

【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9月25日(2008.9.25)

【公表番号】特表2008-518628(P2008-518628A)

【公表日】平成20年6月5日(2008.6.5)

【年通号数】公開・登録公報2008-022

【出願番号】特願2007-540139(P2007-540139)

【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 7/64 (2006.01)

A 2 3 L 1/30 (2006.01)

A 2 3 K 1/16 (2006.01)

A 6 1 K 31/202 (2006.01)

A 6 1 P 25/00 (2006.01)

A 6 1 P 27/02 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

C 1 2 R 1/645 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 1/19 Z N A

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 P 7/64

A 2 3 L 1/30 Z

A 2 3 K 1/16 3 0 1 F

A 6 1 K 31/202

A 6 1 P 25/00

A 6 1 P 27/02

A 6 1 P 43/00 1 1 2

A 2 3 K 1/16 3 0 4 B

C 1 2 N 1/19

C 1 2 P 7/64

C 1 2 R 1:645

C 1 2 R 1:645

【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_{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

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、

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) 種を含んでなるアラキドン酸生成のための組換え生産宿

主細胞。

【請求項 2】

- 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、および
- 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、

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、背景ヤロウィア (Yarrowia) 種を含んでなる、アラキドン酸生成のための組換え生産宿主細胞。

【請求項 3】

- e) 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、
- f) 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、
- g) 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
- 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、背景ヤロウィア (Yarrowia) 種を含んでなるアラキドン酸生成のための組換え生産宿主細胞であって、

イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ (Leu 2 -) 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 4】

- f) 9 エロンガーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、
- g) 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、
- h) 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、
- i) 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、および
- j) 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

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、背景ヤロウィア (Yarrowia) 種を含んでなる、アラキドン酸生成のための組換え生産宿主細胞であって、

サッカロピンデヒドロゲナーゼ (Lys 5 -) 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 5】

a) (1) 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、

(2) 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

よりなる群から選択される少なくとも一組の遺伝子

- b) (1) 12 デサチュラーゼ、
- (2) 9 デサチュラーゼ、
- (3) C_{14/16} エロンガーゼ、
- (4) 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.) DGAT 1、DGAT 2、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 (LPCAT)、

iii.) グリセロール - 3 - リン酸アシルトランスフェラーゼ (GPAT)、

iv.) リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ (LPAAT)、

v.) ホスホリパーゼ C、および

vi.) ホスホリパーゼ A₂

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、背景ヤロウィア (*Yarrowia*) 種を含んでなる、アラキドン酸生成のための組換え生産宿主細胞であって、

(1) 背景ヤロウィア (*Yarrowia*) 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) 背景ヤロウィア (*Yarrowia*) 種が、リパーゼ1 (*Lip1* -)、ペルオキシソームアシル CoA オキシダーゼ ACO3 (*Pox3* -)、アシル - CoA オキシダーゼ2 (*Pox2* -)、オロチジン - 5' - リン酸デカルボキシラーゼ (*Ura3* -)、サッカロピンデヒドロゲナーゼ (*Lys5* -)、リパーゼ2 (*Lip2* -)、およびイソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ (*Leu2* -) 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) 請求項1または2のいずれかに記載の生産宿主を培養して、アラキドン酸を含んでなる微生物油が生成され、そして、

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アラキドン酸を含んでなる微生物油の生成方法。

【請求項7】

請求項6に記載の方法によって生成される微生物油。

【請求項8】

請求項6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9】

請求項6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10】

請求項6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11】

有効量の微生物油を含んでなり、場合により請求項1または2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。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0685

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0685】

本明細書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、A R 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 2 0 3 4、Y 2 0 4 7、Y 2 2 1 4 株)、% 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 2 2 1 4 株中の天然 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以下に記載する。

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_{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

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、

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*) 種を含んでなるアラキドン酸生成のための組換え生産宿主細胞。

態様 2 . 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、および

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、
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、背景ヤロウイア (Yarrowia) 種を含んでなる、アラキドン酸生成のための組換え生産宿主細胞。

態様3. 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または2のいずれか一項に記載の組換え生産宿主。

態様4. 背景ヤロウイア (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3に記載の組換え生産宿主。

態様5. 前記 - 3 / - 6 脂肪酸生合成経路遺伝子の少なくとも1つが、配列番号 1 5 8 ~ 1 6 8 および 3 6 4 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または2のいずれか一項に記載の組換え生産宿主。

態様6. 前記 1 2 デサチュラーゼが、配列番号 2 4、2 6、2 8、3 0、3 1、3 2、3 4、3 6、3 8、3 5 8、3 5 9、3 6 1、3 6 2 および 3 6 3 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に記載の組換え生産宿主。

態様7. 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 1 8 および 2 1 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に記載の組換え生産宿主細胞。

態様8.

