

【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シ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シ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シア種。

【請求項 7】

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、

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、

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、および

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

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シ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シ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シア種。

7. ヤロウシア・リポリティカ ATCC # 20362、ヤロウシア・リポリティカ ATCC # 8862、ヤロウシア・リポリティカ ATCC # 18944、ヤロウシア・リポリティカ ATCC # 76982、およびヤロウシア・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シア種。

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、

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。

10. 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、および

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。

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.) 宿主細胞がヤロウィア・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 (Schizochytrium) 種、およびモルティエレラ (Mortierella) 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、ヤロウシア、カンジダ、ロドトルラ、ロドスポリジウム、クリプトコッカス、トリコスポロン、およびリボ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. ヤロウシアが、ヤロウシア・リポリティカ ATCC # 20362、ヤロウシア・リポリティカ ATCC # 8862、ヤロウシア・リポリティカ ATCC # 18944、ヤロウシア・リポリティカ ATCC # 76982、およびヤロウシア・リポリティカ LGAM S (7) 1 よりなる群から選択される、上記 16 に記載の方法。