

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7298812号

(P7298812)

(45)発行日 令和5年6月27日(2023.6.27)

(24)登録日 令和5年6月19日(2023.6.19)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 P 23/00 (2006.01)

C 1 2 P 23/00

Z N A

C 1 2 N 9/10 (2006.01)

C 1 2 N 9/10

C 1 2 N 15/54 (2006.01)

C 1 2 N 15/54

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

請求項の数 6 (全17頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-512715(P2020-512715)

(86)(22)出願日 平成30年9月25日(2018.9.25)

(65)公表番号 特表2020-534806(P2020-534806  
A)

(43)公表日 令和2年12月3日(2020.12.3)

(86)国際出願番号 PCT/EP2018/076021

(87)国際公開番号 WO2019/057996

(87)国際公開日 平成31年3月28日(2019.3.28)

審査請求日 令和3年9月17日(2021.9.17)

(31)優先権主張番号 62/562,680

(32)優先日 平成29年9月25日(2017.9.25)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(73)特許権者 503220392

ディーエスエム アイピー アセットズ  
ー・ブイ・

DSM IP ASSETS B.V.

オランダ国, 6411 テーイーヘ

ーレン, ヘット オーバールーン 1

Het Overloon 1, NL -

6411 TE Heerlen, Net

herlands

(74)代理人 100107456

弁理士 池田 成人

(74)代理人 100128381

弁理士 清水 義憲

(74)代理人 100162352

弁理士 酒巻 順一郎

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 レチニルエステルの生産

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

アシルトランスフェラーゼ [ E C 2 . 3 . 1 . 2 0 ] の酵素活性によって、総レチノイドを基準として少なくとも14%長鎖レチニルエステルを増加させることを含む、レチノイドを生産するためのプロセスであって、レチノールを、適切なレチノイド産生宿主細胞において発現された配列番号3、5、又はそれらに対して少なくとも90%の同一性を有する配列に従うアシルトランスフェラーゼと接触させることを含む、前記長鎖レチニルエステル混合物中のトランス - アイソフォームのシス - アイソフォームに対する比率が少なくとも4であり、前記増加が前記アシルトランスフェラーゼを含まない又は発現しない宿主細胞と比較したものである、プロセス。

## 【請求項2】

( a ) 配列番号3、5、又はそれらに対して少なくとも90%の同一性を有する配列に従うアシルトランスフェラーゼ [ E C 2 . 3 . 1 . 2 0 ] をコードする核酸分子を適切なレチノイド産生宿主細胞に導入するステップと、

( b ) レチノールを、少なくとも4の比率のトランス - 及びシス - レチニルエステルを含む長鎖レチニルエステル混合物に酵素変換するステップと、

( c ) 適切な培養条件下で長鎖レチニルエステルをビタミンAに変換するステップとを含む、ビタミンAの生産プロセス。

## 【請求項3】

前記レチノイド産生宿主細胞が、植物、真菌、藻類又は微生物から選択される、請求項1

又は2に記載のプロセス。

【請求項4】

前記レチノイド産生宿主細胞が、エシェリキア属 (Escherichia)、ストレプトミセス属 (Streptomyces)、パンテア属 (Pantoea)、バチルス属 (Bacillus)、フラボバクテリウム属 (Flavobacterium)、シネココックス属 (Synechococcus)、ラクトバチルス属 (Lactobacillus)、コリネバクテリウム属 (Corynebacterium)、ミクロコックス属 (Micrococcus)、ミクソコックス属 (Mixococcus)、ブレヴィバクテリウム属 (Brevibacterium)、ブラディリゾビウム属 (Bradyrhizobium)、ゴルドニア属 (Gordonia)、ディエトジア属 (Dietzia)、ムリカウダ属 (Muricauda)、スフィンゴモナス属 (Sphingomonas)、シノコキスティス属 (Synochocystis)、パラコックス属 (Paracoccus)、サッカロミセス属 (Saccharomyces)、アスペルギルス属 (Aspergillus)、ピキア属 (Pichia)、ハンゼヌラ属 (Hansenula)、フィコミセス属 (Phycomyces)、ムコール属 (Mucor)、ロドトルラ属 (Rhodotorula)、スポロボロミセス属 (Sporobolomyces)、キサントフィロミセス属 (Xanthophyllomyces)、ファフィア属 (Phaffia)、ブラケスレア属 (Blakeslea)、及びヤロウイア属 (Yarrowia) からなる群から選択される、請求項1又は2に記載のプロセス。

10

【請求項5】

前記レチノイド産生宿主細胞が、ヤロウイア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) 又は サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) から選択される、請求項4に記載のプロセス。

20

【請求項6】

前記宿主細胞が ヤロウイア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) である、請求項5に記載のプロセス。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、レチノールの変換によって、特にレチニル長鎖エステルなどのレチニルエステルを生産するための新規の酵素プロセスに関し、本プロセスは、アシルトランスフェラーゼ活性を有する酵素の使用を含む。前記プロセスは、ビタミンAの生物工学的生産のために使用され得る。

30

【0002】

例えば、長鎖レチニルエステルを含むレチニルエステルは、特にビタミンAの生産プロセスなどのレチノイドの生産プロセスにおける重要な中間体/前駆体である。ビタミンAを含むレチノイドは、栄養による供給を受けなければならないヒトにとって非常に重要で不可欠な栄養素の1つである。レチノイドは、特に視覚、免疫系及び成長に関して、ヒトの健康な状態を促進する。

【0003】

ビタミンA及びその前駆体を含むレチノイドの現在の化学的生産方法は、例えば、高エネルギー消費、複雑な精製工程及び/又は望ましくない副産物などのいくつかの望ましくない特徴を有する。したがって、過去数十年間にわたって、ビタミンA及びその前駆体を含むレチノイドを製造するために、より経済的且つ生態学的であり得る、微生物変換工程を含む他のアプローチが研究されている。

40

【0004】

一般に、レチノイドを産生する生物系は産業的に扱いが困難であり、且つ/或いは非常に低レベルの化合物を生じるので、商業規模の単離が実用的でない。これには、このような生物系におけるレチノイドの不安定性、又は比較的高い副産物の生成を含むいくつかの理由がある。

【0005】

50

したがって、ベータ - カロテンからビタミン A への酵素変換の産物特異性及び / 又は生産性を改善することが継続中の課題である。特に、例えば長鎖レチニルエステルなどのレチニルエステルに対するレチノールの変換に関与する酵素の生産性を最適化することが望ましい。

【 0 0 0 6 】

驚くことに、我々は今回、レチニルエステル、特に長鎖レチニルエステルの産生が、レチノールを長鎖レチニルエステルに変換することができるアシルトランスフェラーゼ活性を有する特定の酵素の使用によって誘発されることを見出した。

【 0 0 0 7 】

特に、本発明は、アシルトランスフェラーゼ活性を含む宿主細胞、特にカロテノイド産生宿主細胞、特に真菌宿主細胞に関し、前記宿主細胞は、レチニル長鎖エステルを産生することができる、すなわち、レチノールをレチニル長鎖エステルに酵素的に変換することができる。

10

【 0 0 0 8 】

「アシルトランスフェラーゼ」、「レチノールアシル化酵素」、「レチノールアシル化活性を有する酵素」という用語は本明細書では互換的に使用され、レチノールから長鎖レチニルエステルへの変換を触媒することができる酵素を指す。

