

【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26年10月2日(2014.10.2)

【公表番号】特表2013-541328(P2013-541328A)

【公表日】平成25年11月14日(2013.11.14)

【年通号数】公開・登録公報2013-062

【出願番号】特願2013-526175(P2013-526175)

【国際特許分類】

|         |       |           |
|---------|-------|-----------|
| C 1 2 N | 15/09 | (2006.01) |
| C 1 2 N | 9/00  | (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) |
| C 1 1 C | 3/00  | (2006.01) |
| C 1 2 R | 1/645 | (2006.01) |

【F I】

|         |       |         |
|---------|-------|---------|
| C 1 2 N | 15/00 | Z N A A |
| C 1 2 N | 9/00  |         |
| 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 | 7/64  |         |
| C 1 1 C | 3/00  |         |
| C 1 2 P | 7/64  |         |
| C 1 2 R | 1:645 |         |

【手続補正書】

【提出日】平成26年8月13日(2014.8.13)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0295

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0295】

上で示されるように、全9エロンガーゼ変換効率がY9502株で83.3%と判定された一方、Z1978株では効率が改善された（すなわち85.3%）。この9エロンガーゼ活性の改善に基づいて、EgD9eS-L35Gは、PUFAの生合成のための機能的9エロンガーゼ／8デサチュラーゼ経路で使用される有用な変異遺伝子と見なされる。

本実施例で実証されるように、本明細書の発明の変異9エロンガーゼのいずれも、ヤロウィア・リポリティカ(Yarrowia lipolytica)の好ましい株の発現のために、適切なベクターに同様に導入し得る。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0296

【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0296】

以上、本発明を要約すると下記のとおりである。

1. (a) 9エロンガーゼ活性を有する変異ポリペプチドをコードし、

i) L35F変異；

ii) L35M変異；

iii) L35G変異；

iv) L35G変異と、S9A、S9D、S9G、S9I、S9K、S9Q、Q12K、A21D、A21T、A21V、V32F、Y84C、Q107E、L108G、G127L、W132T、M143N、M143W、L161T、L161Y、W168G、I179M、I179R、C236N、Q244N、A254W、およびA254Yからなる群から選択される、少なくとも1つのその他の変異；

v) L35G、A21V、L108G、およびI179R変異；

vi) L35G、W132T、およびI179変異；

vii) L35G、S9D、Y84C、およびI179R変異；

viii) L35G、Y84C、I179R、およびQ244N変異；

ix) L35G、A21V、W132T、I179R、およびQ244N変異；

x) K58RおよびI257T変異；

xi) D98G変異；

xii) L130MおよびV243A変異；および

i) K58R、L35F、L35G、L35M、S9A、S9D、S9G、S9I、S9K、S9Q、Q12K、A21D、A21T、A21V、V32F、Y84C、D98G、Q107E、L108G、G127L、L130M、W132T、M143N、M143W、L161T、L161Y、W168G、I179M、I179R、C236N、V243A、Q244N、A254W、A254Y、およびI257Tからなる群から選択される、少なくとも2つの変異を含んでなる任意の組み合わせ

からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸変異によって配列番号10と異なる、配列番号22に記載のアミノ酸配列を有するヌクレオチド配列；

(b) (a)部分のヌクレオチド配列と同数のヌクレオチドからなり100%相補的である、(a)部分のヌクレオチド配列の相補体

を含んでなる、単離ポリヌクレオチド。

2. ヌクレオチド配列が、配列番号28、配列番号31、配列番号34、配列番号37、配列番号40、配列番号58、配列番号61、配列番号86、配列番号95、配列番号96、配列番号97、配列番号100、配列番号103、配列番号106、および配列番号109からなる群から選択される、上記1に記載の単離ポリヌクレオチド。

3. 上記1に記載の単離ポリヌクレオチドによってコードされる、9エロンガーゼ活性を有する変異ポリペプチド。

4. タンパク質配列が、配列番号29、配列番号32、配列番号35、配列番号38、配列番号41、配列番号59、配列番号62、配列番号87、配列番号101、配列番号104、配列番号107、および配列番号110からなる群から選択される、上記3に記載の変異ポリペプチド。

