

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7460540号
(P7460540)

(45)発行日 令和6年4月2日(2024.4.2)

(24)登録日 令和6年3月25日(2024.3.25)

| | |
|-------------------------|--------------------|
| (51)国際特許分類 | F I |
| C 1 2 N 9/10 (2006.01) | C 1 2 N 9/10 Z N A |
| C 1 2 N 1/19 (2006.01) | C 1 2 N 1/19 |
| C 1 2 P 33/00 (2006.01) | C 1 2 P 33/00 |
| C 1 2 N 15/54 (2006.01) | C 1 2 N 15/54 |

請求項の数 9 (全14頁)

| | | | |
|-------------------|-------------------------------|----------|--|
| (21)出願番号 | 特願2020-557258(P2020-557258) | (73)特許権者 | 503220392 ディーエスエム アイピー アセツ ビー・ブイ・ DSM IP ASSETS B.V. オランダ国, 6411 テーイーヘーレン, ヘット オーバールーン 1 Het Overloon 1, NL-6411 TE Heerlen, Netherlands |
| (86)(22)出願日 | 令和1年5月21日(2019.5.21) | (74)代理人 | 100107456 弁理士 池田 成人 |
| (65)公表番号 | 特表2021-523692(P2021-523692 A) | (74)代理人 | 100128381 弁理士 清水 義憲 |
| (43)公表日 | 令和3年9月9日(2021.9.9) | (74)代理人 | 100162352 弁理士 酒巻 順一郎 |
| (86)国際出願番号 | PCT/EP2019/063076 | | |
| (87)国際公開番号 | WO2019/224187 | | |
| (87)国際公開日 | 令和1年11月28日(2019.11.28) | | |
| 審査請求日 | 令和4年2月28日(2022.2.28) | | |
| (31)優先権主張番号 | 00627/18 | | |
| (32)優先日 | 平成30年5月22日(2018.5.22) | | |
| (33)優先権主張国・地域又は機関 | スイス(CH) | | |

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 修飾ステロールアシルトランスフェラーゼ

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

ステロールアシルトランスフェラーゼ活性を有する、EC 2.3.1.26 から選ばれる修飾酵素であって、

1つ又は2つのアミノ酸置換を含み、

配列番号1によるポリペプチドにおける592の位置、又は、哺乳動物、酵母若しくは植物ステロールアシルトランスフェラーゼ1 (ARE1)における対応する位置、のアミノ酸がロイシンであり、

及び/又は

配列番号1によるポリペプチドにおける595の位置、又は、哺乳動物、酵母若しくは植物ステロールアシルトランスフェラーゼ1 (ARE1)における対応する位置、のアミノ酸がアスパラギン酸である、修飾酵素。

10

【請求項2】

前記アミノ酸置換が、F592L及び/又はG595Dから選ばれる請求項1に記載の修飾酵素。

【請求項3】

請求項1又は2に記載の修飾酵素を含む、ステロール産生酵母。

【請求項4】

チモステロール及び7-DHCを含むステロールミックス中のチモステロールのパーセンテージを低減するプロセスであって、適切な条件下において、請求項3に記載の酵母を

20

培養することを含むプロセス。

【請求項 5】

7 - D H C 及びチモステロールを含むステロールミックス中の 7 - D H C のパーセンテージを増加させるプロセスであって、適切な条件下において、請求項 3 に記載の酵母を培養することを含むプロセス。

【請求項 6】

前記ステロールミックスから前記 7 - D H C を単離及び / 又は精製することをさらに含む、請求項 4 又は 5 に記載のプロセス。

【請求項 7】

請求項 3 に記載の酵母を用いる、チモステロール及び 7 - D H C を含むステロールミックスへのアセチル - C o A の酵素的変換を含む、7 - D H C の生成のプロセスであって、前記ステロールミックス中の 7 - D H C のパーセンテージは、少なくとも 70 % である、プロセス。

10

【請求項 8】

前記 7 - D H C は、ビタミン D 3 に更に変換され、及び / 又は、25 - ヒドロキシビタミン D 3 に更に変換される、請求項 7 に記載のプロセス。

【請求項 9】

7 - D H C の生成のプロセスにおける、請求項 1 又は 2 に記載の修飾酵素又は請求項 3 に記載の酵母の使用であって、前記 7 - D H C は、チモステロール及び 7 - D H C を含むステロールミックスから単離され、チモステロールに対する 7 - D H C の比は、それぞれの非修飾酵素及び宿主細胞を用いたプロセスとそれぞれ比較して少なくとも 15 % 増加される、使用。

20

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、ビタミン D 3 の生物工学的生成に使用されるビタミン D 3 前駆物質 7 - デヒドロコlesteroール (7 - D H C) のアシル化に対する向上した活性及び / 又は特異性を有する修飾ステロールアシルトランスフェラーゼ酵素に関する。本発明は、前記修飾酵素を発現する酵母株並びにビタミン D 3 又はその誘導体及び / 若しくは代謝産物を生成するプロセスにおけるその使用に更に関する。

【0002】

ビタミン D 3 (コレカルシフェロール又はカルシオールとしても知られる) は、哺乳動物の皮膚においてプロビタミン D 3 (7 - デヒドロコlesteroール又は 7 - D H C としても知られる) から合成され得、それは、コレステロール生合成の産物であり、紫外線に曝露されると、7 - D H C は、プロビタミン D 3 に光化学的に変換され、体温において生物活性型ビタミン D 3 に異性化する。肝臓において、ビタミン D 3 は、生物学的に不活性な 25 - ヒドロキシビタミン D 3 (カルシジオール、カルシフェジオール、25 - ヒドロキシコレカルシフェロール、25 - O H - D 3 又は H y D としても知られる) に変換され、それは、ビタミン D 3 の主要な循環形である。更なるヒドロキシル化が腎臓内で生じる。

