.1	2.3	2.9	15.4	30.7	8.8	--	4.5	3.0	3.0	2.8	18.1	--	--
Y4184		--	2.2	1.1	2.6	11.6	29.8	6.6	--	6.4	2.0	0.4	1.9	28.5	--	24.8
Y8404		--	2.8	0.8	1.8	5.1	20.4	2.1		2.9	2.5	0.6	2.4	51.1	--	27.3
Y8406		PTA-10025	2.6	0.5	2.9	5.7	20.3	2.8		2.8	2.1	0.5	2.1	51.2	--	30.7
Y8412		PTA-10026	2.5	0.4	2.6	4.3	19.0	2.4		2.2	2.0	0.5	1.9	55.8	--	27.0
Y8647		--	1.3	0.2	2.1	4.7	20.3	1.7		3.3	3.6	0.7	3.0	53.6	--	37.6
Y9028		--	1.3	0.2	2.1	4.4	19.8	1.7		3.2	2.5	0.8	1.9	54.5	--	39.6
Y9477		--	2.6	0.5	3.4	4.8	10.0	0.5		2.5	3.7	1.0	2.1	61.4	--	32.6
Y9497		--	2.4	0.5	3.2	4.6	11.3	0.8		3.1	3.6	0.9	2.3	58.7	--	33.7
Y9502		--	2.5	0.5	2.9	5.0	12.7	0.9		3.5	3.3	0.8	2.4	57.0	--	37.1
Y9508		--	2.3	0.5	2.7	4.4	13.1	0.9		2.9	3.3	0.9	2.3	58.7	--	34.9
Y8145		--	4.3	1.7	1.4	4.8	18.6	2.8		2.2	1.5	0.6	1.5	48.5	--	23.1
Y8259		PTA-10027	3.5	1.3	1.3	4.8	16.9	2.3		1.9	1.7	0.6	1.6	53.9	--	20.5
Y8370		--	3.4	1.1	1.4	4.0	15.7	1.9		1.7	1.9	0.6	1.5	56.4	--	23.3
Y8672		--	2.3	0.4	2.0	4.0	16.1	1.4		1.8	1.6	0.7	1.1	61.8	--	26.5

注:

用語「総脂肪酸」(「TFA」)は、例えばバイオマスまたは油のこともある所与の試料において、塩基エステル転移反応法(当技術分野で公知)により脂肪酸メチルエステル(「FAME」)に誘導することができる、すべての細胞脂肪酸の合計を指す。したがって、総脂肪酸は、中性脂肪酸は、中性脂質分画(ジアシルグリセロール、モノアシルグリセロール、およびトリアシルグリセロールを含む)および極性脂質分画に由来する脂肪酸を含むが遊離脂肪酸を含まない。総脂肪酸中の脂肪酸濃度は、TFAの重量パーセント[「%TFA」]、例えば「TFA100 ミリグラム当たりの所与の脂肪酸のミリグラム」として本明細書では表現する。本明細書の開示に特に記載がない限り、総脂肪酸に対する所与の脂肪酸のパーセントに言及する場合、%TFAとしての脂肪酸濃度に等しい(例えば、総脂肪酸の%TFAは、EPA%TFAに等しい)。

DCWのパーセントとしてのFAMEの尺度[「FAME%DCW」]で総脂肪酸含量を近似することができるが、細胞の「総脂肪酸含量」という用語は、乾燥細胞重量(DCW)のパーセントとしてのTFAの尺度である。こうして、総脂肪酸含量[「TFA%DCW」]は、例えばDCW100ミリグラム当たりの総脂肪酸のミリグラムに等しい。

脂肪酸は、16:0(パルミチン酸)、16:1(パルミトレイン酸)、18:0(ステアリン酸)、18:1(オレイン酸)、18:2(リノール酸)、18:3(ALAまたはアルファリノレン酸)、GLA(ガンマリノレン酸)、20:2(EDAまたはエイコサジエン酸)、DGLA(ジホモガンマリノレン酸)、ARA(アラキドン酸)、ETA(エイコサテトラエン酸)、EPA(エイコサペンタエン酸)、DPA(ドコサペンタエン酸)、およびDHA(ドコサヘキサエン酸)である。

【0121】

炭素源としてスクロースを用いて増殖させる場合、形質転換されたY、リポリティカ(

10

20

30

40

50

Y . l i p o l y t i c a) で産生することができる目的の適切な非天然生成物としてカロテノイドも考えられる。本明細書で使用する用語「カロテノイド」は、イソブレンから形式的に誘導される共役ポリエン炭素骨格を有する炭化水素のクラスを指す。このクラスの分子は、トリテルペン [「C₃₀ジアポカルテノイド」(diapocarotenoid)] およびテトラテルペン [「C₄₀カロテノイド」] ならびにそれらの酸化誘導体から構成され、典型的には、これらの分子は強い光吸収特性を有し、長さがC₂₀₀を超えることもある。長さが、例えばC₃₅、C₅₀、C₆₀、C₇₀、およびC₈₀である他の「カロテノイド化合物」が知られている。用語「カロテノイド」には、カロテンおよびキサントフィルの両方が含まれる。「カロテン」は、炭化水素カロテノイド(例えば、フィトエン、 α -カロテン、およびリコペン)を指す。これに対して、用語「キサントフィル」は、1つまたは複数の酸素原子を、ヒドロキシ-、メトキシ-、オキシ-、エポキシ-、カルボキシ-、またはアルデヒドの官能基形態で含有するC₄₀カロテノイドを指す。キサントフィルはカロテンより極性であり、この性質により、脂肪および脂質へのそれらの溶解性が劇的に低下する。したがって、カロテノイドの適切な例として、アンテラキササンチン、アドニルビン、アドニキササンチン、アスタキササンチン(すなわち、3,3'-ジヒドロキシ- α -カロテン-4,4'-ジオン)、カンタキササンチン(すなわち、 β -カロテン-4,4'-ジオン)、カプソルブリン(capsorubrin)、 γ -クリプトキササンチン、 δ -カロテン、 ϵ -カロテン、 ζ -カロテン、 η -カロテン、 θ -カロテン、 ι -カロテン、エキネノン、3-ヒドロキシエキネノン、3'-ヒドロキシエキネノン、 κ -カロテン、 λ -カロテン、 μ -カロテン、ゼアキササンチン、アドニルビン、テトラヒドロキシ- α -カロテン-4,4'-ジオン、テトラヒドロキシ- β -4-オン、カロキササンチン、エリスロキササンチン、ノストキササンチン、フレキシキササンチン、3-ヒドロキシ- β -カロテン、3-ヒドロキシ-4-ケト- β -カロテン、バクテリオルビキササンチン、バクテリオルビキササンチナール、4-ケト- β -カロテン、 γ -クリプトキササンチン、デオキシフレキシサンチン、ジアトキササンチン、7,8-ジデヒドロアスタキササンチン、ジデヒドロリコペン、フコキササンチン、フコキササンチノール、イソレニエラテン、 α -イソレニエラテン、ラクツカキササンチン、ルテイン、リコペン、ミクソバクトン、ネオキササンチン、ニューロスポレン、ヒドロキシニューロスポレン、ペリジニン、フィトエン、フィトフルエン、ロドピン、ロドピングルコシド、4-ケト-ルビキササンチン、シホナキササンチン、スフェロイデン、スフェロイデノン、スピリロキササンチン、トルレン、4-ケト-トルレン、3-ヒドロキシ-4-ケト-トルレン、ウリオリド、ウリオリドアセタート、ビオラキササンチン、ゼアキササンチン- γ -ジグルコシド、およびそれらの組合せが挙げられる。

【0122】

野生型Y . リポリティカ(Y . l i p o l y t i c a) は、通常カロテン産生性ではない。しかしながら、国際公開第2008/073367号パンフレットおよび国際公開第2009/126890号パンフレットは、ゲラニルゲラニルピロリン酸シンターゼ、フィトエンシンターゼをコードするcrtB、フィトエンデサチュラーゼをコードするcrtI、リコペンシクラーゼをコードするcrtY、カロテノイドヒドロキシラーゼをコードするcrtZ、および/またはカロテノイドケトラゼをコードするcrtWなどのカロテノイド生合成経路遺伝子の導入による、組換えY . リポリティカ(Y . l i p o l y t i c a) の一連のカロテノイド産生について記載している。

【0123】

炭素源としてスクロースを用いて増殖させた場合に、形質転換されたY . リポリティカ(Y . l i p o l y t i c a) で産生されうる目的の他の非天然生成物としては、例えば、キニーネ誘導体化合物、ステロール、およびリスベラトロールが挙げられる。用語「少なくとも1つのキノン誘導体化合物」は、酸化還元活性のあるキノン環構造を有する化合物を指し、CoQ系列(すなわち、Q₆、Q₇、Q₈、Q₉、およびQ₁₀)のキノン、ビタミンK化合物、ビタミンE化合物、ならびにそれらの組合せからなる群から選択される化合物を含む。例えば、補酵素Q₁₀ [「CoQ₁₀」] という用語は、ユビキノン1

10

20

30

40

50

0としても知られる2,3-ジメトキシ-ジメチル-6-デカプレニル-1,4-ベンゾキノン(CAS登録番号303-98-0)を指す。CoQ₁₀のベンゾキノン部分はチロシンから合成されるが、イソプレニル側鎖はメバロン酸経路を介してアセチルCoAから合成される。したがって、CoQ₁₀などのCoQ化合物の生合成はNADPHを必要とする。「ビタミンK化合物」には、例えばメナキノンまたはフィロキノンが含まれるが、「ビタミンE化合物」には、例えばトコフェロール、トコトリエノール、または α -トコフェロールが含まれる。用語「リスベラトロール」は、3',4,5-トリヒドロキシステシルベンを指す。

【0124】

米国特許出願公開第2009/0142322-A1号明細書および国際公開第2007/120423号パンフレットは、補酵素Q₁₀を産生するためのデカプレニルピロリン酸シンターゼをコードするddsA、ビタミンK化合物を産生するためのMenF、MenD、MenC、MenE、MenB、MenA、UbiE、および/またはMenGのポリペプチドをコードする遺伝子、ならびにビタミンE化合物を産生するためのtyrA、pds1(hppd)、VTE1、HPT1(VTE2)、VTE3、VTE4、および/またはGGHのポリペプチドをコードする遺伝子などの異種のキノン生合成経路遺伝子の導入による、Y.リポリティカ(Y.lipolytica)における種々のキノン誘導体化合物の産生について記載している。国際公開第2008/130372号パンフレットは、スクアレンシンターゼをコードするERG9/SQS1およびスクアレンエポキシダーゼをコードするERG1の導入による、Y.リポリティカ(Y.lipolytica)のステロール産生について記載している。また、米国特許第7,772,444号明細書は、リスベラトロールシンターゼをコードする遺伝子の導入による、Y.リポリティカ(Y.lipolytica)のリスベラトロール産生について記載している。

【0125】

形質転換された宿主細胞は、キメラ遺伝子(例えば、インベルターゼをコードする遺伝子、目的の非天然生成物の生合成を可能にする遺伝子等)の発現を最適にする条件下で増殖させる。一般に、最適化可能な培地条件としては、炭素源のタイプおよび量、窒素源のタイプおよび量、炭素対窒素比、種々のミネラルイオンの量、酸素レベル、増殖温度、pH、バイオマス生産段階の期間、油蓄積段階の期間、ならびに細胞採取の時期および方法が挙げられる。油性酵母は、複合培地(例えば、酵母抽出物-ペプトン-デキストロースブロス[「YPD」])、または増殖に必要な成分を欠損し、それによって所望の発現カセットの選択を引き出す合成最少培地(例えば、Yeast Nitrogen Base(DIFCO Laboratories, Detroit, MI))の中で増殖させることが多い。

【0126】

本発明における発酵培地は発酵性の炭素源を含む。発酵性の炭素源は、例えば、スクロース、転化スクロース、グルコース、フルクトース、およびこれらの組合せとすることができる。転化スクロースは、本明細書では、スクロースの加水分解から生じるフルクトースとグルコースをほぼ等量含む混合物を指す。転化スクロースは、加水分解度にその量が依存するスクロースを含むこともあるが、25~50%のグルコースと25~50%のフルクトースを含む混合物とすることができる。転化スクロースは、サトウキビまたはサトウダイコンなどの種々の供給源から入手可能なスクロースの加水分解により得ることができる。当技術分野で公知のように、グルコースおよびフルクトースへのスクロースの加水分解は、酸(例えば、クエン酸またはアスコルビン酸の添加)により、または酵素(例えば、インベルターゼまたは α -フルクトフラノシダーゼ)により触媒することができる。

【0127】

一部の実施形態では、本明細書で開示のY.リポリティカ(Y.lipolytica)は、他の糖の存在下(「混合糖」)、スクロース含有培地中で増殖させる。混合糖は、スクロースに加えて少なくとも1つの追加の糖を含む。Y.リポリティカ(Y.lipolytica)細胞の代謝のためにエネルギー源を提供することができる任意の糖、また

はスクロースを含有する混合物中に存在する任意の糖が含まれてもよい。しかしながら、野生型 *Y. lipolytica* (*Y. lipolytica*) 細胞のように、本明細書で開示された、スクロースを利用する *Y. lipolytica* (*Y. lipolytica*) は、依然として唯一の炭素源としてグルコースを使用することができる。

【0128】

さらに、発酵培地は適切な窒素源を含む。窒素は、無機（例えば、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ）または有機（例えば、尿素、グルタミン酸、または酵母抽出物）の供給源から補充することができる。スクロースおよび窒素源に加えて、発酵培地はまた、微生物の増殖に適した、当業者に公知の適切なミネラル、塩、補因子、緩衝液、ビタミン、および他の成分を含有する。

10

【0129】

本発明における好ましい増殖培地は、*Yeast Nitrogen Base* (*DIFCO Laboratories, Detroit, MI*) などの一般の商業的調製培地である。他の合成 (*defined*) 増殖培地または合成 (*synthetic*) 増殖培地も使用することができ、特定の微生物の増殖に適した培地は、微生物学または発酵科学の当業者には公知である。発酵に適した pH 範囲は、典型的には、約 pH 4.0 ~ pH 8.0 の間であり、その中では初期増殖条件の範囲として pH 5.5 ~ pH 7.5 が好ましい。発酵は好気性または嫌気性条件下で行うことができ、その中では微好気条件が好ましい。

20

【0130】

典型的には、増殖と脂肪の合成 / 貯蔵との間で代謝状態の「バランス」を取らなければならないため、油性酵母細胞における高レベルの *PUFA* の蓄積には、二段階発酵工程が必要である。したがって、二段階発酵工程を油性酵母における *PUFA* の産生に使用することが最も好ましい。この方法は米国特許第 7,238,482 号明細書に種々の適切な発酵工程設計（すなわち、バッチ、フェドバッチおよび連続）および増殖中の検討事項として記載されている。

