

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成25年8月1日 (2013.8.1)

【公表番号】特表2012-529912(P2012-529912A)

【公表日】平成24年11月29日 (2012.11.29)

【年通号数】公開・登録公報2012-050

【出願番号】特願2012-516171(P2012-516171)

【国際特許分類】

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 P 7/64 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 P 7/64

【手続補正書】

【提出日】平成25年6月14日 (2013.6.14)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも 1 つの長鎖多価不飽和脂肪酸の産生を改良するための組換え油性微生物宿主細胞であって、前記宿主細胞が少なくともアシル C o A : リゾリン脂質アシルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも 1 つの単離ポリヌクレオチドを含み、前記ポリペプチドが、

a) C l u s t a l W アラインメント法に基づき配列番号 9 及び配列番号 11 からなる群から選択されるアミノ酸配列と比較したとき少なくとも 45 % のアミノ酸同一性を有するポリペプチド；

b) 配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5 及び配列番号 28 からなる群から選択される少なくとも 1 つの膜結合型 O - アシルトランスフェラーゼタンパク質ファミリーモチーフを有するポリペプチド；

c) C l u s t a l W アラインメント法に基づき配列番号 2 に示されるとおりのアミノ酸配列と比較したとき少なくとも 90 % のアミノ酸同一性を有するポリペプチド；

d) C l u s t a l W アラインメント法に基づき配列番号 15、配列番号 17 及び配列番号 18 からなる群から選択されるアミノ酸配列と比較したとき少なくとも 43.9 % のアミノ酸同一性を有するポリペプチド；及び、

e) 配列番号 19 及び配列番号 20 からなる群から選択される少なくとも 1 つの 1 - アシル - s n - グリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼファミリーモチーフを有するポリペプチド；

からなる群から選択され、

前記少なくともアシル C o A : リゾリン脂質アシルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも 1 つの単離ポリヌクレオチドが、少なくとも 1 つの調節配列に作動可能に連結され、前記調節配列は同じであるか又は異なり；及び、

さらに前記宿主細胞が、

(i) 対照宿主細胞と比較したときの少なくとも1つの長鎖多価不飽和脂肪酸を産生する油性微生物宿主細胞における C_{18} から C_{20} への伸長変換効率の増加、

(i i) 対照宿主細胞と比較したときの少なくとも1つの長鎖多価不飽和脂肪酸を産生する油性微生物宿主細胞における 4 不飽和化変換効率の増加、
からなる群から選択される少なくとも1つの改良を有する、組換え宿主細胞。

【請求項 2】

前記少なくともアシル C o A : リゾリン脂質アシルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが安定的に組み込まれ、及び、
さらに前記宿主細胞が、

a) 対照宿主細胞と比較したときの少なくとも1つの長鎖多価不飽和脂肪酸を産生する油性微生物宿主細胞における少なくとも4%の C_{18} から C_{20} への伸長変換効率の増加；及び、

b) 対照宿主細胞と比較したときの少なくとも1つの長鎖多価不飽和脂肪酸を産生する油性微生物宿主細胞における少なくとも5%の 4 不飽和化変換効率の増加
からなる群から選択される少なくとも1つの改良を有する、請求項 1 に記載の組換え宿主細胞。

【請求項 3】

前記改良が、

a) 対照宿主細胞と比較したときのエイコサペンタエン酸産生宿主細胞における少なくとも13%の C_{18} から C_{20} への伸長変換効率の増加；

b) 対照宿主細胞と比較したときのドコサヘキサエン酸産生宿主細胞における少なくとも4%の C_{18} から C_{20} への伸長変換効率の増加；

c) 対照宿主細胞と比較したときのドコサヘキサエン酸産生宿主細胞における少なくとも18%の 4 不飽和化変換効率の増加；

d) 対照宿主細胞と比較したときの全脂肪酸の重量パーセントとして計測されるエイコサペンタエン酸産生宿主細胞中のエイコサペンタエン酸の少なくとも9重量パーセントの増加；

e) 対照宿主細胞と比較したときの全脂肪酸の重量パーセントとして計測されるドコサヘキサエン酸産生宿主細胞中のエイコサペンタエン酸の少なくとも2重量パーセントの増加；及び、

f) 対照宿主細胞と比較したときの全脂肪酸の重量パーセントとして計測されるドコサヘキサエン酸産生宿主細胞中のドコサヘキサエン酸の少なくとも9重量パーセントの増加
からなる群から選択される、請求項 2 に記載の組換え宿主細胞。