30

【0003】

ビタミン D 3 の工業的製造について、化学合成及び生物工学的合成のいずれも (原則的に) 利用可能である。化学合成は、例えば、羊毛脂から単離されたコレステロールから開始され、それは、化学合成及び生物工学的合成のいずれでも重要な中間体である 7 - D H C に脱水素される。紫外線による曝露及び更なる精製 / 抽出工程により、7 - D H C は、ビタミン D 3 に変換される。修飾酵母株を 7 - D H C の生合成に使用することができ、多段階酵素的プロセスでアセチル - C o A が 7 - D H C に変換される。前記酵素的変換は、酵母の小胞体内で行われる。細胞膜で必要とされない、7 - D H C 及びその前駆物質などの過剰量のステロールは、酵母に対して毒性であり、したがって細胞小器官内にステリルエステル (いわゆる脂肪滴) として貯蔵され、細胞小器官からそれを更に単離することができる。遊離ステロールと、脂肪滴に貯蔵されるステロール (主にステリルエステルの形態における) との平衡状態は、ステロールアシルトランスフェラーゼの作用など、数種類

40

50

のタンパク質（酵素）の作用を介して誘発される。酵母、特にサッカロミセス・セレビジエ（*Saccharomyces cerevisiae*）において、ステロールのエステル形成は、主に2種類のステロールアシルトランスフェラーゼAre1p及びAre2pによって行われる。

【0004】

前記ステロールアシルトランスフェラーゼ酵素の非特異的作用のため、脂肪滴内に貯蔵されているステリルエステルのプールは、相対的に多様であり、限定されないが、例えばエルゴステロール、チモステロール、ラノステロール、ラトステロール、コレスタ-5,7,24(25)-トリエノール又は7-DHCのエステルなどが挙げられる。ビタミンD3合成には、7-DHCの前駆物質、コレスタ-5,7,24(25)-トリエノールのみを使用することができ、チモステロールを使用することができないため、例えば7-DHCのエステルなど、脂肪滴内への特異的なエステルの選択的な貯蔵並びに/或いはビタミンD3及び/又はその誘導体若しくは代謝産物に更に変換される、かかる酵母株によって生成される7-DHCの中間体の代謝回転を増加することのいずれかが必要とされる。本発明の焦点でもある特定の代謝産物は、25-ヒドロキシビタミンD3である。

10

【0005】

したがって、7-DHCに対する高い生産性/特異性を有し、且つ/又は副産物/中間体、例えばチモステロール、ラノステロール若しくはラトステロール、特に脂肪滴内に貯蔵されるかかる中間体のエステルの蓄積が低減された、ステロールを生成することができる酵母などの宿主細胞を生成することが継続的な課題である。

20

【0006】

意外なことに、本発明者らは、ここで、宿主細胞におけるステロールアシルトランスフェラーゼ活性の特異性が、ARE2及び/又はARE1の配列に特定のアミノ酸置換を導入することにより、7-DHCに対してシフトすることができ、それによりビタミンD3生成における重要な中間体としての7-DHCに対する宿主細胞の生産性及び/又は生成比が高まることを見出した。

【0007】

したがって、本発明は、ステロールアシルトランスフェラーゼ活性、すなわち修飾ステロールアシルトランスフェラーゼ、特にステロールアシルトランスフェラーゼアイソフォームAre1p及び/又はAre2pの活性を有する修飾酵素であって、配列番号1によるポリペプチドにおける592及び/又は595から選択される残基に対応する位置での1つ又は複数のアミノ酸置換を含み、チモステロールなどの副産物/中間体と比較して7-DHCに対して増加した特異性を有する、修飾酵素に関する。

30

【0008】

ARE1活性を示す、配列番号1によるポリペプチドであって、配列番号1によるかかるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むポリペプチドがサッカロミセス・セレビジエ（*Saccharomyces cerevisiae*）から単離されている。ARE2活性を示す、配列番号3によるポリペプチドであって、配列番号3によるかかるポリヌクレオチドをコードするポリヌクレオチドを含むポリペプチドがサッカロミセス・セレビジエ（*Saccharomyces cerevisiae*）から単離されている。

40

【0009】

「ステロールアシルトランスフェラーゼ」、「アシルトランスフェラーゼ」、「ARE」、「アシルトランスフェラーゼ活性を有する酵素」又は単なる「酵素」という用語は、本明細書において区別なく使用され、且つ酵素[EC2.3.1.26]、すなわち1つの分子から別の分子に脂肪酸アシル基を転移するアシルトランスフェラーゼを意味する。かかる転移又は酵素活性は、当業者に公知の手段で測定することができる。ステロールアシルトランスフェラーゼは、哺乳動物、酵母又は植物などの様々な起源から単離されている。ARE1及びARE2のいずれも、例えば、チモステロールなどのステロール及び/又は7-DHCをそれぞれのエステルにアシル化することができる。本明細書で使用される「修飾」酵素、すなわち修飾アシルトランスフェラーゼは、例えば、チモステロールの

50

エステル化と比較して、7-DHCのエステル化に対して好ましい活性及び/若しくは特異性を有し、且つ/又は例えば7-DHC若しくはチモステロールなどのステロールエステル全体の向上した形成を有する。好ましいアシルトランスフェラーゼアイソフォームは、A r e 1 p又はA r e 2 pである。本明細書で使用される「非修飾」ステロールアシルトランスフェラーゼ、特にA R E 1及びA R E 2は、本明細書で定義される1つ又は複数のアミノ酸置換を保有しないそれぞれの内因性酵素を意味する。

【0010】

本明細書で定義される修飾ステロールアシルトランスフェラーゼ活性を保持する、特に本明細書で定義される1つ又は複数のアミノ酸置換を含む、A R E 2及び/又はA R E 1を保持する、本明細書で使用される宿主細胞は、「修飾」宿主細胞と呼ばれる。非修飾ステロールアシルトランスフェラーゼ活性を保持する、すなわち野生型A R E 1及び/又はA R E 2遺伝子をコードするそれぞれの宿主細胞は、「非修飾」宿主細胞と呼ばれる。