5. 9エロンガーゼ活性が、配列番号10に記載のポリペプチドの9エロンガーゼ活性と少なくとも機能的にほぼ同等である、上記3または4に記載の変異ポリペプチド。

6. リノール酸からエイコサジエン酸への%基質変換が、配列番号10に記載のポリペプチドのリノール酸からエイコサジエン酸への%基質変換と比べて、少なくとも110%である、上記5に記載の変異ポリペプチド。

7. リノール酸からエイコサジエン酸への%基質変換が、配列番号10に記載のポリペプチドのリノール酸からエイコサジエン酸への%基質変換と比べて、少なくとも120%である、上記6に記載の変異ポリペプチド。

8. 少なくとも1つの調節制御配列に作動可能に連結された、上記1に記載の単離ポリヌ

クレオチドを含んでなる組換えコンストラクト。

9. 上記1に記載の単離ポリヌクレオチドを含んでなる、形質転換細胞。

10. 前記細胞が、植物、細菌、酵母、藻類、ユーグレナ属、ストラメノパイル、卵菌綱、および真菌からなる群から選択される、上記9に記載の形質転換細胞。

11. 細胞がその乾燥細胞質量の少なくとも約25%を油として產生する油性酵母である、上記10に記載の形質転換細胞。

12. 油性酵母が、少なくとも1つの調節配列に作動可能に連結された单離ポリヌクレオチドを含んでなる、少なくとも1つの組換えDNAコンストラクトをさらに含んでなり、組換えDNAコンストラクトが、4デサチュラーゼ、5デサチュラーゼ、8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、C<sub>14</sub>/C<sub>16</sub>エロンガーゼ、C<sub>16</sub>/C<sub>18</sub>エロンガーゼ、C<sub>18</sub>/C<sub>20</sub>エロンガーゼ、およびC<sub>20</sub>/C<sub>22</sub>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、上記11に記載の形質転換細胞。

13. 油性酵母によって產生される油が、アラキドン酸、エイコサジエン酸、エイコサベントエン酸、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12に記載の形質転換細胞。

14. 油性酵母が、ヤロウイア(*Yarrowia*)、カンジダ(*Candida*)、ロドトルラ(*Rhodotorula*)、ロドスボリジウム(*Rhodosporidium*)、クリプトコッカス(*Cryptococcus*)、トリコスボロン(*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10または11に記載の形質転換細胞。

15. 細胞がヤロウイア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)である、上記14に記載の形質転換細胞。

16. a) i) 少なくとも1つの調節配列に作動可能に連結され、9エロンガーゼ活性を有する変異ポリペプチドをコードする单離ポリヌクレオチドを含んでなり、

(a) L35F変異；

(b) L35M変異；

(c) L35G変異；

(d) L35G変異と、S9A、S9D、S9G、S9I、S9K、S9Q、Q12K、A21D、A21T、A21V、V32F、Y84C、Q107E、L108G、G127L、W132T、M143N、M143W、L161T、L161Y、W168G、I179M、I179R、C236N、Q244N、A254W、およびA254Yからなる群から選択される、少なくとも1つのその他の変異；

(e) L35G、A21V、L108G、およびI179R変異；

(f) L35G、W132T、およびI179変異；

(g) L35G、S9D、Y84C、およびI179R変異；

(h) L35G、Y84C、I179R、およびQ244N変異；

(i) L35G、A21V、W132T、I179R、およびQ244N変異；

(j) K58RおよびI257T変異；

(k) D98G変異；

(l) L130MおよびV243A変異；および

(m) K58R、L35F、L35G、L35M、S9A、S9D、S9G、S9I、S9K、S9Q、Q12K、A21D、A21T、A21V、V32F、Y84C、D98G、Q107E、L108G、G127L、L130M、W132T、M143N、M143W、L161T、L161Y、W168G、I179M、I179R、C236N、V243A、Q244N、A254W、A254Y、およびI257Tからなる群から選択される少なくとも2つの変異を含んでなる任意の組み合わせ

からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸変異によって、配列番号10と異なる、配列番号22に記載のアミノ酸配列を有する組換えコンストラクト；および

i i ) リノール酸および - リノレン酸からなる群から選択される基質脂肪酸源を含んでなる、油性酵母を備えるステップと；

b ) 9 エロンガーゼ活性を有する変異ポリペプチドをコードする組換えコンストラクトが発現され、基質脂肪酸が生産物脂肪酸に変換される条件下で、ステップ( a )の酵母を培養するステップで、ここでリノール酸がエイコサジエン酸に変換され、 - リノレン酸がエイコサトリエン酸に変換される、該ステップと；

c ) 任意選択的に、ステップ( b )の生産物脂肪酸を回収するステップとを含んでなる多価不飽和脂肪酸を生産する方法。

17 . 上記 9 に記載の油性酵母から得られる微生物油。

18 . 乾燥細胞質量の質量 % として測定して少なくとも 22 . 5 質量 % のエイコサペンタエン酸を含んでなる油を產生し、配列番号 59 に記載のアミノ酸配列を含んでなる少なくとも 1 つの変異 9 エロンガーゼポリペプチドを含んでなる、組換え微生物宿主細胞。

#### 【手続補正 3】

【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 ) 9 エロンガーゼ活性を有する変異ポリペプチドをコードし、

i ) L 35 F 変異；

ii ) L 35 M 変異；

iii ) L 35 G 変異；

iv ) L 35 G 変異と、 S 9 A 、 S 9 D 、 S 9 G 、 S 9 I 、 S 9 K 、 S 9 Q 、 Q 12 K 、 A 21 D 、 A 21 T 、 A 21 V 、 V 32 F 、 Y 84 C 、 Q 107 E 、 L 108 G 、 G 127 L 、 W 132 T 、 M 143 N 、 M 143 W 、 L 161 T 、 L 161 Y 、 W 168 G 、 I 179 M 、 I 179 R 、 C 236 N 、 Q 244 N 、 A 254 W 、 および A 254 Y からなる群から選択される、少なくとも 1 つのその他の変異；

v ) L 35 G 、 A 21 V 、 L 108 G 、 および I 179 R 変異；

vi ) L 35 G 、 W 132 T 、 および I 179 変異；

vii ) L 35 G 、 S 9 D 、 Y 84 C 、 および I 179 R 変異；

viii ) L 35 G 、 Y 84 C 、 I 179 R 、 および Q 244 N 変異；

ix ) L 35 G 、 A 21 V 、 W 132 T 、 I 179 R 、 および Q 244 N 変異；

x ) K 58 R および I 257 T 変異；

xi ) D 98 G 変異；

xii ) L 130 M および V 243 A 変異； および

i ) K 58 R 、 L 35 F 、 L 35 G 、 L 35 M 、 S 9 A 、 S 9 D 、 S 9 G 、 S 9 I 、 S 9 K 、 S 9 Q 、 Q 12 K 、 A 21 D 、 A 21 T 、 A 21 V 、 V 32 F 、 Y 84 C 、 D 98 G 、 Q 107 E 、 L 108 G 、 G 127 L 、 L 130 M 、 W 132 T 、 M 143 N 、 M 143 W 、 L 161 T 、 L 161 Y 、 W 168 G 、 I 179 M 、 I 179 R 、 C 236 N 、 V 243 A 、 Q 244 N 、 A 254 W 、 A 254 Y 、 および I 257 T からなる群から選択される、少なくとも 2 つの変異を含んでなる任意の組み合わせ

からなる群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸変異によって配列番号 10 と異なる、配列番号 22 に記載のアミノ酸配列を有するヌクレオチド配列；

( b ) ( a ) 部分のヌクレオチド配列と同数のヌクレオチドからなり 100 % 相補的である、 ( a ) 部分のヌクレオチド配列の相補体を含んでなる、単離ポリヌクレオチド。