【請求項 4】

請求項 3 に記載の油性微生物組換え宿主細胞から得られたエイコサペンタエン酸及び / 又はドコサヘキサエン酸を含む油。

【請求項 5】

エイコサペンタエン酸及び / 又はドコサヘキサエン酸を含む油を作製する方法であって、

a) 請求項 3 に記載の油性微生物宿主細胞を培養するステップであって、エイコサペンタエン酸及び / 又はドコサヘキサエン酸を含む油が産生されるステップと、

b) ステップ (a) の前記微生物油を回収してもよいステップと、
を含む方法。

【請求項 6】

長鎖多価不飽和脂肪酸を産生する油性微生物組換え宿主細胞における C_{18} から C_{20} への伸長変換効率を増加させる方法であって、

a) 前記長鎖多価不飽和脂肪酸を産生する組換え宿主細胞に、少なくともアシル C o A : リゾリン脂質アシルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの単離ポリヌクレオチドを導入するステップであって、前記ポリペプチドが、

(i) C l u s t a l W アラインメント法に基づき配列番号 9 及び配列番号 11 が

らなる群から選択されるアミノ酸配列と比較したとき少なくとも45%のアミノ酸同一性を有するポリペプチド；

(ii) 配列番号3、配列番号4、配列番号5及び配列番号28からなる群から選択される少なくとも1つの膜結合型O-アシルトランスフェラーゼタンパク質ファミリーモチーフを有するポリペプチド；

(iii) Clustal Wアラインメント法に基づき配列番号2に示されるとおりのアミノ酸配列と比較したとき少なくとも90%のアミノ酸同一性を有するポリペプチド；

(iv) Clustal Wアラインメント法に基づき配列番号15、配列番号17及び配列番号18からなる群から選択されるアミノ酸配列と比較したとき少なくとも43.9%のアミノ酸同一性を有するポリペプチド；及び、

(v) 配列番号19及び配列番号20からなる群から選択される少なくとも1つの1-アシル-sn-グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼタンパク質ファミリーモチーフを有するポリペプチド；

からなる群から選択され、

前記少なくともアシルCoA：リゾリン脂質アシルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの単離ポリヌクレオチドが、少なくとも1つの調節配列に作動可能に連結され、前記調節配列は同じであるか又は異なる、ステップと、

b) 前記油性微生物宿主細胞を増殖するステップと、
を含み、前記油性微生物宿主細胞のC₁₈からC₂₀への伸長変換効率が対照宿主細胞と比べて増加する、方法。

【請求項7】

長鎖多価不飽和脂肪酸を産生する油性微生物組換え宿主細胞における4不飽和化変換効率を増加させる方法であって、

a) 前記長鎖多価不飽和脂肪酸を産生する組換え宿主細胞に、少なくともアシルCoA：リゾリン脂質アシルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの単離ポリヌクレオチドを導入するステップであって、前記ポリペプチドが、

(i) Clustal Wアラインメント法に基づき配列番号9及び配列番号11からなる群から選択されるアミノ酸配列と比較したとき少なくとも45%のアミノ酸同一性を有するポリペプチド；

(ii) 配列番号3、配列番号4、配列番号5及び配列番号28からなる群から選択される少なくとも1つの膜結合型O-アシルトランスフェラーゼタンパク質ファミリーモチーフを有するポリペプチド；

(iii) Clustal Wアラインメント法に基づき配列番号2に示されるとおりのアミノ酸配列と比較したとき少なくとも90%のアミノ酸同一性を有するポリペプチド；

