

【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22年5月20日(2010.5.20)

【公表番号】特表2009-534032(P2009-534032A)

【公表日】平成21年9月24日(2009.9.24)

【年通号数】公開・登録公報2009-038

【出願番号】特願2009-506580(P2009-506580)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/09	(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 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	A

【手続補正書】

【提出日】平成22年3月26日(2010.3.26)

【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】

a.) 配列番号3および配列番号7よりなる群から選択された17デサチュラーゼ酵素をコードする単離されたヌクレオチド配列、または

b.) (a)に完全に相補的である単離されたヌクレオチド配列よりなる群から選択される、単離された核酸分子。

【請求項2】

配列番号4で記載される17デサチュラーゼ酵素をコードする単離された核酸分子。

【請求項3】

少なくとも168個のコドンがヤロウィア中での発現のためにコドン最適化された、配列番号2で記載される17デサチュラーゼ酵素をコードする単離された核酸分子。

【請求項4】

少なくとも160個のコドンがヤロウィア中での発現のためにコドン最適化された、配列番号6で記載される17デサチュラーゼ酵素をコードする単離された核酸分子。

【請求項5】

適切な制御配列と作動的に結合する、請求項1に記載の単離された核酸分子を含むキメラ遺伝子。

【請求項6】

請求項1に記載の単離された核酸分子を含む、形質転換されたヤロウィア種。

【請求項7】

a) i) 1) クラスターW法のアラインメントに基づいて、配列番号2で記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較すると少なくとも90.9%の同一性を有する、17デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子、

2) クラスターW法のアラインメントに基づいて、配列番号4で記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較すると少なくとも91.4%の同一性を有する、17デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子、および

3) クラスターW法のアラインメントに基づいて、配列番号6で記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較すると少なくとも89.5%の同一性を有する、17デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子

よりなる群から選択される、17デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子と、

ii) アラキドン酸源

とを含む宿主細胞を提供する工程と、

b) 17デサチュラーゼポリペプチドをコードする核酸分子が発現されてアラキドン酸がエイコサペンタエン酸に転換される条件下で、工程(a)の宿主細胞を生育させる工程と、

c) 場合により工程(b)のエイコサペンタエン酸を回収する工程とを含む、エイコサペンタエン酸を製造する方法。

【請求項8】

a) i) 1) クラスターW法のアラインメントに基づいて、配列番号2で記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較すると少なくとも90.9%の同一性を有する、17デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子、

2) クラスターW法のアラインメントに基づいて、配列番号4で記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較すると少なくとも91.4%の同一性を有する、17デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子、および

3) クラスターW法のアラインメントに基づいて、配列番号6で記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較すると少なくとも89.5%の同一性を有する、17デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子

よりなる群から選択される、17デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子と、

ii) ジホモ- -リノレン酸源

とを含む宿主細胞を提供する工程と、

b) 17デサチュラーゼポリペプチドをコードする核酸分子が発現されてジホモ- -リノレン酸がエイコサテトラエン酸に変換される条件下で、工程(a)の宿主細胞を生育させる工程と、

c) 場合により工程(b)のエイコサテトラエン酸を回収する工程とを含む、エイコサテトラエン酸を製造する方法。

【請求項9】

a) i) 1) クラスターW法のアラインメントに基づいて、配列番号2で記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較すると少なくとも90.9%の同一性を有する、17デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子、および

2) クラスターW法のアラインメントに基づいて、配列番号4で記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較すると少なくとも91.4%の同一性を有する、17デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子

よりなる群から選択された、二機能性 17デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子と、

ii) リノール酸源

とを含む宿主細胞を提供する工程と、

b) 二機能性 17デサチュラーゼポリペプチドをコードする核酸分子が発現されてリノール酸が - リノレン酸に変換される条件下で、工程(a)の宿主細胞を生育させる工

程と、

c) 場合により工程 (b) の - リノレン酸を回収する工程と
を含む、 - リノレン酸を製造する方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0214

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0214】

10個の形質転換体中で、平均で総脂質の0.4%のALAおよび39.6%のLA(C18:2)が生成された。これらの10株中でPrD17SがLAをALAに変換する変換効率は、平均率で約1%のみであった。

したがってPrD17Sは、ここでARAからEPAへの変換を触媒する単機能性17デサチュラーゼとして同定される。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0215