前記 9 エロンガーゼが配列番号 4 0 および 1 8 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 4 5、4 7、および 4 9 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に記載の組換え生産宿主細胞。

態様9. 前記 5 デサチュラーゼが、配列番号 7、9、および 1 2 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のいずれかに記載の組換え生産宿主細胞。

態様10. 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または2のいずれかに記載の組換え生産宿主。

態様11. 前記 C_{16/18} エロンガーゼが配列番号 5 1、5 4 および 6 2 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 6 5 に記載のアミノ酸配列を有する態様10に記載の組換え生産宿主。

態様12. 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 (D G A T 1)、

b) ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ (D G A T 2)、

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 (P D A T)、

d) 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)、

e) 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)、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 (L P A A T)

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または2のいずれかに記載の組換え生産宿主。

態様13. 前記ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ (D G A T 1) が配列番号 8 2 および 8 4 ~ 8 8 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 (D G A T 2) が配列番号 9 0、9 2、9 4、および 9 6 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 (P D A T) が配列番号 7 7 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 (G P A T) が配列番号 9 8 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 (

L P A A T) が配列番号 68、70、72、および 75 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 - 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) が配列番号 80 に記載のアミノ酸配列を有する態様 12 に記載の組換え生産宿主。

態様 14 . e) 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、

f) 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、

g) 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

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、背景ヤロウイア (Y a r r o w i a) 種を含んでなるアラキドン酸生成のための組換え生産宿主細胞であって、

イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ (L e u 2 -) 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 15 . f) 9 エロンガーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、

g) 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、

h) 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、

i) 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、および

j) 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

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、背景ヤロウイア (Y a r r o w i a) 種を含んでなる、アラキドン酸生成のための組換え生産宿主細胞であって、

サッカロピンデヒドロゲナーゼ (L y s 5 -) 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 16 . a) (1) 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、

(2) 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

よりなる群から選択される少なくとも一組の遺伝子

b) (1) 12 デサチュラーゼ、

(2) 9 デサチュラーゼ、

(3) C_{14/16} エロンガーゼ、

(4) 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 A₂

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、背景ヤロウイア (Y a r r o w i a) 種を含んでなる、アラキドン酸生成のための組換え生産宿主細胞であって、

(1) 背景ヤロウイア (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) 背景ヤロウイア (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CoAオキシダーゼACOX3(Pox3-)、アシル-CoAオキシダーゼ2(Pox2-)、オロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ(Ura3-)、サッカロピンデヒドロゲナーゼ(Lys5-)、リパーゼ2(Lip2-)、およびイソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ(Leu2-)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17. 宿主が全脂肪酸の%として少なくとも約5%のアラキドン酸を含んでなる微生物油を生成する態様1または2のいずれか一項に記載の組換え生産宿主。

態様18. 宿主がアラキド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1または2のいずれか一項に記載の組換え生産宿主。

態様19. a) 請求項1または2のいずれかに記載の生産宿主を培養して、アラキドン酸を含んでなる微生物油が生成され、そして、

b) 場合によりステップ(a)の微生物油を回収すること
を含んでなるアラキドン酸を含んでなる微生物油の生成方法。

態様20. 態様19に記載の方法によって生成される微生物油。

態様21. 油が少なくとも約5%のアラキドン酸を含有する態様20に記載の微生物油。

態様22. 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20に記載の混合油。

態様23. 態様19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24. 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23に記載の食品。

態様25. 態様19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26. 態様19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27. 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26に記載の動物飼料。

態様28. 有効量の微生物油を含んでなり、場合により請求項1または2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29. 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28に記載の動物飼料。

態様30. 態様19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、アラキドン酸で栄養強化された食品の製造方法。

態様31. 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19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、アラキドン酸で製品が栄養強化される方法。

態様31. 態様19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、アラキドン酸で栄養強化された動物飼料の製造方法。

態様33. 態様26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、アラキド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34. 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33に記載の方法。

態様35. 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アラキドン酸を含有する態様19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、

アラキド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 36 . A T C C 名称 A T C C を有する、アラキドン酸生成に有用な組換え生
産宿主ヤロウィア・リポリティカ (Y a r r o w i a l i p o l y t i c a) Y 2 0 4
7。