【実施例】

【0131】

本発明を以下の実施例の中でさらに詳細に説明する。これらの実施例が、本発明の好ましい実施形態を示す一方、例示としてのみ示されることは理解されるべきである。上記の考察およびこれらの実施例から、当業者は、本発明の本質的特性を確認することができ、その精神および範囲から逸脱することなく、本発明に種々の変更および修正をなして、様々な使用および条件に本発明を適合させることができる。

30

【0132】

略語の意味は以下のとおりである：「*sec*」は秒を意味し、「*min*」は分を意味し、「*h*」は時間を意味し、「*d*」は日を意味し、「*μL*」はマイクロリットルを意味し、「*mL*」はミリリットルを意味し、「*L*」はリットルを意味し、「*μM*」はマイクロモル濃度を意味し、「*mM*」はミリモル濃度を意味し、「*M*」はモル濃度を意味し、「*mmol*」はミリモルを意味し、「*μmol*」はマイクロモルを意味し、「*g*」はグラムを意味し、「*μg*」はマイクログラムを意味し、「*ng*」はナノグラムを意味し、「*U*」は単位を意味し、「*bp*」は塩基対を意味し、「*kB*」はキロベースを意味する。

40

【0133】

発現カセットの命名法

発現カセットの構造は「*X::Y::Z*」の単純な表記法により表され、ここで *X* はプロモーター断片を記述し、*Y* は遺伝子断片を記述し、*Z* はターミネーター断片を記述し、これらはすべて互いに作動可能に連結されている。

【0134】

ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) の形質転換および培養

Y. lipolytica (*Y. lipolytica*) ATCC 番号 20362 株は米国培養

50

細胞系統保存機関 (Rockville, MD) から購入した。Y. lipolytica 株は、下記の処方に従った数種の培地中で 28 ~ 30 にてルーチン的に増殖させた。

【0135】

高グルコース培地 [「HGM」] (1リットル当たり) : 80 グルコース、2.58 g の KH_2PO_4 、および 5.36 g の K_2HPO_4 、pH 7.5 (調整不要)。

【0136】

高スクロース培地 [「HSM」] (1リットル当たり) : 80 スクロース、2.58 g の KH_2PO_4 、および 5.36 g の K_2HPO_4 、pH 7.5 (調整不要)。

【0137】

合成デキストロース培地 [「SD」] (1リットル当たり) : 硫酸アンモニウム含有、アミノ酸非含有の 6.7 g の Yeast Nitrogen base ; 20 g のグルコース。

【0138】

合成スクロース培地 [「SS」] (1リットル当たり) : 硫酸アンモニウム含有、アミノ酸非含有の 6.7 g の Yeast Nitrogen base ; 20 g のスクロース。

【0139】

発酵培地 [「FM」] (1リットル当たり) : アミノ酸非含有の 6.7 g / L の YNB ; 6 g / L の KH_2PO_4 ; 2 g / L の K_2HPO_4 ; 1.5 g / L の MgSO_4 - ヘプタハイドレード ; 5 g / L の酵母抽出物 ; 2 % の炭素源 (炭素源はグルコースまたはスクロースのいずれかである)。

【0140】

参照によって本明細書に組み込む米国特許出願公開第 2009 - 0093543 - A1 号明細書に記載のように、Y. lipolytica の形質転換を実施した。

【0141】

ヤロウィア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) の脂肪酸分析
脂肪酸 [「FA」] 分析のために、細胞を遠心分離により回収し、Bligh, E. G. および Dyer, W. J. (Can. J. Biochem. Physiol., 37 : 911 - 917 (1959)) に記載のように脂質を抽出した。ナトリウムメトキシドによる脂質抽出物のエステル転移反応により脂肪酸メチルエステル [「FAME」] を調製し (Roughan, G., and Nishida I., Arch Biochem Biophys., 276 (1) : 38 - 46 (1990))、次いで、30 mm x 0.25 mm (内径) の HP-INNOWAX (Hewlett-Packard) カラムを装着した Hewlett-Packard 6890 GC で分析した。オープン温度は、3.5 / 分で 170 (25 分間保持) から 185 とした。

【0142】

直接の塩基エステル転移反応のために、ヤロウィア (Yarrowia) 細胞 (0.5 mL 培養物) を回収し、蒸留水で 1 回洗浄し、Speed-Vac で 5 ~ 10 分間真空乾燥した。ナトリウムメトキシド (1 % の 100 μl) および既知量の C15 : 0 トリアシルグリセロール (C15 : 0 TAG ; カタログ番号 T-145, Nu-Check Prep, Elysian, MN) を試料に加え、次いで試料を 50 で 30 分間、攪拌揺動した。1 M NaCl を 3 滴およびヘキサンを 400 μl 添加した後、試料を攪拌回転した。上層を取り出し、GC により分析した。

【0143】

代替的に、Lipid Analysis, William W. Christie, 2003 に記載の塩基触媒エステル転移反応法を修正して、発酵またはフラスコ試料のいずれかに由来するプロス試料のルーチン分析に使用した。具体的には、プロス試料を室温水で迅速に解凍し、次いで 0.22 μm の Corning (登録商標) Costar (登録商標) Spin-X (登録商標) 遠心管フィルター (カタログ番号 8161) を備えた

10

20

30

40

50

、タール被覆の2 mL微量遠心チューブに秤量した(0.1 mg)。試料(75~800 μ l)は、あらかじめ測定したDCWに応じて使用した。エッペンドルフ5430遠心分離機を使用して、試料を14,000 rpmで5~7分間またはブロス除去するのに必要な限り、遠心分離した。フィルターを取り出し、液体を排水し、試料を洗浄するために約500 μ lの脱イオン水をフィルターに加えた。遠心分離して水を除去した後、フィルターを再び取り出し、液体を排水し、フィルターを再挿入した。次いで、チューブを遠心分離機に再挿入し、今度は乾燥させるために約3~5分間上部を開けた状態にした。次いで、フィルターをチューブのほぼ中段で切断し、新たな2 mL丸底エッペンドルフチューブ(カタログ番号22 36 335-2)に挿入した。

【0144】

カットフィルター容器の縁に接触するのみで、試料またはフィルター材料には接触しない適切な道具を用いてチューブの底にフィルターを押しつけた。トルエン中の既知量のC15:0 TAG(上記)を加え、新たに調製した1%ナトリウムメトキシドのメタノール溶液500 μ lを加えた。試料ペレットを、適切な道具で強く粉碎し、チューブを閉じて、50 加熱ブロック(VWRカタログ番号12621-088)中に30分間静置した。次いで、チューブを少なくとも5分間放冷した。次いで、400 μ lのヘキサンおよび500 μ lの1M NaCl水溶液を加え、チューブを2×6秒間攪拌し、1分間遠心分離した。約150 μ lの上部(有機)層を、インサートを備えたGCバイアルに入れ、GCにより分析した。

【0145】

GC分析により記録されたFAMEピークは、それらの保持時間を既知脂肪酸の保持時間と比較して同定し、FAMEピーク面積を既知量の内部標準(C15:0 TAG)と比較して定量した。したがって、任意の脂肪酸FAMEの概算量(μ g) [「 μ g FAME」]は以下の式に従って計算し: (特定の脂肪酸についてのFAMEピーク面積/標準FAMEピーク面積) × (標準C15:0 TAGの μ g)、一方任意の脂肪酸の量(μ g) [「 μ g FA」]は、1 μ gのC15:0 TAGが0.9503 μ gの脂肪酸に等しいので、以下の式に従って計算する: (特定の脂肪酸についてのFAMEピーク面積/標準FAMEピーク面積) × (標準C15:0 TAGの μ g) × 0.9503。0.9503の変換係数は、大部分の脂肪酸について決定された値(0.95~0.96の範囲にある)の近似であることに留意されたい。

【0146】

TFAの重量%としてそれぞれ個々の脂肪酸の量をまとめた脂質プロファイルは、すべてのFAMEピーク面積の合計で個々のFAMEピーク面積を除し、そして100を乗じて決定した。

【0147】

フラスコアッセイによる、ヤロウィア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)における総脂質含量および組成の分析

特定のY.リポリティカ(*Y. lipolytica*)株における全脂質含量及び組成を詳細に分析するために、以下のようにフラスコアッセイを実施した。具体的には、新たに画線した細胞の1つのループを3 mLのFM培地に接種し、250 rpm及び30 で一晩増殖させた。OD_{600nm}を測定し、125 mLフラスコ中の25 mLのFM培地に0.3の最終OD_{600nm}まで細胞のアリコートを加えた。250 rpmで30 の振盪インキュベーター中で2日後、遠心分離により6 mLの培養物を回収し、125 mLフラスコ中の25 mLのHGM中に再懸濁した。250 rpmで30 の振盪インキュベーター中で5日後、1 mLのアリコートを用いて脂肪酸分析(上記)を行い、10 mLを乾燥させて乾燥細胞重量 [「DCW」] を測定した。

【0148】

DCWを決定するために、Beckman GS-6R遠心分離機のBeckman GH-3.8ロータにおいて4000 rpmで5分間遠心分離することにより、10 mLの培養物を回収した。ペレットを25 mLの水に再懸濁し、上記のとおり再度回収した

10

20

30

40

50

。洗浄したペレットを20 mLの水に再懸濁し、あらかじめ秤量したアルミニウム皿に移した。細胞懸濁液を真空オープン中、80℃で一晩乾燥させた。細胞の重量を測定した。

【0149】

細胞の総脂質含量[「TFA%DCW」]を計算し、TFAの重量パーセントとしての各脂肪酸の濃度[「%TFA」]および乾燥細胞重量のパーセントとしてのEPA含量[「EPA%DCW」]を表にしたデータと併せて検討する。

【0150】

実施例1

ヤロウイア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)細胞外インベルターゼ発現プラスミドpZSUCの構築および発現

本実施例は、Current Genetics(16:253-260(1989))におけるNicaudらの報告と同様の方法による、XPR2プロモーターおよびシグナル配列とインベルターゼをコードするサッカロミセス・セレビシア(*Saccharomyces cerevisiae*)SUC2[「m-ScSUC2」]遺伝子の短縮変異体との融合物を含むプラスミドpZSUC(配列番号22)の構築について記載する。

【0151】

より具体的には、Nicaudらは、*Y. lipolytica* XPR2遺伝子のプロモーターおよびN末端アミノ酸シグナル配列の制御下で*S. cerevisiae* SUC2遺伝子を発現する場合における、*Y. lipolytica*の周辺質へのインベルターゼの分泌を報告した。その中(257頁)には、「融合物では、アミノ酸11から開始するインベルターゼの前に、XPR2遺伝子由来の23個のN末端アミノ酸を配置する」ことが記載されている(すなわち、このようにして、完全長インベルターゼの最初の10個のアミノ酸が短縮される一方、シグナル配列のアミノ酸11~19が、発現される成熟タンパク質と共に含まれた)。しかしながら、Nicaudらの図1B(255頁)によると、そうではなくて、融合コンストラクトは、アミノ酸5から開始するインベルターゼに融合した、シグナル配列としてのXPR2遺伝子由来の23個のN末端アミノ酸を含んでいたように見える(すなわち、このようにして、完全長インベルターゼの最初の4個のアミノ酸が短縮される一方、シグナル配列のアミノ酸5~19が、発現される成熟タンパク質と共に含まれた)。融合物に関して明瞭さが欠けてはいるものの、Nicaudらは、インベルターゼの発現が、形質転換された*Y. lipolytica*(*Y. lipolytica*)にスクロース利用(Suc+)表現型を付与すると報告した。

【0152】

上記のNicaudらと同様の方法で、XPR2::SUC2融合コンストラクトを製作した(「pZSUC」;図2)。最初に、369bpのXPRプロモーター(-369~-1)および63bpのコード領域(+1~+63)を含有する432bpのDNA断片を、鋳型としてヤロウイア(*Yarrowia*)ゲノムDNAを、またプライマーとしてオリゴヌクレオチドYL427およびYL428(配列番号:36および37)を使用して、PCRにより増幅した。設計したPCR断片(配列番号38)の5'末端にClaI部位を加え、3'末端にHindIII部位を加えた。PCR増幅は、以下のものを含む全容積50μlで実施した;PCR緩衝液(10mM KCl、10mM (NH₄)₂SO₄、20mM Tris-HCl(pH8.75)、2mM MgSO₄、0.1% Triton X-100を含有する)、100μg/mLのBSA(最終濃度)、200μMの各デオキシリボヌクレオチド三リン酸、10pmoleの各プライマー、50ngの*Y. lipolytica*(ATCC番号76982)ゲノムDNA、および1μlのTaq DNAポリメラーゼ(Epicentre Technologies)。サーモサイ클ー条件は、95℃で1分間を35サイクル、56℃で30秒間、および72℃で1分間の後、最終伸長を72℃で10分間に設定した。

【0153】

PCR生成物は、Qiagen PCR精製キット(Valencia, CA)を使用

して精製し、次いで *Cla*I / *Hind*III で消化した；消化生成物は、1% (w/v) アガロース中でゲル電気泳動法により分離し、*Cla*I / *Hind*III 断片を pZSUC (下記) の構築に使用した。

【0154】

最初の10個のアミノ酸以外の *S. cerevisiae* (S. cerevisiae) SUC2 コード領域を含有する1569bpのDNA断片を、鋳型として *S. cerevisiae* (S. cerevisiae) ゲノムDNAを、またプライマーとしてオリゴヌクレオチドYL429およびYL430 (配列番号：39および40) を使用して、PCRにより増幅した。SUC2コード領域と同じ読み枠で5'末端に *Hind*III 部位を加え、SUC2コード領域 (配列番号41) の停止コドンの後に *Bsi*WI 部位を加えた。PCR増幅は、50ngの *Y. lipolytica* (Y. lipolytica) ゲノムDNA (ATCC番号76982) の代わりに、50ngの *S. cerevisiae* (S. cerevisiae) ゲノムDNAを使用したことを除いて、上記に示す成分を含む全容積50μlで実施した。サーモサイクラー条件は、95 で1分間を35サイクル、56 で30秒間、および72 で2分間の後、最終伸長を72 で10分間に設定した。

10

【0155】

PCR生成物は、Qiagen PCR精製キット (Valencia, CA) を使用して精製し、次いで *Hind*III / *Bsi*WI で消化した；消化生成物は、1% (w/v) アガロース中でゲル電気泳動法により分離し、*Hind*III / *Bsi*WI 断片を pZSUC (下記) の構築に使用した。

