

【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 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 P 1/02 (2006.01)

【 F I 】

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 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】0 2 3 5
 【補正方法】変更
 【補正の内容】
 【 0 2 3 5 】

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
 て同定された。表 1 4 に、期待値が「 4 e - 9 0 」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 1 4 のタンパク質は、配列番号 4 と 9 1 % ~ 9 9 % の間のクエリーカバレッジ (q u
 e r y c o v e r a g e) を共有した。

【表 15】

表 14. インベ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	インベルターゼ[サッカロミセス・パラドキサス (<i>Saccharomyces paradoxus</i>)]	99%	0.0
CBK52121.1	インベルターゼ[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・ハンセニイ (<i>Debaryomyces hansenii</i>) CBS767]	98%	5e-174
XP_451456.1	インベルターゼ[クリベロミセス・ラクチス(<i>Kluyveromyces lactis</i>) NRRL Y-1140]	98%	1e-172
P24133.1	インベルターゼ[シャワニオミセス・オクシデンタリス (<i>Schwanniomyces occidentalis</i>)]	98%	2e-151
P40912.1	インベルターゼ[ウィケルハモミセス・アノマルス (<i>Wickerhamomyces anomalus</i>)]	98%	6e-150
XP_002175417.1	インベルターゼ[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 マンズ(<i>Cryptococcus neoformans</i>) 変種ネオフォルマンズ (<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・アニソプリエ (<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 インベルターゼ(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	インベルターゼ[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・ フィツシェリ(<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・フミガー 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】0236

【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) Xpr2 プレ/プロ領域およびN末端Xpr2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ィア・リポリティカ。

2．スクロ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．成熟スクロ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、かつ前記スクロ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．前記スクロ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．スクロ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、スクロ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産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%のスクロ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ロ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ィア・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産生させるステップ、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ィア・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) Xpr2 プレ/プロ領域およびN末端Xpr2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ィア・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ィア・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産生させるステップ、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。