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0215】

以上、本発明を要約すると下記のとおりである。

1 . a .) 配列番号3および配列番号7よりなる群から選択された17デサチュラーゼ酵素をコードする単離されたヌクレオチド配列、または

b .) (a) に完全に相補的である単離されたヌクレオチド配列よりなる群から選択される、単離された核酸分子。

2 . 配列番号4で記載される17デサチュラーゼ酵素をコードする単離された核酸分子。

3 . 少なくとも168個のコドンがヤロウイア中での発現のためにコドン最適化された、配列番号2で記載される17デサチュラーゼ酵素をコードする単離された核酸分子。

4 . 少なくとも160個のコドンがヤロウイア中での発現のためにコドン最適化された、配列番号6で記載される17デサチュラーゼ酵素をコードする単離された核酸分子。

5 . 適切な制御配列と作動的に結合する、上記1に記載の単離された核酸分子を含むキメラ遺伝子。

6 . 上記1に記載の単離された核酸分子を含む、形質転換されたヤロウイア種。

7 . ヤロウイア・リポリティカATCCC#20362、ヤロウイア・リポリティカATCC#8862、ヤロウイア・リポリティカATCCC#18944、ヤロウイア・リポリティカATCCC#76982、およびヤロウイア・リポリティカ LGAM S(7)1よりなる群から選択される、上記6に記載の形質転換されたヤロウイア種。

8 . a) i) 1) クラスタルW法のアラインメントに基づいて、配列番号2で記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較すると少なくとも90.9%の同一性を有する、17デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子、

2) クラスタルW法のアラインメントに基づいて、配列番号4で記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較すると少なくとも91.4%の同一性を有する、17デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子、および

3) クラスタルW法のアラインメントに基づいて、配列番号6で記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較すると少なくとも89.5%の同一性を有する、17デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子

よりなる群から選択される、17デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子と、

i) アラキドン酸源

とを含む宿主細胞を提供する工程と、

b) 17デサチュラーゼポリペプチドをコードする核酸分子が発現されてアラキドン酸がエイコサペンタエン酸に転換される条件下で、工程(a)の宿主細胞を生育させる工程と、

c) 場合により工程(b)のエイコサペンタエン酸を回収する工程と
を含む、エイコサペンタエン酸を製造する方法。

9. a) i) 1) クラスターW法のアラインメントに基づいて、配列番号2で記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較すると少なくとも90.9%の同一性を有する、17デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子、

2) クラスターW法のアラインメントに基づいて、配列番号4で記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較すると少なくとも91.4%の同一性を有する、17デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子、および

3) クラスターW法のアラインメントに基づいて、配列番号6で記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較すると少なくとも89.5%の同一性を有する、17デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子

よりなる群から選択される、17デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子と、

i i) ジホモ- -リノレン酸源

とを含む宿主細胞を提供する工程と、

b) 17デサチュラーゼポリペプチドをコードする核酸分子が発現されてジホモ- -リノレン酸がエイコサテトラエン酸に変換される条件下で、工程(a)の宿主細胞を生育させる工程と、

c) 場合により工程(b)のエイコサテトラエン酸を回収する工程と
を含む、エイコサテトラエン酸を製造する方法。

10. a) i) 1) クラスターW法のアラインメントに基づいて、配列番号2で記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較すると少なくとも90.9%の同一性を有する、17デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子、および

2) クラスターW法のアラインメントに基づいて、配列番号4で記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較すると少なくとも91.4%の同一性を有する、17デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子

よりなる群から選択された、二機能性 17デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたヌクレオチド分子と、

i i) リノール酸源

とを含む宿主細胞を提供する工程と、

b) 二機能性 17デサチュラーゼポリペプチドをコードする核酸分子が発現されてリノール酸が -リノレン酸に変換される条件下で、工程(a)の宿主細胞を生育させる工程と、

c) 場合により工程(b)の -リノレン酸を回収する工程と
を含む、 -リノレン酸を製造する方法。

11. 単離された核酸分子が、配列番号2、4、および6よりなる群から選択されたアミノ酸配列を有する 17デサチュラーゼポリペプチドをコードする、上記8または9に記載の方法。

12. a.) 単離された核酸分子が、配列番号3および配列番号7よりなる群から選択された核酸配列を有し、

b.) 宿主細胞がヤロウイア・リポリティカである、
上記8または9に記載の方法。

13. 宿主細胞が、藻類、細菌、酵母、卵菌綱、および真菌よりなる群から選択される、上記8または9に記載の方法。

14. 宿主細胞が、スラウストキトリウム(Thraustochytrium)種、シ

ゾキトリウム (S ch i z o c h y t r i u m) 種、およびモルティエレラ (M o r t i e r e l l a) 種よりなる群から選択された真菌である、上記 13 に記載の方法。

15. 酵母が油性酵母である、上記 13 に記載の方法。

16. 油性酵母が、ヤロウィア、カンジダ、ロドトルラ、ロドスボリジウム、クリプトコッカス、トリコスボロン、およびリポマイセスよりなる群から選択される、上記 15 に記載の方法。

17. ヤロウィアが、ヤロウィア・リポリティカ ATCC # 20362、ヤロウィア・リポリティカ ATCC # 8862、ヤロウィア・リポリティカ ATCC # 18944、ヤロ
ウイア・リポリティカ ATCC # 76982、およびヤロウィア・リポリティカ L G A M
S (7) 1 よりなる群から選択される、上記 16 に記載の方法。