

【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 19 年 6 月 28 日 (2007.6.28)

【公表番号】特表 2007-504839 (P2007-504839A)

【公表日】平成 19 年 3 月 8 日 (2007.3.8)

【年通号数】公開・登録公報 2007-009

【出願番号】特願 2006-532907 (P2006-532907)

【国際特許分類】

**C 1 2 P 7/64 (2006.01)**

**C 1 2 N 15/09 (2006.01)**

**C 1 2 N 1/19 (2006.01)**

**C 1 2 R 1/645 (2006.01)**

**C 1 2 R 1/72 (2006.01)**

【F I】

C 1 2 P 7/64 Z N A

C 1 2 P 7/64

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 1/19

C 1 2 P 7/64

C 1 2 P 7/64

C 1 2 R 1:645

C 1 2 R 1:72

【手続補正書】

【提出日】平成 19 年 5 月 1 日 (2007.5.1)

【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) 機能的な - 3 / - 6 脂肪酸生合成経路をコードする遺伝子を含んでなる油性酵母菌を準備し、

b) ステップ (a) の酵母菌を発酵可能な炭素源の存在下で生育させ、これにより 1 種もしくはそれ以上の - 3 または - 6 脂肪酸を生成せしめ、

c) 場合により、- 3 または - 6 脂肪酸を回収することを含んでなる - 3 または - 6 脂肪酸の製造方法。

【請求項 2】

機能的な - 3 / - 6 脂肪酸生合成経路をコードする遺伝子が、12 デサチュラーゼ、6 デサチュラーゼ、エロンガーゼ、5 デサチュラーゼ、17 デサチュラーゼ、15 デサチュラーゼ、9 デサチュラーゼ、および 4 デサチュラーゼよりなる群から選択される請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

発酵可能な炭素源が、単糖類、少糖類、多糖類、モノグリセリド、ジグリセリド、トリグリセリド、メタノールおよび炭素含有アミンよりなる群から選択される請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

油性酵母菌が、ヤロウイア属 (Yarrowia)、カンジダ属 (Candida)、

ロドトルラ属 (*Rhodotorula*)、ロドスポリジウム属 (*Rhodosporidium*)、クリプトコッカス属 (*Cryptococcus*)、トリコスポロン属 (*Trichosporon*) およびリポマイセス属 (*Lipomyces*) よりなる群から選択される請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

油性酵母菌がヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) である請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

宿主細胞が、ヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) ATCC 番号 20362、ヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) ATCC 番号 8862、ヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) ATCC 番号 18944、ヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) ATCC 番号 76982 およびヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) LGAMS (7) 1 よりなる群から選択される請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

a) (i) - 3 / - 6 脂肪酸生合成経路中の酵素をコードする遺伝子、および

(ii) オレイン酸の内在性供給源

を含んでなる油性酵母菌を準備し、

b) ステップ (a) の酵母菌を適切な発酵可能な炭素源の存在下で生育させて、- 3 / - 6 脂肪酸生合成経路中の酵素をコードする遺伝子を発現させそしてオレイン酸をエイコサペンタエン酸に変換させ、

c) 場合により、ステップ (b) のエイコサペンタエン酸を回収することを含んでなるエイコサペンタエン酸の製造方法。

【請求項 8】

a) (i) - 3 / - 6 脂肪酸生合成経路中の酵素をコードする遺伝子、および

(ii) オレイン酸の内在性供給源

を含んでなる油性酵母菌を準備し、

b) ステップ (a) の酵母菌を適切な発酵可能な炭素源の存在下で生育させて、- 3 / - 6 脂肪酸生合成経路中の酵素をコードする遺伝子を発現させそしてオレイン酸をドコサヘキサエン酸に変換させ、

c) 場合により、ステップ (b) のドコサヘキサエン酸を回収することを含んでなるドコサヘキサエン酸の製造方法。

【請求項 9】

- 3 / - 6 脂肪酸生合成経路の酵素をコードする遺伝子を含んでなる形質転換された油性酵母菌。

【請求項 10】

ヤロウイア属 (*Yarrowia*)、カンジダ属 (*Candida*)、ロドトルラ属 (*Rhodotorula*)、ロドスポリジウム属 (*Rhodosporidium*)、クリプトコッカス属 (*Cryptococcus*)、トリコスポロン属 (*Trichosporon*) およびリポマイセス属 (*Lipomyces*) よりなる群から選択される請求項 9 に記載の油性酵母菌。

【請求項 11】

酵母菌がヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) である請求項 10 に記載の油性酵母菌。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法によって製造される微生物油。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0249