10

【0011】

本明細書で使用される、ビタミンD3中間体を特定化する「チモステロール」、「ラノステロール」、「ラトステロール」、「コレスタ-5, 8, 24(25)-トリエノール」、「コレスタ-5, 7, 24(25)-トリエノール」又は「7-DHC」という用語は、前記化合物の遊離型及びエステル型の両方を含む。本明細書で使用されるステロールミックスは、7-DHC及び「副産物」又は中間体、限定されないが、チモステロール、ラノステロール、ラトステロール、コレスタ-5, 8, 24(25)-トリエノール若しくはコレスタ-5, 7, 24(25)-トリエノールなどを含有する。

20

【0012】

本明細書で使用される「コレステロール産生酵母」は、もはやエルゴステロールを産生することができないが、限定されないが、コレスタ-5, 7, 24(25)-トリエノール、コレスタ-5, 8, 24(25)-トリエノール、コレスタ-7, 24(25)-ジエノール、7-DHC又はチモステロールなどのコレステロール生成物を産生することができる。特に、これは、e r g 5 e r g 6ダブルノックアウトの導入によって達成され得る。

【0013】

一実施形態において、本明細書で定義される修飾酵素、特に修飾A R E 1活性は、配列番号1によるポリペプチドにおける残基592に対応する位置でのアミノ酸置換、好ましくはロイシンによるフェニルアラニンの置換(F592L)を含む。好ましくは、修飾A R E 1活性を有する酵素は、サッカロミセス・セレビジエ(S . c e r e v i s i a e)などのサッカロミセス属(S a c c h a r o m y c e s)に由来する。前記修飾A R E 1酵素を使用すると、ステロールミックス中のチモステロールに対する7-DHCの比を、非修飾内因性A R E 1を発現する株と比べて少なくとも約15%だけ増加させることができた。

30

【0014】

一実施形態において、本明細書で定義される修飾酵素、特に修飾A R E 1活性は、配列番号1によるポリペプチドにおける残基595に対応する位置でのアミノ酸置換、好ましくはロイシンによるフェニルアラニンの置換(G595D)を含む。好ましくは、修飾A R E 1活性を有する酵素は、サッカロミセス・セレビジエ(S . c e r e v i s i a e)などのサッカロミセス属(S a c c h a r o m y c e s)に由来する。前記修飾A R E 1酵素を使用すると、ステロールミックス中のチモステロールに対する7-DHCの比を、非修飾内因性A R E 1を発現する株と比べて2倍を超えて、すなわち少なくとも約55%だけ増加させることができた。

40

【0015】

更なる実施形態において、本明細書で定義される修飾酵素、特に修飾A R E 2活性は、配列番号3によるポリペプチドにおける残基624に対応する位置でのアミノ酸置換、好ましくはロイシンによるフェニルアラニンの置換(F624L)を含む。好ましくは、修飾A R E 2活性を有する酵素は、サッカロミセス・セレビジエ(S . c e r e v i s i a

50

e)などのサッカロミセス属(*Saccharomyces*)に由来する。前記修飾ARE2酵素を使用すると、ステロールミックス中のチモステロールに対する7-DHCの比を、非修飾内因性ARE2を発現する株と比べて少なくとも約15%だけ増加させることができた。

【0016】

更なる実施形態において、本明細書で定義される修飾酵素、特に修飾ARE2活性は、配列番号3によるポリペプチドにおける残基627に対応する位置でのアミノ酸置換、好ましくはアスパラギン酸によるグリシンの置換(G627D)を含む。好ましくは、修飾ARE2活性を有する酵素は、サッカロミセス・セレビジエ(*S. cerevisiae*)などのサッカロミセス属(*Saccharomyces*)に由来する。前記修飾ARE2酵素を使用すると、ステロールミックス中のチモステロールに対する7-DHCの比を、非修飾内因性ARE2を発現する株と比べて少なくとも約15%だけ増加させることができた。

10

【0017】

配列番号1における残基F592L及び/又はG595Dに対応する位置での記載のアミノ酸置換は、本明細書で定義される更なる置換、すなわち配列番号3による且つ本明細書に記載のポリペプチドにおけるアミノ酸残基624及び/又は627に対応する1つ又は複数の位置での置換と組み合わせられ得る。好ましくは、配列番号1における残基F592Lに対応する位置でのアミノ酸置換は、配列番号1におけるG595Dに対応し、且つ/又は配列番号3におけるF624Lに対応し、且つ/又は配列番号3におけるG627Dに対応する位置でのアミノ酸置換などの更なる置換と組み合わせられ得る。好ましい修飾酵素は、ARE1活性を有し、且つ配列番号1におけるG595Dに対応する位置での少なくとも1つのアミノ酸置換を含み、少なくとも約30、35、40、45%高い7-DHC力価を示し、ステロールミックス中の7-DHCのパーセンテージが約70~76%であると共に、ステロールミックス中のチモステロールが少なくとも約15、20、25、30%少ない。

20

【0018】

本明細書で使用されるARE1及び/又はARE2の活性は、修飾される。これは、例えば、ARE1及び/又はARE2をコードする内因性遺伝子に変異、すなわち本明細書に記載の1つ又は複数の位置でのアミノ酸置換を導入することによって達成され得る。酵母細胞をどのように遺伝子操作して、ARE1及び/又はARE2活性が修飾されるかは、当業者に公知である。これらの遺伝子操作としては、限定されないが、例えば遺伝子置換、遺伝子増幅、遺伝子破壊、トランスフェクション、プラスミド、ウイルス又は他のベクターを用いた形質転換が挙げられる。

30

【0019】

核酸又はアミノ酸内への変異の生成、すなわち変異誘発は、様々な方法において、例えばランダム若しくは部位特異的突然変異誘発、例えば放射線、化学的治療などの薬剤又は遺伝因子の挿入によって起こる物理的ダメージなどによって行われ得る。

【0020】

本発明は、特に、7-DHC、ビタミンD3の中間体を生成するプロセスにおける、本明細書で定義されるかかる修飾ARE1及び/又はARE2酵素の使用に関する。好ましくは、本発明の修飾酵素は、酵母、好ましくはステロール産生酵母、特にコレステロール産生酵母細胞、例えばサッカロミセス・セレビジエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス属(*Schizosaccharomyces* spp.)、ピキア属(*Pichia* spp.)、クルイベロミセス属(*Kluyveromyces* spp.)、ハンゼヌラ属(*Hansenula* spp.)又はヤロウイア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)、好ましくは*S. cerevisiae*から選択される酵母など、適切な宿主細胞に導入され、且つ/又は発現される。修飾宿主は、ビタミンD3及び/又は25-ヒドロキシビタミンD3に更に変換され得る7-DHCを生成するために使用される。