20

【0156】

したがって、プラスミド pZSUC2 は下記の構成要素を含有する。

【0157】

【表5】

表4. プラスミド pZSUC2 の説明

配列番号:XXにおけるRE部位およびヌクレオチド位置	断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明
<i>Asc</i> I / <i>Bsi</i> WI (2780-2010)	ヤロウィア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) Pox3 (GenBank 受託番号 XP_503244) の 770bp の 5'部分
<i>Pac</i> I / <i>Sph</i> I (6312-5488)	ヤロウィア (Yarrowia) Pox3 遺伝子 (GenBank 受託番号 AJ001301) の 824bp の 3'部分
<i>Cla</i> I / <i>Bsi</i> WI (2-2010)	XPR2 プロモーター/SUC2 融合物、以下を含む： <ul style="list-style-type: none"> XPR2 プロモーター：XPR2 プロモーターの 369bp (-369~-1) および XPR2 プレ/プロ領域の 63bp のコード領域を含む 432bp の <i>Y. リポリティカ</i> (Y. lipolytica) XPR2 遺伝子； SUC2: 配列番号2のアミノ酸11~532に対応する1569bpの <i>S. セルビシヤ</i> (S. cerevisiae) SUC2 コード領域
3768-4628	<u>大腸菌 (E. coli) における選択のためのアンピシリン抵抗性遺伝子 (Amp^R)</u>
<i>Swa</i> I / <i>Pme</i> I (6862-8672)	Leu2: <i>Y. リポリティカ</i> (Y. lipolytica) のベータ-イソプロピルマレートデヒドロゲナーゼ遺伝子 (GenBank 受託番号 M37309)

30

40

【0158】

次いで、発現プラスミド pZSUC (配列番号22) を *Y. リポリティカ* (Y. lipolytica) ATCC番号76982に形質転換して、インペルターゼ発現について試験した。形質転換体を合成スクロース培地 [「SS」] 上で増殖させた。しかしながら、形質転換された *Y. リポリティカ* (Y. lipolytica) 株は、スクロース培地上で増殖することができなかった。

【0159】

50

pZSUC内のXPR2::SUC2融合コンストラクトでは、XPR2コード配列の最初の63bp(すなわち、プレ/プロ領域)は、「シグナル配列」として使用され、SUC2遺伝子には最初の30個のヌクレオチドがなかった(すなわち、SUC2シグナル配列の最初の10個のアミノ酸が除去されている)。Nicaudらによる記載を注意深く調査したところ、操作された株の増殖を試験するために、高圧蒸気滅菌されたスクロース培地が使用されたことが判明した。高圧蒸気滅菌工程により、Y.リポリティカ(Y. lipolytica)が炭素源として使用することができるフルクトースおよびグルコースに、スクロースの一部が加水分解される可能性がある(データを示さず)。

【0160】

本実施例において示されたデータにより、Nicaudらが記載のような、ScSUC2の短縮変異体と融合したY.リポリティカ(Y. lipolytica)XPR2のN末端21個のアミノ酸の融合物を発現する形質転換されたY.リポリティカ(Y. lipolytica)は、炭素源としてスクロースを使用することができないことが実証された。SUC2シグナル配列の疎水性コアは、適切な分泌過程と関連しており、その破壊はインベルターゼの細胞内蓄積をもたらすことが報告された(Kaiser and Botstein, Mol. Cell Biol., 6; 2382-2391 (1986); Perlman, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83: 5033-5037 (1986))。

【0161】

実施例2

ヤロウィア・リポリティカ(Yarrowia lipolytica)細胞外インベルターゼ発現プラスミド:pYRH68、pYRH69、pYRH70、pYRH73、およびpYRH74の構築

本実施例は、インベルターゼをコードする「成熟」サッカロミセス・セレビスシア(Saccharomyces cerevisiae)SUC2[「m-ScSUC2」]遺伝子に融合した、XPR2プレプロ領域[「XPR2PP+13」]および/またはSUC2シグナル配列[「SUC2SS」]の種々異なる組合せを含む一連のプラスミドの構築について記載する。各コンストラクト中の異種遺伝子は、強力なY.リポリティカ(Y. lipolytica)プロモーター(FBAInm; 米国特許第7,202,356号明細書を参照のこと)およびY.リポリティカ(Y. lipolytica)Pex2ターミネーター配列により挟まれた。

【0162】

SUCSS/m-ScSUC2を含むpYRH68の構築

プラスミドpYRH68は、インベルターゼをコードする「成熟」ScSUC2遺伝子(「m-ScSUC2」; 配列番号4)に融合したSUC2シグナル配列(「SUCSS」; 配列番号8)を高発現させるために構築した。しかしながら、SUCSS/m-ScSUC2として本明細書に記載のこの人為的な融合物は、5'-シグナル配列を天然に含有する野生型完全長ScSUC2遺伝子に事実上相当する。

【0163】

ScSUC2 ORFをコードする1.6kB断片を、プライマーSc.SUC2-5'(配列番号23)およびSc.SUC2-3'(配列番号24)を使用して、S.セレビスシア(S. cerevisiae)BY4743(Open Biosystems, Huntsville, AL)のゲノムDNAから増幅した。これらのプライマーは、アミノ酸位置2でPciI制限酵素部位を導入するように設計した(それによって、野生型Leu2残基がPhe2に変更されるが、SUC2の分泌過程に影響を及ぼさずにシグナル配列の疎水性が維持される)[Kaiser, et al., Science, 235: 312-317 (1987)]。反応混合物には、1μlのゲノムDNA、1μlの各プライマー、2μlの水、および45μlのAccuPrime(商標)Pfx SuperMix(Invitrogen; Carlsbad, CA)が含まれた。増幅は以下のように実施した: 94℃で5分間の初期変性、続いて94℃で15秒間の変性を35サ

10

20

30

40

50

イクル、55 で30秒間のアニーリング、および68 で2分間の伸長。68 で7分間の最終伸長サイクルを実施した後、4 で反応を終了させた。次いで、ScSUC2 ORFをPciII/NotI制限酵素で消化し、下記の構成要素(NcoIおよびPciIIはイソ制限酵素である)を含有するプラスミドpYRH68(図3A; 配列番号13)を作製するために利用した:

【0164】

【表6】

表5. プラスミドpYRH68の説明

配列番号13内のRE部位およびヌクレオチド	断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明
<i>PmeI/BsiWI</i> (6204--317)	FBAINm::SucSS/m-ScSUC2::PEX20、以下を含む: <ul style="list-style-type: none"> • FBAINm: ヤロウイア・リポリティカ(<i>Yarrowia lipolytica</i>)FBAINmプロモーター(米国特許第7,202,356号明細書); • SucSS/m-ScSUC2: <i>S. セルビシ</i> (<i>S. cerevisiae</i>)「成熟」SUC2遺伝子(配列番号11)に融合したサッカロミセス・セレビシヤ(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)5'-SUC2シグナル配列; • PEX20: ヤロウイア(<i>Yarrowia</i>) <i>Pex20</i> 遺伝子(GenBank 受託番号 AF054613)由来の <i>Pex20</i> ターミネーター配列
<i>BsiWI/AscI</i> (318-1211)	ヤロウイア(<i>Yarrowia</i>) <i>Lip7</i> 遺伝子(図中で「LipY5」と標記; GenBank 受託番号 AJ549519)の894bpの5'部分
<i>PacI/SphI</i> (3920/4681)	ヤロウイア(<i>Yarrowia</i>) <i>Lip7</i> 遺伝子(図中で「LipY3」と標記; GenBank 受託番号 AJ549519)の762bpの3'部分
<i>PacI/PmeI</i> (4682-6182)	ヤロウイア(<i>Yarrowia</i>) <i>URA3</i> 遺伝子(GenBank 受託番号 AJ306421)
2200-3060	大腸菌(<i>E. coli</i>)における選択のためのアンピシリン抵抗性遺伝子(<i>Amp^R</i>)

10

20

30

40

50

【0165】

2コピーのSucSS/m-ScSUC2を含むpYRH70の構築

プラスミドpYRH70は、5'-シグナル配列を天然に含有する、2コピーの野生型完全長ScSUC2遺伝子に相当する、2コピーのSucSS/m-ScSUC2(配列番号12)を高発現させるために構築した。プラスミドpYRH68(配列番号13)をSalI/SwaIで切断して、第2のコピーとなる1.6kBのPciII/NotI ScSUC2断片を挿入した。具体的には、以下のものを含む4方向連結反応を準備した: 1) pYRH68ベクター骨格; 2) PciII/NotI消化ScSUC2断片; 3) プラスミドpZKLY-PP2(配列番号25; 米国特許出願公開第2011-0244512-A1号明細書に記載)から切り取られたY. リポリティカ(*Y. lipolytica*) FBAプロモーター(米国特許第7,202,356号明細書)を含む533bpのSalI/NcoI断片; および4) さらにpZKLY-PP2(配列番号25)から切り取られた、ヤロウイア(*Yarrowia*) *Lip1* 遺伝子(GenBank 受託番号 Z50020)由来の*Lip1*ターミネーター配列を含む322bpのNotI/SwaI断片。これにより、pYRH70(図3B; 配列番号14)の合成物が得られた。

【0166】

XPR2PP+13もSUC2SSも含有しないm-ScSUC2を含むpYRH73の構築

プラスミドpYRH73は、SUC2シグナル配列(「SucSS」; 配列番号8)を欠損する、インベルターゼをコードする「成熟」ScSUC2遺伝子(「m-ScSUC

2」；配列番号4)を高発現させるために構築した。したがって、5'-シグナル配列を天然に含有する野生型完全長ScSUC2遺伝子からSuccSSの5'-シグナル配列(配列番号2のヌクレオチド1~57に相当する)を切断した。成熟ScSUC2遺伝子にまたがる1.55kB断片を、プライマーSc.SUC2-5'(配列番号23)およびnSc.SUC2-3'(配列番号26)を使用して、S.セルビシア(S.cerevisiae)BY4743のゲノムDNAから増幅した。次いで、この断片をPciI/NotIで切断し、上記と同じ方法でY.リポリティカ(Y.lipolytica)ベクターにクローニングしてプラスミドpYRH73(図4A；配列番号15)を作製した。

【0167】

XPR2PP+13/SuccSS/m-ScSUC2を含むpYRH69の構築

プラスミドpYRH69は、インペルターゼをコードする「成熟」ScSUC2遺伝子(「m-ScSUC2」配列番号4)に融合したSUC2シグナル配列[「SUC2SS」；配列番号8]に融合したXPR2プレプロ領域[「XPR2PP+13」；配列番号10]を高発現させるために構築した。しかしながら、pYRH68に関し上記したように、SuccSS/m-ScSUC2として本明細書に記載の人為的な融合物は、5'-シグナル配列を天然に含有する野生型完全長ScSUC2遺伝子に相当する。したがって、XPR2PP+13/SuccSS/m-ScSUC2として本明細書に記載し、また配列番号16および17として示した、この特定のコンストラクトは、事実上、完全長ScSUC2遺伝子にXPR2PP+13を融合したものである。

【0168】

上記に論述したように、配列番号10のXPR2PP+13領域は、配列番号6のアミノ酸1~170をコードするように設計されており、そのためLys156-Arg157切断部位にXpr6エンドペプチダーゼが確実に到達するように、プレプロ領域の後にXpr2の追加の13個のアミノ酸をコードしている。

【0169】

最初に、完全長ScSUC2 ORFをコードする1.6kB断片を増幅し、上記のプラスミドpYRH68構築中に利用した同一の方法でPciI/NotIを用いて切断した。次いで、Y.リポリティカ(Y.lipolytica)XPR2遺伝子のN末端170個のアミノ酸(すなわち、157個のアミノ酸のプレプロ領域および成熟AEPタンパク質のN末端13個のアミノ酸を含む)(すなわち、配列番号9およびNcoIおよびPciI制限酵素に対応するフランキング配列)をコードする断片を、プライマーY1.XPR2-5'(配列番号27)およびY1.XPR2-3'(配列番号28)を使用してY.リポリティカ(Y.lipolytica)ATCC番号20362のゲノムDNAから増幅した。消化に続いて、PciI/NcoI消化による513bpのXPR2PP+13断片が生成した。

【0170】

PciIおよびNcoI消化末端が適合するので、PciI/NcoI消化による513bpのXPR2PP+13断片およびPciI/NotI消化による1.6kBのScSUC2断片を、PciI/NotI消化によるpYRH68骨格に挿入して、pYRH69(図4B；配列番号18)を作製した。PciI/NcoI消化による513bpのXPR2PP+13断片の配向を確認した。

【0171】

プライマーY1.XPR2-5'(配列番号27)およびY1.XPR2-3'(配列番号28)によるpYRH69の配列決定により、Y.リポリティカ(Y.lipolytica)ATCC番号20362の配列番号9で示されるXPR2PP+13配列が公表されたXPR2配列(Matoba, Set al., Mol. Cell Biol., 8:4904-4916(1988))に100%同一であることが確認された。

【0172】

XPR2PP+13/m-ScSUC2を含むpYRH74の構築

10

20

30

40

50

プラスミド pYRH74 は、インペルターゼをコードする「成熟」ScSUC2 遺伝子（「m-ScSUC2」；配列番号 4）に融合した XPR2 プレプロ領域 [「XPR2PP+13」；配列番号 10] を高発現させるために構築した。

【0173】

成熟 ScSUC2 遺伝子にまたがる 1.55 k B 断片を、プライマー Sc.SUC2-5'（配列番号 23）および nSc.SUC2-3'（配列番号 24）を使用して、S.cerevisiae）BY4743 のゲノム DNA から増幅した。

【0174】

具体的には、成熟 ScSUC2 遺伝子を含む 1.55 k B の PciI / NotI 断片および 513 bp の PciI / NcoI XPR2PP+13 断片を、それぞれプラスミド pYRH73 およびプラスミド pYRH69 のために上記のように調製した。これらの断片を pYRH68 骨格と連結して、プラスミド pYRH74（図 5；配列番号 21）を作製した。

【0175】

実施例 3

唯一の炭素源としてスクロースまたはグルコースのいずれかを用いて増殖させたヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）における、プラスミド pYRH68、pYRH69、pYRH70、pYRH73、および pYRH74 の形質転換および発現

プラスミド pYRH68、pYRH69、pYRH70、pYRH73、および pYRH74 を、Y.リポリティカ（*Y. lipolytica*）Y4184U 株（実施例 5）および Y.リポリティカ（*Y. lipolytica*）Z1978U 株（実施例 6）（両方とも大量の EPA% TFA を産生させるために遺伝子操作された株）に形質転換するために AscI / SphI で別々に消化した。形質転換体は、唯一の炭素源としてスクロースまたはグルコースのいずれかを含む種々の培地上で増殖させた。