## 【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0249】

GC分析（一般方法で述べられる方法に従った）は、4個のキメラ遺伝子（図16）を含有する形質転換体中のエイコサペンタエン酸（EPA）の存在を示したが、野生型ヤロウイア（*Yarrowia*）対照株中には示されなかった。これらのデータはヤロウイア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）が遺伝子操作されて、 $\omega$ -3脂肪酸であるEPAを生成したことを確証した。

なお、本発明の特徴および態様を要約すれば以下のとおりである。

1. a) 機能的な  $\omega$ -3 /  $\omega$ -6 脂肪酸生合成経路をコードする遺伝子を含んでなる油性酵母菌を準備し、

b) ステップ(a)の酵母菌を発酵可能な炭素源の存在下で生育させ、これにより1種もしくはそれ以上の  $\omega$ -3 または  $\omega$ -6 脂肪酸を生成せしめ、

c) 場合により、 $\omega$ -3 または  $\omega$ -6 脂肪酸を回収することを含んでなる  $\omega$ -3 または  $\omega$ -6 脂肪酸の製造方法。

2. 機能的な  $\omega$ -3 /  $\omega$ -6 脂肪酸生合成経路をコードする遺伝子が、12デサチュラーゼ、6デサチュラーゼ、エロンガーゼ、5デサチュラーゼ、17デサチュラーゼ、15デサチュラーゼ、9デサチュラーゼ、および4デサチュラーゼよりなる群から選択される上記1に記載の方法。

3. 発酵可能な炭素源が、単糖類、少糖類、多糖類、モノグリセリド、ジグリセリド、トリグリセリド、メタノールおよび炭素含有アミンよりなる群から選択される上記1に記載の方法。

4. 油性酵母菌が、ヤロウイア属（*Yarrowia*）、カンジダ属（*Candida*）、ロドトルラ属（*Rhodotorula*）、ロドスポリジウム属（*Rhodospiridium*）、クリプトコッカス属（*Cryptococcus*）、トリコスポロン属（*Trichosporon*）およびリポマイセス属（*Lipomyces*）よりなる群から選択される上記1に記載の方法。

5. 油性酵母菌がヤロウイア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）である上記4に記載の方法。

6. a) (i) 12デサチュラーゼポリペプチドをコードする遺伝子、および (ii) オレイン酸からなるデサチュラーゼ基質の供給源を含んでなる油性酵母菌を準備し、

b) ステップ(a)の酵母菌を適切な炭素源の存在下で生育させ、12デサチュラーゼポリペプチドをコードする遺伝子を発現させそしてオレイン酸をリノール酸に変換させ、

c) 場合により、ステップ(b)のリノール酸を回収することを含んでなるリノール酸の生成方法。

7. a) (i) 6デサチュラーゼポリペプチドをコードする遺伝子、および (ii) リノール酸からなるデサチュラーゼ基質の供給源

を含んでなる油性酵母菌を準備し、

b) ステップ(a)の酵母菌を適切な炭素源の存在下で生育させて、6デサチュラーゼポリペプチドをコードする遺伝子を発現させそしてリノール酸を  $\omega$ -リノレン酸に変換させ、

c) 場合により、ステップ(b)の  $\omega$ -リノレン酸を回収することを含んでなる  $\omega$ -リノレン酸の製造方法。

8. a) (i) 6デサチュラーゼポリペプチドをコードする遺伝子、および (ii)  $\omega$ -リノール酸からなるデサチュラーゼ基質の供給源

を含んでなる油性酵母菌を準備し、

b) ステップ(a)の酵母菌を適切な発酵可能な炭素基質の存在下で生育させて、6

デサチュラーゼポリペプチドをコードする遺伝子を発現させそして - リノール酸がステアリドン酸に変換させ、

c) 場合により、ステップ (b) のステアリドン酸を回収することを含んでなるステアリドン酸の製造方法。

9. a) (i) 15 デサチュラーゼポリペプチドをコードする遺伝子、および (ii) リノール酸からなるデサチュラーゼ基質の供給源

を含んでなる油性酵母菌を準備し、

b) ステップ (a) の酵母菌を適切な発酵可能な炭素源の存在下で生育させて、15 デサチュラーゼポリペプチドをコードする遺伝子を発現させそしてリノール酸を - リノール酸に変換させ、

c) 場合により、ステップ (b) の - リノール酸を回収することを含んでなる - リノール酸の製造方法。

10. a) (i)  $C_{18/20}$  エロンガーゼポリペプチドをコードする遺伝子、および (ii) - リノレン酸からなるエロンガーゼ基質の供給源

を含んでなる油性酵母菌を準備し、

b) ステップ (a) の酵母菌を適切な発酵可能な炭素源の存在下で生育させて、エロンガーゼポリペプチドをコードする遺伝子を発現させそして - リノレン酸をジホモ - - リノール酸に変換させ、