40

50

【 0 0 2 1 】

適切な宿主細胞を更に修飾して、ビタミンD3の生合成に対する重要な中間体、7-DHCの生成が更に増加され、且つ/又は副産物の蓄積が低減され得る。

【 0 0 2 2 】

したがって、一実施形態において、本発明は、修飾ARE1及び/又はARE2活性を有する酵母株に関し、更に、ERG5及びERG6は、不活化されている。酵母細胞は、前記酵母細胞内で発現することができる限り、コレスタ-7,24-ジエノール、チモステロール又はトリエノール(例えば、コレスタ-5,7,25-トリエノール)上で活性である異種C24-レダクターゼ、好ましくは植物若しくは脊椎動物ステロール24-レダクターゼ、より好ましくは脊椎動物由来のレダクターゼ、更により好ましくはヒト、ブタ、イヌ、マウス、ラット、ウマ、ゼブラフィッシュ(*Danio rerio*)又は既知のいずれかの源由来のレダクターゼなど、EC1.3.1.72から特に選択される、C24-レダクターゼ活性を有する異種酵素の発現によって更に修飾され得る。最も好ましくは、ステロール24-レダクターゼは、ゼブラフィッシュ(*Danio rerio*)、ラット又はヒトから選択される。前記ステロール24-レダクターゼ酵素を発現する配列は、公的に入手可能であり、限定されないが、UniProtKB/Swiss-Prot参照番号Q15392、Q60HC5、Q8VCH6、Q5BQE6、Q39085又はP93472(例えば、国際公開第2003064650号パンフレットを参照されたい)が挙げられる。かかる酵母株を使用すると、ステロールミックス中に存在する7-DHCのパーセンテージは、ステロールの総量に対して約70%以上の範囲であり、好ましくは例えば75、80、88、90、95、98%である。

【 0 0 2 3 】

他の実施形態において、本発明による宿主細胞は、例えば、C5-ステロールデサチュラーゼ(ERG3)及び/又はC8-ステロールイソメラーゼ(ERG2)など、7-DHCの生合成に関与する内因性酵素のホモログの導入によって更に修飾され得、7-DHCの特異性及び/又は生産性が増加すると共に、限定されないが、チモステロール、ラノステロール及び/又はラトステロールなどの副産物又はビタミンD3中間体の蓄積が低減される。好ましくは、本明細書に定義される修飾宿主細胞は、異種ERG2及び/又はERG3を含み、ERG2は、好ましくは、*Ustilago maydis*(UniProtKB P32360に由来の配列)から選択され、且つ/又はERG3は、好ましくは、*Pichia pastoris*(UniProtKB C4QY87に由来する配列)又はシゾサッカロミセス・ポンベ(*Schizosaccharomyces pombe*)(UniProtKB O94457に由来する配列)から選択される。本明細書において定義される修飾ARE1及び/又はARE2と共にERG2及びERG3ホモログの両方を含む株は、7-DHC約80%のパーセンテージを有し、且つコレスタ-8-エノール及び/又はラトステロールに対する7-DHCの比が少なくとも約15~20%増加したステロールミックスを産生する。上述のERG2及び/又はERG3ホモログのいずれかの2つ以上のコピーを更に含む、本明細書に定義される修飾株が更に好ましい。

【 0 0 2 4 】

特定の実施形態において、本発明は、その宿主細胞が、本明細書で定義される修飾宿主細胞、すなわち本明細書において定義されるステロールアシルトランスフェラーゼARE1及び/又はARE2における1つ又は複数のアミノ酸置換の導入によって修飾された修飾宿主細胞、特にコレステロール産生酵母細胞、好ましくはERG5及びERG6が不活化されている酵母細胞であり、且つ任意選択的に、本明細書で定義されるC-24-レダクターゼ活性を有する異種酵素が発現され、且つ/又は任意選択的に、内因性ERG2及び/又はERG3のホモログが発現され、宿主細胞は、前記宿主細胞によって産生されるステロール総量中の7-DHCのパーセンテージが、非修飾、すなわち野生型ARE1及び/又はARE2活性を発現する酵母株と比べて約少なくとも70、75、80%、好ましくは88、90、95、98%に増加され、特にチモステロール及びコレスタ-8-エ

10

20

30

40

50

ノールなどの副産物に対する 7 - D H C の比が少なくとも約 5、10、15、18、20、25% だけ増加されるように改善される、7 - D H C の産生に対して宿主細胞を向上させるプロセスに関する。

【0025】

本発明の一態様において、本明細書で定義される修飾 A R E 1 及び / 又は A R E 2 活性を含む宿主細胞がビタミン D 3 前駆物質 7 - D H C を産生するプロセスで使用される。それぞれのコレステロール産生宿主細胞に関して、好気性又は無気的条件下において且つ当業者に公知のように、適切な栄養で補われた水性媒体中で修飾宿主細胞が培養され得る。任意選択的に、かかる培養は、当技術分野で公知のように、タンパク質及び / 又は電子の移行に關与する補因子の存在下にある。宿主細胞の培養 / 増殖は、バッチ、フェドバッチ、半連続又は連続式で行われ得る。宿主細胞に応じて、好ましくは、ビタミン D 3 及び 7 - D H C などのその前駆物質の生成は、当業者に公知であるように様々であり得る。ビタミン D 3 の生成における 7 - D H C 及び他の中間体の培養及び単離は、例えば、国際公開第 2011067144 号パンフレット又は国際公開第 2017108799 号パンフレットに記載されている。7 - D H C は、ステロールミックスから単離され、且つ / 又は任意選択的に更に精製され得、当技術分野で公知の方法を用いてビタミン D 3 及び / 又は 25 - ヒドロキシビタミン D 3 に更に変換され得る。