【0176】

具体的には、形質転換体を、ウラシルを欠損する SD 培地プレート上で最初に選択した（全般的な方法）。下記の表 6 に記載のように、種々の Y4184U および Z1978U の形質転換体株が生成した。

【0177】

【表 7】

表 6. 細胞外インペルターゼを高発現するヤロウィア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)の Y4184U および Z1978 の形質転換体株

プラスミド (配列番号)	発現された キメラ遺伝子(配列番号)	生成された形質転換体
pYRH68 (配列番号 13)	Suc2SS/m-ScSUC2 (配列番号 11)	<ul style="list-style-type: none"> Y4184U + Suc2SS/m-ScSUC2 Z1978U + Suc2SS/m-ScSUC2
pYRH70 (配列番号 14)	2 コピーの Suc2SS/m- ScSUC2 (配列番号 11)	<ul style="list-style-type: none"> Z1978U + 2_Suc2SS/m-ScSUC2
pYRH73 (配列番号 15)	m-ScSUC2 (配列番号 3)	<ul style="list-style-type: none"> Z1978U + m-ScSUC2
pYRH69 (配列番号 18)	XPR2PP+13/ Suc2SS/ m-ScSUC2 (配列番号 16)	<ul style="list-style-type: none"> Y4184U + XPR2PP+13/Suc2SS/ m- ScSUC2 Z1978U + XPR2PP+13/Suc2SS/ m- ScSUC2
pYRH74 (配列番号 21)	XPR2PP+13/m- ScSUC2 (配列番号 19)	<ul style="list-style-type: none"> Z1978U + XPR2PP+13/m-ScSUC2

【0178】

Y 4 1 8 4 U + S u c 2 S S / m - S c S U C 2 株および Y 4 1 8 4 株（対照）の増殖を、S D（すなわち、グルコース）および S S（すなわち、スクロース）培地で比較した。スクロースの加水分解を回避するために、培地は高圧蒸気滅菌の代わりに濾過により滅菌した。具体的には、細胞を 0.03 の OD_{600} で接種し、 30°C で増殖させた。図 6 に示すように、Y 4 1 8 4 U + S u c 2 S S / m - S c S U C 2 株はスクロースで極めて良好に増殖したが、対照 Y 4 1 8 4 株は唯一の炭素源としてのスクロース上で増殖しなかった。唯一の炭素源としてグルコースが供給された場合には、両株とも同様に増殖した。Y 4 1 8 4 U + X P R 2 P P + 1 3 / S u c 2 S S / m - S c S U C 2 株もスクロースで増殖しなかった（データを示さず）；2つの異なるシグナル配列が互いに干渉し、分泌過程を妨害しうることが仮定される。

10

【0179】

次に、Z 1 9 7 8 U + S u c 2 S S / m - S c S U C 2 株、Z 1 9 7 8 U + 2 _ S u c 2 S S / m - S c S U C 2 株、Z 1 9 7 8 U + m - S c S U C 2 株、Z 1 9 7 8 U + X P R 2 P P + 1 3 / S u c 2 S S / m - S c S U C 2 株、Z 1 9 7 8 + X P R 2 P P + 1 3 / m - S c S U C 2 株、および Z 1 9 7 8 株（対照）の増殖を、唯一の炭素源としてスクロースまたはグルコースのいずれかを含む F M で比較した。スクロースの加水分解を回避するために、培地は高圧蒸気滅菌の代わりに濾過により滅菌した。細胞を 0.03 の OD_{600} で接種し、 30°C で増殖させた。すべての株が、唯一の炭素源としてグルコースを含有する F M では同等に増殖した（図 7 A）。唯一の炭素源としてスクロースを含有する F M では（図 7 B）、Z 1 9 7 8 U + S u c 2 S S / m - S c S U C 2 株、Z 1 9 7 8 U + 2 _ S u c 2 S S / m - S c S U C 2 株、および Z 1 9 7 8 + X P R 2 P P + 1 3 / m - S c S U C 2 株は極めて良好に増殖したが、Z 1 9 7 8 U + m - S c S U C 2 株、Z 1 9 7 8 U + X P R 2 P P + 1 3 / S u c 2 S S / m - S c S U C 2 株、および Z 1 9 7 8 株（対照）はほとんど増殖しなかった；実際、残存する増殖は炭素源として酵母抽出物を使用する細胞の能力による可能性がある。

20

【0180】

したがって、S u c 2 S S / m - S c S U C 2（配列番号 12）および X P R 2 P P + 1 3 / m - S c S U C 2（配列番号 20）の両方の高発現は、唯一の炭素源としてスクロースを含有する培地で増殖することができる、形質転換された Y . リポリティカ（Y . l i p o l y t i c a）株をもたらした。

30

【0181】

実施例 4

唯一の炭素源としてスクロースまたはグルコースのいずれかで増殖させた形質転換体ヤロウィア・リポリティカ（Y a r r o w i a l i p o l y t i c a）における脂質含量および組成

本実施例は、唯一の炭素源としてスクロースを含有する培地で増殖させる場合における、S . セルビシア（S . c e r e v i s i a e）細胞外インペルターゼを高発現する Z 1 9 7 8 株（すなわち、Z 1 9 7 8 U + S u c 2 S S / m - S c S U C 2 株、Z 1 9 7 8 U + 2 _ S u c 2 S S / m - S c S U C 2 株、および Z 1 9 7 8 + X P R 2 P P + 1 3 / m - S c S U C 2 株）の脂質含量および組成について検討する。これらの株で蓄積された脂質のレベルおよび組成は、グルコースを唯一の炭素源として増殖させた対照株と同等であった。

40

【0182】

Z 1 9 7 8 U + S u c 2 S S / m - S c S U C 2 株における総脂質含量および脂肪組成に対するスクロース利用の影響を評価するために、全般的な方法に記載のように、株の重複培養物を、H S M（唯一の炭素源としてスクロース）中の同等油性条件下で増殖させた。したがって、H G M（唯一の炭素源としてグルコース）中の同等油性条件下で増殖させて、Z 1 9 7 8 U + S u c 2 S S / m - S c S U C 2 の2つの培養物（それぞれ培養物 R H Y 2 4 3 および R H Y 2 4 4 と命名）を対照 Z 1 9 7 8 株の二つ組試料と比較した。より

50

具体的には、最初に25 mLのSDまたはSS培地中にて30 で48時間、好氣的に培養物を増殖させることにより油性条件を達成し、次いで遠心分離により回収した。次いで、ペレットを25 mLのHGMまたはHSMのいずれかに再懸濁し、これらの培養物を振盪インキュベーターにおいて250 rpmおよび30 で5日間さらにインキュベートした。

【0183】

これらの株についての乾燥細胞重量[「DCW」]、細胞の総脂質含量[「TFA%DCW」]、TFAの重量パーセントとしての各脂肪酸の濃度[「%TFA」]、およびEPA生産性(すなわち、乾燥細胞重量のパーセントとしてのEPA含量[「EPA%DCW」])を下記の表7に示す。ここでは、平均を灰色で強調し、「平均」として示す。脂肪酸の略語は以下のとおりである:オレイン酸(18:1)、リノール酸(18:2)、およびエイコサペンタエン酸(「EPA」、20:5)。

【0184】

【表8】

表7. Z1978(グルコース上で増殖)およびZ1978U+Suc2SS/m-ScSUC2(スクロース上で増殖)の脂質含量および組成

株 (炭素源)	試料	DCW (g/L)	TFAs % DCW	% TFAs			EPA % DCW
				18:1	18:2	20:5 EPA	
Z1978 (グルコース)	対照-1	4.40	33	5.3	11.5	53.7	17.7
	対照-2	4.48	32	4.4	11.1	53.8	17.1
平均		4.44	33	4.9	11.3	53.8	17.4
Z1978U + Suc2SS/m- ScSUC2 (スクロース)	RHY243	4.58	32	5.2	13.0	48.9	15.8
	RHY244	4.62	32	5.3	13.1	48.8	15.4
平均		4.60	32	5.3	13.1	48.9	15.6

【0185】

表7の結果より、スクロース上で増殖させたZ1978U+Suc2SS/m-ScSUC2株におけるTFA%DCWがグルコース上で増殖させたZ1978株と同様であることが示された。しかしながら、スクロースを唯一の炭素源とした場合、平均のEPA%DCWが約10%減少することが観察された。

【0186】

Z1978U+Suc2SS/m-ScSUC2株における株性能に何らかの変化があるか否かを判定するために、グルコースまたはスクロースのいずれかを唯一の炭素源として、RHY243(表7)を二つ組で増殖させた。表8に、表7で使用したのと同様のフォーマットで、DCW、TFA%DCW、%TFAとしての各脂肪酸の濃度、およびEPA%DCWを要約する。

【0187】

【表 9】

表 8. グルコース上またはスクロース上のいずれかで増殖させた Z1978U+Suc2SS/m-ScSUC2 の脂質含量および組成

炭素源	重複	DCW (g/L)	TFAs % DCW	% TFAs			EPA % DCW
				18:1	18:2	20:5 EPA	
グルコース	1	3.84	35	4.5	12.6	51.1	17.9
	2	4.34	34	4.6	12.8	51.0	17.2
	平均	4.09	35	4.6	12.7	51.1	17.6
スクロース	1	4.56	33	5.3	13.6	48.8	15.9
	2	4.56	32	5.3	13.5	48.8	15.5
	平均	4.56	33	5.3	13.6	48.8	15.7

10

【0188】

表 8 の結果より、スクロース上で増殖させた Z 1 9 7 8 U + S u c 2 S S / m - S c S U C 2 株の T F A % D C W が、グルコース上で増殖させた場合の同株の脂質含量と同様であることが示された。しかしながら、スクロースを唯一の炭素源とした場合、平均の E P A % D C W が約 1 0 % 減少することが観察された。

【0189】

さらに、全般的な方法に記載のように、H S M (唯一の炭素源としてスクロース) 中の同等油性条件下で増殖させたときの、Z 1 9 7 8 U + S u c 2 S S / m - S c S U C 2 の 2 つの培養物 (すなわち、R H Y 2 4 3 および R H Y 2 4 4)、Z 1 9 7 8 U + 2 _ S u c 2 S S / m - S c S U C 2 の 3 つの培養物 (R H Y 2 4 8、R H Y 2 4 9、および R H Y 2 5 0 と命名)、および Z 1 9 7 8 + X P R 2 P P + 1 3 / m - S c S U C 2 の 3 つの培養物 (R H Y 2 5 7、R H Y 2 5 8、および R H Y 2 5 9 と命名) の総脂質含量および脂肪酸組成を比較した。これらの株を、H G M (唯一の炭素源としてグルコース) 中の同等油性条件下で増殖させた対照 Z 1 9 7 8 株の二つ組試料と比較した。

20

【0190】

表 9 に、表 7 で使用したのと同様のフォーマットで、D C W、T F A % D C W、% T F A としての各脂肪酸の濃度、および E P A % D C W を要約する。

30

【0191】

【表 10】

表 9. Z1978(グルコース上で増殖)、ならびに Z1978U+Suc2SS/m-ScSUC2、Z1978U+2_Suc2SS/m-ScSUC2、および Z1978U+XPR2PP+13/m-ScSUC2(スクロース上で増殖)の脂質含量および組成

株 (炭素源)	試料	DCW (g/L)	TFAs % DCW	% TFAs			EPA % DCW
				18:1	18:2	20:5 EPA	
Z1978 (グルコース)	対照-1	4.30	31	4.8	11.4	54.8	16.8
	対照-2	4.34	32	4.8	11.5	54.7	17.5
	平均	4.32	31	4.8	11.4	54.8	17.2
Z1978U + Suc2SS/m- ScSUC2 (スクロース)	RHY243	4.82	33	5.7	13.8	50.6	16.6
	RHY244	5.04	33	5.8	13.7	50.0	16.6
	平均	4.93	33	5.7	13.8	50.3	16.6
Z1978U + XPR2PP+13/m- ScSUC2 (スクロース)	RHY257	4.44	33	4.9	13.4	51.4	16.8
	RHY258	4.64	34	5.6	13.7	50.6	17.2
	RHY259	4.20	35	5.8	14.2	50.1	17.4
	平均	4.43	34	5.4	13.7	50.7	17.1
Z1978U + 2_Suc2SS/m- ScSUC2 (スクロース)	RHY248	4.76	33	5.4	13.4	50.2	16.8
	RHY249	4.82	33	5.5	13.4	50.1	16.4
	RHY250	4.48	31	4.2	11.6	54.0	16.5
	平均	4.69	32	5.0	12.8	51.4	16.6

10

20

【0192】

上記の結果より、スクロースを唯一の炭素源として増殖させた Z1978U + Suc2SS/m-ScSUC2 株、Z1978U + 2_Suc2SS/m-ScSUC2 株、および Z1978 + XPR2PP + 13/m-ScSUC2 株の TFA % DCW および EPA % DCW は、グルコースで増殖させた対照株 Z1978 の TFA % DCW および EPA % DCW との差が 10 % 未満であることが示された。3 つの SUC2 操作株のうち、Z1978 + XPR2PP + 13/m-ScSUC2 株が EPA % DCW について最良の性能を示した。3 つの SUC2 発現株はすべて、対照 Z1978 株よりも、最大 14 % 高い最終 DCW (g/L) を一貫して示した。したがって、EPA の容積生産性は、対照 Z1978 株と操作されたスクロース利用株との間で同様である。

30

【0193】

実施例 5

高 EPA 生産性のためのヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) Y4184 株および Y4184U 株の生成

Y. リポリティカ (*Y. lipolytica*) Y4184U 株は、上記の実施例 3 で宿主として使用した。Y4184U 株は、Y. リポリティカ (*Y. lipolytica*) ATCC 番号 20362 に由来し、デルタ - 9 エロンゲース / デルタ - 8 デサチュラーゼ経路の発現により、総脂質に対して EPA を高く産生することができる。この株は Ura - 表現型を示し、その構築は、参照により本明細書に組み込む PCT 国際公開第 2008/073367 号パンフレットの実施例 7 に記載されている。

40

【0194】

Y4184U 株の開発は、Y2224 株、Y4001 株、Y4001U 株、Y4036 株、Y4036U 株、Y4069 株、Y4084 株、Y4084U1 株、Y4127 株 (2007 年 11 月 29 日に受託番号 ATCC PTA - 8802 で米国培養細胞系統保存機関に寄託された)、Y4127U2 株、Y4158 株、Y4158U1 株、および Y4184 株の構築を必要とした。