【 0 0 0 9 】

本明細書に記載される酵素は、それぞれの宿主細胞において発現されるトランス特異的ベータ - カロテンオキシダーゼ ( B C O ) 酵素の作用に起因し得る高い割合のトランス - アイソフォームを産生することができる、例えば、少なくとも約 6 5 % の割合が、例えばトランス - レチナル又はトランス - レチノールを含むトランス - レチノイドであるレチノイド、例えば、少なくとも約 6 5 ~ 9 0 % のトランス - アイソフォームのレチノイドを産生することができるカロテノイド産生宿主細胞、特に真菌宿主細胞の使用を含むプロセスにおいて特に有用であり得る。しかしながら、本明細書で定義されるアシルトランスフェラーゼは、同じ活性を有するトランス - レチノール又はシス - レチノールのいずれかを触媒することができる。

20

【 0 0 1 0 】

本明細書で使用される場合、「真菌宿主細胞」という用語は、特に、宿主細胞としての酵母、例えば、ヤロウイア属 ( Y a r r o w i a ) 又はサッカロミケス属 ( S a c c h a r o m y c e s ) などを含む。

30

【 0 0 1 1 】

レチノールの酵素触媒作用に関連する「変換」又は「アシル化」という用語は本明細書において互換的に使用され、本明細書で定義される D G A T、D G A、Y A L を含むが、これらに限定されないアシルトランスフェラーゼの作用を指す。

【 0 0 1 2 】

レチニルエステル、特に長鎖レチニルエステルの総量を基準として少なくとも約 2 0 % の長鎖レチニルエステルの産生をもたらす本明細書で定義されるアシルトランスフェラーゼは、好ましくは、カロテノイド産生宿主細胞、特に真菌宿主細胞などの適切な宿主細胞に導入される、すなわち異種酵素として発現されるか、又は内在性酵素として発現されてもよい。好ましくは、本明細書に記載される酵素は異種酵素として ( 過剰 ) 発現される。

40

【 0 0 1 3 】

本発明に従う適切なアシルトランスフェラーゼは、例えば、植物、ヒトを含む動物、藻類、酵母を含む真菌、又は細菌などの種々の供給源から得ることができる。適切なアシルトランスフェラーゼには、D G A T [ E C 2 . 3 . 1 . 2 0 ]、例えば、D G A T 1 又は D G A T 2、A R A T、m d y を含むがこれらに限定されないアシル - C o A : ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼファミリー [ E C 2 . 3 . 1 ] のメンバー、特に、ヤロウイア属 ( Y a r r o w i a )、好ましくはヤロウイア・リポリティカ ( Y a r r o w i a l i p o l y t i c a ) から単離されるアシルトランスフェラーゼ、例えば、配列番号 5、7 に従う酵素、又はデータベースからの配列 ( 例えば、ヤロウイア・リポリ

50

ティカ (*Yarrowia lipolytica*) DGA2 をコードする XM\_504700 ; ヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) ARE2 をコードする XM\_505086 ) によってコードされる酵素など ; ムコール属 (*Mucor*)、好ましくはムコール・キルキネロイデス (*Mucor circinelloides*) から単離されるアシルトランスフェラーゼ、例えば、データベースから知られている配列 (例えば、EPB93051.1) によってコードされる酵素など ; フザリウム属 (*Fusarium*)、好ましくはフザリウム・フジクロイ (*Fusarium fujikuroi*) から単離されるアシルトランスフェラーゼ、例えば、データベースから知られている配列 (例えば、CCT66282.1) によってコードされる酵素など ; 10  
例えばヒト又はラットなどの哺乳類、好ましくはホモ・サピエンス (*Homo sapiens*) 又はラトゥス・ノルベギクス (*Rattus norvegicus*) から単離されるアシルトランスフェラーゼ、例えば、データベースから知られている配列 (例えば、NM\_053437 又は NM\_012079) によってコードされる酵素など ; ドロソフィラ属 (*Drosophila*)、好ましくはドロソフィラ・メラノガスター (*Drosophila melanogaster*) から単離されるアシルトランスフェラーゼ、例えば、データベースから知られている酵素 (NM\_135969、例えば、UniProtKB 配列 Q960U8) などが含まれる。

#### 【0014】

一実施形態では、本明細書で定義されるアシルトランスフェラーゼ活性を有する、すなわちレチノールのアシル化による長鎖レチニルエステルの形成に対する活性が増大された 20  
ポリペプチドは、ドロソフィラ・メラノガスター (*Drosophila melanogaster*) などのドロソフィラ属 (*Drosophila*) から得ることができ、特に、例えば配列番号4に従うポリヌクレオチド配列によってコードされる、配列番号3に対して少なくとも約60%、例えば、65、70、75、80、85、90、92、95、97、98、99%又は最大100%までの同一性を有するポリペプチドから選択され、前記配列は、適切なカロテノイド産生宿主細胞、特に真菌宿主細胞において、本明細書に記載される適切な条件下で発現される。配列は、それぞれの宿主細胞における発現に対してコドン最適化され得る。

#### 【0015】

一実施形態では、本明細書で定義されるアシルトランスフェラーゼ活性を有する、すなわちレチノールのアシル化による長鎖レチニルエステルの形成に対する活性が増大された 30  
ポリペプチドは、フザリウム・フジクロイ (*Fusarium fujikuroi*) などのフザリウム属 (*Fusarium*) から得ることができ、特に、FfDgat1 (配列CCT66282.1) に対して少なくとも約60%、例えば、65、70、75、80、85、90、92、95、97、98、99%又は最大100%までの同一性を有するポリペプチドから選択され、前記配列は、適切なカロテノイド産生宿主細胞、特に真菌宿主細胞において、本明細書に記載される適切な条件下で発現される。配列は、それぞれの宿主細胞における発現に対してコドン最適化され得る。

#### 【0016】

一実施形態では、本明細書で定義されるアシルトランスフェラーゼ活性を有する、すなわちレチノールのアシル化による長鎖レチニルエステルの形成に対する活性が増大された 40  
ポリペプチドは、ヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) などのヤロウイア属 (*Yarrowia*) から得ることができ、特に、Y1DGA2 (配列XM\_504700)、Y1ARE2 (配列XM\_505086)、配列番号5又は7に対して少なくとも約60%、例えば、65、70、75、80、85、90、92、95、97、98、99%又は最大100%までの同一性を有するポリペプチドから選択され、前記配列は、適切なカロテノイド産生宿主細胞、特に真菌宿主細胞において、本明細書に記載される適切な条件下で発現される。配列は、それぞれの宿主細胞における発現に対してコドン最適化され得る。

#### 【0017】

10

20

30

40

50

好ましくは、アシルトランスフェラーゼ活性を有する本明細書に記載されるポリヌクレオチドは、例えば、カロテノイド産生宿主細胞、特に真菌宿主細胞などの適切な宿主細胞への形質転換の後に、その中にクローン化された前記ポリヌクレオチドの発現を増強することができる適切な（発現）ベクターにおいて発現される。クローン化ポリヌクレオチドは、通常、例えばプロモーター配列などの特定の制御配列に動作可能に連結される。当業者には、どの（発現）ベクター及び／又はプロモーターが本明細書に記載されるカロテノイド産生宿主細胞における発現に適しているかが分かる。

#### 【 0 0 1 8 】

本明細書で定義される宿主細胞に、遺伝子及び／又はタンパク質のコピーをより多く生じさせるための改変は、強力なプロモーター、適切な転写及び／若しくは翻訳エンハンサーの使用、又はカロテノイド産生宿主細胞、特に真菌宿主細胞への１つ若しくは複数の遺伝子コピーの導入を含み得、所与の時間におけるそれぞれの酵素の蓄積の増大をもたらし得る。当業者には、宿主細胞に基づいてどの技術を使用するかが分かる。遺伝子発現の増大又は低減は、例えば、ノーザン、サザン又はウエスタンブロット技術などの当該技術分野で知られている種々の方法によって測定することができる。