(iv) Clustal Wアラインメント法に基づき配列番号15、配列番号17及び配列番号18からなる群から選択されるアミノ酸配列と比較したとき少なくとも43.9%のアミノ酸同一性を有するポリペプチド；及び、

(v) 配列番号19及び配列番号20からなる群から選択される少なくとも1つの1-アシル-sn-グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼタンパク質ファミリーモチーフを有するポリペプチド；

からなる群から選択され、

前記少なくともアシルCoA：リゾリン脂質アシルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの単離ポリヌクレオチドが、少なくとも1つの調節配列に作動可能に連結され、前記調節配列は同じであるか又は異なる、ステップと、

b) 前記油性微生物宿主細胞を増殖するステップと、
を含み、前記油性微生物宿主細胞の4不飽和化変換効率が対照宿主細胞と比べて増加する、方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0367

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0367】

LC-PUFA生合成の改良(LA % TFAの低下、EPA % TFAの増加及び9エロンガーゼ変換効率の増加として計測される)は、複製プラスミド上のヤロウイア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*) Y8406株に形質転換されたときのScLPAA TS及びYL LPAA Tの双方について同程度であるため、双方のLP LAATとも宿主染色体に安定的に組み込まれた場合には同様に機能し得ると予想される。従って、ScLPAA TSは、宿主染色体に安定的に組み込まれた場合、実施例4及び5での観察と同様に脂質プロファイルを改良する可能性が高い。

次に、本発明の態様を示す。

1. 少なくとも1つの長鎖多価不飽和脂肪酸の産生を改良するための組換え油性微生物宿主細胞であって、前記宿主細胞が少なくともアシルCoA:リゾリン脂質アシルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの単離ポリヌクレオチドを含み、前記ポリペプチドが、

a) Clustal Wアラインメント法に基づき配列番号9及び配列番号11からなる群から選択されるアミノ酸配列と比較したとき少なくとも45%のアミノ酸同一性を有するポリペプチド；

b) 配列番号3、配列番号4、配列番号5及び配列番号28からなる群から選択される少なくとも1つの膜結合型O-アシルトランスフェラーゼタンパク質ファミリーモチーフを有するポリペプチド；

c) Clustal Wアラインメント法に基づき配列番号2に示されるとおりのアミノ酸配列と比較したとき少なくとも90%のアミノ酸同一性を有するポリペプチド；

d) Clustal Wアラインメント法に基づき配列番号15、配列番号17及び配列番号18からなる群から選択されるアミノ酸配列と比較したとき少なくとも43.9%のアミノ酸同一性を有するポリペプチド；及び、

e) 配列番号19及び配列番号20からなる群から選択される少なくとも1つの1-アシル-sn-グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼファミリーモチーフを有するポリペプチド；

からなる群から選択され、

前記少なくともアシルCoA:リゾリン脂質アシルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの単離ポリヌクレオチドが、少なくとも1つの調節配列に作動可能に連結され、前記調節配列は同じであるか又は異なり；及び、

さらに前記宿主細胞が、

(i) 対照宿主細胞と比較したときの少なくとも1つの長鎖多価不飽和脂肪酸を産生する油性微生物宿主細胞におけるC₁₈からC₂₀への伸長変換効率の増加、

(ii) 対照宿主細胞と比較したときの少なくとも1つの長鎖多価不飽和脂肪酸を産生する油性微生物宿主細胞における4不飽和化変換効率の増加、

からなる群から選択される少なくとも1つの改良を有する、組換え宿主細胞。

2. 前記少なくとも1つの長鎖多価不飽和脂肪酸が、エイコサジエン酸、ジホモ-リノレン酸、アラキドン酸、エイコサトリエン酸、エイコサテトラエン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサテトラエン酸、-6ドコサペンタエン酸、-3ドコサペンタエン酸及びドコサヘキサエン酸からなる群から選択される、上記1に記載の組換え宿主細胞。

3. 前記少なくともアシルCoA:リゾリン脂質アシルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが安定的に組み込まれ、及び、

