

【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12月25日(2014.12.25)

【公表番号】特表2014-503216(P2014-503216A)

【公表日】平成26年2月13日(2014.2.13)

【年通号数】公開・登録公報2014-008

【出願番号】特願2013-547474(P2013-547474)

【国際特許分類】

C 12 N 1/19 (2006.01)

C 12 N 15/09 (2006.01)

C 12 P 1/02 (2006.01)

【F I】

C 12 N 1/19  
C 12 N 15/00 Z N A A  
C 12 P 1/02 Z

【手続補正書】

【提出日】平成26年11月6日(2014.11.6)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0235

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0235】

多くのタンパク質が、m - S c S U C 2 (配列番号4)と有意な類似性を共有するとして同定された。表14に、期待値が「4e - 90」以上で、「インベルターゼ」または「ベータ - フルクトフラノシダーゼ」のいずれかとして具体的にタンパク質を同定したアノテーションを有するヒットの部分的な要約を示す。ただし、これは本明細書の開示を限定するものと見なすべきではない。サッカロミセス・セレビシア (S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e)に対するヒットはすべて、以下に報告の結果から除外した。表14のタンパク質は、配列番号4と91% ~ 99%の間のクエリーカバレッジ (query coverage)を共有した。

## 【表 15】

表 14. インペルターゼをコードする公的に入手可能な遺伝子の一部

受託番号	説明	クエリー カバレッジ	E 値
BAJ07830.1, BAJ07833.1, BAJ07829.1	インペルターゼ[ サッカロミセス・パラドキサス ( <i>Saccharomyces paradoxus</i> )]	99%	0.0
CBK52121.1	インペルターゼ[ サッカロミセス・バヤヌス( <i>Saccharomyces bayanus</i> )]	99%	0.0
AAX82487.1	ベータフルクトシダーゼ[ サッカロミセス・カリオカヌス ( <i>Saccharomyces cariocanus</i> )]	96%	0.0
XP_461505.2	ベータフルクトフラノシダーゼ[ デバリオミセス・ハンセンii ( <i>Debaryomyces hansenii</i> ) CBS767]	98%	5e-174
XP_451456.1	インペルターゼ[クリベロミセス・ラクチス( <i>Kluyveromyces lactis</i> ) NRRL Y-1140]	98%	1e-172
P24133.1	インペルターゼ[シャフニオミセス・オクシデンタリス ( <i>Schwanniomyces occidentalis</i> )]	98%	2e-151
P40912.1	インペルターゼ[ウィケルハモミセス・アノマルス ( <i>Wickerhamomyces anomalus</i> )]	98%	6e-150
XP_002175417.1	インペルターゼ[シゾサッカロミセス・ジャポニカス ( <i>Schizosaccharomyces japonicus</i> ) yFS275]	98%	3e-108
XP_003196854.1	ベータフルクトフラノシダーゼ[クリプトコックス・ガッティ ( <i>Cryptococcus gattii</i> ) WM276]	92%	1e-107
XP_567775.1	ベータ-フルクトフラノシダーゼ[クリプトコックス・ネオフォル マンス( <i>Cryptococcus neoformans</i> )変種ネオフォルマンス ( <i>neoformans</i> ) JEC21]	92%	6e-106
EFZ01512.1	ベータ-フルクトフラノシダーゼ[メタリジウム・アニソブリエ ( <i>Metarhizium anisopliae</i> ) ARSEF 23]	92%	2e-104
NP_588300.1	ベータ-フルクトフラノシダーゼ[シゾサッカロミセス・ ポンベ( <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ) 972h-]	94%	2e-104
CBQ72191.1	可能性が高い SUC2 インペルターゼ(スクロース加水分解 酵素) [ソロスボリウム・レイリアヌム( <i>Sporisorium reilianum</i> ) SRZ2]	96%	5e-104
EGX95794.1	ベータ-フルクトフラノシダーゼ[コルディセプス・ミリタリス ( <i>Cordyceps militaris</i> ) CM01]	95%	2e-103
XP_001823245.1, ABY49829.1	ベータ-フルクトフラノシダーゼ[アスペルギルス・オリゼ ( <i>Aspergillus oryzae</i> ) RIB40]	92%	3e-95
YP_001603959.1	インペルターゼ[グルコンアセトバクター・ジアゾトロフィクス ( <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> ) PAI 5]	91%	1e-91
XP_001265685.1	ベータ-フルクトフラノシダーゼ、推定上の[ネオサルトリア・ フィッシャリ( <i>Neosartorya fischeri</i> ) NRRL 181]	92%	2e-91
XP_001273181.1	ベータ-フルクトフラノシダーゼ、推定上の[アスペルギルス・ クラバタス ( <i>Aspergillus clavatus</i> ) NRRL 1]	92%	2e-90
XP_749260.1, EDP53788.1	ベータ-フルクトフラノシダーゼ [アスペルギルス・フミガ ツス( <i>Aspergillus fumigatus</i> )]	92%	4e-90

## 【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 2 3 6

【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0236】

以上、本発明を要約すると下記のとおりである。

1. スクロースインベルターゼ活性を有するポリペプチドをコードする外因性ポリヌクレオチドを含む、形質転換ヤロウィア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) であって、

(a) 上記ポリペプチドが、成熟スクリースインベルターゼをコードするポリペプチド配列に融合したシグナル配列を含み；かつ

(b) 該シグナル配列が、

(i) Xpr2プレ／プロ領域およびN末端Xpr2断片；および

(ii) スクリースインベルターゼシグナル配列の2番目のアミノ酸が任意の疎水性アミノ酸であってよい、スクリースインベルターゼシグナル配列；からなる群から選択され；かつ