#### 【 0 0 1 9 】

核酸又はアミノ酸への突然変異の発生、すなわち突然変異誘発は、例えば、ランダム若しくは部位特異的（*side-directed*）突然変異誘発、例えば放射線などの作用物質によって生じる物理的損傷、化学的処理、又は遺伝因子の挿入などによる種々の方法で実施され得る。当業者には、突然変異を導入する方法が分かる。

#### 【 0 0 2 0 】

したがって、本発明は、発現ベクター、又はその染色体DNAに組み込まれた本明細書に記載されるアシルトランスフェラーゼをコードするポリヌクレオチドを含む、本明細書に記載されるカロテノイド産生宿主細胞、特に真菌宿主細胞に関する。本明細書に記載されるアシルトランスフェラーゼをコードする、発現ベクター上の又は染色体DNAに組み込まれた異種ポリヌクレオチドを含むこのようなカロテノイド産生宿主細胞、特に真菌宿主細胞は、組換え宿主細胞と呼ばれる。カロテノイド産生宿主細胞、特に真菌宿主細胞は、本明細書で定義されるアシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子、例えば、配列番号 3、5、7、9 に従う既知の配列に対して少なくとも 60 % の同一性を有するか、又はデータベース配列、例えば、XM\_\_504700、EPB93051.1、XM\_\_505086、CCCT66282.1、NM\_\_012079、又はNM\_\_053437 によってコードされるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドなどの１つ又は複数のコピーを含有し、本明細書で定義されるようなアシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子の過剰発現をもたらし得る。遺伝子発現の増大は、例えば、ノーザン、サザン又はウエスタンブロット技術などの当該技術分野で知られている種々の方法によって測定することができる。

#### 【 0 0 2 1 】

本明細書で開示される配列と、長鎖レチニルエステルの形成において少なくとも約 20 % の変換率を有するレチノールの長鎖レチニルエステルへのアシル化に対する優先性とはに基づいて、レチノールから長鎖レチニルエステルへの変換に使用され得る、本明細書で定義されるレチノールアシル化活性を有するポリペプチドをコードするさらなる適切な遺伝子を容易に推定することができる。したがって、本発明は、新規のレチノールアシル化酵素を同定するための方法に関し、ここで、トランス - 又はシス - アイソフォームのいずれかの長鎖レチニルエステルの産生に対する優先性を有する新規のアシルトランスフェラーゼのスクリーニングプロセスにおけるプローブとして、配列番号 3、5、7、9 に対して少なくとも約 60 %、例えば、65、70、75、80、85、90、95、97、98、99 % 若しくは最大 100 % までの同一性を有するか、又はデータベース配列、例えば、XM\_\_504700、EPB93051.1、XM\_\_505086、CCCT66282.1、NM\_\_012079、若しくはNM\_\_053437 によってコードされるポリペプチドが使用される。アシル化作用が、産生されるレチノイドの総量を基準として少なくと

10

20

30

40

50

も約 20 % の長鎖レチニルエステルをもたらす限り、アシルトランスフェラーゼ活性を有し、本明細書で開示されるあらゆるポリペプチドが、本明細書に記載されるレチノールからの長鎖レチニルエステルの産生のために使用され得る。

#### 【0022】

本発明は特に、長鎖レチニルエステルの生産プロセスにおけるこのような新規のアシルトランスフェラーゼの使用に関し、ここで、シス - アイソフォームの生産は、レチノイドの総量を基準として約 20 % 以下まで低減され得る。このプロセスは、前記アシルトランスフェラーゼを発現し（好ましくは、前記酵素をコードする遺伝子は異種発現される、すなわち前記宿主細胞に導入される）、さらに、ベータ - カロテンから、好ましくはトランス - アイソフォームのレチナールへの変換を触媒する例えばトランス特異的 BCO などのトランス特異的酵素を発現する、適切なカロテノイド産生宿主細胞、特に真菌宿主細胞を用いて実施することができる。レチニルエステル、特に長鎖レチニルエステルはさらに、（既知の）適切な機構の作用によってビタミン A に変換され得る。

#### 【0023】

本明細書で使用される場合、長鎖レチニルエステルの産生に関して「少なくとも約 20 %」という用語は、レチノイドの少なくとも約 20 %、例えば、30、40、50、60、70、80、87、90、92、95、97、99 又は最大 100 % までが長鎖レチニルエステルであることを意味する。シス - アイソフォームの長鎖レチニルエステルの産生に関して「約 20 % 以下」という用語は、産生した長鎖レチニルエステルの約 20 % 以下、例えば、18、16、14、12、10、8、7、5、2 又は 0 % までがシス - アイソフォームの形態であることを意味する。これらの数値は全て、本明細書で定義される適切なカロテノイド産生宿主細胞、特に真菌宿主細胞中に存在するレチノイドの総量を基準とする。

#### 【0024】

「配列同一性」、「同一性 %」又は「配列相同性」という用語は、本明細書において互換的に使用される。本発明の目的で、2つのアミノ酸配列又は2つの核酸配列の配列相同性又は配列同一性の割合を決定するために、配列は最適な比較を目的として整列されることが本明細書において定義される。2つの配列間のアライメントを最適化するために、比較される2つの配列のいずれかにギャップが導入され得る。このようなアライメントは、比較されている配列の全長にわたって行うことができる。或いは、アライメントは、より短い長さ、例えば約 20、約 50、約 100 又はそれ以上の核酸 / 塩基又はアミノ酸にわたって行われてもよい。配列同一性は、報告された整列領域にわたる2つの配列間の同一マッチの割合である。2つのアミノ酸配列間又は2つのヌクレオチド配列間の配列同一性パーセントは、2つの配列のアライメントのための Needleman 及び Wunsch アルゴリズム (Needleman, S. B. and Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443 - 453) を用いて決定され得る。アミノ酸配列及びヌクレオチド配列はいずれも、このアルゴリズムによって整列され得る。Needleman - Wunsch アルゴリズムはコンピュータプログラム NEEDLE に実装されている。本発明の目的では、EMBOS S パッケージからの NEEDLE プログラムを使用した（バージョン 2.8.0 以上、EMBOS S : European Molecular Biology Open Software Suite (2000) Rice, Longden and Bleasby, Trends in Genetics 16, (6) pp 276 - 277、<http://emboss.bioinformatics.nl/>）。タンパク質配列については、置換マトリックスのために EBL O S U M 6 2 が使用される。ヌクレオチド配列については、E D N A F U L L が使用される。使用される任意選択的パラメータは、10 のギャップ - オープンペナルティ及び 0.5 のギャップ伸長ペナルティである。当業者は、これらの異なるパラメータ全てがわずかに異なる結果をもたらし得るが、異なるアルゴリズムを用いたときに2つの配列の全体の同一性の割合は有意に変化されないことを認識するであろう。

#### 【0025】

上記のプログラム N E E D L E によるアライメントの後、クエリー配列と本発明の配列との間の配列同一性の割合は、以下のように計算される：両方の配列内の同一アミノ酸又は同一ヌクレオチドを示すアライメント内の対応する位置の数を、アライメント内のギャップの総数を差し引いた後のアライメントの全長で除する。本明細書で定義される同一性は、N O B R I E F オプションを使用することによって N E E D L E から得ることができ、プログラムの出力において「最長同一性」として標識される。比較される両方のアミノ酸配列が、そのアミノ酸のいずれにおいても違いがない場合、これらは同一である、すなわち 100% の同一性を有する。本明細書で定義される植物に由来する酵素に関して、当業者には、植物由来の酵素が例えば葉緑体プロセッシング酵素 (C P E) などの特異的酵素により切断され得る葉緑体標的シグナルを含有し得ることが分かる。