c) 場合により、ステップ (b) のジホモ - - リノール酸を回収することを含んでなるジホモ - - リノール酸の製造方法。

11. a) (i)  $C_{18/20}$  エロンガーゼポリペプチドをコードする遺伝子、および (ii) ステアリドン酸からなるエロンガーゼ基質の供給源

を含んでなる油性酵母菌を準備し、

b) ステップ (a) の酵母菌を適切な発酵可能な炭素源の存在下で生育させて、エロンガーゼポリペプチドをコードする遺伝子を発現させそしてステアリドン酸をエイコサテトラエン酸に変換させ、

c) 場合により、ステップ (b) のエイコサテトラエン酸を回収することを含んでなるエイコサテトラエン酸の製造方法。

12. a) (i)  $C_{20/22}$  エロンガーゼポリペプチドをコードする遺伝子、および (ii) エイコサペンタエン酸からなるエロンガーゼ基質の供給源

を含んでなる油性酵母菌を準備し、

b) ステップ (a) の酵母菌を適切な発酵可能な炭素源の存在下で生育させて、エロンガーゼポリペプチドをコードする遺伝子を発現させそしてエイコサペンタエン酸をドコサペンタエン酸に変換させ、

c) 場合により、ステップ (b) のドコサペンタエン酸を回収することを含んでなるドコサペンタエン酸の製造方法。

13. a) (i) 5 デサチュラーゼポリペプチドをコードする遺伝子、および (ii) ジホモ - - リノール酸からなるデサチュラーゼ基質の供給源

を含んでなる油性酵母菌を準備し、

b) ステップ (a) の酵母菌を適切な発酵可能な炭素源の存在下で生育させて、5 デサチュラーゼポリペプチドをコードする遺伝子を発現させそしてジホモ - - リノール酸をアラキドン酸に変換させ、

c) 場合により、ステップ (b) のアラキドン酸を回収することを含んでなるアラキドン酸の製造方法。

14. a) (i) 5 デサチュラーゼポリペプチドをコードする遺伝子、および (ii) エイコサテトラエン酸からなるデサチュラーゼ基質の供給源

を含んでなる油性酵母菌を準備し、

b) ステップ (a) の酵母菌を適切な発酵可能な炭素源の存在下で生育させて、5 デサチュラーゼポリペプチドをコードする遺伝子を発現させそしてエイコサテトラエン酸をエイコサペンタエン酸に変換させ、

c) 場合により、ステップ (b) のエイコサペンタエン酸を回収することを含んでなるエイコサペンタエン酸の生成方法。

15. a) (i) 4 デサチュラーゼポリペプチドをコードする遺伝子、および (ii) ドコサペンタエン酸からなるデサチュラーゼ基質の供給源

を含んでなる油性酵母菌を準備し、

b) ステップ (a) の酵母菌を適切な発酵可能な炭素源の存在下で生育させて、4 デサチュラーゼポリペプチドをコードする遺伝子を発現させそしてドコサペンタエン酸をドコサヘキサエン酸に変換させ、

c) 場合により、ステップ (b) のドコサヘキサエン酸を回収することを含んでなるドコサヘキサエン酸の製造方法。

16. a) (i) 17 デサチュラーゼポリペプチドをコードする遺伝子、および (ii) ジホモ - リノール酸からなるデサチュラーゼ基質の供給源

を含んでなる油性酵母菌を準備し、

b) ステップ (a) の酵母菌を適切な発酵可能な炭素源の存在下で生育させて、17 デサチュラーゼポリペプチドをコードする遺伝子を発現させそしてジホモ - リノール酸をエイコサテトラエン酸に変換させ、

c) 場合により、ステップ (b) のエイコサテトラエン酸を回収することを含んでなるエイコサテトラエン酸の製造方法。

17. a) (i) 17 デサチュラーゼポリペプチドをコードする遺伝子、および (ii) アラキドン酸からなるデサチュラーゼ基質の供給源

を含んでなる油性酵母菌を準備し、

b) ステップ (a) の酵母菌を適切な発酵可能な炭素源の存在下で生育させて、17 デサチュラーゼポリペプチドをコードする遺伝子を発現させそしてアラキドン酸をエイコサペンタエン酸に変換させ、

c) 場合により、ステップ (b) のエイコサペンタエン酸を回収することを含んでなるエイコサペンタエン酸の製造方法。

18. デサチュラーゼまたはエロンガーゼ基質の供給源が、油性酵母菌に内在性である上記 6 ~ 17 のいずれか一項に記載の方法。

19. デサチュラーゼまたはエロンガーゼ基質の供給源が、油性酵母菌に外来性である上記 6 ~ 17 のいずれか一項に記載の方法。

20. 油性酵母菌が、ヤロウイア属 (*Yarrowia*)、カンジダ属 (*Candida*)、ロドトルラ属 (*Rhodotorula*)、ロドスポリジウム属 (*Rhodospiridium*)、クリプトコッカス属 (*Cryptococcus*)、トリコスポロン属 (*Trichosporon*) およびリポマイセス属 (*Lipomyces*) よりなる群から選択される上記 6 ~ 17 のいずれか一項に記載の方法。

21. 油性酵母菌がヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) である上記 20 に記載の方法。

22. 6 デサチュラーゼポリペプチドをコードする遺伝子が、

(a) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列をコードする単離された核酸分子、および

(b) 0.1 x SSC、0.1 % SDS、65 °C、2 x SSC、0.1 % SDS で洗浄後、0.1 x SSC、0.1 % SDS のハイブリダイゼーション条件下で (a) とハイブリダイズする単離された核酸分子

よりなる群から選択される上記 7 または 8 のいずれかに記載の方法。

23. エロンガーゼポリペプチドをコードする遺伝子が、

(a) 配列番号 8 に記載のアミノ酸配列をコードする単離された核酸分子、および

(b) 0.1 x SSC、0.1 % SDS、65 °C、2 x SSC、0.1 % SDS で洗浄後、0.1 x SSC、0.1 % SDS のハイブリダイゼーション条件下で (a) とハイブリダイズする単離された核酸分子

よりなる群から選択される上記 10、11 および 12 のいずれかに記載の方法。

24. 5 デサチュラーゼポリペプチドをコードする遺伝子が、

(a) 配列番号 4、配列番号 115、配列番号 119、および配列番号 123 よりなる群から選択されるアミノ酸配列をコードする単離された核酸分子、

(b) 0.1 x SSC、0.1% SDS、65℃、2 x SSC、0.1% SDS で洗浄後、0.1 x SSC、0.1% SDS のハイブリダイゼーション条件下で (a) とハイブリダイズする単離された核酸分子

よりなる群から選択される上記 13 または 14 のいずれかに記載の方法。

25. 17 デサチュラーゼポリペプチドをコードする遺伝子が、

(a) 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列をコードする単離された核酸分子、および

(b) 0.1 x SSC、0.1% SDS、65℃、2 x SSC、0.1% SDS で洗浄後、0.1 x SSC、0.1% SDS のハイブリダイゼーション条件下で (a) とハイブリダイズする単離された核酸分子

よりなる群から選択される上記 16 または 17 のいずれかに記載の方法。

26. 宿主細胞が、ヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) ATCC 番号 20362、ヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) ATCC 番号 8862、ヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) ATCC 番号 18944、ヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) ATCC 番号 76982 および ヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) LGAMS (7) 1 よりなる群から選択される上記 5 または 21 のいずれかに記載の方法。

27. a) (i) -3/-6 脂肪酸生合成経路中の酵素をコードする遺伝子、および

(ii) オレイン酸の内在性供給源

を含んでなる油性酵母菌を準備し、

b) ステップ (a) の酵母菌を適切な発酵可能な炭素源の存在下で生育させて、-3/-6 脂肪酸生合成経路中の酵素をコードする遺伝子を発現させそしてオレイン酸をエイコサペンタエン酸に変換させ、

c) 場合により、ステップ (b) のエイコサペンタエン酸を回収することを含んでなるエイコサペンタエン酸の製造方法。

28. a) (i) -3/-6 脂肪酸生合成経路中の酵素をコードする遺伝子、および

(ii) オレイン酸の内在性供給源

を含んでなる油性酵母菌を準備し、

b) ステップ (a) の酵母菌を適切な発酵可能な炭素源の存在下で生育させて、-3/-6 脂肪酸生合成経路中の酵素をコードする遺伝子を発現させそしてオレイン酸をドコサヘキサエン酸に変換させ、

c) 場合により、ステップ (b) のドコサヘキサエン酸を回収することを含んでなるドコサヘキサエン酸の製造方法。

29. -3/-6 脂肪酸生合成経路の酵素をコードする遺伝子を含んでなる形質転換された油性酵母菌。

30. ヤロウイア属 (*Yarrowia*)、カンジダ属 (*Candida*)、ロドトルラ属 (*Rhodotorula*)、ロドスポリジウム属 (*Rhodospiridium*)、クリプトコッカス属 (*Cryptococcus*)、トリコスポロン属 (*Trichosporon*) および リポマイセス属 (*Lipomyces*) よりなる群から選択される上記 29 に記載の油性酵母菌。

31. 酵母菌がヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) a) である上記 30 に記載の油性酵母菌。

32. 上記 1 ~ 28 のいずれか一項に記載の方法によって製造される微生物油。