

【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23年1月27日 (2011.1.27)

【公表番号】特表2010-512146(P2010-512146A)

【公表日】平成22年4月22日 (2010.4.22)

【年通号数】公開・登録公報2010-016

【出願番号】特願2009-540294(P2009-540294)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 9/02 (2006.01)

C 1 2 N 1/16 (2006.01)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/19 (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)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 9/02

C 1 2 N 1/16

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/00 A

C 1 2 P 7/64

【手続補正書】

【提出日】平成22年11月30日 (2010.11.30)

【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) 8 デサチュラーゼ活性を有して、配列番号 10 と同一でない配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有する、変異ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、

(b) パート (a) のヌクレオチド配列の補体、

(c) 8 デサチュラーゼ活性を有して、配列番号 10 と同一でない配列番号 198 に記載のアミノ酸配列を有する、変異ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、

(d) パート (c) のヌクレオチド配列補体

からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含んでなり、補体およびヌクレオチド配列が同数のヌクレオチドからなって 100% 相補的である、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 2】

8 デサチュラーゼ活性を有する、請求項 1 に記載の単離されたポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド。

【請求項 3】

少なくとも 1 つの制御配列と作動的に連結する、請求項 1 に記載の単離されたポリヌクレオチドを含んでなる組み換えコンストラクト。

## 【請求項 4】

請求項 1 に記載の単離されたポリヌクレオチドを含んでなる細胞であって、前記細胞が酵母であり、好ましくはその乾燥細胞重量の少なくとも約 25 % を油として産生する油性酵母である、細胞。

## 【請求項 5】

(a) 請求項 4 に記載の酵母細胞を提供するステップと、

(b) 長鎖多価不飽和脂肪酸が生成される条件下で、好ましくは、酵母がその乾燥細胞重量の少なくとも 25 % を油として産生する油性細胞である (a) の酵母細胞を成長させるステップと

を含んでなる、酵母細胞中で長鎖多価不飽和脂肪酸を製造する方法。

## 【請求項 6】

請求項 5 に記載の方法から得られる微生物油。

## 【請求項 7】

a) 請求項 2 に記載の 8 デサチュラーゼポリペプチドをコードして、少なくとも 1 つの制御配列と作動的に連結する、単離されたポリヌクレオチドを含んでなる第 1 の組み換え DNA コンストラクト、および

b) 少なくとも 1 つの制御配列と作動的に連結する単離されたポリヌクレオチドを含んでなり、コンストラクトが、4 デサチュラーゼ、5 デサチュラーゼ、6 デサチュラーゼ、9 デサチュラーゼ、12 デサチュラーゼ、15 デサチュラーゼ、17 デサチュラーゼ、9 エロンガーゼ、 $C_{14/16}$  エロンガーゼ、 $C_{16/18}$  エロンガーゼ、 $C_{18/20}$  エロンガーゼ、および  $C_{20/22}$  エロンガーゼからなる群から選択されるポリペプチドをコードする、少なくとも 1 つの第 2 の組み換え DNA コンストラクト

を含んでなり、好ましくは酵母が、ヤロウィア (*Yarrowia*)、カンジダ (*Candida*)、ロドトルラ (*Rhodotorula*)、ロドスポリジウム (*Rhodospiridium*)、クリプトコッカス (*Cryptococcus*)、トリコスポロン (*Trichosporon*)、およびリボマイセス (*Lipomyces*) からなる群から選択され、油がアラキドン酸、エイコサジエン酸、エイコサペンタエン酸、エイコサテトラエン酸、エイコサトリエン酸、ジホモ - リノレン酸、ドコサペンタエン酸、およびドコサヘキサエン酸からなる群から選択される長鎖多価不飽和脂肪酸を含んでなるその乾燥細胞重量の少なくとも約 25 % を油として産生する油性酵母。

## 【請求項 8】

請求項 7 に記載の酵母から得られる微生物油。

## 【請求項 9】

a) (i) 配列番号 10 と同一でない配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有する 8 デサチュラーゼポリペプチドをコードする組み換えコンストラクト、および

(ii) エイコサジエン酸源またはエイコサトリエン酸源を含んでなる、油性酵母を提供するステップと、

b) 8 デサチュラーゼポリペプチドをコードする組み換えコンストラクトが発現して、エイコサジエン酸がジホモ - リノール酸に、またはエイコサトリエン酸がエイコサテトラエン酸に変換される条件下で、ステップ (a) の酵母を成長させるステップと、

c) 場合によりステップ (b) のジホモ - リノール酸またはエイコサテトラエン酸を回収するステップと

を含んでなる、ジホモ - リノール酸及びエイコサテトラエン酸からなる群から選択される、多価不飽和脂肪酸を生成する方法。

## 【請求項 10】

a) i) 少なくとも 1 つの制御配列と作動的に連結する請求項 1 に記載の単離されたポリヌクレオチドを含んでなる第 1 の組み換え DNA コンストラクト、および

ii) 少なくとも 1 つの制御配列と作動的に連結する 9 エロンガーゼポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドを含んでなる少なくとも 1 つの第 2 の組み換え DNA コンストラクト