10

#### 【0026】

宿主細胞に応じて、レチノールのアシル化のための本明細書で定義されるポリヌクレオチドは、それぞれの宿主細胞における発現のために最適化され得る。当業者には、このような改変ポリヌクレオチドを作成する方法が分かる。本明細書で定義されるポリヌクレオチドは、このような宿主最適化核酸分子が本明細書で定義されるそれぞれの活性を有するポリペプチドを依然として発現する限り、これらも包含することが理解される。

#### 【0027】

本明細書で定義されるアシルトランスフェラーゼは、酵素活性を変更しないアミノ酸置換を保有する酵素も包含し、すなわちこれらは野生型酵素に関して同じ特性を示し、本明細書で定義されるレチノールから長鎖レチニルエステルへの変換を触媒する。このような突然変異は「サイレント変異」とも呼ばれ、本明細書に記載される酵素の (酵素) 活性を変更しない。

20

#### 【0028】

本発明に従う核酸分子は、本発明により提供される核酸配列の一部のみ又は断片、例えば、本明細書で開示される配列、例えば、配列 X M \_ 5 0 4 7 0 0、X M \_ 5 0 4 0 3 8、E P B 9 3 0 5 1 . 1、X M \_ 5 0 5 0 8 6、C C T 6 6 2 8 2 . 1、X M \_ 5 0 2 5 5 7、N M \_ 1 3 5 9 6 9、N M \_ 0 1 2 0 7 9、N M \_ 0 5 3 4 3 7 に従う、又は配列番号 1 若しくは 2 に従う配列に示されるような配列、例えば、プローブ若しくはプライマーとして使用され得る断片、又は本明細書で定義されるアシルトランスフェラーゼの一部をコードする断片を含み得る。アシルトランスフェラーゼのクローニングから決定されるヌクレオチド配列は、他の種からの他の相同体の同定及び / 又はクローニングにおいて使用するために設計されるプローブ及びプライマーの作成を可能にする。プローブ / プライマーは、通常、実質的に精製されたオリゴヌクレオチドを含み、これは、通常、本明細書で開示されるヌクレオチド配列の少なくとも約 12 若しくは 15、好ましくは約 18 若しくは 20、より好ましくは約 22 若しくは 25、さらにより好ましくは約 30、35、40、45、50、55、60、65、若しくは 75 以上の連続ヌクレオチド、例えば、配列 X M \_ 5 0 4 7 0 0、X M \_ 5 0 4 0 3 8、E P B 9 3 0 5 1 . 1、X M \_ 5 0 5 0 8 6、C C T 6 6 2 8 2 . 1、X M \_ 5 0 2 5 5 7、N M \_ 1 3 5 9 6 9、N M \_ 0 1 2 0 7 9、N M \_ 0 5 3 4 3 7 若しくは配列番号 1、2、4、6、8、10 に従うヌクレオチド配列、又はこれらの断片若しくは誘導体に対して好ましくは高ストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列の領域を含む。

30

40

#### 【0029】

このようなハイブリダイゼーション条件の好ましい非限定的な例は、約 45 における 6 x 塩化ナトリウム / クエン酸ナトリウム (S S C) 中のハイブリダイゼーションと、その後の、50、好ましくは 55、より好ましくは 60、さらにより好ましくは 65 における 1 x S S C、0.1% S D S 中の 1 回又は複数回の洗浄である。

#### 【0030】

高ストリンジェント条件には、例えば、100 µg / ml サケ精子 D N A を含むか又は含まない D i g E a s y H y b 溶液 (R o c h e D i a g n o s t i c s G m b H)、又は 50% ホルムアミド、5 x S S C (150 mM の N a C l、15 mM のクエン酸三ナ

50

トリウム)、0.02%ドデシル硫酸ナトリウム、0.1%N-ラウロイルサルコシン、及び2%ブロッキング試薬(Roche Diagnostics GmbH)を含む溶液などの溶液中でジゴキシゲニン(DIG)標識DNAプローブ(DIG標識化系; Roche Diagnostics GmbH, 68298 Mannheim, Germany)を用いて調製)を用いた42における2時間~4日間のインキュベーションと、その後、室温において2xSSC及び0.1%SDS中で5~15分間フィルターを2回洗浄し、次に、65~68において0.5xSSC及び0.1%SDS又は0.1xSSC及び0.1%SDS中で15~30分間2回洗浄することが含まれる。

#### 【0031】

本明細書で定義される特異的アシルトランスフェラーゼの1つをコードする酵素/ポリヌクレオチドの発現は、カロテノイド/レチノイドの産生に適しており、且つ本明細書に記載される機能的等価物又は誘導体を含む本明細書で開示される酵素の1つをコードする核酸の発現を可能にする(微)生物を含む任意の宿主系において達成することができる。適切なカロテノイド/レチノイド産生宿主(微)生物の例は、細菌、藻類、酵母を含む真菌、植物、又は動物細胞である。好ましい細菌は、例えばエシェリキア・コリ(*Escherichia coli*)などのエシェリキア属(*Escherichia*)、ストレプトミセス属(*Streptomyces*)、パンテア属(*Pantoea*) (エルウィニア属(*Erwinia*))、バチルス属(*Bacillus*)、フラボバクテリウム属(*Flavobacterium*)、シネココックス属(*Synechococcus*)、ラクトバチルス属(*Lactobacillus*)、コリネバクテリウム属(*Corynebacterium*)、ミクロコックス属(*Micrococcus*)、ミクソコックス属(*Mixococcus*)、ブレビバクテリウム属(*Brevibacterium*)、ブラディリゾビウム属(*Bradyrhizobium*)、ゴルドニア属(*Gordonia*)、ディエトジア属(*Dietzia*)、ムリカウダ属(*Muricauda*)、スフィンゴモナス属(*Sphingomonas*)、シノコキスティス属(*Synochocystis*)、例えばパラコックス・ゼアキサントニファキエンス(*Paracoccus zeaxanthinifaciens*)などのパラコックス属(*Paracoccus*)のものである。好ましい真核微生物、特に酵母を含む真菌は、サッカロミセス・セレビスエ(*Saccharomyces cerevisiae*)などのサッカロミセス属(*Saccharomyces*)、アスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)などのアスペルギルス属(*Aspergillus*)、ピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)などのピキア属(*Pichia*)、ハンゼヌラ・ポリモルファ(*Hansenula polymorpha*)などのハンゼヌラ属(*Hansenula*)、フィコミセス・ブラケスレアヌス(*Phycomyces blakesleanus*)などのフィコミセス属(*Phycomyces*)、ムコール属(*Mucor*)、ロドトルラ属(*Rhodotorula*)、スポロボロミセス属(*Sporobolomyces*)、キサントフィロミセス属(*Xanthophyllomyces*)、ファフィア属(*Phaffia*)、例えばブラケスレア・トリスポラ(*Blakeslea trispora*)などのブラケスレア属(*Blakeslea*)、又はヤロウイア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)などのヤロウイア属(*Yarrowia*)から選択される。特に好ましいのは、例えば、ヤロウイア属(*Yarrowia*)若しくはサッカロミセス属(*Saccharomyces*)などの真菌宿主細胞における発現、又はエシェリキア属(*Escherichia*)における発現、より好ましくは、ヤロウイア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)又はサッカロミセス・セレビスエ(*Saccharomyces cerevisiae*)における発現である。

#### 【0032】

本発明に関して、例えば、微生物、真菌、藻類、又は植物などの生物は、原核生物の国際命名規約又は藻類、真菌、及び植物の国際命名規約(メルボルン規約)によって定義されるような、同じ生理学的特性を有するこのような種の同義語又はバソニムも含むことが