【0195】

野生型 Y. リポリティカ (*Y. lipolytica*) ATCC 番号 20362 に対す

50

る Y 4 1 8 4 株 (総脂質の 3 0 . 7 % の E P A を産生する) の最終的な遺伝子型は、未知 1 - 、未知 2 - 、未知 4 - 、未知 5 - 、未知 6 - 、未知 7 - 、 Y A T 1 : : M E 3 S : : P e x 1 6 、 E X P 1 : : M E 3 S : : P e x 2 0 (2 コピー) 、 G P A T : : E g D 9 e : : L i p 2 、 F B A I N m : : E g D 9 e S : : L i p 2 、 E X P 1 : : E g D 9 e S : : L i p 1 、 F B A : : E g D 9 e S : : P e x 2 0 、 Y A T 1 : : E g D 9 e S : : L i p 2 、 G P D : : E g D 9 e S : : L i p 2 、 G P D I N : : E g D 8 M : : L i p 1 、 Y A T 1 : : E g D 8 M : : A c o 、 E X P 1 : : E g D 8 M : : P e x 1 6 、 F B A I N m : : E g D 8 M : : P e x 2 0 、 F B A I N : : E g D 8 M : : L i p 1 (2 コピー) 、 G P M / F B A I N : : F m D 1 2 S : : O c t 、 E X P 1 : : F m D 1 2 S : : A c o 、 Y A T 1 : : F m D 1 2 : : O c t 、 G P D : : F m D 1 2 : : P e x 2 0 、 E X P 1 : : E g D 5 S : : P e x 2 0 、 Y A T 1 : : E g D 5 S : : A c o 、 Y A T 1 : : R d 5 S : : O c t 、 F B A I N : : E g D 5 : : A c o 、 F B A I N m : : P a D 1 7 : : A c o 、 E X P 1 : : P a D 1 7 : : P e x 1 6 、 Y A T 1 : : P a D 1 7 S : : L i p 1 、 Y A T 1 : : Y l C P T 1 : : A c o 、 G P D : : Y l C P T 1 : : A c o であった。

【 0 1 9 6 】

上記略語は以下のとおりである： M E 3 S は、モルティエラ・アルピナ (*Mortiera alpina*) [米国特許第 7 , 4 7 0 , 5 3 2 号明細書] に由来するコドン最適化 C₁₆/18 エロンゲース遺伝子であり； E g D 9 e は、ユーグレナ・グラシリス (*Euglena gracilis*) デルタ - 9 エロンゲース遺伝子 [米国特許第 7 , 6 4 5 , 6 0 4 号明細書] であり； E g D 9 e S は、ユーグレナ・グラシリス (*Euglena gracilis*) [米国特許第 7 , 6 4 5 , 6 0 4 号明細書] に由来する、コドン最適化デルタ - 9 エロンゲース遺伝子であり； E g D 8 M は、ユーグレナ・グラシリス (*Euglena gracilis*) [米国特許第 7 , 2 5 6 , 0 3 3 号明細書] に由来する合成変異体デルタ - 8 デサチュラーゼ [米国特許第 7 , 7 0 9 , 2 3 9 号明細書] であり； F m D 1 2 は、フザリウム・モニリフォルメ (*Fusarium moniliforme*) デルタ - 1 2 デサチュラーゼ遺伝子 [米国特許第 7 , 5 0 4 , 2 5 9 号明細書] であり； F m D 1 2 S は、フザリウム・モニリフォルメ (*Fusarium moniliforme*) [米国特許第 7 , 5 0 4 , 2 5 9 号明細書] に由来するコドン最適化デルタ - 1 2 デサチュラーゼ遺伝子であり； E g D 5 は、ユーグレナ・グラシリス (*Euglena gracilis*) デルタ - 5 デサチュラーゼ [米国特許第 7 , 6 7 8 , 5 6 0 号明細書] であり； E g D 5 S は、ユーグレナ・グラシリス (*Euglena gracilis*) [米国特許第 7 , 6 7 8 , 5 6 0 号明細書] に由来するコドン最適化デルタ - 5 デサチュラーゼ遺伝子であり； R D 5 S は、ペリディニウム (*Peridinium*) 種 C C M P 6 2 6 [米国特許第 6 , 2 5 5 , 4 9 7 号明細書] に由来するコドン最適化デルタ - 5 デサチュラーゼであり； P a D 1 7 は、ピチウム・アフアニデルマツム (*Pythium aphanidermatum*) デルタ - 1 7 デサチュラーゼ [米国特許第 7 , 5 5 6 , 9 4 9 号明細書] であり； P a D 1 7 S は、ピチウム・アフアニデルマツム (*Pythium aphanidermatum*) [米国特許第 7 , 5 5 6 , 9 4 9 号明細書] に由来するコドン最適化デルタ - 1 7 デサチュラーゼであり； Y l C P T 1 は、ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) ジアシルグリセロールコリンホスホトランスフラナーゼ遺伝子 [米国特許第 7 , 9 3 2 , 0 7 7 号明細書] である。

【 0 1 9 7 】

最終的に、 Y 4 1 8 4 株における U r a 3 遺伝子を破壊するために、コンストラクト p Z K U E 3 S (P C T 国際公開第 2 0 0 8 / 0 7 3 3 6 7 号パンフレットおよびその中の配列番号 7 8) を使用して、 E X P 1 : : M E 3 S : : P e x 2 0 キメラ遺伝子を Y 4 1 8 4 株の U r a 3 遺伝子に組み込み、 Y 4 1 8 4 U 1 株 (総脂質の 1 1 . 2 % の E P A) 、 Y 4 1 8 4 U 2 株 (総脂質の 1 0 . 6 % の E P A) 、および Y 4 1 8 4 U 4 株 (総脂質の 1 5 . 5 % の E P A) (まとめて Y 4 1 8 4 U) をそれぞれ得た。

【0198】

国際公開第2008/073367号パンフレットが、異なる増殖条件による、Y4184(30.7%)対Y4184U(平均12.4%)における、定量化されたEPA% TFAの差異について記載していることに留意されたい。

【0199】

実施例6

高EPA生産性のためのヤロウィア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)Z1978株およびZ1978U株の生成

Y・リポリティカ(*Y. lipolytica*)Z1978U株は、上記の実施例3で宿主として使用した。Z1978U株は、Y・リポリティカ(*Y. lipolytica*)ATCC番号20362に由来し、デルタ-9エロンゲース/デルタ-8デサチュラーゼ経路の発現により、総脂質に対してEPAを高く産生することができる。この株はUra-表現型を示し、その構築は、参照により本明細書に組み込む米国特許出願第13/218,708号明細書(2011年8月26日に出願されたE.I. du Pont de Nemours & Co., Inc., 代理人整理番号CL5411USNA)の実施例2に記載されている。

10

【0200】

Z1978U株の開発は、Y2224株、Y4001株、Y4001U株、Y4036株、Y4036U株、L135株、L135U9株、Y8002株、Y8006株、Y8006U株、Y8069株、Y8069U株、Y8154株、Y8154U株、Y8269株、Y8269U株、Y8412株(2009年5月14日に受託番号ATCC PTA-10026で米国培養細胞系統保存機関に寄託された)、Y8412U株、Y8647株、Y8467U株、Y9028株、Y9028U株、Y9502株、Y9502U株、およびZ1978株の構築を必要とした。

20

【0201】

ヤロウィア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)Y9502株の遺伝子型

Y9502株の生成は、米国特許出願公開第2010-0317072-A1号明細書に記載されている。Y9502株は、Y・リポリティカ(*Y. lipolytica*)ATCC番号20362に由来し、デルタ-9エロンゲース/デルタ-8デサチュラーゼ経路の発現により、総脂質に対して約57.0%のEPAを産生することができた。

30

【0202】

野生型Y・リポリティカ(*Y. lipolytica*)ATCC番号20362に対するY9502株の最終的な遺伝子型は、Ura+、Pex3-、未知1-、未知2-、未知3-、未知4-、未知5-、未知6-、未知7-、未知8-、未知9-、未知10-、YAT1::ME3S::Pex16、GPD::ME3S::Pex20、YAT1::ME3S::Lip1、FBAINm::EgD9eS::Lip2、EXP1::EgD9eS::Lip1、GPAT::EgD9e::Lip2、YAT1::EgD9eS::Lip2、FBAINm::EgD8M::Pex20、EXP1::EgD8M::Pex16、FBAIN::EgD8M::Lip1、GPD::EaD8S::Pex16(2コピー)、YAT1::E389D9eS/EgD8M::Lip1、YAT1::EgD9eS/EgD8M::Aco、FBAINm::EaD9eS/EaD8S::Lip2、GPD::FmD12::Pex20、YAT1::FmD12::Oct、EXP1::FmD12S::Aco、GPDIN::FmD12::Pex16、EXP1::EgD5M::Pex16、FBAIN::EgD5SM::Pex20、GPDIN::EgD5SM::Aco、GPM::EgD5SM::Oct、EXP1::EgD5SM::Lip1、YAT1::EaD5SM::Oct、FBAINm::PaD17::Aco、EXP1::PaD17::Pex16、YAT1::PaD17S::Lip1、YAT1::YLCPT1::Aco、YAT1::MCS::Lip1、FBA::MCS::Lip1、YAT1::MaLPAAT1S::P

40

50

e x 1 6 であった。

【 0 2 0 3 】

上記で使用され、実施例 5 で記載されなかった略語は以下のとおりである：E a D 8 S は、ユーグレナアナベーナ (*E u g l e n a a n a b a e n a*) [米国特許第 7 , 7 9 0 , 1 5 6 号明細書] に由来するコドン最適化デルタ - 8 デサチュラーゼ遺伝子であり；E 3 8 9 D 9 e S / E g D 8 M は、ユートレプチエラ (*E u t r e p t i e l l a*) 種 C C M P 3 8 9 (米国特許第 7 , 6 4 5 , 6 0 4 号明細書) に由来するコドン最適化デルタ - 9 エロンゲース遺伝子 (「 E 3 8 9 D 9 e S 」) を、デルタ - 8 デサチュラーゼ「E g D 8 M」(上記) [米国特許出願公開第 2 0 0 8 - 0 2 5 4 1 9 1 - A 1 号明細書] に連結することにより作製された D G L A シンターゼであり；E g D 9 e S / E g D 8 M は、デルタ - 9 エロンゲース「E g D 9 e S」(上記) を、デルタ - 8 デサチュラーゼ「E g D 8 M」(上記) [米国特許出願公開第 2 0 0 8 - 0 2 5 4 1 9 1 - A 1 号明細書] に連結することにより作製された D G L A シンターゼであり；E a D 9 e S / E g D 8 M は、E . アナベーナ (*E . a n a b a e n a*) [米国特許第 7 , 7 9 4 , 7 0 1 号明細書] に由来するコドン最適化デルタ - 9 エロンゲース遺伝子 (「 E a D 9 e S 」) を、デルタ - 8 デサチュラーゼ「E g D 8 M」(上記) [米国特許出願公開第 2 0 0 8 - 0 2 5 4 1 9 1 - A 1 号明細書] に連結することにより作製された D G L A シンターゼであり；E g D 5 M および E g D 5 S M は、ユーグレナ・グラシリス (*E u g l e n a g r a c i l i s*) [米国特許第 7 , 6 7 8 , 5 6 0 号明細書] に由来する、変異 H P G モチーフ [米国特許出願公開第 2 0 1 0 - 0 0 7 5 3 8 6 - A 1 号明細書] を含む合成変異体デルタ - 5 デサチュラーゼ遺伝子であり；E a D 5 S M は、E . アナベーナ (*E . a n a b a e n a*) [米国特許第 7 , 9 4 3 , 3 6 5 号明細書] に由来する、変異 H a G G モチーフ [米国特許出願公開第 2 0 1 0 - 0 0 7 5 3 8 6 - A 1 号明細書] を含む合成変異体デルタ - 5 デサチュラーゼ遺伝子であり；M C S は、リゾビウム・レグミノサルム・ビービー・ピシアエ (*R h i z o b i u m l e g u m i n o s a r u m b v . v i c i a e*) 3 8 4 1 [米国特許出願公開第 2 0 1 0 - 0 1 5 9 5 5 8 - A 1 号明細書] に由来する、コドン最適化マロニル C o A 合成酵素遺伝子であり、M a L P A A T 1 S は、モルティエラ・アルピナ (*M o r t i e r e l l a a l p i n a*) [米国特許第 7 , 8 7 9 , 5 9 1 号明細書] に由来するコドン最適化リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ遺伝子である。

10

20

30

【 0 2 0 4 】

Y 9 5 0 2 株における総脂質含量および組成の詳細な分析のために、細胞を合計 7 日間、2 段階で増殖させるフラスコアッセイを実施した。分析に基づくと、Y 9 5 0 2 株は、3 . 8 g / L の D C W、3 7 . 1 の T F A % D C W、2 1 . 3 の E P A % D C W を産生し、脂質プロファイルは以下のとおりであった (各脂肪酸の濃度は T F A の重量パーセント [「 % T F A 」] として示す) : 1 6 : 0 (パルミチン酸) - 2 . 5、1 6 : 1 (パルミトレイン酸) 0 . 5、1 8 : 0 (ステアリン酸) 2 . 9、1 8 : 1 (オレイン酸) 5 . 0、1 8 : 2 (L A) - 1 2 . 7、A L A - 0 . 9、E D A - 3 . 5、D G L A - 3 . 3、A R A - 0 . 8、E T r A - 0 . 7、E T A - 2 . 4、E P A - 5 7 . 0、その他 - 7 . 5。

40

【 0 2 0 5 】

ヤロウシア・リポリティカ (*Y a r r o w i a l i p o l y t i c a*) Z 1 9 7 8 株の生成

Y 9 5 0 2 株からの Z 1 9 7 8 株の開発は、参照により本明細書で組み込む米国仮特許出願第 6 1 / 3 7 7 2 4 8 号明細書 (米国特許出願第 1 3 / 2 1 8 , 5 9 1 号明細書に対応する) および米国仮特許出願第 6 1 / 4 2 8 , 2 7 7 号明細書 (米国特許出願第 1 3 / 2 1 8 , 6 7 3 号明細書に対応する) に最初に記載された。

【 0 2 0 6 】

具体的には、Y 9 5 0 2 株における U r a 3 遺伝子を破壊するために、全般的方法に従って、S a l I / P a c I 消化コンストラクト p Z K U M (米国特許出願公開第 2 0 0 9

50

- 0093543 - A1号明細書、その中の表15、配列番号133、および図8Aを参照のこと)を使用して、Ura3変異遺伝子をY9502株のUra3遺伝子に組み込んだ。合計27の形質転換体(8つの形質転換体を含む第1群、8つの形質転換体を含む第2群、および11の形質転換体を含む第3群から選択された)を、最少培地+5-フルオロオロチン酸[「MM+5-FOA」]選択プレート上で増殖させ、30℃で2~5日間維持した。MM+5-FOAは以下のものを含む(1リットル当たり):20gのグルコース、6.7gの酵母窒素基礎培地、75mgのウラシル、75mgのウリジン、および100mg/L~1000mg/Lの濃度範囲に対するFOA活性試験に基づいた(供給業者から入手した各パッチ内で変動があるので)適正量のFOA(Zymo Research Corp., Orange, CA)。

