

【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24年7月19日(2012.7.19)

【公表番号】特表2011-522547(P2011-522547A)

【公表日】平成23年8月4日(2011.8.4)

【年通号数】公開・登録公報2011-031

【出願番号】特願2011-512807(P2011-512807)

【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	1/15	(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	23/00	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 1 2 N	9/02	
C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/00	1 0 1
C 1 2 P	23/00	

【手続補正書】

【提出日】平成24年6月1日(2012.6.1)

【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】

ベータカロテンをアスタキサンチンに変換する酵素アスタキサンチンシンターゼにより触媒される反応における電子供与体の役目を果たす、シトクロムP450レダクターゼ活性を有する酵素をコードしていることを特徴とするDNAであって、

以下のヌクレオチド配列：

a) SEQ 1により表される配列、または  
 b) ヌクレオチド配列であって、その遺伝子コードが縮重しているため、a)において記述されたヌクレオチド配列によりコードされるものと同じアミノ酸配列を有するシトクロムP450レダクターゼをコードするヌクレオチド配列、あるいは  
 c) a)および/またはb)において記述されたヌクレオチド配列の相補鎖に標準的なストリンジエントな条件の下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；  
 から選択されるヌクレオチド配列を含む、前記DNA。

【請求項2】

ベータカロテンをアスタキサンチンに変換する酵素アスタキサンチンシンターゼにより触媒される反応における電子供与体の役目を果たす、シトクロムP450レダクターゼ活性を有する酵素をコードしていることを特徴とするDNAであって、

以下のヌクレオチド配列：

a ) S E Q 2 により表される配列、または

b ) ヌクレオチド配列であって、その遺伝子コードが縮重しているため、a ) において記述されたヌクレオチド配列によりコードされるものと同じアミノ酸配列を有するシトクロム P 4 5 0 レダクターゼをコードするヌクレオチド配列、あるいは

c ) a ) および / または b ) において記述されたヌクレオチド配列の相補鎖に標準的なストリングエントな条件の下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；  
から選択されるヌクレオチド配列を含む、前記 D N A 。

【請求項 3】

シトクロム P 4 5 0 レダクターゼ活性を有し、そして、請求項 1 および 2 に記載の D N A のヌクレオチド配列によりコードされることを特徴とする、ポリペプチド。

【請求項 4】

a ) S E Q 3 により表されるアミノ酸配列、または  
b ) アミノ酸の 1 個以上の変化を有し、記述されたシトクロム P 4 5 0 レダクターゼの活性を維持している、S E Q 3 に類似のアミノ酸配列、あるいは  
c ) 化学合成または生合成により合成される、a ) および / または b ) において記述されたアミノ酸配列；  
を有することを特徴とする、請求項 3 に記載のポリペプチド。

【請求項 5】

S E Q 4 ~ S E Q 1 0 6 で構成されるグループから選択され、そして、請求項 1 又は 2 に記載のヌクレオチド配列とハイブリダイズすることを特徴とする、オリゴヌクレオチド。

【請求項 6】

P C R または他の分子生物学の技法により D N A を増幅するのに役立つことを特徴とする、請求項 5 に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項 7】

請求項 1 又は 2 に記載の D N A を含むことを特徴とする、ベクターまたはプラスミド。

【請求項 8】

請求項 1 又は 2 に記載の D N A により形質転換またはトランスフェクションされていることを特徴とする、宿主生物。

【請求項 9】

請求項 7 に記載のベクターまたはプラスミドにより形質転換またはトランスフェクションされていることを特徴とする、宿主生物。

【請求項 10】

シトクロム P 4 5 0 レダクターゼ活性を有するポリペプチドを生成するためのプロセスであって、それが請求項 8 又は 9 に記載の宿主生物を、この酵素の產生の助けになる条件下で培養することを含むことを特徴とするプロセス。

【請求項 11】

アスタキサンチンの生物学的生産のためのプロセスであって、それが請求項 1 又は 2 に記載の 1 種類以上の D N A を適切な宿主生物へ導入し、アスタキサンチンの產生の助けになる条件下で増殖させ、その培養物からアスタキサンチンを回収することを含むことを特徴とするプロセス。

【請求項 12】

ベータカロテンからのアスタキサンチンの製造のためのプロセスであって、それが適切な再構成された膜を含む適切な反応混合物中のアスタキサンチンシンターゼにより触媒される反応のために、請求項 3 又は 4 記載のポリペプチドからの電子の供与を提供することを特徴とする、前記プロセス。

【請求項 13】

請求項 12 に記載のベータカロテンからのアスタキサンチンの製造のプロセスであって、前記ポリペプチドが、ミクロソームまたはミトコンドリア膜のような生物学的な膜から調製された再構成された膜の形で存在することを特徴とする、前記プロセス。

【請求項 14】

請求項 1 2 に記載のベータカロテンからのアスタキサンチンの製造のプロセスであって、前記ポリペプチドが、リポソームのような再構成された人工的な膜の形で存在することを特徴とする、前記プロセス。