10

20

30

40

50

理解される。

【 0 0 3 3 】

本明細書で使用される場合、カロテノイド産生宿主細胞、特に真菌宿主細胞は、それぞれのポリペプチドがインビボで発現され且つ活性であり、カロテノイド、例えばベータ - カロテンの産生をもたらす宿主細胞である。カロテノイド産生宿主細胞を作成するための遺伝子及び方法は当該技術分野において知られており、例えば、国際公開第 2 0 0 6 1 0 2 3 4 2 号パンフレットが参照される。産生されるカロテノイドに応じて、異なる遺伝子が関与し得る。

【 0 0 3 4 】

本明細書で使用される場合、レチノイド産生宿主細胞、特に真菌宿主細胞は、それぞれのポリペプチドがインビボで発現され且つ活性であり、ベータ - カロテンからレチナール、レチノール及びレチニルエステルへの酵素変換によって、レチノイド、例えば、ビタミン A 及びその前駆体の産生をもたらす宿主細胞である。これらのポリペプチドは、本明細書で定義されるアシルトランスフェラーゼを含む。ビタミン A 経路の遺伝子、及びレチノイド産生宿主細胞の作成方法は、当該技術分野において知られている。

10

【 0 0 3 5 】

本明細書で使用される場合、レチニルエステル混合物は、長鎖レチニルエステルを含むレチニルエステルの混合物である。さらに、酢酸レチニルなどの他のエステル形態も含み得る。好ましくは、このような混合物はトランス - アイソフォームを多く含み、例えば、少なくとも約 2 0 % のトランス - アイソフォームのレチニルエステル、特に長鎖トランスレチニルエステルを含む。「長鎖レチニルエステル」という用語は、少なくとも約 8 個、例えば、9、1 0、1 2、1 3、1 5 又は 2 0 個の炭素原子及び最大約 2 6 個まで、例えば、2 5、2 2、2 1 個又はそれより少ない炭素原子からなり、好ましくは最大約 6 個までの不飽和結合、例えば、0、1、2、4、5、6 個の不飽和結合を有する炭化水素エステルを定義する。長鎖レチニルエステルは、リノール酸、オレイン酸、又はパルミチン酸を含むが、これらに限定されない。

20

【 0 0 3 6 】

本発明は、本明細書に記載されるアシルトランスフェラーゼの作用によるレチノールのアシル化によって、少なくとも 2 0 % の割合のトランス - 又はシス - アイソフォームのいずれか、好ましくはトランス - アイソフォームの長鎖レチニルエステルを有する長鎖レチニルエステル、すなわちレチノイドを生産するためのプロセスに関し、ここで、アシル化酵素は、好ましくは、本明細書に記載される適切な条件下、適切な宿主細胞において異種発現される。産生される長鎖レチニルエステルは、培地及び / 又は宿主細胞から単離され、任意選択的にさらに精製され得る。さらなる実施形態では、長鎖レチニルエステルは、ビタミン A をもたらす多段階プロセスにおける前駆体として使用することができる。ビタミン A は、当該技術分野で知られているように培地及び / 又は宿主細胞から単離され、任意選択的にさらに精製され得る。

30

【 0 0 3 7 】

ベータ - カロテン産生遺伝子、本明細書で定義されるアシルトランスフェラーゼ、任意選択的に、ベータ - カロテン酸素化酵素をコードする遺伝子、任意選択的に、レチナール還元酵素をコードする遺伝子、及び / 又は任意選択的に、ビタミン A の生合成に必要とされるさらなる遺伝子を発現することができる宿主細胞、すなわち微生物、藻類、真菌、動物又は植物細胞は、好気性又は嫌気性条件下で適切な栄養分が補充され、種々の宿主細胞に対して当業者により知られているような水性培地中で培養され得る。任意選択的に、このような培養は、本明細書で定義される電子の移動に関与するタンパク質及び / 又は補助因子の存在下で行われる。宿主細胞の培養 / 成長は、バッチ、流加バッチ ( f e d - b a t c h )、半連続又は連続モードで行うことができる。宿主細胞に応じて、好ましくは、例えば、ビタミン A 及びその前駆体 ( レチナール、レチノール、レチニルエステルなど ) などのレチノイドの産生は、当業者に知られているように異なり得る。ヤロウイア属 ( Y a r r o w i a ) から選択されるベータ - カロテン及びレチノイド産生宿主細胞の培養及

40

50

び単離は、例えば、国際公開第2008042338号パンフレットに記載されている。E. コリ (E. coli) から選択される宿主細胞におけるレチノイドの産生に関して、方法は、例えば、Jang et al, Microbial Cell Factories, 10:95 (2011) に記載されている。例えば、サッカロミケス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) などの酵母宿主細胞においてベータ - カロテン及びレチノイドを生産するための特定の方法は、例えば、国際公開第2014096992号パンフレットに開示されている。

#### 【0038】

本明細書で使用される場合、酵素に関して「比活性」又は「活性」という用語は、その触媒活性、すなわち所与の基質からの産物の形成を触媒するその能力を意味する。比活性は、規定温度において所与の期間に規定量のタンパク質によって消費される基質及び/又は産生される産物の量を定義する。通常、比活性は、タンパク質1mg当たり1分間に消費される基質又は形成される産物の $\mu\text{mol}$ で表される。通常、 $\mu\text{mol}/\text{分}$ はU (=単位) で略される。したがって、 $\mu\text{mol}/\text{分}/(\text{タンパク質mg})$ 又は $\text{U}/(\text{タンパク質mg})$ という比活性の単位の定義は、本文書を通して互換的に使用される。酵素は、インビボで、すなわち本明細書で定義される宿主細胞内、又は適切な基質が存在する系内でその触媒活性を実施すれば活性である。当業者には、酵素活性、特に、本明細書で定義されるアシルトランスフェラーゼの活性の測定方法が分かる。レチノールの変換からのレチニルエステルの産生、特に長鎖レチニルエステルの産生について本明細書で定義される適切なアシルトランスフェラーゼの能力を評価するための分析方法は当該技術分野において知られており、例えば、国際公開第2014096992号パンフレットの実施例4などに記載されている。簡単には、レチニルエステル、特に長鎖レチニルエステル、レチノール、トランス - レチナール、シス - レチナール、ベータ - カロテンなどの産物の力価は、HPLCによって測定することができる。

#### 【0039】

本明細書で使用されるレチノイドは、レチナール、レチノール酸、レチノール、レチノイン酸メトキシド (retinoic methoxide)、酢酸レチニル、レチニルエステル、4 - ケト - レチノイド、3ヒドロキシ - レチノイド又はこれらの組合せを含むがこれらに限定されない、アポカロテノイドとしても知られているベータカロテン切断産物を含む。レチナール、レチノール及びレチニルエステルを含む混合物は、本明細書では、「レチノイド混合物」と呼ばれる。レチノイドの生合成は、例えば、国際公開第2008042338号パンフレットに記載されている。

#### 【0040】

本明細書で使用されるレチナールは、IUPAC名(2E, 4E, 6E, 8E) - 3, 7 - ジメチル - 9 - (2, 6, 6 - トリメチルシクロヘキセン - 1 - イル) ノナ - 2, 4, 6, 8 - テトラエナールで知られている。これは、本明細書では互換的にレチナルデヒド又はビタミンAアルデヒドと称され、シス - 及びトランス - アイソフォームの両方、例えば、11 - シスレチナール、13 - シスレチナール、トランス - レチナール及び全トランスレチナールなどが含まれる。

