

【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26年10月2日(2014.10.2)

【公表番号】特表2013-535987(P2013-535987A)

【公表日】平成25年9月19日(2013.9.19)

【年通号数】公開・登録公報2013-049

【出願番号】特願2013-526178(P2013-526178)

【国際特許分類】

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 P 7/64 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 R 1/645 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 1/19 Z N A

C 1 2 P 7/64

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 P 7/64

C 1 2 R 1:645

【手続補正書】

【提出日】平成26年8月13日(2014.8.13)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 5 1 5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 5 1 5】

【表 5 0】

表 39. HaGG(配列番号 428)および変異 HxxxH(配列番号 186)モチーフを同時に含んでなる EaD5S 変異体中の Δ5 デサチュラーゼ活性

Y4036U1 形質転換体	変異遺伝子	プライマーの配列番号	変異 HDASH モチーフの配列	平均変換効率	EaD5S-35a と比較した%活性
pZuFmEaD5S-A(S)	EaD5S-35a (配列番号 334)	--	HDASH (配列番号 183)	37.2%	100%
pZuFmEaD5S-A(S)-157e	EaD5S-35a157e	340 および 341	HeASH (配列番号 433)	14.0%	37.6%
pZuFmEaD5S-A(S)-158f	EaD5S-35a157f	342 および 343	HDfSH (配列番号 393)	2.1%	5.6%
pZuFmEaD5S-A(S)-158g	EaD5S-35a158g (配列番号 111)	344 および 345	HDgSH (配列番号 429)	28.4%	76.3%
pZuFmEaD5S-A(S)-158m	EaD5S-35a 158m	346 および 347	HDmSH (配列番号 398)	1.8%	4.8%
pZuFmEaD5S-A(S)-158s	EaD5S-35a158s (配列番号 362)	348 および 349	HDsSH (配列番号 430)	27.4%	73.7%
pZuFmEaD5S-A(S)-158y	EaD5S-35a158y	350 および 351	HDySH (配列番号 406)	1.9%	5.1%
pZuFmEaD5S-A(S)-159a	EaD5S-35a159a	352 および 353	HDAaH (配列番号 431)	2.0%	5.4%
pZuFmEaD5S-A(S)-159c	EaD5S-35a159c	354 および 355	HDaCH (配列番号 407)	14.2%	38.2%
pZuFmEaD5S-A(S)-159g	EaD5S-35a159g (配列番号 364)	356 および 357	HDAGH (配列番号 432)	26.5%	71.2%
pZuFmEaD5S-A(S)-159n	EaD5S-35a159n	358 および 359	HDAnH (配列番号 416)	4.2%	11.3%
pZuFmEaD5S-A(S)-159t	EaD5S-35a159t	360 および 361	HDAtH (配列番号 420)	9.8%	26.3%

結果は、変異 H P G G モチーフ（すなわち H a G G [配列番号 428]）のみを有する

変異 E a D 5 S - 3 5 a と比べて、なおも妥当な 5 デサチュラーゼ活性を保ちながら、コドン最適化 E a D 5 S 5 デサチュラーゼが、変異 H P G G (配列番号 1 8 1 ) および変異 H D A S H (配列番号 1 8 3 ) モチーフの双方を含んでなるように、修飾され得ることを実証した。好ましい二重変異体は、E a D 5 S - 3 5 a 1 5 8 g (配列番号 1 1 1 および 1 1 2 ; p Z u F m E a D 5 S - A (S) - 1 5 8 g 形質転換体中において 2 8 . 4 % の変換効率で D G L A を A R A に変換できる)、E a D 5 S - 3 5 a 1 5 8 s (配列番号 3 6 2 および 3 6 3 ; p Z u F m E a D 5 S - A (S) - 1 5 8 s 形質転換体中において 2 7 . 4 % の変換効率で D G L A を A R A に変換できる)、および E a D 5 S - 3 5 a 1 5 9 g (配列番号 3 6 4 および 3 6 5 ; p Z u F m E a D 5 S - A (S) - 1 5 9 g 形質転換体中において 2 6 . 5 % の変換効率で D G L A を A R A に変換できる) であった。

## 【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 5 1 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【0 5 1 6】

以上、本発明を要約すると下記のとおりである。

- 1 . 乾燥細胞重量の質量 % として測定して、少なくとも 2 5 質量 % のエイコサペンタエン酸を含んでなる油を產生する、組換え微生物宿主細胞。
- 2 . 油が、総脂肪酸の質量 % として測定して、少なくとも 4 5 質量 % のエイコサペンタエン酸を含んでなる、上記 1 に記載の組換え微生物宿主細胞。
- 3 . 油の総脂肪酸の質量 % として測定されたリノール酸と、総脂肪酸の質量 % として測定されたエイコサペンタエン酸との比率が少なくとも 2 . 4 である、上記 1 または 2 に記載の組換え微生物宿主細胞。

4 . ( a ) 少なくとも 1 つの 8 デサチュラーゼに連結された少なくとも 1 つの 9 エロングーゼを有するポリペプチドを含んでなる、少なくとも 1 つのマルチザイム；

( b ) その発現が下方制御されている、少なくとも 1 つのペルオキシソーム形成因子タンパク質；および

( c ) 少なくともリゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ [「 L P A A T 」] 活性を有する、少なくとも 2 つのポリペプチド；

( d ) 少なくともリン脂質：ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ [「 P D A T 」] 活性を有する、少なくとも 1 つのポリペプチド

を含んでなる、組換え宿主細胞。

5 . i ) L 3 5 F 変異；

i i ) L 3 5 M 変異；

i i i ) L 3 5 G 変異；

i v ) L 3 5 G 変異と、S 9 A 、 S 9 D 、 S 9 G 、 S 9 I 、 S 9 K 、 S 9 Q 、 Q 1 2 K 、 A 2 1 D 、 A 2 1 T 、 A 2 1 V 、 V 3 2 F 、 Y 8 4 C 、 Q 1 0 7 E 、 L 1 0 8 G 、 G 1 2 7 L 、 W 1 3 2 T 、 M 1 4 3 N 、 M 1 4 3 W 、 L 1 6 1 T 、 L 1 6 1 Y 、 W 1 6 8 G 、 I 1 7 9 M 、 I 1 7 9 R 、 C 2 3 6 N 、 Q 2 4 4 N 、 A 2 5 4 W 、 および A 2 5 4 Y からなる群から選択される少なくとも 1 つのその他の変異；

v ) L 3 5 G 、 A 2 1 V 、 L 1 0 8 G 、 および I 1 7 9 R 変異；

v i ) L 3 5 G 、 W 1 3 2 T 、 および I 1 7 9 変異；

v i i ) L 3 5 G 、 S 9 D 、 Y 8 4 C 、 および I 1 7 9 R 変異；

v i i i ) L 3 5 G 、 Y 8 4 C 、 I 1 7 9 R 、 および Q 2 4 4 N 変異；

i x ) L 3 5 G 、 A 2 1 V 、 W 1 3 2 T 、 I 1 7 9 R 、 および Q 2 4 4 N 変異；

x ) K 5 8 R および I 2 5 7 T 変異；

x i ) D 9 8 G 変異；

x i i ) L 1 3 0 M および V 2 4 3 A 変異； および

x i i i ) K 5 8 R 、 L 3 5 F 、 L 3 5 G 、 L 3 5 M 、 S 9 A 、 S 9 D 、 S 9 G 、 S 9

I、S 9 K、S 9 Q、Q 1 2 K、A 2 1 D、A 2 1 T、A 2 1 V、V 3 2 F、Y 8 4 C、D 9 8 G、Q 1 0 7 E、L 1 0 8 G、G 1 2 7 L、L 1 3 0 M、W 1 3 2 T、M 1 4 3 N、M 1 4 3 W、L 1 6 1 T、L 1 6 1 Y、W 1 6 8 G、I 1 7 9 M、I 1 7 9 R、C 2 3 6 N、V 2 4 3 A、Q 2 4 4 N、A 2 5 4 W、A 2 5 4 Y、およびI 2 5 7 Tからなる群から選択される、少なくとも2つの変異を含んでなる任意の組み合わせからなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸変異によって、配列番号3と異なる、配列番号1に記載のアミノ酸配列を含んでなる、少なくとも1つの変異 9エロンガーゼポリペプチドをさらに含んでなる、上記4に記載の組換え微生物宿主細胞。

6. 少なくとも1つの変異 9エロンガーゼポリペプチドがL 3 5 G置換を含んでなり、変異 9エロンガーゼポリペプチドが配列番号3の 9エロンガーゼ活性と比べて改善された 9エロンガーゼ活性を有する、上記5に記載の組換え微生物宿主細胞。

7. マルチザイムが、

(a) リンカーが、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、および配列番号10からなる群から選択される；および

(b) 配列が、配列番号12、配列番号14、および配列番号16からなる群から選択される配列から本質的になる

からなる群から選択される特性を有する、上記4に記載の組換え微生物宿主細胞。

8. 少なくとも2つのリゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼが、

(a) 配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号23、および配列番号25からなる群から選択される配列から本質的になる配列；および

(b) 配列番号18、配列番号22、および配列番号23からなる群から選択されるアミノ酸配列と比較して、アラインメントのC l u s t a l W法に基づいて少なくとも43.9%のアミノ酸同一性を有し、配列番号26および配列番号27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-モチーフをさらに含んでなるポリペプチド

からなる群から選択される、上記4に記載の組換え微生物宿主細胞。

9. 少なくとも1つのリン脂質：ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼが、

(a) 配列番号29および配列番号30からなる群から選択される配列から本質的になる配列；および

(b) 配列番号29および配列番号30からなる群から選択されるアミノ酸配列と比較して、アラインメントのC l u s t a l W法に基づいて少なくとも90%のアミノ酸同一性を有するポリペプチド

からなる群から選択される、上記4に記載の組換え微生物宿主細胞。

10. 宿主細胞がヤロウィニア属(Yarrowia)のものである、上記4に記載の組換え微生物宿主細胞。

11. 宿主細胞が、少なくとも1つの変異 5デサチュラーゼポリペプチドをさらに含んでなり、ここで該変異 5デサチュラーゼポリペプチドが、

a) 配列番号180[H x G x]に記載のアミノ酸モチーフと、配列番号182[H x x x H]に記載のアミノ酸モチーフとを含んでなり、配列番号180[H x G x]が配列番号181[HPGG]と同一でなく、配列番号182[H x x x H]が配列番号183[H D A S H]と同一でない、変異ポリペプチド；

b) 配列番号106[E g D 5 Mまたはコドン最適化E g D 5 R \* - 3 4 g 1 5 8 g]、配列番号108[E g D 5 R \* - 3 4 g 1 5 8 g 3 4 7 s]、配列番号110[E g D 5 S - 3 6 s 1 5 7 g]、配列番号112[E a D 5 S - 3 5 a 1 5 8 g]、配列番号299[E g D 5 R \* - 3 4 g 1 5 7 g]、配列番号301[E g D 5 R \* - 3 4 g 1 5 8 a]、配列番号303[E g D 5 R \* - 3 4 g 1 5 8 g]、配列番号329[E g D 5 S - 3 6 s 1 5 6 e]、配列番号331[E g D 5 S - 3 6 s 1 5 8 a]、配列番号333[E g D 5 S - 3 6 s 1 5 8 g]、配列番号363[E a D 5 S - 3 5 a 1 5 8 s]、および配列番号365[E a D 5 S - 3 5 a 1 5 9 g]からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、変異ポリペプチド

からなる群から選択される、上記 4 ~ 10 のいずれかに記載の組換え微生物宿主細胞。  
12. a) エイコサペンタエン酸を含んでなる微生物油が生産される、上記 1 ~ 10 のいずれかに記載の宿主細胞を培養するステップと；

b) 任意選択的に、ステップ(a)の微生物油を回収するステップと  
を含んでなる、エイコサペンタエン酸を含んでなる微生物油を製造する方法。  
13. ステップ(b)の回収された油をさらに処理する、上記 12 に記載の方法。

【手続補正 3】

【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】

乾燥細胞重量の質量%として測定して、少なくとも 25 質量%のエイコサペンタエン酸を含んでなる油を產生する、組換え微生物宿主細胞。

【請求項 2】

(a) 少なくとも 1 つの 8 デサチュラーゼに連結された少なくとも 1 つの 9 エロンガーゼを有するポリペプチドを含んでなる、少なくとも 1 つのマルチザイム；

(b) その発現が下方制御されている、少なくとも 1 つのペルオキシソーム形成因子タンパク質；および

(c) 少なくともリゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ [「L P A A T」] 活性を有する、少なくとも 2 つのポリペプチド；

(d) 少なくともリン脂質：ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ [「P D A T」] 活性を有する、少なくとも 1 つのポリペプチド  
を含んでなる、組換え宿主細胞。

【請求項 3】

a) エイコサペンタエン酸を含んでなる微生物油が生産される、請求項 1 または 2 に記載の宿主細胞を培養するステップと；

b) 任意選択的に、ステップ(a)の微生物油を回収するステップと  
を含んでなる、エイコサペンタエン酸を含んでなる微生物油を製造する方法。