【請求項 1 5】

請求項 1 または 2 に記載の DNA を含むことを特徴とする、ベータカロテンからのアスタキサンチンの製造のための組成物。

【請求項 1 6】

請求項 3 又は 4 に記載のポリペプチドを含むことを特徴とする、ベータカロテンからのアスタキサンチンの製造のための組成物。

【請求項 1 7】

請求項 5 又は 6 に記載のオリゴヌクレオチドを含むことを特徴とする、ベータカロテンからのアスタキサンチンの製造のための組成物。

【請求項 1 8】

請求項 7 に記載のベクターを含むことを特徴とする、ベータカロテンからのアスタキサンチンの製造のための組成物。

【請求項 1 9】

請求項 1 5 ~ 1 8 に記載の組成物の使用であって、それがベータカロテンから始まるアスタキサンチンの製造に有用であることを特徴とする使用。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 0 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 0 8】

基質中への酸素の挿入に関して、シトクロム P 4 5 0 モノオキシゲナーゼ型の酵素は真核生物では電子供与系を必要とし、タンパク質シトクロム P 4 5 0 レダクターゼ ( C P R ) である ( van den Brink et al . , 1998 ) 。加えて、 Ojima ( 2 0 0 6 ) は、大腸菌を互いに共存できる 3 種類のプラスミドで形質転換し、そのプラスミドの内の 1 種類はベータカロテンの合成に必要な遺伝子を含み、別のプラスミドは X . デンドロロウスの遺伝子 c r t S を含み、 3 番目は出芽酵母の P 4 5 0 レダクターゼを含み、この系はベータカロテンの酸化型誘導体を得ることのみ可能であり、アスタキサンチンは得られなかったという研究を記述した。これらの結果から、我々はその系における生合成経路を補完するのに適したシトクロム P 4 5 0 レダクターゼの配列が必要であると推論することができる。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 2 4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 2 4】

本発明は、 X . デンドロロウスの c r t R 遺伝子の DNA 配列に関し、その好ましい様において、ゲノムおよび相補的 DNA の配列、ならびにその遺伝子の断片、ならびにこれらの半縮重 ( semi - degenerate ) またはそうでないものに関する。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 5 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 5 2】

実施例 1 : X . デンドロロウスから c r t R 遺伝子のゲノム DNA 配列を得る。

## 【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0053

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0053】

X. デンドロロウスの c r t R 遺伝子 を単離および特性付けするため、オリゴヌクレオチドを設計して PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) の技法により c r t R 遺伝子 の一部を増幅した。この目的のため、我々は酵母クンニンハメラ・エキヌラタ、出芽酵母、およびロドトルラ・ミヌタの酵素 CPR 類の遺伝子のヌクレオチド配列を Clustal W プログラムにより比較し、保存された領域を同定し、これらに基づいて表1において記述した半縮重オリゴヌクレオチド (SEQ 4 ~ SEQ 9) を設計し、比較した配列内でのそれらの位置を図3において示す。プライマー SEQ 8 および SEQ 4 のペアを用いて、X. デンドロロウスの野生株 UCD 67-385 のゲノム DNA から、次の条件下での PCR プロトコルを用いて c r t R 遺伝子 を増幅した：95 °C で 3 分間の最初の変性、35 サイクルの：94 °C において 30 秒間の変性、55 °C において 30 秒間のアニーリング、72 °C において 3 分間の伸長。最後の伸長の後、72 °C において 10 分間。得られた増幅産物を 0.8% アガロースゲルで泳動し、それから精製し、次いで配列決定した。この技法を用いて、1649 塩基対の増幅産物を得ることができた。得られた配列を BLASTX プログラムを用いて国際データベースと比較する（得られたヌクレオチド配列をアミノ酸に翻訳したものを用いてタンパク質データベースを検索する）ことにより、得られた増幅産物が他の酵母の CPR 類と高い百分率の類似性を有することが分かり、カワラタケ (Trametes versicolor) BAB83588.1 (一致：61% および E の値：3 × 10<sup>-142</sup>) およびファネロキーテ・クリソスポリウム (Phanerochaete chrysosporium) AAG31351.1 (一致：59% および E の値：1 × 10<sup>-137</sup>) との一致が最大であった。