#### 【0041】

本明細書で使用される「カロテノイド」という用語は、当該技術分野においてよく知られている。これは、2つの20炭素ゲラニルゲラニルピロリン酸分子の連結により天然で形成される長い40炭素の結合イソプレノイドポリエンを含む。これらには、4 - ケト位置又は3 - ヒドロキシ位置で酸化されてカンタキサンチン、ゼアキサンチン、又はアスタキサンチンをもたらす得る、フィトエン、リコペン、及び例えばベータ - カロテンなどのカロテンが含まれるが、これらに限定されない。カロテノイドの生合成は、例えば、国際公開第2006102342号パンフレットに記載される。

#### 【0042】

本明細書で使用されるビタミンAは、水溶液中に見られるビタミンAの任意の化学形態(例えば、その遊離酸形態で非解離、又はアニオンとして解離)であり得る。本明細書で

10

20

30

40

50

使用される用語は、生物工学的ビタミン A 経路における全ての前駆体又は中間体を含む。  
また、酢酸ビタミン A も含む。

【 0 0 4 3 】

特に、本発明は、本実施形態を特徴とする：

【 0 0 4 4 】

- レチノールアシル化活性、好ましくはアシルトランスフェラーゼ [ E C 2 . 3 . 1 ] 活性、より好ましくはアシルトランスフェラーゼ [ E C 2 . 3 . 1 . 2 0 ] 活性を有する酵素を含むカロテノイド産生宿主細胞、特に真菌宿主細胞であって、前記宿主細胞により産生されるレチノイドの総量を基準として少なくとも約 2 0 % の割合で長鎖レチニルエステルを産生する、カロテノイド産生宿主細胞、特に真菌宿主細胞。

10

【 0 0 4 5 】

- レチノールアシル化活性、好ましくはアシルトランスフェラーゼ [ E C 2 . 3 . 1 ] 活性、より好ましくはアシルトランスフェラーゼ [ E C 2 . 3 . 1 . 2 0 ] 活性を有する酵素を含む、上記の及び本明細書で定義されるカロテノイド産生宿主細胞、特に真菌宿主細胞であって、前記宿主細胞が長鎖レチニルエステルを含むレチニルエステル混合物を産生し、混合物が、少なくとも約 2 0 % 、例えば、3 0 、4 0 、5 0 、6 0 、7 0 、8 0 、8 7 、9 0 、9 2 、9 5 、9 7 、9 9 又は最大 1 0 0 % までのトランス - アイソフォームの長鎖レチニルエステルを含む、カロテノイド産生宿主細胞、特に真菌宿主細胞。

【 0 0 4 6 】

- レチニルエステルが長鎖レチニルエステルから選択される、上記の及び本明細書で定義されるカロテノイド産生宿主細胞、特に真菌宿主細胞。

20

【 0 0 4 7 】

- 異種アシルトランスフェラーゼを含む、上記の及び本明細書で定義されるカロテノイド産生宿主細胞、特に真菌宿主細胞。

【 0 0 4 8 】

- 宿主細胞が植物、真菌、藻類又は微生物から選択され、好ましくは、エシェリキア属 ( E s c h e r i c h i a ) 、ストレプトミセス属 ( S t r e p t o m y c e s ) 、パンテア属 ( P a n t o e a ) 、バチルス属 ( B a c i l l u s ) 、フラボバクテリウム属 ( F l a v o b a c t e r i u m ) 、シネココックス属 ( S y n e c h o c o c c u s ) 、ラクトバチルス属 ( L a c t o b a c i l l u s ) 、コリネバクテリウム属 ( C o r y n e b a c t e r i u m ) 、ミクロコックス属 ( M i c r o c o c c u s ) 、ミクソコックス属 ( M i x o c o c c u s ) 、ブレヴィバクテリウム属 ( B r e v i b a c t e r i u m ) 、ブラディリゾビウム属 ( B r a d y r h i z o b i u m ) 、ゴルドニア属 ( G o r d o n i a ) 、ディエトジア属 ( D i e t z i a ) 、ムリカウダ属 ( M u r i c a u d a ) 、スフィンゴモナス属 ( S p h i n g o m o n a s ) 、シノコキスティス属 ( S y n o c h o c y s t i s ) 、パラコックス属 ( P a r a c o c c u s ) 、サッカロミセス属 ( S a c c h a r o m y c e s ) 、アスペルギルス属 ( A s p e r g i l l u s ) 、ピキア属 ( P i c h i a ) 、ハンゼヌラ属 ( H a n s e n u l a ) 、フィコミセス属 ( P h y c o m y c e s ) 、ムコール属 ( M u c o r ) 、ロドトルラ属 ( R h o d o t o r u l a ) 、スポロボロミセス属 ( S p o r o b o l o m y c e s ) 、キサントフィロミセス属 ( X a n t h o p h y l l o m y c e s ) 、ファフィア属 ( P h a f f i a ) 、ブラケスレア属 ( B l a k e s l e a ) 及びヤロウイア属 ( Y a r r o w i a ) からなる群から、より好ましくは、ヤロウイア・リポリティカ ( Y a r r o w i a l i p o l y t i c a ) 又はサッカロミセス・セレビシエ ( S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e ) から選択される、上記の及び本明細書で定義されるカロテノイド産生宿主細胞、特に真菌宿主細胞。

30

40

【 0 0 4 9 】

- アシルトランスフェラーゼが植物、ヒトを含む動物、藻類、酵母を含む真菌、又は細菌から選択され、好ましくは、ドロソフィラ属 ( D r o s o p h i l a ) 、フザリウム属 ( F u s a r i u m ) 、ムコール属 ( M u c o r ) 、ヒト、ラット及びヤロウイア属 (

50

Yarrowia) からの群から選択される、上記の及び本明細書で定義されるカロテノイド産生宿主細胞、特に真菌宿主細胞。

【0050】

- アシルトランスフェラーゼが、ヤロウイア属 (Yarrowia) 又はドロソフィラ属 (Drosophila) から選択され、好ましくは、Y. リポリティカ (Y. lipolytica) 又は D. メラノガスター (D. melanogaster) から選択されるアシルトランスフェラーゼである、上記の及び本明細書で定義されるカロテノイド産生宿主細胞、特に真菌宿主細胞。

【0051】

- アシルトランスフェラーゼが、配列 XM\_502557、配列 NM\_135969 に従うか、又は配列番号 1 及び 2 に従うポリヌクレオチドによってコードされるアシルトランスフェラーゼに対して少なくとも約 60% の同一性を有するポリペプチドから選択される、上記の及び本明細書で定義されるカロテノイド産生宿主細胞、特に真菌宿主細胞。

【0052】

- 長鎖レチニルエステルを含むレチニルエステルがさらにビタミン A に変換される、上記の及び本明細書で定義されるカロテノイド産生宿主細胞、特に真菌宿主細胞。

【0053】

- アシルトランスフェラーゼ [EC 2.3.1] の酵素活性によって長鎖レチニルエステルを含むレチニルエステル混合物を生産するためのプロセスであって、レチノールを前記アシルトランスフェラーゼと接触させることを含み、混合物中のトランス - アイソフォームのシス - アイソフォームに対する比率が少なくとも約 4 である、プロセス。

【0054】

- アシルトランスフェラーゼの酵素作用から産生されるレチノイド混合物中のシス - アイソフォームの量を低減するためのプロセスであって、前記プロセスがレチノールをアシルトランスフェラーゼと接触させることを含み、前記酵素作用から得られるレチノイド混合物中のシス - レチニルエステルの量が、酵素との接触前のレチノイド混合物中の量と比較して少なくとも約 20% 低減される、プロセス。

【0055】

- アシルトランスフェラーゼの酵素作用から産生されるレチノイド混合物中のトランス - アイソフォームの量を増大させるためのプロセスであって、前記プロセスがレチノールをアシルトランスフェラーゼと接触させることを含み、前記酵素作用から得られるレチノイド混合物中のトランス - レチニルエステルの量が、酵素との接触前のレチノイド混合物中の量と比較して少なくとも約 20% 増大される、プロセス。