を含んでなる、酵母細胞を提供するステップと、

b) (a) の酵母細胞にリノレン酸源を提供するステップと、

c) ジホモ - リノール酸が形成される条件下で (b) の酵母細胞を成長させるステップと

を含んでなる、ジホモ - リノール酸を生成する方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0271

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0271】

配列番号176に記載のアミノ酸配列をBLASTPによって評価し、イソクリシス・ガルバナ (*Isochrysis galbana*) 配列 (配列番号173) に対して38.70 (E値2e-39) のpLog値を得た。ミドリムシ (*Euglena gracilis*) 9エロンガーゼは、Jotun Hein法を使用して、イソクリシス・ガルバナ (*Isochrysis galbana*) 9エロンガーゼ配列と39.4%同一である。Jotun Hein法 (Hein, J. J., Meth. Enz., 183: 626~645頁 (1990年)) によって実施された配列%同一性計算は、ペアワイズアラインメントのためのデフォルトパラメーター (KTUPLE=2) で、LASERGENE (商標) バイオインフォマティクス演算スイートのMegAlign (商標) v6.1プログラム (DNASTAR (商標) Inc., Madison, WI) を使用して行った。ミドリムシ (*Euglena gracilis*) 9エロンガーゼは、Clustal V法を使用して、イソクリシス・ガルバナ (*Isochrysis galbana*) 9エロンガーゼ配列と31.8%同一である。Clustal V法 (Higgins, D. G. および Sharp, P. M., Comput. Appl. Biosci., 5: 151~153頁 (1989年); Higginsら, Comput. Appl. Biosci., 8: 189~191頁 (1992年)) によって実施した配列%同一性計算は、ペアワイズアラインメントのためのデフォルトパラメーターで (KTUPLE=1、GAP PENALTY=3、WINDOW=5およびDIAGONALS SAVED=5およびGAP LENGTH PENALTY=10)、LASERGENE バイオインフォマティクス演算スイートのMegAlign (商標) v6.1プログラム (DNASTAR Inc., Madison, WI) を使用して行った。BLASTスコアおよび確率は、ここで配列番号175として述べられている核酸断片が、ミドリムシ (*Euglena gracilis*) 9エロンガーゼ全体をコードすることを示唆する。

以下に本発明の態様を示す。

1. (a) 8デサチュラーゼ活性を有して、配列番号10と同一でない配列番号2に記載のアミノ酸配列を有する、変異ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、または

(b) パート(a)のヌクレオチド配列の補体

を含んでなり、補体およびヌクレオチド配列が同数のヌクレオチドからなって100%相補的である、単離されたポリヌクレオチド。

2. ヌクレオチド配列が配列番号1を含んでなり、配列番号1が配列番号9と同一でない、上記1に記載の単離されたポリヌクレオチド。

3. (a) 8デサチュラーゼ活性を有して、配列番号10と同一でない配列番号198に記載のアミノ酸配列を有する、変異ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、または

(b) パート(a)のヌクレオチド配列の補体

を含んでなり、補体およびヌクレオチド配列が同数のヌクレオチドからなって100%相補的である、単離されたポリヌクレオチド。

4. ヌクレオチド配列が、配列番号9と同一でない配列番号197を含んでなる、上記3

に記載の単離されたポリヌクレオチド。

5. 8 デサチュラーゼ活性を有する、上記 1 に記載の単離されたポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド。

6. 8 デサチュラーゼ活性を有する、上記 3 に記載の単離されたポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド。

7. 8 デサチュラーゼ活性が、配列番号 10 に記載のポリペプチドの 8 デサチュラーゼ活性と少なくとも機能的にほぼ同等である、上記 5 に記載のポリペプチド。

8. 8 デサチュラーゼ活性が、配列番号 10 に記載のポリペプチドの 8 デサチュラーゼ活性と少なくとも機能的にほぼ同等である、上記 6 に記載のポリペプチド。

9. 少なくとも 1 つの制御配列と作動的に連結する、上記 1 または 3 のいずれか一項に記載の単離されたポリヌクレオチドを含んでなる組み換えコンストラクト。

10. 上記 1 または上記 3 のいずれかに記載の単離されたポリヌクレオチドを含んでなる細胞。

11. 前記細胞が酵母である、上記 10 に記載の細胞。

12. 酵母が、その乾燥細胞重量の少なくとも約 25 % を油として産生する油性酵母である、上記 11 に記載の細胞。

13. 油性酵母が、ヤロウィア (*Yarrowia*)、カンジダ (*Candida*)、ロドトルラ (*Rhodotorula*)、ロドスポリジウム (*Rhodospiridium*)、クリプトコッカス (*Cryptococcus*)、トリコスポロン (*Trichosporon*)、およびリポマイセス (*Lipomyces*) からなる群から選択される、上記 12 に記載の細胞。