10

【0026】

本明細書に記載の宿主細胞を使用して、ステロールアシルトランスフェラーゼ活性の基質特異性を 7 - D H C に対してシフトすることができ、前記宿主細胞によって産生される総ステロール中の 7 - D H C のパーセンテージが少なくとも約 70% となり、適切な培養条件下において約 100 時間発酵させた後に産生される 7 - D H C の力価は、最大で約 10 g / l 又はそれを超える。

20

【0027】

「A R E 1」及び「A r e 1 p」、「A R E 2」及び「A r e 2 p」、「E R G 5」及び「E r g 5 p」、「E R G 6」及び「E r g 6 p」という用語は、本明細書において区別なく使用され、それぞれの遺伝子 a r e 1、a r e 2、e r g 5 及び e r g 6 によってコードされるポリペプチドを意味する。本発明の目的のために、コレステロール産生酵母細胞は、A R E 1 及び / 又は A R E 2 の修飾活性を示す例えば内因性 A R E 1、A R E 2 又はその両方の修飾を保持し、A R E 1 及び / 又は A R E 2 の修飾特異性が得られるように修飾され、前記修飾は、本明細書で定義される 1 つ又は複数のアミノ酸置換の導入を介して活性化される。

30

【0028】

E R G 5、E R G 6、A R E 1、A R E 2、E R G 2、E R G 3 又はステロール 24 - レダクターゼ (E R G 4) をコードする遺伝子、本明細書において使用される酵母細胞の培養及び遺伝子操作は、公知であり、例えば米国特許第 7608421 号明細書に記載されている。

【0029】

本明細書で使用される「C - 24 - レダクターゼ」又は「24 - レダクターゼ」という用語は、本明細書において区別なく使用される。酵母において、この酵素は、e r g 4 によってコードされ、位置 24 の炭素原子のメチル基に対して活性である。したがって、前記位置でかかるメチル基を示さないトリエノールは、酵母 E R G 4 に対して許容可能な基質ではない。

40

【0030】

「C - 8 ステロールイソメラーゼ」、「8, 7 - イソメラーゼ」又は「C - 8 ステロールイソメラーゼを有する酵素」という用語は、本明細書において区別なく使用され、コレスタ - 8 - エノールのコレスタ - 7 - エノールへの変換及び / 又はチモステロールのコレスタ - 7, 24 - ジエノールへの変換を触媒することができる酵素を意味する。本発明による修飾宿主細胞において使用される好ましい E R G 2 ホモログは、配列番号 5 と少なくとも約 41%、例えば少なくとも 44、45、48、49、53、56、60、70、

50

80、90、92、95、98又は100%までの同一性を有するポリペプチドであり、C-8ステロールイソメラーゼ活性を示し、*Ustilago maydis*から入手可能なかかるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。特に、前記ERG2ホモログの少なくとも約1、2、3、5つなど、1つ又は複数のコピーは、本明細書で定義される修飾宿主細胞において発現される。

【0031】

「C-5ステロールデサチュラーゼ」、「C-5ステロールデサチュラーゼを有する酵素」という用語は、本明細書において区別なく使用され、コレスタ-8-エノールのコレスタ-7,24-ジエノールへの変換並びに/又はコレスタ-7-エノールのコレスタ-5,7,24-トリエノール及び/若しくは7-DHCへの変換を触媒することができる酵素を意味する。酵母において、この酵素は、*erg3*によってコードされる。本発明による修飾宿主細胞において使用される好ましいERG3ホモログは、配列番号7と少なくとも約45%、例えば少なくとも50、52、60、70、80、90、92、95、98又は100%までの同一性を有するポリペプチドであり、C-5ステロールデサチュラーゼ活性を示し、ピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)又はシゾサッカロミセス・ポンベ(*Schizosaccharomyces pombe*)から入手可能なかかるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。特に、前記ERG3ホモログの少なくとも1、2、3、5つなど、1つ又は複数のコピーは、本明細書で定義される修飾宿主細胞において発現される。

【0032】

「配列同一性」、「同一性%」という用語は、本明細書において区別なく使用される。本発明の目的では、2つのアミノ酸配列又は2つの核酸配列の配列同一性のパーセンテージを決定するために、最適な比較のために配列がアライメントされることが本明細書において定義される。2つの配列間のアライメントを最適化するために、比較される2つの配列のいずれかにギャップが導入され得る。かかるアライメントは、比較される配列の完全長をわたって行うことができる。代わりに、アライメントは、それより短い長さにわたり、例えば約20、約50、約100以上の核酸/塩基又はアミノ酸にわたり行われ得る。配列同一性は、報告されるアライメント領域にわたる2つの配列間の同一マッチのパーセンテージである。2つのアミノ酸配列間又は2つのヌクレオチド配列間の配列同一性%は、2つの配列のアライメントのためのNeedleman及びWunschアルゴリズム(Needleman, S. B. and Wunsch, C. D. (1970) *J. Mol. Biol.* 48, 443-453)を用いて決定され得る。アミノ酸配列とヌクレオチド配列とのいずれもアルゴリズムによってアライメントすることができる。Needleman-Wunschアルゴリズムは、コンピュータープログラムNEEDLEにおいて実現されている。本発明の目的では、EMBOSSパッケージからのNEEDLEプログラムが使用された(バージョン2.8.0以上, EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite (2000) Rice, Longden and Bleasby, *Trends in Genetics* 16, (6) pp 276-277, <http://emboss.bioinformatics.nl/>)。タンパク質の配列に関して、置換行列にEBL0SUM62が使用される。ヌクレオチド配列について、EDNAFULLが使用される。使用される任意のパラメーターは、ギャップオープンペナルティ10及びギャップ伸長ペナルティ0.5である。これらの異なるすべてのパラメーターによってわずかに異なる結果が生じるが、2つの配列の同一性の全体的なパーセンテージは、異なるアルゴリズムを使用した場合に有意に変化しないことを当業者は理解するであろう。

