

【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20年10月2日(2008.10.2)

【公表番号】特表2008-520193(P2008-520193A)

【公表日】平成20年6月19日(2008.6.19)

【年通号数】公開・登録公報2008-024

【出願番号】特願2007-540127(P2007-540127)

【国際特許分類】

C 1 2 N	1/19	(2006.01)
C 1 2 N	1/15	(2006.01)
C 1 2 N	1/21	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
C 1 2 P	7/64	(2006.01)
A 2 3 L	1/30	(2006.01)
C 1 2 N	15/09	(2006.01)
A 2 3 D	9/007	(2006.01)
A 2 3 C	9/152	(2006.01)
C 1 1 C	3/00	(2006.01)
A 6 1 K	31/202	(2006.01)
A 2 3 K	1/16	(2006.01)
A 2 3 K	1/18	(2006.01)
A 6 1 K	36/06	(2006.01)
A 6 1 P	25/28	(2006.01)
A 6 1 P	25/32	(2006.01)
A 6 1 P	25/24	(2006.01)
A 6 1 P	25/20	(2006.01)
A 6 1 P	3/00	(2006.01)
A 6 1 P	11/00	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	1/19	Z N A
C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/00	A
C 1 2 P	7/64	
A 2 3 L	1/30	Z
C 1 2 N	15/00	A
A 2 3 D	9/00	5 1 6
A 2 3 C	9/152	
C 1 1 C	3/00	
A 6 1 K	31/202	
A 2 3 K	1/16	3 0 4 B
A 2 3 K	1/16	3 0 1 F
A 2 3 K	1/18	A
A 2 3 K	1/18	1 0 2 B
A 2 3 K	1/18	1 0 2 A
A 2 3 K	1/18	D
A 6 1 K	35/72	
A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	25/32	

A 6 1 P 25/24  
 A 6 1 P 25/20  
 A 6 1 P 3/00  
 A 6 1 P 11/00

【手続補正書】

【提出日】平成20年8月8日(2008.8.8)

【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) 6 デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、
- b) C<sub>18/20</sub> エロンガーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、
- c) 5 デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、
- d) 17 デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子
- e) C<sub>20/22</sub> エロンガーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、および
- f) 4 デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子。

の - 3 / - 6 脂肪酸生合成経路遺伝子を含んでなる遺伝子プールを含んでなる、背景ヤロウシア (Yarrowia) 種を含んでなるドコサヘキサエン酸生成のための組換え生産宿主細胞。

【請求項 2】

- a) 15 デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、
- b) 6 デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、
- c) C<sub>18/20</sub> エロンガーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、
- d) 5 デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子
- e) C<sub>20/22</sub> エロンガーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、および
- f) 4 デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子。

の - 3 / - 6 脂肪酸生合成経路遺伝子を含んでなる遺伝子プールを含んでなる、背景ヤロウシア (Yarrowia) 種を含んでなるドコサヘキサエン酸生成のための組換え生産宿主細胞。

【請求項 3】

- a) 9 エロンガーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、
- b) 8 デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、
- c) 5 デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、
- d) 17 デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子
- e) C<sub>20/22</sub> エロンガーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、および
- f) 4 デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子。

の - 3 / - 6 脂肪酸生合成経路遺伝子を含んでなる遺伝子プールを含んでなる、背景ヤロウシア (Yarrowia) 種を含んでなるドコサヘキサエン酸生成のための組換え生産宿主細胞。

【請求項 4】

- a) 15 デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、
- b) 9 エロンガーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、
- c) 8 デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、
- d) 5 デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子
- e) C<sub>20/22</sub> エロンガーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、および
- f) 4 デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子。

の - 3 / - 6 脂肪酸生合成経路遺伝子を含んでなる遺伝子プールを含んでなる、背景ヤロウシア (Yarrowia) 種を含んでなるドコサヘキサエン酸生成のための組換え生産宿主細胞。

【請求項 5】

- a) 6 デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、
- b)  $C_{18/20}$  エロンガーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、
- c) 5 デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、
- d) 17 デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、
- e)  $C_{20/22}$  エロンガーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、
- f) 4 デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、
- g)  $C_{16/18}$  エロンガーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、および、
- h) 12 デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子

の - 3 / - 6 脂肪酸生合成経路の遺伝子を含んでなる遺伝子プールを含んでなる、背景ヤロウシア (Yarrowia) 種を含んでなる、ドコサヘキサエン酸生産のための組換え生産宿主細胞であって、

背景ヤロウシア (Yarrowia) 種が、オロチジン - 5' - リン酸デカルボキシラーゼ (Ura3)、イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ (Leu2)、アシル - CoA オキシダーゼ (Pox3)、アシル - CoA オキシダーゼ (Pox2)、12 デサチュラーゼ、およびリパーゼ 1 (Lip1) よりなる群から選択される酵素をコードするあらゆる天然遺伝子を欠いている組換え生産宿主細胞。

【請求項 6】

a) i. 6 デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、および  $C_{18/20}$  エロンガーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、および 5 デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、および 17 デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、および  $C_{20/22}$  エロンガーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、および 4 デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、

ii. 9 エロンガーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、および 8 デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、および 5 デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、および 17 デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、および  $C_{20/22}$  エロンガーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、および 4 デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、

iii. 15 デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、6 デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、および  $C_{18/20}$  エロンガーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、および 5 デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、および  $C_{20/22}$  エロンガーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、および 4 デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、

iv. 15 デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、9 エロンガーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、および 8 デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、および 5 デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、および  $C_{20/22}$  エロンガーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、および 4 デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子

よりなる群から選択される少なくとも 1 組の遺伝子、および

- b) i. 12 デサチュラーゼ、
- ii. 9 デサチュラーゼ、
- iii.  $C_{14/16}$  エロンガーゼ、
- iv.  $C_{16/18}$  エロンガーゼ

よりなる群から選択される酵素をコードする少なくとも 1 つの遺伝子、および

c) (i) DGAT1、DGAT2、および PDAT よりなる群から選択されるジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ、

(ii) アシル - CoA : 1 - アシルリゾホスファチジルコリンアシルトランスフェラ

ーゼ ( L P C A T )、

( i i i ) グリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼ ( G P A T )、

( i v ) リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ ( L P A A T )、

( v ) ホスホリパーゼ C、および

( v i ) ホスホリパーゼ A<sub>2</sub>

よりなる群から選択される酵素をコードする少なくとも 1 つの遺伝子

の - 3 / - 6 脂肪酸生合成経路の遺伝子を含んでなる遺伝子プールを含んでなる、背景ヤロウシア ( Y a r r o w i a ) 種を含んでなる、ドコサヘキサエン酸生成のための組換え生産宿主細胞であって、

( 1 ) 背景ヤロウシア ( Y a r r o w i a ) 種が、 1 2 デサチュラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするあらゆる天然遺伝子を欠いており、

( 2 ) 背景ヤロウシア ( Y a r r o w i a ) 種が、リパーゼ 1 ( L i p 1 - )、ペルオキシソームアシル C o A オキシダーゼ A C O 3 ( P o x 3 - )、アシル - C o A オキシダーゼ 2 ( P o x 2 - )、オロチジン - 5 ' - リン酸デカルボキシラーゼ ( U r a 3 - )、サッカロピンデヒドロゲナーゼ ( L y s 5 - )、リパーゼ 2 ( L i p 2 - )、およびイソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ ( L e u 2 - ) よりなる群から選択される酵素をコードするあらゆる天然遺伝子を欠いている組換え生産宿主細胞。

【請求項 7】

a ) 請求項 1、2、3、または 4 のいずれか一項に記載の生産宿主を培養して、ドコサヘキサエン酸を含んでなる微生物油が生成され、

b ) 場合によりステップ ( a ) の微生物油を回収すること  
を含んでなるドコサヘキサエン酸を含んでなる微生物油の生成方法。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の方法によって生成される微生物油。

【請求項 9】

請求項 7 に記載の方法によって生成される有効量の微生物油を含んでなる食品。

【請求項 10】

請求項 7 に記載の方法によって生成される有効量の微生物油を含んでなる、メディカルフード、栄養補助食品、乳児用調製粉乳、および医薬品よりなる群から選択される製品。

【請求項 11】

請求項 7 に記載の方法によって生成される有効量の微生物油を含んでなる動物飼料。

【請求項 12】

有効量の微生物油を含んでなり、場合により請求項 1、2、3 または 4 のいずれか一項に記載の組換え宿主を含んでなる酵母バイオマスを含んでなる動物飼料。

【請求項 13】

請求項 7 に記載の方法によって生成される微生物油と食品とを組み合わせることを含んでなるドコサヘキサエン酸で栄養強化された食品の製造方法。

【請求項 14】

メディカルフード、栄養補助食品、乳児用調製粉乳、および医薬品よりなる群から選択される製品の製造方法であって、請求項 7 に記載の方法によって生成される微生物油と製品とを組み合わせることを含んでなるドコサヘキサエン酸で製品が栄養強化される方法。

【請求項 15】

請求項 7 に記載の方法によって生成される微生物油と動物飼料とを組み合わせることを含んでなるドコサヘキサエン酸で栄養強化された動物飼料の製造方法。

【請求項 16】

請求項 1 2 に記載の動物飼料と飼料栄養素を含んでなる酵母バイオマスとを組み合わせることを含んでなるドコサヘキサエン酸を含んでなる動物飼料を飼料栄養素で栄養強化する方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】 0775

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【0775】

ここで報告された結果に基づいて、天然 D G A T 2 および / または D G A T 1 および / または P D A T の中断は、D H A をはじめとする高濃度の P U F A を生成するように遺伝子操作されたヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 株において (例えば Y 3 0 0 0 株内で)、% P U F A を実質的に増大させる有用な手段であることが考察される。事実、Y・リポリティカ (*lipolytica*) 株 Y 2 2 1 4 (9 エロンガーゼ / 8 デサチュラーゼ経路を通じて、14 % の A R A を生成し、野生型 Y・リポリティカ (*lipolytica*) A T C C # 2 0 3 6 2 に対する最終遺伝子型は、A c o 2 -、L y s 5 -、2 X G P A T : : I g D 9 e : : P E X 2 0、2 X T E F : : I g D 9 e : : L I P 1、F B A I N m : : I g D 9 e : : O C T、2 X F B A I N : : D 8 S F : : P E X 1 6、G P D : : D 8 S F : : P E X 1 6、G P A T : : M A 5 : : P E X 2 0、F B A I N : : M A 5 : : P E X 2 0、Y A T 1 : : I . D 5 S : : L I P 1、G P M / F B A I N : : I . D 5 S : : O C T、F B A I N : : F . D 1 2 S : : P E X 2 0、および G P M / F B A I N : : r E L O 2 S : : O C T) 中の天然 D G A T 2 遺伝子の中断は、パーセント A R A の 1 . 7 倍の増大をもたらす (データ示さず)。本発明の主な特徴または態様を次に記載する。態様 1 . a ) 6 デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、

b ) C<sub>18/20</sub> エロンガーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、

c ) 5 デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、

d ) 17 デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子

e ) C<sub>20/22</sub> エロンガーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、および

f ) 4 デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子。

の - 3 / - 6 脂肪酸生合成経路遺伝子を含んでなる遺伝子プールを含んでなる、背景ヤロウィア (*Yarrowia*) 種を含んでなるドコサヘキサエン酸生成のための組換え生産宿主細胞。

態様 2 . a ) 15 デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、

b ) 6 デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、

c ) C<sub>18/20</sub> エロンガーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、

d ) 5 デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子

e ) C<sub>20/22</sub> エロンガーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、および

f ) 4 デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子。

の - 3 / - 6 脂肪酸生合成経路遺伝子を含んでなる遺伝子プールを含んでなる、背景ヤロウィア (*Yarrowia*) 種を含んでなるドコサヘキサエン酸生成のための組換え生産宿主細胞。

態様 3 . a ) 9 エロンガーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、

b ) 8 デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、

c ) 5 デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、

d ) 17 デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子

e ) C<sub>20/22</sub> エロンガーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、および

f ) 4 デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子。

の - 3 / - 6 脂肪酸生合成経路遺伝子を含んでなる遺伝子プールを含んでなる、背景ヤロウィア (*Yarrowia*) 種を含んでなるドコサヘキサエン酸生成のための組換え生産宿主細胞。

態様 4 . a ) 15 デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、

b ) 9 エロンガーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、

c ) 8 デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、

d ) 5 デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子

e)  $C_{20/22}$  エロンガーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、および

f) 4 デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子。

の - 3 / - 6 脂肪酸合成経路遺伝子を含んでなる遺伝子プールを含んでなる、背景ヤロウシア (Yarrowia) 種を含んでなるドコサヘキサエン酸生成のための組換え生産宿主細胞。

態様5. 遺伝子プールが、場合により 1 2 デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子を含んでなる態様1、2、3または4のいずれか一項に記載の組換え生産宿主細胞。

態様6. 背景ヤロウシア (Yarrowia) 種が、1 2 デサチュラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするあらゆる天然遺伝子を欠いている態様5に記載の組換え生産宿主細胞。

態様7. 前記 - 3 / - 6 脂肪酸合成経路遺伝子の少なくとも1つが、配列番号 210 ~ 221 よりなる群から選択される核酸配列を有するプロモーター配列の制御下にある態様1、2、3または4のいずれか一項に記載の組換え生産宿主細胞。

態様8. 前記 1 2 デサチュラーゼが、配列番号 29、31、33、35、36、37、39、41、43、45、46、48 ~ 50 よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有する態様5に記載の組換え生産宿主細胞。

態様9. 前記 6 デサチュラーゼが配列番号 2 および 5 よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、前記  $C_{18/20}$  エロンガーゼが配列番号 23 および 26 よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有する態様1または2のどちらかに記載の組換え生産宿主細胞。

態様10. 前記 9 エロンガーゼが配列番号 70 および 23 よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、前記 8 デサチュラーゼが配列番号 78、80、および 82 よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有する態様3または4のどちらかに記載の組換え生産宿主細胞。

態様11. 前記 5 デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子が、酵素基質として、

a) リノレン酸およびジホモ - リノレン酸、

b) - リノレン酸およびエイコサテトラエン酸、および

c) リノレン酸、ジホモ - リノレン酸、 - リノレン酸、およびエイコサテトラエン酸よりなる群から選択される少なくとも2つの脂肪酸を結合する二機能 5 / 6 デサチュラーゼポリペプチドをコードする態様1、2、3または4のいずれか一項に記載の組換え生産宿主細胞。

態様12. 前記二機能 5 / 6 デサチュラーゼポリペプチドが、配列番号 15 および 18 よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有する態様11に記載の組換え生産宿主細胞。

態様13. 前記 5 デサチュラーゼが、配列番号 7、9、12、15、および 18 よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、前記  $C_{20/22}$  エロンガーゼが配列番号 101 および 103 よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、前記 4 デサチュラーゼが配列番号 105 および 107 よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、態様1、2、3、または4のいずれか一項に記載の組換え生産宿主細胞。

態様14. 前記 1 7 デサチュラーゼが、配列番号 20 に記載のアミノ酸配列を有する態様1または3のどちらかに記載の組換え生産宿主細胞。

態様15. 遺伝子プールが、場合により 1 5 デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子を含んでなる態様1または3のどちらかに記載の組換え生産宿主細胞。

態様16. 前記 1 5 デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子が、酵素基質としてオレイン酸およびリノール酸の双方を結合する二機能 15 / 12 デサチュラーゼポリペプチドをコードする態様2または4のいずれかに記載の組換え生産宿主細胞。

態様17. 前記二機能 15 / 12 デサチュラーゼポリペプチドが、配列番号 52 に記載のアミノ酸配列を有する態様16に記載の組換え生産宿主細胞。

態様18. 前記 1 5 デサチュラーゼが、配列番号 52、54、56、58、60、62、および 64 ~ 68 よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有する態様2また

は4のいずれかに記載の組換え生産宿主。

態様19. 遺伝子プールが、場合により

- a) 9デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、
- b)  $C_{16/18}$ エロンガーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、および
- c)  $C_{14/16}$ エロンガーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子

よりなる群から選択される - 3 / - 6 脂肪酸生合成経路遺伝子を含んでなる態様1、2、3または4のいずれか一項に記載の組換え生産宿主。

態様20. 前記  $C_{16/18}$ エロンガーゼが配列番号84、87、および95よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、前記  $C_{14/16}$ エロンガーゼが配列番号98に記載のアミノ酸配列を有する態様19に記載の組換え生産宿主。

態様21. 遺伝子プールが、場合により

- a) ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ (DGAT1)、
- b) ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ (DGAT2)、
- c) リン脂質：ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ (PDAT)、
- d) アシル - CoA：1 - アシルリゾホスファチジルコリンアシルトランスフェラーゼ (LPCAT)、
- e) グリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼ (GPAT)、および
- f) リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ (LPAAT)

よりなる群から選択されるアシルトランスフェラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子を含んでなる態様1、2、3または4のいずれか一項に記載の組換え生産宿主。

態様22. 前記ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ (DGAT1) が配列番号123、および125 ~ 129よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、前記ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ (DGAT2) が配列番号131、133、135、および137よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、前記リン脂質：ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ (PDAT) が配列番号118に記載のアミノ酸配列を有し、前記グリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼ (GPAT) が配列番号139に記載のアミノ酸配列を有し、前記リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ (LPAAT) が配列番号109、113、および116よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、前記アシル - CoA：1 - アシルリゾホスファチジルコリンアシルトランスフェラーゼ (LPCAT) が配列番号121に記載のアミノ酸配列を有する態様21に記載の組換え生産宿主。

態様23. a) 6デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、

- b)  $C_{18/20}$ エロンガーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、
- c) 5デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、
- d) 17デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、
- e)  $C_{20/22}$ エロンガーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、
- f) 4デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、
- g)  $C_{16/18}$ エロンガーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、および、
- h) 12デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子

の - 3 / - 6 脂肪酸生合成経路の遺伝子を含んでなる遺伝子プールを含んでなる、背景ヤロウシア (Yarrowia) 種を含んでなる、ドコサヘキサエン酸生産のための組換え生産宿主細胞であって、

背景ヤロウシア (Yarrowia) 種が、オロチジン - 5' - リン酸デカルボキシラーゼ (Ura3)、イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ (Leu2)、アシル - CoAオキシダーゼ (Pox3)、アシル - CoAオキシダーゼ (Pox2)、12デサチュラーゼ、およびリパーゼ1 (Lip1) よりなる群から選択される酵素をコードするあらゆる天然遺伝子を欠いている組換え生産宿主細胞。

態様24. a) i. 6デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、および  $C_{18/20}$ エロンガーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、および 5デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、および 17デサチュラーゼをコードする少なく

とも1つの遺伝子、および  $C_{20/22}$  エロンガーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、および 4 デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、

i i . 9 エロンガーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、および 8 デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、および 5 デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、および 17 デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、および  $C_{20/22}$  エロンガーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、および 4 デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、

i i i . 15 デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、6 デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、および  $C_{18/20}$  エロンガーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、および 5 デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、および  $C_{20/22}$  エロンガーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、および 4 デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、

i v . 15 デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、9 エロンガーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、および 8 デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、および 5 デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、および  $C_{20/22}$  エロンガーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、および 4 デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子

よりなる群から選択される少なくとも1組の遺伝子、および

b ) i . 12 デサチュラーゼ、  
i i . 9 デサチュラーゼ、  
i i i .  $C_{14/16}$  エロンガーゼ、  
i v .  $C_{16/18}$  エロンガーゼ

よりなる群から選択される酵素をコードする少なくとも1つの遺伝子、および

c ) ( i ) D G A T 1、D G A T 2、および P D A T よりなる群から選択されるジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ、

( i i ) アシル - C o A : 1 - アシルリゾホスファチジルコリンアシルトランスフェラーゼ ( L P C A T )、

( i i i ) グリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼ ( G P A T )、

( i v ) リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ ( L P A A T )、

( v ) ホスホリパーゼ C、および

( v i ) ホスホリパーゼ A<sub>2</sub>

よりなる群から選択される酵素をコードする少なくとも1つの遺伝子

の - 3 / - 6 脂肪酸生合成経路の遺伝子を含んでなる遺伝子プールを含んでなる、背景ヤロウシア ( Y a r r o w i a ) 種を含んでなる、ドコサヘキサエン酸生成のための組換え生産宿主細胞であって、

( 1 ) 背景ヤロウシア ( Y a r r o w i a ) 種が、12 デサチュラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするあらゆる天然遺伝子を欠いており、

( 2 ) 背景ヤロウシア ( Y a r r o w i a ) 種が、リパーゼ 1 ( L i p 1 - )、ベルオキシソームアシル C o A オキシダーゼ A C O 3 ( P o x 3 - )、アシル - C o A オキシダーゼ 2 ( P o x 2 - )、オロチジン - 5 ' - リン酸デカルボキシラーゼ ( U r a 3 - )、サッカロピンデヒドロゲナーゼ ( L y s 5 - )、リパーゼ 2 ( L i p 2 - )、およびイソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ ( L e u 2 - ) よりなる群から選択される酵素をコードするあらゆる天然遺伝子を欠いている組換え生産宿主細胞。

態様 25 . 宿主が全脂肪酸の % として少なくとも約 5 % のドコサヘキサエン酸を含んでなる微生物油を生成する態様 1、2、3 または 4 のいずれか一項に記載の組換え生産宿主。

態様 26 . 宿主がドコサヘキサエン酸を含んでなる微生物油を生成し、微生物油があらゆる - リノール酸を欠いている態様 25 に記載の組換え生産宿主。

態様 27 . a ) 態様 1、2、3、または 4 のいずれか一項に記載の生産宿主を培養して、ドコサヘキサエン酸を含んでなる微生物油が生成され、



b) 場合によりステップ (a) の微生物油を回収すること

を含んでなるドコサヘキサエン酸を含んでなる微生物油の生成方法。

態様 28 . 態様 27 に記載の方法によって生成される微生物油。

態様 29 . 油が少なくとも約 5 % のドコサヘキサエン酸を含有する態様 28 に記載の微生物油。

態様 30 . 油があらゆる - リノール酸を欠いている態様 28 に記載の微生物油。

態様 31 . 油がリノール酸、 - リノレン酸、エイコサジエン酸、ジホモ - リノール酸、アラキドン酸、 - リノレン酸、ステアリドン酸、エイコサトリエン酸、エイコサテトラエン酸、ドコサペンタエン酸、およびドコサヘキサエン酸よりなる群から選択される脂肪酸を含んでなる態様 28 に記載の混合油。

態様 32 . 態様 27 に記載の方法によって生成される有効量の微生物油を含んでなる食品。

態様 33 . 類似食品、肉製品、穀物製品、ベーカリー食品、スナック食品、および乳製品よりなる群から選択される態様 32 に記載の食品。

態様 34 . 態様 27 に記載の方法によって生成される有効量の微生物油を含んでなる、メディカルフード、栄養補助食品、乳児用調製粉乳、および医薬品よりなる群から選択される製品。

態様 35 . 態様 27 に記載の方法によって生成される有効量の微生物油を含んでなる動物飼料。

態様 36 . ペットフード、反芻動物飼料、家禽飼料、および水産養殖飼料よりなる群から選択される態様 35 に記載の動物飼料。

態様 37 . 有効量の微生物油を含んでなり、場合により態様 1、2、3 または 4 のいずれか一項に記載の組換え宿主を含んでなる酵母バイオマスを含んでなる動物飼料。

態様 38 . 酵母バイオマスが、タンパク質、脂質、炭水化物、ビタミン、ミネラル、および核酸よりなる群から選択される飼料栄養素を含んでなる態様 37 に記載の動物飼料。

態様 39 . 態様 27 に記載の方法によって生成される微生物油と食品とを組み合わせることを含んでなるドコサヘキサエン酸で栄養強化された食品の製造方法。

態様 40 . メディカルフード、栄養補助食品、乳児用調製粉乳、および医薬品よりなる群から選択される製品の製造方法であって、態様 27 に記載の方法によって生成される微生物油と製品とを組み合わせることを含んでなるドコサヘキサエン酸で製品が栄養強化される方法。

態様 41 . 態様 27 に記載の方法によって生成される微生物油と動物飼料とを組み合わせることを含んでなるドコサヘキサエン酸で栄養強化された動物飼料の製造方法。

態様 42 . 態様 37 に記載の動物飼料と飼料栄養素を含んでなる酵母バイオマスとを組み合わせることを含んでなるドコサヘキサエン酸を含んでなる動物飼料を飼料栄養素で栄養強化する方法。

態様 43 . 飼料栄養素が、タンパク質、脂質、炭水化物、ビタミン、ミネラル、および核酸よりなる群から選択される態様 42 に記載の方法。

態様 44 . ヒトまたは動物によって消費可能または使用可能な形態でドコサヘキサエン酸を含有する態様 27 に記載の方法によって生成される微生物油を提供することを含んでなるエイコサペンタエン酸で強化された栄養補助食品をヒト、動物または水産養殖生物に提供する方法。

態様 45 . ドコサヘキサエン酸の欠乏症を処置するために、ヒトまたは動物によって消費可能または使用可能な形態でドコサヘキサエン酸を含有する態様 27 に記載の方法によって生成される微生物油を提供することを含んでなる動物またはヒトにおけるドコサヘキサエン酸の欠乏症の処置方法。

態様 46 . ATCC 名称 ATCC \_\_\_\_\_ を有する、ドコサヘキサエン酸生産に有用な組換え生産宿主ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) Y3000。