10

【0207】

さらなる実験により、第3群の形質転換体のみが実際のUra-表現型を示すことが決定された。

【0208】

全般的方法に従って、Ura-細胞をMM+5-FOAプレートから掻き取り、脂肪酸分析に付した。このようにして、GC分析より、MM+5-FOAプレート上で増殖させた第3群のpZKUM-形質転換体#1、#3、#6、#7、#8、#10、および#11において、それぞれTFAの28.5%、28.5%、27.4%、28.6%、29.2%、30.3%、および29.6%のEPAが存在することが示された。これら7株はそれぞれ、Y9502U12株、Y9502U14株、Y9502U17株、Y9502U18株、Y9502U19株、Y9502U21株、およびY9502U22株(まとめてY9502U)と命名した。

20

【0209】

次いで、コンストラクトpZKL3-9DP9N(図9;配列番号29)を生成して、1つのデルタ-9デサチュラーゼ遺伝子、1つのコリンリン酸シチジルトランスフェラーゼ遺伝子、および1つのデルタ-9エロンゲース変異遺伝子を、Y9502U株のヤロウイア(Yarrowia)YALI0F32131p遺伝子座(GenBank受託番号XM_506121)に組み込んだ。したがって、pZKL3-9DP9Nプラスミドは下記の構成要素を含有した:

【0210】

30

【表 1 1】

表 10. プラスミド pZKL3-9DP9N (配列番号 29)の説明

配列番号 29 内の RE 部位および ヌクレオチド	断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明
<i>AscI/BsWI</i> (887-4)	YALI0F32131p 遺伝子座の 884bp の 5'部分(GenBank 受託番号 XM_506121、図中で「Lip3-5」と標記)
<i>PacI/SphI</i> (4396-3596)	YALI0F32131p 遺伝子座の 801bp の 3'部分(GenBank 受託番号 XM_506121、図中で「Lip3-3」と標記)
<i>SwaI/BsWI</i> (11716 - 1)	YAT1::EgD9eS-L35G::Pex20、以下を含む: <ul style="list-style-type: none"> • YAT1: ヤロウイア・リポリティカ(<i>Yarrowia lipolytica</i>) YAT1 プロモーター; (図中で「YAT」と標記; 米国特許出願公開第 2010-0068789-A1 号明細書); • EgD9eS-L35G: ユーグレナ・グラシリス(<i>Euglena gracilis</i>) (「EgD9eS」; 米国特許第 7,645,604 号明細書)に由来するデルタ-9 エロンゲース遺伝子 (配列番号 30; 米国特許出願 13/218,591 号明細書)の合成変異体(図中で「EgD9ES-24」と標記); • Pex20: ヤロウイア(<i>Yarrowia</i>)Pex20 遺伝子(GenBank 受託番号 AF054613)由来の Pex20 ターミネーター配列
<i>PmeI/SwaI</i> (8759-11716)	GPDIN::YID9::Lip1、以下のものを含む: <ul style="list-style-type: none"> • GPDIN: <i>Y. lipolytica</i>(<i>Y. lipolytica</i>) GPDIN プロモーター(米国特許第 7,459,546 号明細書; 図中で「GPDPro+Intron」と標記); • YID9: <i>Y. lipolytica</i>(<i>Y. lipolytica</i>) デルタ-9 デサチュラーゼ遺伝子 (GenBank 受託番号 XM_501496; 配列番号 32) (図中で「YID9D」と標記); • Lip1: ヤロウイア(<i>Yarrowia</i>) Lip1 遺伝子(GenBank 受託番号 Z50020)由来の Lip1 ターミネーター配列
<i>ClalI/PmeI</i> (6501-8759)	EXP1::YIPCT::Pex16、以下のものを含む: <ul style="list-style-type: none"> • EXP1: <i>Y. lipolytica</i>(<i>Y. lipolytica</i>) 排出タンパク質(EXP1)プロモーター (図中で「EXP」と標記; 国際公開第 2006/052870 号パンフレット); • YIPCT: <i>Y. lipolytica</i>(<i>Y. lipolytica</i>)コリンリン酸シチジルトランスフェラーゼ[「PCT」]遺伝子(GenBank 受託番号 XM_502978; 配列番号 34); • Pex16: ヤロウイア(<i>Yarrowia</i>)Pex16 遺伝子(GenBank 受託番号 U75433)由来の Pex16 ターミネーター配列
<i>SalI/EcoRI</i> (6501-4432)	ヤロウイア(<i>Yarrowia</i>) Ura3 遺伝子(GenBank 受託番号 AJ306421)

10

20

30

【0 2 1 1】

p Z K L 3 - 9 D P 9 N プラスミドを A s c I / S p h I で消化し、次いで Y 9 5 0 2 U 1 7 株の形質転換に使用した。形質転換細胞を最少培地 [「MM」] プレート上に播種し、30 で 3 ~ 4 日間維持した。MM プレートは以下のものを含んだ (1 リットル当たり) : 20 g のグルコース、1.7 g のアミノ酸非含有 yeast nitrogen base、1.0 g のプロリン、および pH 6.1 (調整不要)。単一コロニーを MM プレート上に再画線し、次いで 30 で液体 MM に接種して 250 rpm / 分で 2 日間振盪した。細胞を遠心分離により回収して HGM に再懸濁し、次いで 250 rpm / 分で 5 日間振盪した。細胞を上記の脂肪酸分析に付した。

40

【0 2 1 2】

GC 分析により、p Z K L 3 - 9 D P 9 N を含有する Y 9 5 0 2 U 1 7 から選択された 96 株の大部分が TFA の 50 ~ 56 % の EPA を産生することが示された。TFA の約 59.0 %、56.6 %、58.9 %、56.5 %、および 57.6 % の EPA を産生する 5 株 (すなわち、# 31、# 32、# 35、# 70、および # 80) を、それぞれ Z 1 9 7 7 株、Z 1 9 7 8 株、Z 1 9 7 9 株、Z 1 9 8 0 株、および Z 1 9 8 1 株と命名した

50

。

【0213】

野生型 *Y. lipolytica* (ATCC 番号 20362) に対して、これらの pZKL3-9DP9N 形質転換株の最終的な遺伝子型は、Ura⁺、Pex3⁻、未知1⁻、未知2⁻、未知3⁻、未知4⁻、未知5⁻、未知6⁻、未知7⁻、未知8⁻、未知9⁻、未知10⁻、未知11⁻、YAT1::ME3S::Pex16、GPD::ME3S::Pex20、YAT1::ME3S::Lip1、FBAINm::EgD9eS::Lip2、EXP1::EgD9eS::Lip1、GPAT::EgD9e::Lip2、YAT1::EgD9eS::Lip2、YAT1::EgD9eS-L35G::Pex20、FBAINm::EgD8M::Pex20、EXP1::EgD8M::Pex16、FBAIN::EgD8M::Lip1、GPD::EaD8S::Pex16 (2コピー)、YAT1::E389D9eS/EgD8M::Lip1、YAT1::EgD9eS/EgD8M::Aco、FBAINm::EaD9eS/EaD8S::Lip2、GPDIN::YLD9::Lip1、GPD::FmD12::Pex20、YAT1::FmD12::Oct、EXP1::FmD12S::Aco、GPDIN::FmD12::Pex16、EXP1::EgD5M::Pex16、FBAIN::EgD5SM::Pex20、GPDIN::EgD5SM::Aco、GPM::EgD5SM::Oct、EXP1::EgD5SM::Lip1、YAT1::EaD5SM::Oct、FBAINm::PaD17::Aco、EXP1::PaD17::Pex16、YAT1::PaD17S::Lip1、YAT1::YLCPT1::Aco、YAT1::MCS::Lip1、FBA::MCS::Lip1、YAT1::MaLPAAT1S::Pex16、EXP1::YLPCT::Pex16 であった。

10

20

【0214】

Z1977株、Z1978株、Z1979株、Z1980株、およびZ1981株におけるYALI0F32131p遺伝子座 (GenBank 受託番号 XM_50612) のノックアウトは、pZKL3-9DP9Nによる形質転換により生成した、これらのEP株のいずれにも確認されなかった。

【0215】

Z1977株、Z1978株、Z1979株、Z1980株、およびZ1981株のYPDプレートからの細胞を増殖させて、総脂質含量および組成について分析した。具体的には、全般的な方法に記載のように、フラスコアッセイを実施した。下記の表11に、これらの株のそれぞれにおける総脂質含量および組成を要約する (すなわち、総DCW、TF A%DCW、TF A [「%TF A」] の重量パーセントとしての各脂肪酸の濃度、およびEPA%DCW)。脂肪酸は、16:0 (パルミチン酸)、16:1 (パルミトレイン酸)、18:0 (ステアリン酸)、18:1 (オレイン酸)、18:2 (リノール酸)、ALA (アルファ-リノレン酸)、EDA (エイコサジエン酸)、DGLA (ジホモ-ガンマ-リノレン酸)、ARA (アラキドン酸)、ETRA (エイコサトリエン酸)、ETA (エイコサテトラエン酸)、EPA (エイコサペンタエン酸)、およびその他である。

30

【0216】

40

【表 1 2】

表 11. フラスコアッセイによる、ヤロウウィア(Yarrowia) Z1977 株、Z1978 株、Z1979 株、Z1980 株、および Z1981 株における総脂質含量および組成

株	DCW (g/L)	TFAs % DCW	% TFAs													EPA % DCW
			16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	ALA	EDA	DGLA	ARA	EtrA	ETA	EPA	その他	
Z1977	3.8	34.3	2.0	0.5	1.9	4.6	11.2	0.7	3.1	3.3	0.9	0.7	2.2	59.1	9.9	20.3
Z1978	3.9	38.3	2.4	0.4	2.4	4.8	11.1	0.7	3.2	3.3	0.8	0.6	2.1	58.7	9.5	22.5
Z1979	3.7	33.7	2.3	0.4	2.4	4.1	10.5	0.6	3.2	3.6	0.9	0.6	2.2	59.4	9.8	20.0
Z1980	3.6	32.7	2.1	0.4	2.2	4.0	10.8	0.6	3.1	3.5	0.9	0.7	2.2	59.5	10.0	19.5
Z1981	3.5	34.3	2.2	0.4	2.1	4.2	10.6	0.6	3.3	3.4	1.0	0.8	2.2	58.5	10.7	20.1

【 0 2 1 7 】

Z 1 9 7 8 株は、続いて部分的なゲノム配列決定に付された。この研究により、米国特許出願第 1 3 / 2 1 8 , 6 7 3 号明細書に記載のように、ヤロウウィア (Y a r r o w i a) ゲノムに組み込まれた 6 つのデルタ - 5 デサチュラーゼ遺伝子 (すなわち、キメラ遺伝子 E X P 1 : : E g D 5 M : : P e x 1 6 、 F B A I N : : E g D 5 S M : : P e x 2 0

10

20

30

40

50

、GPDIN::EgD5SM::Aco、GPM::EgD5SM::Oct、EXP1::EgD5SM::Lip1、YAT1::EaD5SM::Oct)の代わりに、実際には4つのデルタ-5デサチュラーゼ遺伝子(すなわち、EXP1::EgD5SM::Pex16、FBAIN::EgD5SM::Pex20、EXP1::EgD5SM::Lip1、およびYAT1::EaD5SM::Oct)のみを操作された株が含有していることが判明した。

【0218】

Z1978株におけるUra3遺伝子を破壊するために、コンストラクトpZKUM(米国特許出願公開第2009-0093543-A1号明細書、その中の表15、配列番号133、および図8Aを参照のこと)を使用して、Y9502株のpZKUM形質転換についての記載(上記)と同様の方法で、Ura3変異遺伝子をZ1978株のUra3遺伝子に組み込んだ。合計16の形質転換体(8つの形質転換体を含む第1の「B」群および8つの形質転換体を含む第2の「C」群から選択された)を増殖させ、Ura-表現型を有することを確認した。

10

【0219】

GC分析により、MM+5-FOAプレート上で増殖させたB群pZKUM-形質転換体株#1、#2、#3、および#4に、それぞれTFAの30.8%、31%、30.9%、および31.3%のEPAが存在することが示された。これらの4株を、それぞれZ1978BU1株、Z1978BU2株、Z1978BU3株、およびZ1978BU4株と命名した。

20

【0220】

GC分析により、MM+5-FOAプレート上で増殖させたC群pZKUM-形質転換体株#1、#2、#5、および#6に、それぞれTFAの34.4%、31.9%、31.2%、および31%のEPAが存在することが示された。これらの4株を、それぞれZ1978CU1株、Z1978CU2株、Z1978CU3株、およびZ1978CU4株と命名した。

【0221】

Z1978BU1株、Z1978BU2株、Z1978BU3株、Z1978BU4株、Z1978CU1株、Z1978CU2株、Z1978CU3株、およびZ1978CU4株を、まとめてZ1978U株と命名した。

30

【0222】

実施例7

ヤロウィア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)形質転換体における分泌されたインベルターゼの局在

プラスミドpYRH68(配列番号13、Suc2SS/m-ScSUC2融合物を含む)、pYRH73(配列番号15、m-ScSUC2のみを含む)、pYRH69(配列番号18、XPR2PP+13/Suc2SS/m-ScSUC2融合物を含む)、および/またはpYRH74(配列番号21、XPR2PP+13/m-ScSUC2融合物を含む)を、*Y. lipolytica*(*Y. lipolytica*)Y2224U株(野生型ヤロウィア(*Yarrowia*)ATCC番号20362株のUra3遺伝子の自律変異からの5-フルオロオロチン酸[「FOA」]抵抗性変異体)または*Y. lipolytica*(*Y. lipolytica*)Z1978U株(実施例6)のいずれかへの形質転換のために、BsWI/PacIで別々に消化した。インベルターゼ活性は、形質転換体全細胞およびその培地で測定した。

40

【0223】

インベルターゼ活性のアッセイ

インピボでのインベルターゼ活性を、Silveiraら(Anal. Biochem., 238:26-28(1996))の記載を若干修正して、全細胞を使用して測定した。手短に言えば、SDまたはSS培地中で指数関数的に増殖している細胞(1.4~1.8のOD₆₀₀)40mg(乾燥細胞重量)を4で遠心分離して回収し、冷酢酸ナト