【0033】

上述のNEEDLEプログラムによってアライメントした後、問い合わせ配列と本発明の配列との配列同一性のパーセンテージが以下の通りに計算される: 両方の配列における同一アミノ酸又は同一ヌクレオチドを示すアライメントの対応する位置の数は、アライメントにおけるギャップの総数を引いた後にアライメントの全長で割られる。本明細書で定

10

20

30

40

50

義される同一性は、NOBRIEFオプションを使用することによってNEEDLEから得ることができ、「最長の同一性」としてプログラムのアウトプットで標識される。比較される両方のアミノ酸配列がそれらのアミノ酸のいずれにおいても違いがない場合、それらは、同一であるか又は100%の同一性を有する。本明細書において定義される植物に由来する酵素に関して、植物由来酵素は、例えば、葉緑体処理酵素(CPE)などの特異的酵素によって切断される、葉緑体標的シグナルを含有し得るという事実が当業者によって認識される。

【0034】

本明細書で定義されるARE2及びARE1酵素/ホモログは、酵素活性を変化させないアミノ酸置換を保持する酵素も包含し、すなわち、その酵素は、野生型酵素に関して同じ特性を示し、本明細書で定義されるステロールのアシル化を触媒する。かかる変異は、「サイレント変異」とも呼ばれ、本明細書に記載の酵素の(酵素的)活性を変化させない。

10

【0035】

本明細書で使用される、酵素に関する「特異的活性」又は「活性」という用語は、その触媒活性、すなわち所定の基質からの産物の形成を触媒するその能力を意味する。所定の時間内及び定義された温度において、タンパク質の定義された量当たりで消費される基質及び/又は生成される産物の量が特異的活性によって定義される。通常、特異的活性は、タンパク質1mg当たり1分当たりで消費される基質又は形成される産物 μmol で表される。通常、 $\mu\text{mol}/\text{分}$ は、U(=単位)によって省略される。したがって、 $\mu\text{mol}/\text{分}/(\text{タンパク質mg})$ 又はU/(タンパク質mg)の特異的活性の単位定義は、本明細書全体を通して区別なく使用される。酵素がその触媒活性を生体内、すなわち本明細書で定義される宿主細胞内又は適切な基質の存在下において適切な(無細胞)システム内で発揮する場合、酵素は、活性である。当業者であれば、例えばHPLCなどによる測定など、どのように酵素活性を測定するかを知っている。

20

【0036】

本発明に関して、例えば、微生物、菌類、藻類又は植物などの生物は、原核生物の命名法の国際コード又は菌類、藻類及び植物の命名法の国際コード(メルボルンコード)によって定義される、同じ生物学的特性を有するかかる種の異名又はバソニムも包含する。

【0037】

特に、本発明は、本発明の以下の実施形態を特徴とする：

30

(1) 配列番号1によるポリペプチドにおける592及び/又は595から選択される残基に対応する位置の1つ又は複数のアミノ酸置換、好ましくはF592L及び/又はG595Dに対応する置換を含む、ステロールアシルトランスフェラーゼ活性を有する修飾酵素。

(2) 7-デヒドロコレステロール(7-DHC)及びチモステロールを含むステロールのエステル化を触媒し、ステロールエステル中のチモステロールに対する7-DHCの比は、それぞれの非修飾酵素を用いた触媒におけるチモステロールに対する7-DHCの比と比べて少なくとも約15%だけ増加される、本明細書に定義され且つ実施形態(1)による修飾酵素。

(3) アミノ酸置換は、G595Dから選択される、本明細書に定義され且つ実施形態(1)又は(2)による修飾酵素。

40

(4) 本明細書で定義され且つ実施形態(1)、(2)、(3)による修飾酵素を含む宿主細胞、好ましくは酵母、より好ましくはステロール産生酵母、更により好ましくはコレステロール産生酵母。

(5) 7-DHC及びチモステロールを含むステロールミックスの生成に使用され、チモステロールに対する7-DHCの比は、非修飾酵素を発現する宿主細胞と比較して少なくとも約15%だけ増加される、本明細書で定義され且つ実施形態(4)による宿主細胞。

(6) ERG5及びERG6は、不活化されている、本明細書で定義され且つ実施形態(4)又は(5)による宿主細胞。

(7) ステロール 24-レダクターゼ活性を有するEC1.3.1.72から選択さ

50

れる異種酵素を発現し、好ましくは、その異種酵素は、植物又は脊椎動物に由来し、より好ましくはヒト、ブタ、イヌ、マウス、ラット、ウマ又はゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) に由来する、本明細書で定義され且つ実施形態 (4)、(5)、(6) による宿主細胞。

(8) サッカロミセス属 (*Saccharomyces*)、シゾサッカロミセス属 (*Schizosaccharomyces*)、ピキア属 (*Pichia*)、クワイベロミセス属 (*Kluyveromyces*)、ハンゼヌラ属 (*Hansenula*) 及びヤロウイア属 (*Yarrowia*) からなる群から選択され、好ましくはサッカロミセス・セレピジエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス属 (*Schizosaccharomyces* spp.)、ピキア属 (*Pichia* spp.)、クワイベロミセス属 (*Kluyveromyces* spp.)、ハンゼヌラ属 (*Hansenula* spp.) 又はヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) から選択される、本明細書で定義され且つ実施形態 (4)、(5)、(6)、(7) による宿主細胞。

10

(9) チモステロール及び 7-DHC を含むステロールミックス中のチモステロールのパーセンテージを低減するプロセスであって、適切な条件下において、本明細書で定義され且つ実施形態 (4)、(5)、(6)、(7)、(8) による宿主細胞を培養することと、任意選択的に、ステロールミックスから 7-DHC を単離及び/又は精製することを含むプロセス。

(10) 7-DHC 及びチモステロールを含むステロールミックス中の 7-DHC のパーセンテージを増加させるプロセスであって、適切な条件下において、本明細書で定義され且つ実施形態 (4)、(5)、(6)、(7)、(8) による宿主細胞を培養することと、任意選択的に、ステロールミックスから 7-DHC を単離及び/又は精製することを含むプロセス。