さらに前記宿主細胞が、

a) 対照宿主細胞と比較したときの少なくとも1つの長鎖多価不飽和脂肪酸を産生する油性微生物宿主細胞における少なくとも4%のC₁₈からC₂₀への伸長変換効率の増加；及

び、

b) 対照宿主細胞と比較したときの少なくとも1つの長鎖多価不飽和脂肪酸を産生する油性微生物宿主細胞における少なくとも5%の 4 不飽和化変換効率の増加
からなる群から選択される少なくとも1つの改良を有する、上記1に記載の組換え宿主細胞。

4. 前記改良が、

a) 対照宿主細胞と比較したときのエイコサペンタエン酸産生宿主細胞における少なくとも13%の C_{18} から C_{20} への伸長変換効率の増加；

b) 対照宿主細胞と比較したときのドコサヘキサエン酸産生宿主細胞における少なくとも4%の C_{18} から C_{20} への伸長変換効率の増加；

c) 対照宿主細胞と比較したときのドコサヘキサエン酸産生宿主細胞における少なくとも18%の 4 不飽和化変換効率の増加；

d) 対照宿主細胞と比較したときの全脂肪酸の重量パーセントとして計測されるエイコサペンタエン酸産生宿主細胞中のエイコサペンタエン酸の少なくとも9重量パーセントの増加；

e) 対照宿主細胞と比較したときの全脂肪酸の重量パーセントとして計測されるドコサヘキサエン酸産生宿主細胞中のエイコサペンタエン酸の少なくとも2重量パーセントの増加；及び、

f) 対照宿主細胞と比較したときの全脂肪酸の重量パーセントとして計測されるドコサヘキサエン酸産生宿主細胞中のドコサヘキサエン酸の少なくとも9重量パーセントの増加
からなる群から選択される、上記3に記載の組換え宿主細胞。

5. 前記微生物が酵母である、上記1～4のいずれか一項に記載の組換え宿主細胞。

6. 前記酵母がヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) である、上記5に記載の組換え宿主細胞。

7. 上記4に記載の油性微生物組換え宿主細胞から得られたエイコサペンタエン酸及び/又はドコサヘキサエン酸を含む油。

8. エイコサペンタエン酸及び/又はドコサヘキサエン酸を含む油を作製する方法であって、

a) 上記4に記載の油性微生物宿主細胞を培養するステップであって、エイコサペンタエン酸及び/又はドコサヘキサエン酸を含む油が産生されるステップと、

b) ステップ(a)の前記微生物油を回収してもよいステップと、
を含む方法。

9. ステップ(b)の前記回収される油がさらに処理される、上記8に記載の方法。

10. 前記宿主細胞が油性酵母である、上記8に記載の方法。

11. 前記油性酵母がヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) である、上記10に記載の方法。

12. 長鎖多価不飽和脂肪酸を産生する油性微生物組換え宿主細胞における C_{18} から C_{20} への伸長変換効率を増加させる方法であって、

a) 前記長鎖多価不飽和脂肪酸を産生する組換え宿主細胞に、少なくともアシル CoA : リゾリン脂質アシルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの単離ポリヌクレオチドを導入するステップであって、前記ポリペプチドが、

(i) *Clustal W* アラインメント法に基づき配列番号9及び配列番号11からなる群から選択されるアミノ酸配列と比較したとき少なくとも45%のアミノ酸同一性を有するポリペプチド；

(ii) 配列番号3、配列番号4、配列番号5及び配列番号28からなる群から選択される少なくとも1つの膜結合型O-アシルトランスフェラーゼタンパク質ファミリーモチーフを有するポリペプチド；

(iii) *Clustal W* アラインメント法に基づき配列番号2に示されるとおりのアミノ酸配列と比較したとき少なくとも90%のアミノ酸同一性を有するポリペプチド；

(i v) C l u s t a l Wアラインメント法に基づき配列番号 1 5、配列番号 1 7 及び配列番号 1 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列と比較したとき少なくとも 4 3 . 9 % のアミノ酸同一性を有するポリペプチド；及び、

(v) 配列番号 1 9 及び配列番号 2 0 からなる群から選択される少なくとも 1 つの 1 - アシル - s n - グリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼタンパク質ファミリーモチーフを有するポリペプチド；

からなる群から選択され、

前記少なくともアシル C o A : リゾリン脂質アシルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも 1 つの単離ポリヌクレオチドが、少なくとも 1 つの調節配列に作動可能に連結され、前記調節配列は同じであるか又は異なる、ステップと、

b) 前記油性微生物宿主細胞を増殖するステップと、

を含み、前記油性微生物宿主細胞の C₁₈ から C₂₀ への伸長変換効率が対照宿主細胞と比べて増加する、方法。

1 3 . a) 少なくともアシル C o A : リゾリン脂質アシルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドが安定的に組み込まれ、及び、

b) 前記 C₁₈ から C₂₀ への伸長変換効率の増加が、対照宿主細胞と比較したときエイコサペンタエン酸産生宿主細胞において少なくとも 1 3 % である、

上記 1 2 に記載の方法。

1 4 . a) 前記少なくともアシル C o A : リゾリン脂質アシルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが安定的に組み込まれ、及び、

b) C₁₈ から C₂₀ への伸長変換効率の増加が、対照宿主細胞と比較したときドコサヘキサエン酸産生宿主細胞において少なくとも 4 % である、

上記 1 2 に記載の方法。

1 5 . 前記宿主細胞が油性酵母である、上記 1 2 に記載の方法。

1 6 . 前記油性酵母がヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) である、上記 1 5 に記載の方法。

1 7 . 長鎖多価不飽和脂肪酸を産生する油性微生物組換え宿主細胞における 4 不飽和化変換効率を増加させる方法であって、

a) 前記長鎖多価不飽和脂肪酸を産生する組換え宿主細胞に、少なくともアシル C o A : リゾリン脂質アシルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも 1 つの単離ポリヌクレオチドを導入するステップであって、前記ポリペプチドが、

(i) C l u s t a l Wアラインメント法に基づき配列番号 9 及び配列番号 1 1 からなる群から選択されるアミノ酸配列と比較したとき少なくとも 4 5 % のアミノ酸同一性を有するポリペプチド；

(i i) 配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5 及び配列番号 2 8 からなる群から選択される少なくとも 1 つの膜結合型 O - アシルトランスフェラーゼタンパク質ファミリーモチーフを有するポリペプチド；

(i i i) C l u s t a l Wアラインメント法に基づき配列番号 2 に示されるとおりのアミノ酸配列と比較したとき少なくとも 9 0 % のアミノ酸同一性を有するポリペプチド；

(i v) C l u s t a l Wアラインメント法に基づき配列番号 1 5、配列番号 1 7 及び配列番号 1 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列と比較したとき少なくとも 4 3 . 9 % のアミノ酸同一性を有するポリペプチド；及び、

(v) 配列番号 1 9 及び配列番号 2 0 からなる群から選択される少なくとも 1 つの 1 - アシル - s n - グリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼタンパク質ファミリーモチーフを有するポリペプチド；

からなる群から選択され、

前記少なくともアシル C o A : リゾリン脂質アシルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも 1 つの単離ポリヌクレオチドが、少なくとも 1 つの調節配列に作動可能に連結され、前記調節配列は同じであるか又は異なる、ステップと、

b) 前記油性微生物宿主細胞を増殖するステップと、
を含み、前記油性微生物宿主細胞の 4 不飽和化変換効率が対照宿主細胞と比べて増加する、方法。

18. a) 前記少なくともアシル CoA : リゾリン脂質アシルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが安定的に組み込まれ、及び、

b) 前記 4 不飽和化変換効率の増加が、対照宿主細胞と比較したとき少なくとも 18 %である、

上記 17 に記載の方法。

19. 前記宿主細胞が油性酵母である、上記 17 に記載の方法。

20. 前記油性酵母がヤロウイア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) である、上記 19 に記載の方法。