【0056】

- レチノールアシル化活性、好ましくはアシルトランスフェラーゼ [EC 2.3.1] 活性、より好ましくはアシルトランスフェラーゼ [EC 2.3.1.20] 活性を有する酵素を含むカロテノイド産生宿主細胞、特に真菌宿主細胞を用いる、上記に従う及び本明細書で定義されるプロセスであって、前記宿主細胞が、長鎖レチニルエステルを含むレチニルエステル混合物を生産し、混合物が、少なくとも約 20%、例えば 30、40、50、60、70、80、87、90、92、95、97、99 又は最大 100% までのトランス - アイソフォームのレチニルエステルを含む、プロセス。

【0057】

- (a) 本明細書で定義されるアシルトランスフェラーゼ [EC 2.3.1] をコードする核酸分子を適切なカロテン産生宿主細胞、特に真菌宿主細胞に導入するステップと、  
(b) レチノールを、少なくとも約 4 の比率のトランス - 及びシス - レチニルエステルを含む長鎖レチニルエステル混合物に酵素変換するステップと、  
(c) 適切な培養条件下でレチニルエステルをビタミン A に変換するステップとを含む、ビタミン A の生産プロセス。

【0058】

- 少なくとも約 4 の比率のトランス - 及びシス - レチニルエステルを含む長鎖レチニ

10

20

30

40

50

ルエステル混合物を産生するための、定義されるアシルトランスフェラーゼ [ E C 2 . 3 . 1 ] の使用であって、アシルトランスフェラーゼが適切なカロテノイド産生宿主細胞、特に真菌宿主細胞において異種発現される、使用。

【 0 0 5 9 】

以下の実施例は説明のためだけのものであって、本発明の範囲を限定することは全く意図されない。本出願全体を通して引用される全ての参考文献、特許出願、特許、及び公開特許出願、特に国際公開第 2 0 0 6 1 0 2 3 4 2 号パンフレット、国際公開第 2 0 0 8 0 4 2 3 3 8 号パンフレット又は国際公開第 2 0 1 4 0 9 6 9 9 2 号パンフレットの内容は、参照によって本明細書に援用される。

【 0 0 6 0 】

[ 実施例 ]

[ 実施例 1 : 一般的な方法、菌株、及びプラスミド ]

本明細書に記載される全ての基本的な分子生物学及び DNA 操作手順は、一般的に、Sambrook et al. (eds.), Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York (1989)、又は Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology. Wiley: New York (1998) に従って実施される。

【 0 0 6 1 】

[ 振とうプレートアッセイ ]

通常、800  $\mu$ l の 0 . 0 7 5 % 酵母抽出物、0 . 2 5 % ペプトン ( 0 . 2 5 X Y P ) に、10  $\mu$ l の新たに成長させたヤロウイア属 ( Yarrowia ) を播種し、200  $\mu$ l の Drakeol 5 鉱油でオーバーレイし、炭素源として鉱油中 5 % のコーン油及び / 又は水相中 5 % のグルコースを用いた。24 ウェルプレート ( Multitron、30、800 RPM ) において、形質転換体を YPD 培地中で 20 % のドデカンと共に 4 日間成長させた。鉱油画分を振とうプレートウェルから取り出し、フォトダイオードアレイ検出器を用いて、順相カラムで HPLC により分析した。

【 0 0 6 2 】

[ DNA 形質転換 ]

菌株を YPD プレート培地上で一晩成長させることにより形質転換させる。50  $\mu$ l の細胞をプレートからこすり取り、1  $\mu$ g の形質転換 DNA、通常は組込み形質転換のための直鎖 DNA、40 % の PEG 3550 MW、100 mM の酢酸リチウム、50 mM のジチオスレイトール、5 mM の Tris - Cl ( pH 8 . 0 )、0 . 5 mM の EDTA を含む 500  $\mu$ l 中、40 で 60 分間のインキュベーションにより形質転換させ、選択培地に直接プレーティングするか、或いは優性抗生物質マーカー選択の場合は、細胞を YPD 液体培地において 30 で 4 時間増殖させた後、選択培地にプレーティングする。

【 0 0 6 3 】

[ DNA 分子生物学 ]

pUC57 ベクターにおいて NheI 及び MluI 末端を用いて遺伝子を合成した。国際公開第 2 0 1 6 1 7 2 2 8 2 号パンフレットの場合のように、通常、ヤロウイア・リポリティカ ( Yarrowia lipolytica ) 形質転換におけるマーカー選択のために、遺伝子を MB5082 「URA3」、MB6157 HygR、及び MB8327 NatR ベクターにサブクローニングした。遺伝子及びマーカー HindIII / XbaI ( MB5082 ) 又は PvuII ( MB6157 及び MB8327 ) のランダム非相同末端結合によるクリーンな遺伝子挿入のために、それぞれゲル電気泳動及び QiaGen ゲル精製カラムにより精製した。

【 0 0 6 4 】

[ プラスミドのリスト ]

使用するプラスミド、菌株、及びコドン最適化配列は、表 1、2 及び配列表に記載される。ヤロウイア属 ( Yarrowia ) における発現に対してコドン最適化された配列番

10

20

30

40

50

号 1、2 を除いて、全ての配列は、データベースにおけるヌクレオチド ( n t ) としての受託配列と同じであった。

【 0 0 6 5 】

【 表 1 】

表1:ヤロウイア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)(*YIDGA1*)、配列XM\_502557及びドロソフィラ・メラノガスター(*Drosophila melanogaster*)(Dm Dgat1)、配列NM\_135969の異種アシルトランスフェラーゼ遺伝子を保有する菌株の構築のために使用されるプラスミドのリスト。さらなる詳細については本文を参照されたい。

MB プラスミド	骨格MB	挿入断片	配列番号 (コドン最適化)
8201	5082	DmDGA1	1
8299	5082	YIDGA1	2

10

【 0 0 6 6 】

【 表 2 】

表2:異種アシルトランスフェラーゼ遺伝子を保有する、レチノイドの産生のために使用されるヤロウイア属(*Yarrowia*)菌株のリスト。さらなる詳細については本文を参照されたい。

ML 菌株	記述	初めての記載
7788	カロテン菌株	国際公開第2016172282号 パンフレット
15710	MB7311-ムコール属( <i>Mucor</i> )CarGで形質転換されたML7788	国際公開第2016172282号 パンフレット
17544	FOAによりURA3、Cre/loxによりHygRが回復されたML15710	本明細書
17767	MB6072 DmBCO-URA3及びMB6732 SbATF1-HygRで形質転換され、マーカーが回復されたML17544	本明細書
17978	MB8200 FfRDH-URA3で形質転換され、マーカーが回復されたML17968	本明細書

20

30

【 0 0 6 7 】

[ 順相レチノール法 ]

W a t e r s 7 1 7 オートサンプラーに取り付けた W a t e r s 1 5 2 5 バイナリーポンプを用いて、サンプルを注入した。安全シリカガードカラムキットを有する P h e n o m e n e x L u n a 3 μ S i l i c a ( 2 ) , 1 5 0 × 4 . 6 m m を使用して、レチノイドを分離した。移動相は、アスタキサンチン関連化合物に対する 1 0 0 0 m L のヘキサン、3 0 m L のイソプロパノール、及び 0 . 1 m L の酢酸、又はゼアキサンチン関連化合物に対する 1 0 0 0 m L のヘキサン、6 0 m L のイソプロパノール、及び 0 . 1 m L の酢酸のいずれかからなる。それぞれの流速は、0 . 6 m L / 分である。カラム温度は周囲温度である。注入容積は 2 0 μ L である。検出器は、2 1 0 n m から 6 0 0 n m までを収集するフォトダイオードアレイ検出器である。表 3 に従って分析物を検出した。