20

(11) 本明細書で定義され且つ実施形態 (4)、(5)、(6)、(7)、(8)、(9)、(10) による宿主細胞を用いる、チモステロール及び 7-DHC を含むステロールミックスへのアセチル-CoA の酵素的変換を含む、7-DHC の生成のプロセスであって、ステロールミックス中の 7-DHC のパーセンテージは、少なくとも約 70% である、プロセス。

(12) 7-DHC は、ビタミン D₃ に更に変換される、本明細書で定義され且つ実施形態 (11) によるプロセス。

30

(13) 7-DHC は、25-ヒドロキシビタミン D₃ に更に変換される、本明細書に定義され且つ実施形態 (11) 又は (12) によるプロセス。

(14) 7-DHC を生成するプロセスにおける、本明細書で定義され且つ実施形態 (1)(2)、(3) による修飾酵素又は本明細書で定義され且つ実施形態 (4)、(5)、(6)、(7)、(8)、(9)、(10) による宿主細胞の使用であって、7-DHC は、チモステロール及び 7-DHC を含むステロールミックスから単離され、チモステロールに対する 7-DHC の比は、それぞれの非修飾酵素及び宿主細胞を使用したプロセスと比較してそれぞれ少なくとも約 15% だけ増加される、使用。

【0038】

40

以下の実施例は、単に例示的なものであり、本発明の範囲を決して限定することを意図するものではない。

【0039】

[実施例]

[実施例 1：一般的方法、株及びプラスミド]

本明細書に記載のすべての基礎的分子生物学及び DNA 操作手順は、一般に、Sambrookら (1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York) 又は Ausubelら (1998, *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley: New York)

50

に準拠して実施した。使用されたサッカロミセス・セレビジエ (*S. cerevisiae*) 株及びプラスミドの遺伝子型を表 1 及び 2 に示す。野生型 CEN . PKバックグラウンド株から開始して、サッカロミセス・セレビジエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 7 - DHC 産生株 Y 2 1 4 0 を作製した。TRP1 と併せて PGK1 プロモーター及び CYC1 ターミネーターによって隣接される、ゼブラフィッシュ由来ステロール 24 - レダクターゼに対するコドン最適化遺伝子を含む *erg5* 破壊カセットをこの野生型株に形質転換した。続いて、LEU2 と併せて TDH3 プロモーター及び PGK1 ターミネーターにより隣接されるラット由来ステロール 24 - レダクターゼの遺伝子を含む *erg6* 破壊カセットを形質転換した。記載のすべての株が MAT であり、短縮された恒常的に活性な HMG - CoA レダクターゼ遺伝子 (*tHMG1*) の過剰発現コピーを保持する。

10

【 0 0 4 0 】

【表 1】

表1: サッカロミセス・セレビジエ(*Saccharomyces cerevisiae*)株。

| | | |
|-------|--|-----------------------|
| Y2159 | <i>erg5Δ::PGK1p-S24R2-CYC1t-TRP1</i> <i>erg6Δ::TDH3p-S24R1-PGK1t-URA3</i> <i>erg4Δ::Hyg^R TDH3p-tHMG1</i> | 伝統的及び標準的な分子的及び遺伝子学的技術 |
| Y2017 | <i>erg5Δ::PGK1p-S24R2-CYC1t-TRP1</i> <i>erg6Δ::TDH3p-S24R1-PGK1t-URA3</i> <i>erg4Δ::PGK1p-Scer-ARE1-CYC1t-LEU2</i> <i>TDH3p-tHMG1</i> | LEU2カセットでの標的化置換 |
| Y2157 | <i>erg5Δ::PGK1p-S24R2-CYC1t-TRP1</i> <i>erg6Δ::TDH3p-S24R1-PGK1t-URA3</i> <i>erg4Δ::PGK1p-Scer-are1 F592L-CYC1t-LEU2</i> <i>TDH3p-tHMG1</i> | LEU2カセットでの標的化置換 |
| Y2159 | <i>erg5Δ::PGK1p-S24R2-CYC1t-TRP1</i> <i>erg6Δ::TDH3p-S24R1-PGK1t-URA3</i> <i>erg4Δ::PGK1p-Scer-are1 G595D-CYC1t-LEU2</i> <i>TDH3p-tHMG1</i> | LEU2カセットでの標的化置換 |

20

【 0 0 4 1 】

【表 2】

表2: ARE変異の作製に使用されるプラスミド。「Scer」は、サッカロミセス・セレビジエ (*Saccharomyces cerevisiae*)を意味する。

| プラスミド | バックボーン | 挿入 | オリゴ又は源 | 配列番号 |
|---------|---------|-----------------|---|--------------------|
| pHyD459 | pHyD445 | Scer-ARE1 | LEU2挿入 | |
| pMB7584 | pHyD459 | Scer-are1 F592L | MO10013 & MO10014, MO10016 & MO10017 | 16 & 17 19 & 20 |
| pMB7585 | pHyD459 | Scer-are1 G595D | MO10013 & MO10015 | 16 & 18 |

40

【 0 0 4 2 】

[実施例 2 : ARE1 - WT プラスミド pHyD459 の作製]

XbaI 部位を 5' 末端に (TCTAGAACAAAatg...)、PstI 部位を 3' 末端に組み込んで、野生型サッカロミセス・セレビジエ (*S. cerevisiae*) ARE1 を DNA 2.0 によって合成した。固有の XbaI 及び PstI 部位を用いて、*erg4* : : Hyg^R 欠失プラスミドにこれをクローニングした。続いて、LEU2 を使用して、KpnI - AgeI クローニングによって Hyg^R 部位を置換した。

【 0 0 4 3 】

[実施例 3 : ARE1 変異体遺伝子のクローニング]

50

ARE1から産生されたBsrGI - BsaI - 切断PCR産物(配列番号16 & 17によるオリゴ)を、配列番号19及び20をBsrGI - PstI - 切断pHyD459にアニーリングすることによって誘導された二本鎖オリゴとライゲートすることにより、サッカロミセス・セレビジエ(*S. cerevisiae*) ARE1変異バリエーションpMB7584(F592L)を産生した。同様に、ARE1から産生されたBsrGI - BsaI - 切断PCR産物(配列番号16 & 18によるオリゴ)を、配列番号21及び22をBsrGI - PstI - 切断pHyD459にアニーリングすることによって誘導された二本鎖オリゴとライゲートすることにより、サッカロミセス・セレビジエ(*S. cerevisiae*) ARE1変異バリエーションpMB7585(G595D)を産生した。本明細書で使用されるオリゴ並びに更なる配列は、配列表に示す。

10

【0044】

[実施例3: サッカロミセス・セレビジエ(*Saccharomyces cerevisiae*)へのARE1WT及び変異体遺伝子の導入]

野生型遺伝子と比較して、7-DHC生成における変異体ARE1遺伝子の影響を試験するために、Y2140株を3つの異なる構築物で形質転換した:

(1) PGK1プロモーターの制御下でのWT ARE1遺伝子を保有するerg4破壊構築物並びにPGK1プロモーター及びLEU2の制御下でのWT ARE1遺伝子を保有するLEU2^{on}構築物であるプラスミドpHyD459のSalI断片;

(2) PGK1プロモーターの制御下でのare1 F592L遺伝子及びPGK1プロモーター及びLEU2の制御下でのLEU2 are1 F592L遺伝子を保有するerg4破壊構築物であるプラスミドpMB7584のSalI断片;

20

(3) PGK1プロモーターの制御下でのare1 G595D遺伝子及びPGK1プロモーター及びLEU2の制御下でのLEU2 are1 G595D遺伝子を保有するerg4破壊構築物であるプラスミドpMB7585のSalI断片。

【0045】

形質転換株を(最少培地)で30°Cにおいて選択し、ハイグロマイシン感度に対してスクリーニングした。これらの形質転換から生じた株を上記の表1に挙げる。続いて、以下の実施例4に記載のように、これらの株をその7-DHC生産性及び7-DHCステロール総純度に関してアッセイした。

【0046】

30

[実施例4: ARE1変異株におけるステロールのHPLC分析]

試験される株を最初にYPD寒天にプレーティングし、30°Cにおいて48時間インキュベートした。YPD前培養物2mLをこれらのプレートから接種し、30°Cにおいて24時間ローラーホイール上で増殖させた。24穴マイクロタイタープレートにおいて、前培養物からYPD 0.8mL + エタノール10g/Lを最終OD₆₀₀ 0.5に接種した。マイクロタイタープレートを加湿環境内で30°Cにおいて増殖し、軌道3mmの振盪機で800rpmにおいて振盪した。接種から24及び48時間後、エタノール16µLをそれぞれのウェルにフィード(feed)として添加した。接種から72時間後、ステロール含有量に関して細胞をサンプリングした。

【0047】

40

培養物からステロールを抽出するために、ガラスビーズを有する2mL Prece11lysチューブに全ブロス80マイクロリットルをピペットで移した。けん化溶液(エタノール中の5% KOH)800マイクロリットルを添加し、Prece11lys 24ホモジナイザーに試料を入れ、15秒/サイクルにおいて6500rpmで3サイクル、攪拌した。次いで、氷酢酸60マイクロリットルを添加し、最高速度でチューブを1分間遠心した。ステロール含有量に関して、HPLCによって上澄をアッセイした(表3を参照されたい)。

【0048】

50

【表 3】

表3: コントロール並びにARE1及び/又はARE2変異株における選択されたステロール中間体に対する7-DHCの比率。「ラノ/ラト」はラノステロールとラトステロールのミックスを意味し、「zym」はチモステロールを意味する。数字はmg/ml(ステロール)である。

| 変異体 | 7-DHC | ラノ/ラト | コレスタ-8-エノール | zym | zymに対する7-DHCの比率 | ラノ/ラトに対する7-DHCの比率 |
|------------|-------|-------|-------------|-----|-----------------|-------------------|
| ARE1 wt | 1060 | 70 | 99 | 92 | 12 | 15 |
| are2-F624L | 1090 | 35 | 122 | 80 | 14 | 31 |
| are2-G627D | 1141 | 50 | 140 | 82 | 14 | 23 |
| are1-F592L | 1240 | 62 | 143 | 105 | 14 | 20 |
| are1-G595D | 1448 | 104 | 152 | 77 | 19 | 14 |

10

【 0 0 4 9 】

種々のサッカロミセス・セレビジエ (*S. cerevisiae*) Are1変異体をスクリーニングした結果、本発明者らは、発現した場合に多くのAre1変異体が高い総生産性で7-DHCを産生すること、ステロール副産物(チモステロール、ラトステロール、ラノステロール、コレスタ-8-エノール等)の蓄積が少ないこと又はその両方を見出した。

20

【配列表】

[0007460540000001.app](#)

30

40

50

フロントページの続き

- (72)発明者 ファレル, クリストファー, マーク
アメリカ合衆国, メリーランド州, コロンビア, ドビン ロード 6480, ケアオブ ディー
エスエム ニュートリショナル プロダクツ リミテッド, パテント デパートメント
- (72)発明者 ラブラード, リサ, アン
アメリカ合衆国, メリーランド州, コロンビア, ドビン ロード 6480, ケアオブ ディー
エスエム ニュートリショナル プロダクツ リミテッド, パテント デパートメント
- (72)発明者 レーマン, オットー, マーティン
スイス連邦, 4303 カイザーアウークシュト, ヴルミスヴェク 576, ケアオブ ディー
エスエム ニュートリショナル プロダクツ リミテッド, パテント デパートメント
- (72)発明者 トゥルーハート, ジョシュア
アメリカ合衆国, メリーランド州, コロンビア, ドビン ロード 6480, ケアオブ ディー
エスエム ニュートリショナル プロダクツ リミテッド, パテント デパートメント

審査官 坂崎 恵美子

- (56)参考文献 特開2012-024084(JP,A)
特表2010-534479(JP,A)
特表2007-516717(JP,A)
特表2003-508052(JP,A)
特表2013-502903(JP,A)
国際公開第2017/108799(WO,A1)
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C12N 15/00 - 15/90
C07K 1/00 - 19/00
C12N 9/00 - 9/99
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(ST
N)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq
PubMed
Google/Google Scholar