(c) 成熟スクリースインベルターゼをコードする上記ポリペプチド配列が、配列番号4と比較すると、CLUSTALWアライメント法に基づいて少なくとも80%の配列同一性を有する、

上記形質転換ヤロウィア・リポリティカ。

2. スクリースインベルターゼシグナル配列の前記2番目のアミノ酸が、ロイシン、フェニルアラニン、イソロイシン、バリン、およびメチオニンからなる群から選択される、上記1に記載の形質転換ヤロウィア・リポリティカ。

3. 成熟スクリースインベルターゼをコードする前記ポリペプチド配列が配列番号4で示される、上記1に記載の形質転換ヤロウィア・リポリティカ。

4. 前記Xpr2プレ／プロ領域およびN末端Xpr2断片が、ヤロウィア・リポリティカに由来し、かつ前記スクリースインベルターゼシグナル配列が、サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) に由来する、上記1に記載の形質転換ヤロウィア・リポリティカ。

5. 前記Xpr2プレ／プロ領域およびN末端Xpr2断片が、

(a) アルカリ細胞外プロテアーゼ前駆体のN末端157個のアミノ酸を含むXpr2プレ／プロ領域；および

(b) 成熟アルカリ細胞外プロテアーゼのN末端13個のアミノ酸を含むN末端Xpr2断片

を含む、上記4に記載の形質転換ヤロウィア・リポリティカ。

6. 前記Xpr2プレ／プロ領域およびN末端Xpr2断片が配列番号10で示される、上記5に記載の形質転換ヤロウィア・リポリティカ。

7. 前記スクリースインベルターゼシグナル配列が配列番号8で示される、上記4に記載の形質転換ヤロウィア・リポリティカ。

8. スクリースインベルターゼコード配列に融合したシグナル配列を含む前記ポリペプチドが、配列番号12および配列番号20からなる群から選択される、上記1に記載の形質転換ヤロウィア・リポリティカ。

9. 前記形質転換ヤロウィア・リポリティカが、スクリースを唯一の炭素源とする条件下で増殖することができる、上記1に記載の形質転換ヤロウィア・リポリティカ。

10. 前記形質転換ヤロウィア・リポリティカが、少なくとも1つの目的の非天然生成物を产生することができる、上記1に記載の形質転換ヤロウィア・リポリティカ。

11. 前記少なくとも1つの目的の非天然生成物が、多価不飽和脂肪酸、カロテノイド、アミノ酸、ビタミン、ステロール、フラボノイド、有機酸、ポリオールおよびヒドロキシエステル、キノン誘導化合物、ならびにレスベラトロールからなる群から選択される、上記10に記載の形質転換ヤロウィア・リポリティカ。

12. 前記形質転換ヤロウィア・リポリティカが、少なくとも80%のスクリースインベルターゼを細胞外に分泌することができ、炭素源として少なくともスクリースを含有する培地中で増殖する、上記1または10に記載の形質転換ヤロウィア・リポリティカ。

13. 少なくとも 1 つの非天然生成物を生産する方法であって、

a) スクロース；および

b) グルコース；

からなる群から選択される少なくとも 1 つの炭素源を含有する培地中で請求項 10 に記載の形質転換ヤロウイア・リポリティカを増殖させ、それによって、少なくとも 1 つの目的の非天然生成物を產生させるステップ、および場合によっては、少なくとも 1 つの目的の非天然生成物を回収するステップ、を含む上記方法。

14. 前記少なくとも 1 つの目的の非天然生成物が、多価不飽和脂肪酸、カロテノイド、アミノ酸、ビタミン、ステロール、フラボノイド、有機酸、ポリオールおよびヒドロキシエステル、キノン誘導化合物、ならびにレスベラトロールからなる群から選択される、上記 13 に記載の方法。

15. 前記形質転換ヤロウイア・リポリティカが、少なくとも 80% のスクロースインベルターゼを細胞外に分泌することができる、上記 13 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】

スクロースインベルターゼ活性を有するポリペプチドをコードする外因性ポリヌクレオチドを含む、形質転換ヤロウイア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) であって、

(a) 上記ポリペプチドが、成熟スクロースインベルターゼをコードするポリペプチド配列に融合したシグナル配列を含み；かつ

(b) 該シグナル配列が、

(i) X pr 2 プレ / プロ領域および N 末端 X pr 2 断片；および

(ii) スクロースインベルターゼシグナル配列の 2 番目のアミノ酸が任意の疎水性アミノ酸であってよい、スクロースインベルターゼシグナル配列；

からなる群から選択され；かつ

(c) 成熟スクロースインベルターゼをコードする上記ポリペプチド配列が、配列番号 4 と比較すると、CLUSTALWアライメント法に基づいて少なくとも 80% の配列同一性を有する。

上記形質転換ヤロウイア・リポリティカ。

### 【請求項 2】

少なくとも 1 つの非天然生成物を生産する方法であって、

a) スクロース；および

b) グルコース；

からなる群から選択される少なくとも 1 つの炭素源を含有する培地中で請求項 10 に記載の形質転換ヤロウイア・リポリティカを増殖させ、それによって、少なくとも 1 つの目的の非天然生成物を產生させるステップ、および場合によっては、少なくとも 1 つの目的の非天然生成物を回収するステップ、を含む上記方法。