#### 【請求項 2】

請求項 1 に記載の単離ポリヌクレオチドによってコードされる、 9 エロンガーゼ活性を有する変異ポリペプチド。

**【請求項3】**

少なくとも1つの調節制御配列に作動可能に連結された、請求項1に記載の単離ポリヌクレオチドを含んでなる組換えコンストラクト。

**【請求項4】**

請求項1に記載の単離ポリヌクレオチドを含んでなる、形質転換細胞。

**【請求項5】**

a) i) 少なくとも1つの調節配列に作動可能に連結され、9エロンガーゼ活性を有する変異ポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチドを含んでなり、

(a) L 3 5 F 変異；

(b) L 3 5 M 変異；

(c) L 3 5 G 変異；

(d) L 3 5 G 変異と、S 9 A、S 9 D、S 9 G、S 9 I、S 9 K、S 9 Q、Q 1 2 K、A 2 1 D、A 2 1 T、A 2 1 V、V 3 2 F、Y 8 4 C、Q 1 0 7 E、L 1 0 8 G、G 1 2 7 L、W 1 3 2 T、M 1 4 3 N、M 1 4 3 W、L 1 6 1 T、L 1 6 1 Y、W 1 6 8 G、I 1 7 9 M、I 1 7 9 R、C 2 3 6 N、Q 2 4 4 N、A 2 5 4 W、およびA 2 5 4 Y からなる群から選択される、少なくとも1つのその他の変異；

(e) L 3 5 G、A 2 1 V、L 1 0 8 G、およびI 1 7 9 R 変異；

(f) L 3 5 G、W 1 3 2 T、およびI 1 7 9 変異；

(g) L 3 5 G、S 9 D、Y 8 4 C、およびI 1 7 9 R 変異；

(h) L 3 5 G、Y 8 4 C、I 1 7 9 R、およびQ 2 4 4 N 変異；

(i) L 3 5 G、A 2 1 V、W 1 3 2 T、I 1 7 9 R、およびQ 2 4 4 N 変異；

(j) K 5 8 R およびI 2 5 7 T 変異；

(k) D 9 8 G 変異；

(l) L 1 3 0 M およびV 2 4 3 A 変異； および

(m) K 5 8 R、L 3 5 F、L 3 5 G、L 3 5 M、S 9 A、S 9 D、S 9 G、S 9 I、S 9 K、S 9 Q、Q 1 2 K、A 2 1 D、A 2 1 T、A 2 1 V、V 3 2 F、Y 8 4 C、D 9 8 G、Q 1 0 7 E、L 1 0 8 G、G 1 2 7 L、L 1 3 0 M、W 1 3 2 T、M 1 4 3 N、M 1 4 3 W、L 1 6 1 T、L 1 6 1 Y、W 1 6 8 G、I 1 7 9 M、I 1 7 9 R、C 2 3 6 N、V 2 4 3 A、Q 2 4 4 N、A 2 5 4 W、A 2 5 4 Y、およびI 2 5 7 T からなる群から選択される少なくとも2つの変異を含んでなる任意の組み合わせ

からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸変異によって、配列番号10と異なる、配列番号22に記載のアミノ酸配列を有する組換えコンストラクト； および

ii) リノール酸および -リノレン酸からなる群から選択される基質脂肪酸源を含んでなる、油性酵母を備えるステップと；

b) 9エロンガーゼ活性を有する変異ポリペプチドをコードする組換えコンストラクトが発現され、基質脂肪酸が生産物脂肪酸に変換される条件下で、ステップ(a)の酵母を培養するステップで、ここでリノール酸がエイコサジエン酸に変換され、 -リノレン酸がエイコサトリエン酸に変換される、該ステップと；

c) 任意選択的に、ステップ(b)の生産物脂肪酸を回収するステップとを含んでなる多価不飽和脂肪酸を生産する方法。

**【請求項6】**

請求項4に記載の油性酵母から得られる微生物油。

**【請求項7】**

乾燥細胞質量の質量%として測定して少なくとも22.5質量%のエイコサペンタエン酸を含んでなる油を产生し、配列番号59に記載のアミノ酸配列を含んでなる少なくとも1つの変異 9エロンガーゼポリペプチドを含んでなる、組換え微生物宿主細胞。