## 【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0054

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0054】

得られた配列から、それらの保存されたコーディングセグメントを分析し (blastP プログラムを用いた)、それらに基づいて X. デンドロロウスの c r t R 遺伝子 に特異的な新しいプライマーを設計した (SEQ 10 ~ SEQ 13、表1)。これらのプライマーを用いて X. デンドロロウスのゲノムライブラリーにおいてクローニングを見つけ、コンストラクションしてプラスミド YIP5 の BamHI 部位の中に入れ、これを c r t R 遺伝子 をコードするゲノム DNA 断片を含む E. coli の DH5<sup>+</sup> 株へのゲストとして用いた。これらのクローニングの研究は、そのゲノムライブラリーのクローニングの挿入断片の PCR による増幅により行われた。c r t R 遺伝子 はそれらの配列の中に BamHI 部位を含み、従って用いたゲノムライブラリーから完全な c r t R 遺伝子 を含むクローニングを得ることはできなかった。しかし、我々はその遺伝子の一部を含む 2 種類のクローニングを得た。12820bp の挿入断片を有する一方を完全に配列決定し、それは c r t R 遺伝子 をエキソン 1 のヌクレオチド番号 82 の塩基からその遺伝子の終わりまで含んでおり、およそ 6500bp の挿入断片を含む他方のクローニングを完全に配列決定し、それは c r t R 遺伝子 のプロモーター領域およびエキソン 1 の 88bp であった。制限酵素による消化およびプライマー SEQ 8 および SEQ 4 により増幅された断片をプローブとして用いたゲノム DNA のハイブリダイゼーション試験により、c r t R 遺伝子 は配列中に SalI 部位を含まず、およそ 4900bp の SalI 断片はその遺伝子を丸ごと含むことが決定された。基本的に、この実験に関して用いられたプロトコルは次のものであった：X. デンドロ

ロウスの U C D 6 7 - 3 8 5 のゲノム D N A を異なる制限酵素で消化し、0.8%アガロースゲル上で電気泳動した。次いでその D N A を変性させ、ナイロン膜に移し、c r t R 遺伝子の一部に相当する D N A 断片をプローブとして用いてハイブリダイゼーションを行った。膜の準備およびハイブリダイゼーションは、S a m b r o o c k e t a l . , 2 0 0 1 の標準的な方法に従って行った。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 5 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 5 6】

実施例2：X. デンドロロウスからの c r t R 遺伝子 の相補的 D N A の配列の獲得。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 6 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 6 2】

酵母 X. デンドロロウスにおけるアスタキサンチンの生合成経路における c r t R 遺伝子の重要性を示すため、野性型の X. デンドロロウスの株における c r t R 遺伝子 の欠失変異体を構築し、その変異体の表現型および遺伝型を元の株と比較した。この目的のため、それを形質転換ベクターの中に挿入し、c r t R 遺伝子を含む D N A 断片をハイグロマイシン B 抗生物質に対する耐性モジュールに置き換えるようなコンストラクションを行った。このモジュールは、T E F 遺伝子（翻訳伸長因子 E F - 1 をコードする）のプロモーターの制御下のハイグロマイシン B に対する抗生物質耐性遺伝子（h p h）および X. デンドロロウスの G P D 遺伝子のターミネーター領域で構成されている。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 6 4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 6 4】

U C D 6 7 - 3 8 5 株を、c r t R 遺伝子の欠失およびハイグロマイシンに対する耐性のモジュールを含む線状 D N A 断片を用いて形質転換した。この断片は、クローン C P R 1 . 3 B s i W I + h y g のエンドヌクレアーゼ S m a I および S p e I による消化から得られた。二重の相同組換えの事象により、U C D 6 7 - 3 8 5 株の c r t R 遺伝子 の対立遺伝子が欠失部分により置き換えられ、その結果 T 1 3 株が得られた。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 6 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 6 8】

上記の株のゲノムレベルでの形質転換を確認するため、我々はそれらの挿入断片により影響を受けた遺伝子座を P C R により、鑄型として形質転換体および野生株からのゲノム D N A を用いて調べた。形質転換株 T 1 3 の分析に関して、次のプライマーのペア：g d p r e v + S E Q 5 0 、S E Q 1 4 + P e f f w d 、S E Q 1 4 + S E Q 5 0 を用いて P C R 反応を行い、鑄型として野生株 U C D 6 7 - 3 8 5 、形質転換株 T 1 3 および陰性対照として蒸留水を用いた。形質転換株 C B S T r の分析に関して、次のプライマーのペア：P e f f w d + S E Q 3 5 、g p d r e v + S E Q 3 0

を用いて P C R 反応を行い、鑄型として野生株 C B S 6 9 3 8 、形質転換株 C B S T r および陰性対照として蒸留水を用い、また、プライマーペア : S E Q 7 5 + h y g S e c R 、 H F + S E Q 3 5 、 H y g S e c F + M 1 3 F 、 M 1 3 R + S E Q 1 5 、 S E Q 2 0 + S E Q 5 0 および S E Q 3 0 + S E Q 5 0 も用い、鑄型として形質転換株 C B S T r を用いた。これらのプライマーのいくつかは c r t R の配列とハイブリダイズせず、それらの配列を表 2 において詳細に述べ、それらの相対的な位置を図 7 において示す。P C R 反応は次のプロトコルに従って行った： 9 5 において 3 分間の最初の変性、 3 5 サイクルの： 9 4 において 30 秒間の変性、 5 5 において 30 秒間のアニーリング、 7 2 において 3 分間の伸長。最後の伸長の後、 7 2 において 10 分間、およびそれを 0.8 % アガロースゲル上にロードした。得られた結果を図 10 において示し、予想される增幅産物の大きさおよび得られた增幅産物の大きさの間の比較を表 3 において示す。

【手続補正 1 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 6 9

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 6 9】

表 2 : 形質転換株のゲノムの分析において用いた、 c r t R の配列に相補的で無いプライマー