

【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】0515

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0515】

【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 デサチユラーゼ活性

| 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 | HDiSH (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 | HDAiH (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 4 2 8] ）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産生する、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。
- 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 Clustal 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 Clustal 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．宿主細胞がヤロウシア属 (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 [H P G G] 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生産する、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。