40

【 0 0 6 8 】

50

## 【表 3】

表3:順相レチノール法を用いる分析物のリスト。さらなる詳細については本文を参照されたい

中間体	保持時間 [分]	ラムダ最大値 [nm]
11-シス-ジヒドロ-レチノール	7.1	293
11-シス-レチナール	4	364
11-シス-レチノール	8.6	318
13-シス-レチナール	4.1	364
ジヒドロ-レチノール	9.2	292
酢酸レチニル	3.5	326
レチニルエステル	3	325
トランス-レチナール	4.7	376
トランス-レチノール	10.5	325

10

20

## 【0069】

## [ サンプル調製 ]

条件に応じて種々の方法によりサンプルを調製した。全培養液又は洗浄培養液サンプルのために、培養液を秤量したPrecellys（登録商標）管に入れ、移動相を添加した。製造指示書に従って最高設定3XにおいてPrecellys（登録商標）ホモジナイザー（Bertin Corp, Rockville, MD, USA）内でサンプルを処理した。洗浄培養液中、サンプルを微量遠心管において10000rpmで1分間、1.7ml管内で回転させ、培養液をデカントし、1mlの水を添加し、混合し、ペレットにし、デカントして、元の容積にした。混合物を再度ペレットにし、適切な量の移動相中に入れ、Precellys（登録商標）ビーズベティングにより処理した。鉱油画分の分析のために、サンプルを4000RPMで10分間回転させ、ポジティブディスプレイメントピペット（Eppendorf, Hauppauge, NY, USA）により油を上部からデカントして除去し、移動相中に希釈し、ボルテックスにより混合し、HPLC分析によりレチノイド濃度を測定した。

30

## 【0070】

## [ 発酵条件 ]

発酵は既に記載された条件と同一であり、鉱油のオーバーレイと、0.5L~5Lの全容積のベンチトップ反応器内に供給されたコーン油である攪拌槽とを用いた（国際公開第2016172282号パンフレットを参照）。一般的に、生産性が増大された流加バッチ攪拌槽反応器を用いて同じ結果が観察され、レチノイドの生産のためのシステムの有用性が実証された。

40

## 【0071】

[ 実施例2：ヤロウイア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）におけるレチノイドの産生 ]

レチノール産生菌株ML17767を、URA3栄養マーカーに連結されたコドン最適

50

化アシルトランスフェラーゼ遺伝子を含有する精製 *H i n D I I I / X b a l* 遺伝子断片で形質転換し、ウラシルを含まない最小培地において選択した。複数の単離株を振とうプレートアッセイにおいてレチノールのアシル化の増大及び残留レチノールの低減についてスクリーニングした。成功した単離株を流加バッチ攪拌槽反応器において実行させ、レチノールエステルの産生の増大のための方法の有用性が示された。実験の結果は以下に示され、真菌産生系においてレチノールアシル化活性が増大された遺伝子が単離されたことを示した。

【 0 0 7 2 】

【表 4】

表4:異種アシルトランスフェラーゼ酵素の作用により増強されたヤロウイア属(*Yarrowia*)におけるレチノイドの産生。「エステル%」は、レチノイド混合物中の長鎖レチニルエステルの割合を意味する。さらなる詳細については本文を参照されたい。

生物	受託番号	エステル増大%	ML菌株	MBプラスミド	配列番号(aa/nt)
D.メラノガスター ( <i>D.melanogaster</i> )	NM_135969	14%	17767	8299	3/4
Y.リポリティカ ( <i>Y.lipolytica</i> )	XM_502557	20%	17767	8201	5/6
Y.リポリティカ ( <i>Y.lipolytica</i> )	XM_504038	0	17767	8195	7/8
F.オキシスポラム ( <i>F.oxysporum</i> )	EXK27040	10%	17767	8200	9/10

【 0 0 7 3 】

[ 実施例 3 : サッカロミケス・セレビシエ (*S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e*) におけるレチノイドの産生 ]

通常、ベータカロテン菌株は、当該技術分野において知られている（例えば、米国特許出願公開第 2 0 1 6 0 1 3 0 6 2 8 号明細書又は国際公開第 2 0 0 9 1 2 6 8 9 0 号パンフレットに記載される）ような標準的方法に従って、ベータカロテンを産生している構築されたグラニルグラニルシンターゼ、フィトエンシンターゼ、リコペンシンターゼ、リコペンシクラーゼなどの酵素をコードする異種遺伝子で形質転換される。本明細書で定義されるアシルトランスフェラーゼ酵素を導入すること、及び/又は過剰発現させることにより、長鎖レチニルエステルの産生に関して同様の結果が得られる。さらに、ベータカロテンオキシダーゼ遺伝子で形質転換される場合、レチナールを産生することができる。さらに、レチノールデヒドロゲナーゼで形質転換されると、レチノールを産生することができる。このアプローチを用いて、長鎖レチニルエステルに対する生産性に関して同様の結果

【配列表】

0007298812000001.app

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	1/13 (2006.01)	C 1 2 N	1/13
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10

(72)発明者 パルチ, ナタリー

スイス, 4 3 0 3 カイザーアウークシュト, ヴルミスヴェク 5 7 6, ケアオブ ディーエス  
エム ニュートリショナル プロダクツ リミテッド, パテント デパートメント

(72)発明者 ブロムクィスト, ポール

スイス, 4 3 0 3 カイザーアウークシュト, ヴルミスヴェク 5 7 6, ケアオブ ディーエス  
エム ニュートリショナル プロダクツ リミテッド, パテント デパートメント

(72)発明者 ドーテン, リード

スイス, 4 3 0 3 カイザーアウークシュト, ヴルミスヴェク 5 7 6, ケアオブ ディーエス  
エム ニュートリショナル プロダクツ リミテッド, パテント デパートメント

(72)発明者 ヒューストン, ピーター

スイス, 4 3 0 3 カイザーアウークシュト, ヴルミスヴェク 5 7 6, ケアオブ ディーエス  
エム ニュートリショナル プロダクツ リミテッド, パテント デパートメント

(72)発明者 ラム, イーサン

スイス, 4 3 0 3 カイザーアウークシュト, ヴルミスヴェク 5 7 6, ケアオブ ディーエス  
エム ニュートリショナル プロダクツ リミテッド, パテント デパートメント

(72)発明者 マクマホン, ジェナ

スイス, 4 3 0 3 カイザーアウークシュト, ヴルミスヴェク 5 7 6, ケアオブ ディーエス  
エム ニュートリショナル プロダクツ リミテッド, パテント デパートメント

(72)発明者 トゥルーハート, ジョシュア

スイス, 4 3 0 3 カイザーアウークシュト, ヴルミスヴェク 5 7 6, ケアオブ ディーエス  
エム ニュートリショナル プロダクツ リミテッド, パテント デパートメント

(72)発明者 ヴィアルージュ, セリーヌ

スイス, 4 3 0 3 カイザーアウークシュト, ヴルミスヴェク 5 7 6, ケアオブ ディーエス  
エム ニュートリショナル プロダクツ リミテッド, パテント デパートメント

審査官 吉門 沙央里

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 0 3 9 2 9 9 ( U S , A 1 )

特表 2 0 0 3 - 5 1 8 3 8 2 ( J P , A )

A. Ruiz, et al., The Journal of Biological Chemistry, 1999年, Vol.274, No.6, p.3834-3841

R. Schreiber, et al., Biochimica et Biophysica Acta, 2012年, 1821, p.113-123

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8

C 1 2 P 1 / 0 0 - 4 1 / 0 0

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )