

【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23年6月30日(2011.6.30)

【公表番号】特表2010-527244(P2010-527244A)

【公表日】平成22年8月12日(2010.8.12)

【年通号数】公開・登録公報2010-032

【出願番号】特願2010-508603(P2010-508603)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 1 2 N	9/00	(2006.01)
C 1 2 P	7/64	(2006.01)
C 1 2 N	1/15	(2006.01)
C 1 2 N	1/19	(2006.01)
C 1 2 N	1/21	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 1 2 N	9/00	
C 1 2 P	7/64	
C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/00	1 0 3

【手続補正書】

【提出日】平成23年5月13日(2011.5.13)

【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】

第一のPUFA PKSシステムと比べて異なる比率の-3対-6のPUFAを産生するキメラPUFA PKSシステムを作出するために、第一のPUFA PKSシステム由来のFabA様-ヒドロキシアル-ACPデヒドラーゼ(DH)ドメインが、異なる第二のPUFA PKSシステム由来のDHドメインと置き換えられる、キメラPUFA PKSシステム。

【請求項2】

第一のPUFA PKSシステム由来のDHドメインを含むタンパク質が、第二のPUFA PKSシステム由来のDHドメインを含む相同タンパク質と置き換えられる、請求項1記載のキメラPUFA PKSシステム。

【請求項3】

第一または第二のPUFA PKSシステム由来のDHドメインが、シゾキトリウム(Schizochytrium)またはスラウストキトリウム(Thraustochytrium)由来のDH2ドメインに相当する、請求項1記載のキメラPUFA PKSシステム。

【請求項4】

第一のPUFA PKSシステムがシゾキトリウムPUFA PKSシステムであり、かつ

第二のPUFA PKSシステムがスラウストキトリウムPUFA PKSシステムである、請求項1記載のキメラPUFA PKSシステム。

**【請求項 5】**

第一のPUFA PKSシステムがシゾキトリウムPUFA PKSシステムであり、かつ  
シゾキトリウムPUFA PKSシステム由来のOrfCが、異なるスラウストキトリド(*Thraustoc*  
*hytrid*)由来のOrfCと置き換えられる、  
請求項1記載のキメラPUFA PKSシステム。

**【請求項 6】**

第一のPUFA PKSシステムがシゾキトリウムPUFA PKSシステムであり、かつ  
シゾキトリウムPUFA PKSシステム由来のOrfCが、スラウストキトリウム23B由来のOrfC  
と置き換えられる、  
請求項1記載のキメラPUFA PKSシステム。

**【請求項 7】**

スラウストキトリウム23B由来のOrfCが、シゾキトリウムのコドン使用(codon usage)  
のために最適化された核酸配列によりコードされる、請求項6記載のキメラPUFA PKSシステム。

**【請求項 8】**

核酸配列がSEQ ID NO:70を含む、請求項7記載のキメラPUFA PKSシステム。

**【請求項 9】**

シゾキトリウムPUFA PKSシステム由来のOrfAが、スラウストキトリウム23B由来のOrfA  
と置き換えられる、請求項6記載のキメラPUFA PKSシステム。

**【請求項 10】**

スラウストキトリウム23B由来のOrfAが、シゾキトリウムのコドン使用のために最適化  
された核酸配列によりコードされる、請求項9記載のキメラPUFA PKSシステム。

**【請求項 11】**

核酸配列がSEQ ID NO:71を含む、請求項10記載のキメラPUFA PKSシステム。

**【請求項 12】**

シゾキトリウムPUFA PKSシステム由来のOrfBが、スラウストキトリウム23B由来のOrfB  
と置き換えられる、請求項6記載のキメラPUFA PKSシステム。

**【請求項 13】**

スラウストキトリウム23B由来のOrfBが、シゾキトリウムのコドン使用のために最適化  
された核酸配列によりコードされる、請求項12記載のキメラPUFA PKSシステム。

**【請求項 14】**

核酸配列がSEQ ID NO:72を含む、請求項13記載のキメラPUFA PKSシステム。

**【請求項 15】**

第一のPUFA PKSシステムがシゾキトリウムPUFA PKSシステムであり、かつ  
シゾキトリウムPUFA PKSシステム由来のOrfCのDH2ドメインが、スラウストキトリウム2  
3B由来のDH2ドメインと置き換えられる、  
請求項1記載のキメラPUFA PKSシステム。

**【請求項 16】**

スラウストキトリウム23B由来のDH2ドメインを含む核酸配列が、SEQ ID NO:73を含む、  
請求項15記載のキメラPUFA PKSシステム。

**【請求項 17】**

スラウストキトリウム23B由来のDH2が、シゾキトリウムのコドン使用のために最適化  
された核酸配列によりコードされる、請求項15記載のキメラPUFA PKSシステム。

**【請求項 18】**

スラウストキトリウム23B由来のDH2ドメインを含む核酸配列が、SEQ ID NO:75を含む、  
請求項17記載のキメラPUFA PKSシステム。

**【請求項 19】**

キメラPUFA PKSシステムが、

- (a) SEQ ID NO:74と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含むタンパク質；
- (b) SEQ ID NO:74のアミノ酸配列を含むタンパク質；

- (c) SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4およびSEQ ID NO:74；
- (d) SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:4およびSEQ ID NO:62；または
- (e) SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:4およびSEQ ID NO:74

を含む、請求項1記載のキメラPUFA PKSシステム。

【請求項20】

キメラPUFA PKSシステムが、

- (a) SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3およびSEQ ID NO:70；
- (b) SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3およびSEQ ID NO:73；
- (c) SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3およびSEQ ID NO:75；または
- (d) SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:3およびSEQ ID NO:70

を含む核酸分子によってコードされる、請求項1記載のキメラPUFA PKSシステム。

【請求項21】

生物において請求項1記載のキメラPUFA PKSシステムを発現させる段階を含む、第一のPUFA PKSシステムにより產生される多価不飽和脂肪酸(PUFA)の-3対-6の比率を変化させる方法。

【請求項22】

キメラPUFA PKSシステムが微生物によって発現される、請求項21記載の方法。

【請求項23】

微生物がシゾキトリウムまたは酵母である、請求項22記載の方法。

【請求項24】

キメラPUFA PKSシステムが植物によって発現される、請求項21記載の方法。

【請求項25】

請求項1、19、または20記載のキメラPUFA PKSシステムを含む、遺伝的に改変された微生物または植物もしくは植物の一部。

【請求項26】

以下の段階を含む、PUFAの產生を増大させるおよび第一のPUFA PKSシステムにより产生される多価不飽和脂肪酸(PUFA)の-3対-6の比率を変化させる方法：

第一のPUFA PKSシステムと比べて異なる比率の-3対-6のPUFAを产生するキメラPUFA PKSシステムを作出するために、第一のPUFA PKSシステム由来のFabA様-ヒドロキシアシル-ACPデヒドラーーゼ(DH)ドメインが、異なる第二のPUFA PKSシステム由来のDHドメインと置き換えられ、かつ、

第二のPUFA PKSシステム由来のDHドメインが、第一のPUFA PKSシステムが由来する生物のコドン使用のために最適化されている、

キメラPUFA PKSシステムを生物において発現させる段階。

【請求項27】

SEQ ID NO:74と少なくとも95%同一であるキメラOrfCタンパク質をコードする単離核酸分子。

【請求項28】

SEQ ID NO:73と少なくとも95%同一である核酸配列を含む、請求項27記載の単離核酸分子。

【請求項29】

核酸配列が、核酸分子を発現させる予定の生物のコドン使用のために最適化される、請求項27記載の単離核酸分子。

【請求項30】

核酸配列が、キメラタンパク質の一部分が由来する生物のコドン使用のために最適化される、請求項27記載の単離核酸分子。

【請求項31】

核酸配列が、SEQ ID NO:75と少なくとも95%同一である、請求項27記載の単離核酸分子。

【請求項32】

請求項27記載の核酸分子を含む組換え核酸分子。

【請求項33】

請求項27記載の核酸分子でトランスフェクトされている組換え宿主細胞。

【請求項34】

細胞が微生物または植物細胞である、請求項33記載の組換え宿主細胞。

【請求項35】

微生物がシゾキトリウム、細菌、または酵母である、請求項34記載の組換え宿主細胞。

【請求項36】

請求項34記載の植物細胞を含む、遺伝的に改変された植物またはその一部。

【請求項37】

DHドメインの少なくとも1つが第一のPUFA PKSシステム由来であり、かつ、  
ドメイン(a)～(h)の残りが、第二の異なるPUFA PKSシステム由来である、  
以下を含むキメラPUFA PKSシステム：

- a) 少なくとも1つのエノイル-ACPレダクターゼ(ER)ドメイン；
- b) 少なくとも4つのACPドメイン；
- c) 少なくとも2つの-ケトアシル-ACPシンターゼ(KS)ドメイン；
- d) 少なくとも1つのアシルトランスフェラーゼ(AT)ドメイン；
- e) 少なくとも1つの-ケトアシル-ACPレダクターゼ(KR)ドメイン；
- f) 少なくとも2つのFabA様-ヒドロキシアシル-ACPデヒドラーーゼ(DH)ドメイン；
- g) 少なくとも1つの鎖伸長因子(CLF)ドメイン；および
- h) 少なくとも1つのマロニル-CoA:ACPアシルトランスフェラーゼ(MAT)ドメイン。

【請求項38】

PUFA PKSシステムにおける少なくとも1つのタンパク質をコードする核酸分子を、PUFA PKSシステムを発現する生物のまたは関連生物の最適化されたコドン使用のために改変する段階

を含む、該生物によるPUFA産生を増大させる方法。

【請求項39】

生物が、異種の組換えPUFA PKSシステムを発現する、請求項38記載の方法。

【請求項40】

生物がシゾキトリウムであり、かつ

内因性PUFA PKSシステムにおける少なくとも1つのタンパク質をコードする核酸分子が、シゾキトリウムのコドン使用のために最適化される、

請求項38記載の方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0025

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0025】

本発明の別の態様は、PUFA PKSシステムを発現する生物によるPUFA産生を増大させる方法に関する。この方法は、PUFA PKSシステムにおける少なくとも1つのタンパク質をコードする核酸分子を、その生物のまたは関連生物の最適化されたコドン使用のために改変する段階を含む。1つの局面では、生物は、異種の組換えPUFA PKSシステムを発現する。1つの局面では、生物はシゾキトリウムであり、内因性PUFA PKSシステムにおける少なくとも1つのタンパク質をコードする核酸分子は、シゾキトリウムのコドン使用のために最適化される。

【請求項1001】

第一のPUFA PKSシステムと比べて異なる比率の-3対-6のPUFAを产生するキメラPUFA PKSシステムを作出するために、第一のPUFA PKSシステム由来のFabA様-ヒドロキシアシル-ACPデヒドラーーゼ(DH)ドメインが、異なる第二のPUFA PKSシステム由来のDHドメイ

ンと置き換えられる、キメラPUFA PKSシステム。

[請求項1002]

第一のPUFA PKSシステム由来のDHドメインを含むタンパク質が、第二のPUFA PKSシステム由来のDHドメインを含む相同タンパク質と置き換えられる、請求項1001記載のキメラPUFA PKSシステム。

[請求項1003]

第一または第二のPUFA PKSシステム由来のDHドメインが、シゾキトリウム(*Schizochytrium*)またはスラウストキトリウム(*Thraustochytrium*)由来のDH2ドメインに相当する、請求項1001記載のキメラPUFA PKSシステム。

[請求項1004]

第一のPUFA PKSシステムがシゾキトリウムPUFA PKSシステムであり、かつ

第二のPUFA PKSシステムがスラウストキトリウムPUFA PKSシステムである、  
請求項1001記載のキメラPUFA PKSシステム。

[請求項1005]

第一のPUFA PKSシステムがシゾキトリウムPUFA PKSシステムであり、かつ

シゾキトリウムPUFA PKSシステム由来のOrfCが、異なるスラウストキトリド(*Thraustocystid*)由来のOrfCと置き換えられる、  
請求項1001記載のキメラPUFA PKSシステム。

[請求項1006]

第一のPUFA PKSシステムがシゾキトリウムPUFA PKSシステムであり、かつ

シゾキトリウムPUFA PKSシステム由来のOrfCが、スラウストキトリウム23B由来のOrfC  
と置き換えられる、  
請求項1001記載のキメラPUFA PKSシステム。

[請求項1007]

スラウストキトリウム23B由来のOrfCが、シゾキトリウムのコドン使用(codon usage)  
のために最適化された核酸配列によりコードされる、請求項1006記載のキメラPUFA PKSシ  
ステム。

[請求項1008]

核酸配列がSEQ ID NO:70を含む、請求項1007記載のキメラPUFA PKSシステム。

[請求項1009]

シゾキトリウムPUFA PKSシステム由来のOrfAが、スラウストキトリウム23B由来のOrfA  
と置き換えられる、請求項1006記載のキメラPUFA PKSシステム。

[請求項1010]

スラウストキトリウム23B由来のOrfAが、シゾキトリウムのコドン使用のために最適化  
された核酸配列によりコードされる、請求項1009記載のキメラPUFA PKSシステム。

[請求項1011]

核酸配列がSEQ ID NO:71を含む、請求項1010記載のキメラPUFA PKSシステム。

[請求項1012]

シゾキトリウムPUFA PKSシステム由来のOrfBが、スラウストキトリウム23B由来のOrfB  
と置き換えられる、請求項1006記載のキメラPUFA PKSシステム。

[請求項1013]

スラウストキトリウム23B由来のOrfBが、シゾキトリウムのコドン使用のために最適化  
された核酸配列によりコードされる、請求項1012記載のキメラPUFA PKSシステム。

[請求項1014]

核酸配列がSEQ ID NO:72を含む、請求項1013記載のキメラPUFA PKSシステム。

[請求項1015]

第一のPUFA PKSシステムがシゾキトリウムPUFA PKSシステムであり、かつ

シゾキトリウムPUFA PKSシステム由来のOrfCのDH2ドメインが、スラウストキトリウム2  
3B由来のDH2ドメインと置き換えられる、  
請求項1001記載のキメラPUFA PKSシステム。

[請求項1016]

スラウストキトリウム23B由来のDH2ドメインを含む核酸配列が、SEQ ID NO:73を含む、  
請求項1015記載のキメラPUFA PKSシステム。

[請求項1017]

スラウストキトリウム23B由来のDH2が、シゾキトリウムのコドン使用のために最適化された核酸配列によりコードされる、請求項1015記載のキメラPUFA PKSシステム。

[請求項1018]

スラウストキトリウム23B由来のDH2ドメインを含む核酸配列が、SEQ ID NO:75を含む、  
請求項1017記載のキメラPUFA PKSシステム。

[請求項1019]

キメラPUFA PKSシステムが、SEQ ID NO:74と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含むタンパク質を含む、請求項1001記載のキメラPUFA PKSシステム。

[請求項1020]

キメラPUFA PKSシステムが、SEQ ID NO:74のアミノ酸配列を含むタンパク質を含む、請求項1001記載のキメラPUFA PKSシステム。

[請求項1021]

キメラPUFA PKSシステムが、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4およびSEQ ID NO:74を含む、請求項1001記載のキメラPUFA PKSシステム。

[請求項1022]

キメラPUFA PKSシステムが、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:4およびSEQ ID NO:62を含む、請求項1001記載のキメラPUFA PKSシステム。

[請求項1023]

キメラPUFA PKSシステムが、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:4およびSEQ ID NO:74を含む、請求項1001記載のキメラPUFA PKSシステム。

[請求項1024]

キメラPUFA PKSシステムが、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3およびSEQ ID NO:70を含む核酸分子によってコードされる、請求項1001記載のキメラPUFA PKSシステム。

[請求項1025]

キメラPUFA PKSシステムが、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3およびSEQ ID NO:73を含む核酸分子によってコードされる、請求項1001記載のキメラPUFA PKSシステム。

[請求項1026]

キメラPUFA PKSシステムが、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3およびSEQ ID NO:75を含む核酸分子によってコードされる、請求項1001記載のキメラPUFA PKSシステム。

[請求項1027]

キメラPUFA PKSシステムが、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:3およびSEQ ID NO:70を含む核酸分子によってコードされる、請求項1001記載のキメラPUFA PKSシステム。

[請求項1028]

生物において請求項1001記載のキメラPUFA PKSシステムを発現させる段階を含む、第一のPUFA PKSシステムにより產生される多価不飽和脂肪酸(PUFA)の -3 対 -6 の比率を変化させる方法。

[請求項1029]

キメラPUFA PKSシステムが微生物によって発現される、請求項1028記載の方法。

[請求項1030]

微生物がシゾキトリウムである、請求項1029記載の方法。

[請求項1031]

微生物が酵母である、請求項1029記載の方法。

[請求項1032]

キメラPUFA PKSシステムが植物によって発現される、請求項1028記載の方法。

[請求項1033]

請求項1001記載のキメラPUFA PKSシステムを含む、遺伝的に改変された微生物または植

物もしくは植物の一部。

[請求項1034]

請求項1019記載のキメラPUFA PKSシステムを含む、遺伝的に改変された微生物または植物もしくは植物の一部。

[請求項1035]

請求項1021記載のキメラPUFA PKSシステムを含む、遺伝的に改変された微生物または植物もしくは植物の一部。

[請求項1036]

請求項1022記載のキメラPUFA PKSシステムを含む、遺伝的に改変された微生物または植物もしくは植物の一部。

[請求項1037]

請求項1023記載のキメラPUFA PKSシステムを含む、遺伝的に改変された微生物または植物もしくは植物の一部。

[請求項1038]

請求項1024記載のキメラPUFA PKSシステムを含む、遺伝的に改変された微生物または植物もしくは植物の一部。

[請求項1039]

請求項1025記載のキメラPUFA PKSシステムを含む、遺伝的に改変された微生物または植物もしくは植物の一部。

[請求項1040]

請求項1026記載のキメラPUFA PKSシステムを含む、遺伝的に改変された微生物または植物もしくは植物の一部。

[請求項1041]

請求項1027記載のキメラPUFA PKSシステムを含む、遺伝的に改変された微生物または植物もしくは植物の一部。

[請求項1042]

以下の段階を含む、PUFAの産生を増大させるおよび第一のPUFA PKSシステムにより産生される多価不飽和脂肪酸(PUFA)の -3 対 -6 の比率を変化させる方法：

第一のPUFA PKSシステムと比べて異なる比率の -3 対 -6 のPUFAを産生するキメラPUFA PKSシステムを作出するために、第一のPUFA PKSシステム由来のFabA様 - ヒドロキシアシル-ACPデヒドローゼ(DH)ドメインが、異なる第二のPUFA PKSシステム由来のDHドメインと置き換えられ、かつ、

第二のPUFA PKSシステム由来のDHドメインが、第一のPUFA PKSシステムが由来する生物のコドン使用のために最適化されている、

キメラPUFA PKSシステムを生物において発現させる段階。

[請求項1043]

SEQ ID NO:74と少なくとも95%同一であるキメラOrfCタンパク質をコードする単離核酸分子。

[請求項1044]

SEQ ID NO:73と少なくとも95%同一である核酸配列を含む、請求項1043記載の単離核酸分子。

[請求項1045]

核酸配列が、核酸分子を発現させる予定の生物のコドン使用のために最適化される、請求項1043記載の単離核酸分子。

[請求項1046]

核酸配列が、キメラタンパク質の一部分が由来する生物のコドン使用のために最適化される、請求項1043記載の単離核酸分子。

[請求項1047]

核酸配列が、SEQ ID NO:75と少なくとも95%同一である、請求項1043記載の単離核酸分子。

[請求項1048]

請求項1043記載の核酸分子を含む組換え核酸分子。

[請求項1049]

請求項1043記載の核酸分子でトランスフェクトされている組換え宿主細胞。

[請求項1050]

細胞が微生物である、請求項1049記載の組換え宿主細胞。

[請求項1051]

微生物がシゾキトリウムである、請求項1050記載の組換え宿主細胞。

[請求項1052]

微生物が細菌である、請求項1050記載の組換え宿主細胞。

[請求項1053]

微生物が酵母である、請求項1050記載の組換え宿主細胞。

[請求項1054]

細胞が植物細胞である、請求項1049記載の組換え宿主細胞。

[請求項1055]

請求項1054記載の組換え宿主細胞を含む、遺伝的に改変された植物またはその一部。

[請求項1056]

DHドメインの少なくとも1つが第一のPUFA PKSシステム由来であり、かつ、

ドメイン(a)～(h)の残りが、第二の異なるPUFA PKSシステム由来である、

以下を含むキメラPUFA PKSシステム：

a) 少なくとも1つのエノイル-ACPレダクターゼ(ER)ドメイン；

b) 少なくとも4つのACPドメイン；

c) 少なくとも2つの -ケトアシル-ACPシンターゼ(KS)ドメイン；

d) 少なくとも1つのアシルトランスフェラーゼ(AT)ドメイン；

e) 少なくとも1つの -ケトアシル-ACPレダクターゼ(KR)ドメイン；

f) 少なくとも2つのFabA様 -ヒドロキシアシル-ACPデヒドローゼ(DH)ドメイン；

g) 少なくとも1つの鎖伸長因子(CLF)ドメイン； および

h) 少なくとも1つのマロニル-CoA:ACPアシルトランスフェラーゼ(MAT)ドメイン。

[請求項1057]

PUFA PKSシステムにおける少なくとも1つのタンパク質をコードする核酸分子を、PUFA PKSシステムを発現する生物のまたは関連生物の最適化されたコドン使用のために改変する段階

を含む、該生物によるPUFA産生を増大させる方法。

[請求項1058]

生物が、異種の組換えPUFA PKSシステムを発現する、請求項1057記載の方法。

[請求項1059]

生物がシゾキトリウムであり、かつ

内因性PUFA PKSシステムにおける少なくとも1つのタンパク質をコードする核酸分子が、シゾキトリウムのコドン使用のために最適化される、

請求項1057記載の方法。