50

リウム緩衝液 (50 mM、pH 5.0) で3回洗浄した。細胞を30 で15分間、100 mM NaF 8 mL 中で撹拌しながらインキュベートした。50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 5.0 中の300 mM スクロース溶液を4 mL 添加した後、10分までの種々の時間間隔でインペルターゼ活性を、Nanosep MF 0.2 μ (Pall Life Sciences; Port Washington, NY) を使用して濾過した後にグルコースアナライザー (YSI Life Sciences) で測定した。酵素活性の1単位 (U) を1分あたりに生成されるグルコースの μ mol と定義し、生成量を計算してDCW 1 グラムあたりのインペルターゼ活性単位を得た。

【0224】

培地からのインペルターゼ活性は、濾過した培地1.5 mL で測定した。試料中の残存した糖をすべて除去するために、試料を4 で一晚、0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に対して透析した。透析試料 (200 μ l) を、50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 中の300 mM スクロース溶液100 μ l と共に最大30分間インキュベートした。50 μ l の K_2HPO_4 を加え、直ちに95 加熱ブロックに10分間置いて反応を停止した。インペルターゼ活性をグルコースアナライザー (YSI Life Sciences) で測定した。タンパク質濃度を、標準としてウシ血清アルブミンを用いて、Coomassie Plus Bradford Assay キット (Thermo Scientific; Rockford, IL) により測定した。培地1リットルあたりのインペルターゼ活性単位として活性を計算し、タンパク質1 mg 当たりの単位として比活性を計算した。生成量を計算して、培養物のDCW 1 グラムあたりのインペルターゼ活性単位を得た。

【0225】

形質転換体 Y. リポリティカ (Y. lipolytica) Y2224U SUC⁺ 株における細胞外および全細胞のインペルターゼ活性

細胞外および全細胞のインペルターゼ活性は、それぞれ培養上清および全細胞を使用して、指数関数的に増殖する細胞で測定した。下記の表12に示すように、2つの独立した実験から少なくとも4つのアッセイを実施して、平均値を報告する。

【0226】

【表13】

表 12. Y. リポリティカ (Y. lipolytica) 株 Y2224U
SUC⁺株の培地および全細胞に由来するインペルターゼ活性

プラスミド (SUC2 コンストラクト)	試料のタイプ	基質	活性 (U/L)	比活性 (U/mg タンパク質)	生成量 (U/g DCW)
pRHY68 (Suc2SS/m- ScSuc2)	培地	グルコース	44.8 \pm 3.8	10.1 \pm 0.7	2431 \pm 355
		スクロース	44.8 \pm 8.9	10.9 \pm 1.1	2361 \pm 256
	全細胞	グルコース	-	-	32 \pm 9
		スクロース	-	-	28 \pm 3
pYRH74 (XPR2PP+13/m- ScSuc2)	培地	グルコース	38.8 \pm 2.2	8.7 \pm 1.4	1934 \pm 62
		スクロース	29.9 \pm 3.3	7.5 \pm 1.1	1612 \pm 183
	全細胞	グルコース	-	-	19 \pm 4
		スクロース	-	-	28 \pm 3

【0227】

増殖研究の結果と一致して、インペルターゼ活性は、pYRH68 または pYRH74 で形質転換された Y. リポリティカ (Y. lipolytica) 株の培養上清および全細胞で観察された。Y. リポリティカ (Y. lipolytica) 形質転換体の pRH69 および pRH73 はスクロース培地上で増殖せず、グルコース培地で増殖させた細胞培養物には、検出可能な細胞外または全細胞のインペルターゼ活性はなかった。

【0228】

インベルターゼ活性は、XPR2PP+13/m-ScSuc2に対してSuc2SS/m-ScSuc2の形質転換体において若干高くなった。成熟Xpr2の13個のアミノ酸を追加しても、分泌シグナルプロセッシングに必要なエンドペプチダーゼへの到達には依然として何らかの二次構造上の障害が存在した可能性がある。しかしながら、両方のSUC⁺株について98%超のインベルターゼ活性が培地に検出され、培養上清中のバイオマス当たりの細胞外インベルターゼ活性が、以前の報告よりも高いことが観察された。

【0229】

形質転換体Y.リポリティカ(Y. lipolytica)株Y1978U SUC⁺株における細胞外および全細胞のインベルターゼ活性

インベルターゼ活性は、形質転換体の全細胞およびその培地で測定した。唯一の炭素源としてグルコースまたはスクロースを含有するYP(10g/LのBacto酵母抽出物および20g/LのBactoペプトン)培地で培養物を増殖させた。下記の表13に示すように、2つの異なる形質転換体についてSUC2コンストラクトのそれぞれを試験し、平均値を報告する。

【0230】

【表14】

表 13. Y.リポリティカ(Y. lipolytica) Z1978U
SUC⁺株の培地および全細胞に由来するインベルターゼ活性

プラスミド (SUC2コンストラクト)	試料のタイプ	基質	活性 (U/L)	比活性 (U/mg タンパク質)	生成量 (U/g DCW)
pRHY68 (Suc2SS/m- ScSuc2)	培地	グルコース	15.2 ± 2.5	0.6 ± 0.1	761 ± 123
		スクロース	13.0 ± 4.7	0.5 ± 0.2	648 ± 235
	全細胞	グルコース	-	-	35 ± 6
		スクロース	-	-	28 ± 3
pYRH74 (XPR2PP+13/m- ScSuc2)	培地	グルコース	40.0 ± 21.4	1.5 ± 0.8	1999 ± 1068
		スクロース	38.1 ± 23.9	1.5 ± 1.0	1906 ± 1196
	全細胞	グルコース	-	-	79 ± 34
		スクロース	-	-	66 ± 28

【0231】

YPベースの培地のタンパク質濃度は、合成ベースの培地よりも顕著に高く(表12)、インベルターゼ比活性(U/mgタンパク質)を低下させた。これにもかかわらず、pRHY68形質転換体は、グルコースとスクロースの培養物間で同様のインベルターゼ活性を示し、90%超のインベルターゼ活性が培地中に検出された。pYRH74形質転換体については、一方の形質転換体が、他方の形質転換体よりも、すべての試験条件において、はるかに高いインベルターゼ活性を示した。したがって、平均インベルターゼ活性は大きな標準誤差を伴って上昇した。それでも、90%超のインベルターゼ活性が、唯一の炭素源としてグルコースまたはスクロースのいずれかを含有した培地中で検出された。

【0232】

実施例 8

インベルターゼをコードする公的に入手可能な遺伝子の同定

サッカロミセス・セレビスシア(Saccharomyces cerevisiae)インベルターゼは、配列番号1として本明細書に示すSUC2遺伝子によりコードされる。この1599bpの遺伝子は、グリコシル化形態でS.セルビスシア(S. cerevisiae)の周辺質に分泌される、532個のアミノ酸の完全長インベルターゼ(配列番号2)をコードする。これに対して、19個のアミノ酸長の5'シグナル配列(すなわち、配列番号1のヌクレオチド1~57によりコードされる)を欠損する「成熟」ScSU

C2遺伝子[「m - S c S U C 2」]は、配列番号3として示され、配列番号4のタンパク質をコードする。

【0233】

m - S c S U C 2をコードするタンパク質配列(配列番号4)を使用して、BLAST「nr」データベース(全ゲノムショットガン(whole genome shotgun)「[WGS]」プロジェクトからの環境試料を除く、非重複性GenBank CDS翻訳、プロテインデータベース「[PDB]」タンパク質配列データベース、SWISS-PROTタンパク質配列データベース、Protein Information Resource「[PIR]」タンパク質配列データベース、および蛋白質研究奨励会「[PRF]」タンパク質配列データベースをすべて含む)内の類似性を有する配列を同定するために、国立バイオテクノロジー情報センター(National Center for Biotechnology Information)「[NCBI]」BLASTP 2.2.26+(Basic Local Alignment Search Tool; Altschul, S.F., et al., Nucleic Acids Res., 25:3389-3402(1997); Altschul, S.F., et al., FEBS J., 272:5101-5109(2005))検索を実施した。

10

【0234】

配列番号4が最大の類似性を有する配列を要約したBLASTP比較の結果を、%同一性、%類似性、および期待値に従って報告する。「%同一性」は、2つのタンパク質間で同一のアミノ酸のパーセントとして定義される。「%類似性」は、2つのタンパク質間で同一または保存のアミノ酸のパーセントとして定義される。「期待値」は、このサイズのデータベース検索においてまったく偶然に期待されるマッチの数を特定し、所与のスコアを用いてマッチの統計的有意性を評価する。

20

【0235】

多くのタンパク質が、m - S c S U C 2(配列番号4)と有意な類似性を共有するとして同定された。表14に、期待値が「4e - 90」以上で、「インベルターゼ」または「ベータ - フルクトフラノシダーゼ」のいずれかとして具体的にタンパク質を同定したアノテーションを有するヒットの部分的な要約を示す。ただし、これは本明細書の開示を限定するものと見なすべきではない。サッカロミセス・セレビシア(Saccharomyces cerevisiae)に対するヒットはすべて、以下に報告の結果から除外した。表14のタンパク質は、配列番号4と91%~99%の間のクエリーカバレッジ(query coverage)を共有した。

30

【0236】

【表 15】

表 14. インベルターゼをコードする公的に入手可能な遺伝子の一部

受託番号	説明	クエリー カバレッジ	E 値
BAJ07830.1, BAJ07833.1, BAJ07829.1	インベルターゼ[サッカロミセス・パラドキサス (<i>Saccharomyces paradoxus</i>)]	99%	0.0
CBK52121.1	インベルターゼ[サッカロミセス・バヤヌス(<i>Saccharomyces bayanus</i>)]	99%	0.0
AAX82487.1	ベータ-フルクトシダーゼ[サッカロミセス・カリオカヌス (<i>Saccharomyces cariocanus</i>)]	96%	0.0
XP_461505.2	ベータ-フルクトフラノシダーゼ[デバリオミセス・ハンセニイ (<i>Debaryomyces hansenii</i>) CBS767]	98%	5e-174
XP_451456.1	インベルターゼ[クリベロミセス・ラクチス(<i>Kluyveromyces lactis</i>) NRRL Y-1140]	98%	1e-172
P24133.1	インベルターゼ[シャワニオミセス・オクシデンタリス (<i>Schwanniomyces occidentalis</i>)]	98%	2e-151
P40912.1	インベルターゼ[ウィケルハモミセス・アノマルス (<i>Wickerhamomyces anomalus</i>)]	98%	6e-150
XP_002175417.1	インベルターゼ[シゾサッカロミセス・ジャポニカス (<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>) yFS275]	98%	3e-108
XP_003196854.1	ベータ-フルクトフラノシダーゼ[クリプトコックス・ガッティ (<i>Cryptococcus gattii</i>) WM276]	92%	1e-107
XP_567775.1	ベータ-フルクトフラノシダーゼ[クリプトコックス・ネオフォル マンズ(<i>Cryptococcus neoformans</i>) 変種ネオフォルマンズ (<i>neoformans</i>) JEC21]	92%	6e-106
EFZ01512.1	ベータ-フルクトフラノシダーゼ[メタリジウム・アニソプリエ (<i>Metarhizium anisopliae</i>) ARSEF 23]	92%	2e-104
NP_588300.1	ベータ-フルクトフラノシダーゼ[シゾサッカロミセス・ ポンベ(<i>Schizosaccharomyces pombe</i>) 972h-]	94%	2e-104
CBQ72191.1	可能性が高い SUC2 インベルターゼ(スクロース加水分解 酵素) [ソロスボリウム・レイリアヌム(<i>Sporisorium reilianum</i>) SRZ2]	96%	5e-104
EGX95794.1	ベータ-フルクトフラノシダーゼ[コルディセプス・ミリタリス (<i>Cordyceps militaris</i>) CM01]	95%	2e-103
XP_001823245.1, ABY49829.1	ベータ-フルクトフラノシダーゼ[アスペルギルス・オリゼ (<i>Aspergillus oryzae</i>) RIB40]	92%	3e-95
YP_001603959.1	インベルターゼ[グルコンアセトバクター・ジアゾトロフィクス (<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>) PAI 5]	91%	1e-91
XP_001265685.1	ベータ-フルクトフラノシダーゼ、推定上の[ネオサルトリア・ フィツシェリ(<i>Neosartorya fischeri</i>) NRRL 181]	92%	2e-91
XP_001273181.1	ベータ-フルクトフラノシダーゼ、推定上の[アスペルギルス・ クラバタス (<i>Aspergillus clavatus</i>) NRRL 1]	92%	2e-90
XP_749260.1, EDP53788.1	ベータ-フルクトフラノシダーゼ [アスペルギルス・フミガー ツス(<i>Aspergillus fumigatus</i>)]	92%	4e-90