14. (a) 上記 10 に記載の酵母細胞を提供するステップと、

(b) 長鎖多価不飽和脂肪酸が生成される条件下で (a) の酵母細胞を成長させるステップと

を含んでなる、酵母細胞中で長鎖多価不飽和脂肪酸を製造する方法。

15. 酵母が、その乾燥細胞重量の少なくとも約 25 % を油として産生する油性酵母である、上記 14 に記載の方法。

16. 酵母がヤロウィア (*Yarrowia*) 種である、上記 15 に記載の方法。

17. 上記 12 に記載の酵母から得られる微生物油。

18. a) 上記 1 または上記 3 に記載の 8 デサチュラーゼポリペプチドをコードして、少なくとも 1 つの制御配列と作動的に連結する、単離されたポリヌクレオチドを含んでなる第 1 の組み換え DNA コンストラクト、および

b) 少なくとも 1 つの制御配列と作動的に連結する単離されたポリヌクレオチドを含んでなり、ポリペプチドをコードするコンストラクトが、4 デサチュラーゼ、5 デサチュラーゼ、6 デサチュラーゼ、9 デサチュラーゼ、12 デサチュラーゼ、15 デサチュラーゼ、17 デサチュラーゼ、9 エロンガーゼ、 $C_{14/16}$  エロンガーゼ、 $C_{16/18}$  エロンガーゼ、 $C_{18/20}$  エロンガーゼ、および  $C_{20/22}$  エロンガーゼからなる群から選択される、少なくとも 1 つの第 2 の組み換え DNA コンストラクト

を含んでなる、その乾燥細胞重量の少なくとも約 25 % を油として産生する油性酵母。

19. ヤロウィア (*Yarrowia*)、カンジダ (*Candida*)、ロドトルラ (*Rhodotorula*)、ロドスポリジウム (*Rhodospiridium*)、クリプトコッカス (*Cryptococcus*)、トリコスポロン (*Trichosporon*)、およびリポマイセス (*Lipomyces*) からなる群から選択される、上記 18 に記載の酵母。

20. 酵母細胞がヤロウィア (*Yarrowia*) 種であり、油がアラキドン酸、エイコサジエン酸、エイコサペンタエン酸、エイコサテトラエン酸、エイコサトリエン酸、ジホモ - リノレン酸、ドコサペンタエン酸、およびドコサヘキサエン酸からなる群から選択される長鎖多価不飽和脂肪酸を含んでなる、上記 19 に記載の酵母。

21. 第 1 の組み換え DNA コンストラクトが、8 デサチュラーゼポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含んでなり、配列番号 2 および配列番号 198 からなる群から

選択されるアミノ酸配列を有する、上記 18 に記載の油性酵母。

22. a) (i) 8 デサチュラーゼポリペプチドをコードして、配列番号 10 と同一でない配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有する組み換えコンストラクト、および

(ii) エイコサジエン酸源

を含んでなる、油性酵母を提供するステップと、

b) 8 デサチュラーゼポリペプチドをコードする組み換えコンストラクトが発現して、エイコサジエン酸がジホモ - リノール酸に変換される条件下で、ステップ (a) の酵母を成長させるステップと、

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ステップと  
を含んでなる、ジホモ - リノール酸を生成する方法。

23. a) (i) 8 デサチュラーゼポリペプチドをコードして、配列番号 10 と同一でない配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有する組み換えコンストラクト、および

(ii) エイコサトリエン酸源

を含んでなる、油性酵母を提供するステップと、

b) 8 デサチュラーゼポリペプチドをコードする組み換えコンストラクトが発現して、エイコサトリエン酸がエイコサテトラエン酸に変換される条件下で、ステップ (a) の酵母を成長させるステップと、

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ステップと  
を含んでなる、エイコサテトラエン酸を生成する方法。

24. a) i) 少なくとも 1 つの制御配列と作動的に連結する上記 1 または上記 3 のいずれかに記載の単離されたポリヌクレオチドを含んでなる第 1 の組み換え DNA コンストラクト、および

ii) 少なくとも 1 つの制御配列と作動的に連結する 9 エロンガーゼポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドを含んでなる少なくとも 1 つの第 2 の組み換え DNA コンストラクト

を含んでなる、酵母細胞を提供するステップと、

b) (a) の酵母細胞にリノレン酸源を提供するステップと、

c) ジホモ - リノール酸が形成される条件下で (b) の酵母細胞を成長させるステップと

を含んでなる、ジホモ - リノール酸を生成する方法。