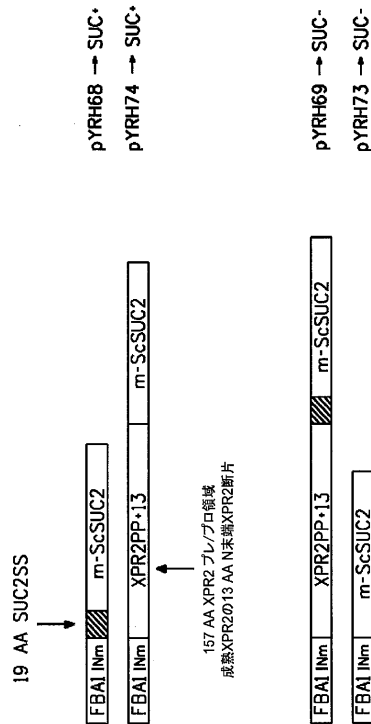
10

20

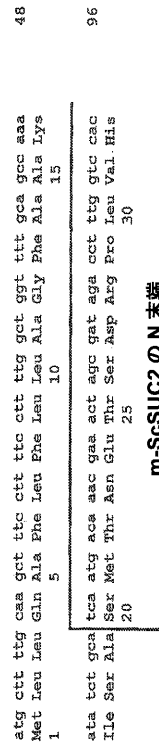
30

40

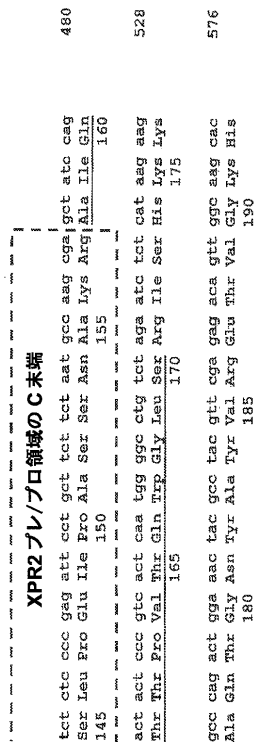
【図 1】



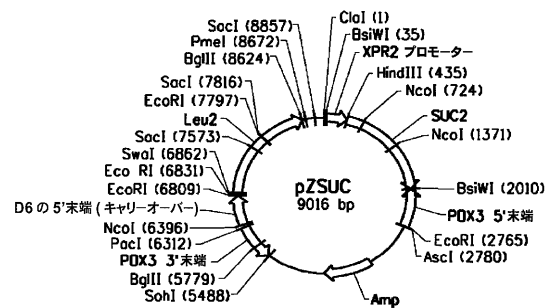
【図 2 A】



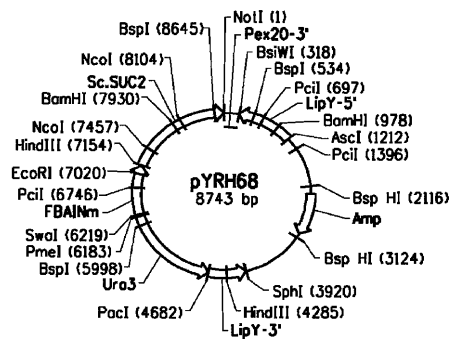
【図 2 B】



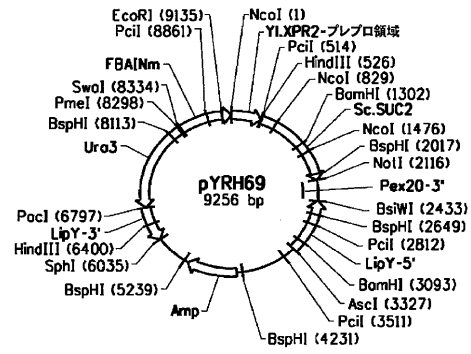
【図 3】



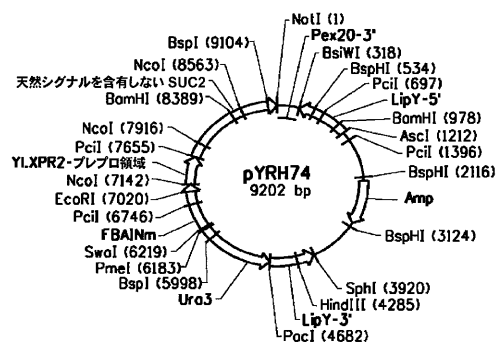
【図 4 A】



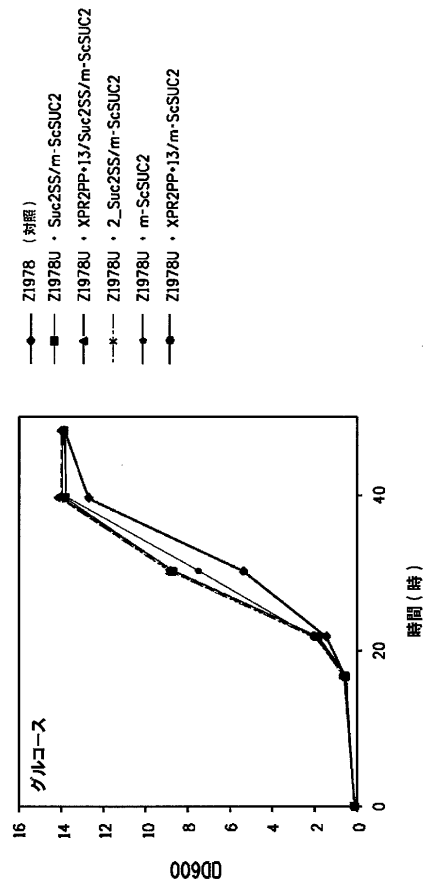
【 図 5 B 】



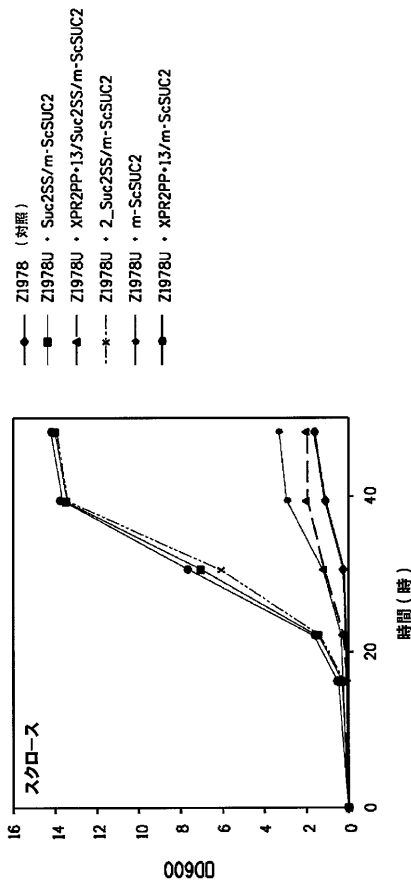
【 図 6 】



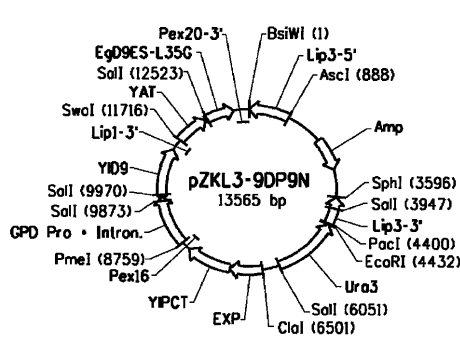
【 図 8 A 】



【 図 8 B 】



【 図 9 】



【 配 列 表 】

2014503216000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2011/060788

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N1/19 C12N9/26 C12N9/60 C12P7/64 C12N15/62 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N C12P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, FSTA, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NICAUD J-M ET AL: "EXPRESSION OF INVERTASE ACTIVITY IN YARROWIA-LIPOLYTICA AND ITS USE AS A SELECTIVE MARKER", CURRENT GENETICS, vol. 16, no. 4, 1 October 1989 (1989-10-01), pages 253-260, XP008148476, ISSN: 0172-8083, DOI: 10.1007/BF00422111 [retrieved on 2004-12-11] cited in the application the whole document	1,3,4, 9-11,13, 14
Y	EP 0 402 226 A1 (AGRONOMIQUE INST NAT RECH [FR]) 12 December 1990 (1990-12-12) the whole document	1,3,4, 9-11,13, 14
----- -/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
16 February 2012		10/04/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer van de Kamp, Mart

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2011/060788

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
5, 6(completely); 1, 3, 4, 8-15(partially)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2011/060788

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 5, 6(completely); 1, 3, 4, 8-15(partially)

A transformed *Yarrowia lipolytica* comprising an exogenous polynucleotide encoding a polypeptide having sucrose invertase activity, wherein: (a) said polypeptide comprises a signal sequence fused to a polypeptide sequence encoding mature sucrose invertase; and, (b) said signal sequence is a Xpr2 pre/pro-region and a N-terminal Xpr2 fragment; and, (c) said polypeptide sequence encoding mature sucrose invertase has at least 80% sequence identity based on the CLUSTALW method of alignment, when compared to SEQ ID NO:4. A method of producing at least one non-native product of interest comprising growing the transformed *Yarrowia lipolytica* capable of producing at least one non-native product of interest in a culture medium having at least one carbon source selected from the group consisting of: a) sucrose; and, b) glucose; whereby the at least one non-native product of interest is produced, and optionally, recovering the at least one non-native product of interest.

2. claims: 2, 7(completely); 1, 3, 4, 8-15(partially)

A transformed *Yarrowia lipolytica* comprising an exogenous polynucleotide encoding a polypeptide having sucrose invertase activity, wherein: (a) said polypeptide comprises a signal sequence fused to a polypeptide sequence encoding mature sucrose invertase; and, (b) said signal sequence is a sucrose invertase signal sequence, wherein the second amino acid of the sucrose invertase signal sequence can be any hydrophobic amino acid; and, (c) said polypeptide sequence encoding mature sucrose invertase has at least 80% sequence identity based on the CLUSTALW method of alignment, when compared to SEQ ID NO:4. A method of producing at least one non-native product of interest comprising growing the transformed *Yarrowia lipolytica* capable of producing at least one non-native product of interest in a culture medium having at least one carbon source selected from the group consisting of: a) sucrose; and, b) glucose; whereby the at least one non-native product of interest is produced, and optionally, recovering the at least one non-native product of interest.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2011/060788

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 329 501 A1 (AGRONOMIQUE INST NAT RECH [FR]) 23 August 1989 (1989-08-23) example 12 claims 12,15,17,18,20 -----	1,3,4, 9-11,13, 14
Y	DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1997, WOJTATOWICZ MARIA ET AL: "Kinetics of cell growth and citric acid production by Yarrowia lipolytica Suc+ transformants in sucrose media", XP002669411, Database accession no. PREV199800046556 abstract & POLISH JOURNAL OF FOOD AND NUTRITION SCIENCES, vol. 6, no. 4, 1997, pages 49-54, ISSN: 1230-0322 -----	1,3,4, 9-11,13, 14
Y	ANDRÉ FÖRSTER ET AL: "Citric acid production from sucrose using a recombinant strain of the yeast Yarrowia lipolytica", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 75, no. 6, 20 April 2007 (2007-04-20), pages 1409-1417, XP019513772, ISSN: 1432-0614, DOI: 10.1007/S00253-007-0958-0 the whole document -----	1,3,4, 9-11,13, 14
A	SREEKRISHNA K ET AL: "Invertase gene (SUC2) of Saccharomyces cerevisiae as a dominant marker for transformation of Pichia pastoris", GENE, ELSEVIER, vol. 59, no. 1, 1 January 1987 (1987-01-01), pages 115-125, XP025705894, ISSN: 0378-1119, DOI: 10.1016/0378-1119(87)90272-1 [retrieved on 1987-01-01] the whole document -----	1
Y	EP 0 220 864 A1 (PFIZER [US]) 6 May 1987 (1987-05-06) cited in the application the whole document page 3, lines 37-41 ----- -/--	1,3,4, 9-11,13, 14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2011/060788

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RONALD TAUSSIG ET AL: "Nucleotide sequence of the yeast SUC2 gene for invertase", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 11, no. 6, 1 January 1983 (1983-01-01), pages 1943-1954, XP001313026, the whole document -----	1
A	WO 2010/147907 A1 (DU PONT [US]; HONG SEUNG-PYO [US]; SHARPE PAMELA L [US]; XUE ZHIXIONG) 23 December 2010 (2010-12-23) the whole document -----	10,11, 13,14
A	WO 2008/151149 A2 (SOLAZYME INC [US]; TRIMBUR DONALD E [US]; IM CHUNG-SOON [US]; DILLON H) 11 December 2008 (2008-12-11) claims 7,11 -----	10,11, 13,14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2011/060788

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0402226	A1	12-12-1990	EP 0402226 A1	12-12-1990
			JP 4117291 A	17-04-1992
EP 0329501	A1	23-08-1989	DK 38989 A	29-07-1989
			EP 0329501 A1	23-08-1989
			FR 2626584 A1	04-08-1989
			IE 890282 L	28-07-1989
			JP 2005882 A	10-01-1990
			US 5212087 A	18-05-1993
EP 0220864	A1	06-05-1987	AT 86302 T	15-03-1993
			AU 586041 B2	29-06-1989
			AU 6416186 A	14-05-1987
			CA 1340837 C	07-12-1999
			CN 1138632 A	25-12-1996
			CN 1141339 A	29-01-1997
			CN 86106522 A	16-09-1987
			DE 3687878 D1	08-04-1993
			DE 3687878 T2	15-07-1993
			DK 496886 A	11-06-1987
			EG 18142 A	30-08-1992
			EP 0220864 A1	06-05-1987
			ES 2038966 T3	16-08-1993
			FI 864206 A	19-04-1987
			HU 209150 B	28-03-1994
			IE 59774 B1	06-04-1994
			IL 80297 A	21-02-1993
			JP 3096297 B2	10-10-2000
			JP 63164889 A	08-07-1988
			NO 864148 A	21-04-1987
			NZ 217985 A	25-06-1991
			PH 27026 A	01-02-1993
			PL 155850 B1	31-01-1992
			PL 261912 A1	19-10-1987
			PT 83562 A	01-11-1986
			RU 2069694 C1	27-11-1996
			RU 2157845 C2	20-10-2000
			US 4937189 A	26-06-1990
			YU 124588 A	31-08-1989
			YU 177386 A	30-04-1989
WO 2010147907	A1	23-12-2010	AU 2010260234 A1	24-11-2011
			CA 2765911 A1	23-12-2010
			EP 2442666 A1	25-04-2012
			WO 2010147907 A1	23-12-2010
WO 2008151149	A2	11-12-2008	AU 2008259834 A1	11-12-2008
			CA 2689724 A1	11-12-2008
			CN 101765661 A	30-06-2010
			CO 6270374 A2	20-04-2011
			EC SP099800 A	26-02-2010
			EP 2152849 A2	17-02-2010
			EP 2351845 A1	03-08-2011
			JP 2010528627 A	26-08-2010
			KR 20100031527 A	22-03-2010
			US 2009004715 A1	01-01-2009
			US 2009011480 A1	08-01-2009
			US 2009035842 A1	05-02-2009

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2011/060788

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2009047721 A1	19-02-2009
		US 2009061493 A1	05-03-2009
		US 2009148918 A1	11-06-2009
		US 2010323413 A1	23-12-2010
		US 2010323414 A1	23-12-2010
		US 2011014665 A1	20-01-2011
		US 2011015417 A1	20-01-2011
		US 2011047863 A1	03-03-2011
		US 2011190522 A1	04-08-2011
		US 2012028319 A1	02-02-2012
		WO 2008151149 A2	11-12-2008

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(72)発明者 ジョン・イー・シーブ

アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 8 0 0 1 . アロウェイ . ピー・オー・ボックス 1 2 9

(72)発明者 チュイン・チュン・ジュウ

アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 3 8 2 . ウェストチェスター . リヴィアロード 5 4 4

Fターム(参考) 4B024 AA03 AA05 BA12 CA04 DA12 EA04 GA11 HA01

4B064 AB06 AC05 AC14 AC39 AD01 AD61 AD88 AE03 AE43 AH01

AH02 AH08 BJ01 BJ04 BJ05 BJ09 BJ11 BJ15 CA06 CA19

CB07 CC24 CD09 DA10

4B065 AA72Y AA80Y AB01 AC15 BA02 BB15 BB16 CA03 CA05 CA09

CA10 CA12 CA13 CA17 CA18 CA31 CA41

(54)【発明の名称】スクロース利用のための、ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowialipolytica*) におけるサッカロミセス・セレビシア (*Saccharomyces cerevisiae*) SUC2 遺伝子の使用