(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 772 650**

(51) Int. Cl.:

C12N 1/12 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
C12N 15/54 (2006.01)
C12P 33/00 (2006.01)
C07C 401/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.10.2015** **PCT/JP2015/078560**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **14.04.2016** **WO16056610**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2015** **E 15848702 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2019** **EP 3205728**

(54) Título: **Procedimiento para producir 7-deshidrocolesterol y vitamina D3**

(30) Prioridad:

08.10.2014 JP 2014207009

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.07.2020

(73) Titular/es:

KYOWA HAKKO BIO CO., LTD. (100.0%)
1-6-1, Ohtemachi, Chiyoda-ku
Tokyo 100-8185, JP

(72) Inventor/es:

UJIHARA, TETSURO y
MITSUHASHI, SATOSHI

(74) Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 772 650 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para producir 7-deshidrocolesterol y vitamina D3.

Campo técnico

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir 7-deshidrocolesterol (en adelante, asimismo denominado “7DHC”) usando microorganismos de Labyrinthulea, y a un procedimiento para producir vitamina D3 que comprende producir 7DHC mediante el procedimiento para producir 7DHC de la presente invención e irradiar, con luz ultravioleta, el 7DHC producido, producido por el procedimiento de producción.

Antecedentes de la técnica

La vitamina D3 es una vitamina implicada en diversas funciones, incluido el mantenimiento del metabolismo y la homeostasis del calcio y el fósforo, y la formación de huesos, y se produce a partir del colesterol en el cuerpo humano. Sin embargo, debido a que la cantidad de vitamina D3 producida en el cuerpo es menor que las cantidades requeridas, la vitamina D3 debe ser ingerida a través de alimentos, productos farmacéuticos o suplementos.

La vitamina D3 contenida en los productos farmacéuticos y suplementos se produce principalmente mediante la irradiación ultravioleta de 7DHC producido por transformación química a partir del colesterol obtenido de la lana. Sin embargo, el uso de materiales derivados de animales como materiales fuente de productos farmacéuticos y suplementos tiende a evitarse debido a las preocupaciones de la EEB y la zoonosis, y existe la necesidad de vitamina D3 no derivada de animales. La vitamina D3 no derivada de animales puede producirse mediante irradiación ultravioleta de 7DHC no derivado de animal.

Generalmente, un esterol biosintetizado por microorganismos es ergosterol. Sin embargo, algunos miembros de los microorganismos de Labyrinthulea son conocidos por biosintetizar el colesterol (documentos 1 a 3 no de patente). El 7DHC se convierte en colesterol por la 7DHC reductasa. Sin embargo, aunque los microorganismos de Labyrinthulea acumulan colesterol, no hay informes de que los microorganismos de Labyrinthulea acumulen 7DHC.

La esterol 24-C-metiltransferasa presenta una actividad para introducir un grupo metilo en la posición 24 de una cadena principal esteroide de zimosterol (en adelante denominada “actividad de esterol 24-C-metiltransferasa” o “actividad de SMT”). La actividad de SMT es esencial para la biosíntesis de ergosterol, pero no está implicada en la biosíntesis de colesterol.

Además, no existe ningún informe de que los microorganismos de Labyrinthulea que biosintetizan el colesterol tengan actividad de SMT, y produzcan y acumulen 7DHC al reducir o eliminar la actividad de SMT.

El documento DE 102 03 352 A1 describe un método para producir 7DHC utilizando el cultivo de organismos como la levadura.

Técnica relacionada

Documento no de patente

Documento 1 no de patente: Exp. Mycol. (1989) 13:183-195
Documento 2 no de patente: Lipids (1997) 32:839-845
Documento 3 no de patente: J. Am. Oil Chem. Soc. (2012) 89:135-143

Divulgación de la invención

Problemas que debe resolver la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para producir eficientemente 7DHC usando un microorganismo de Labyrinthulea, y un procedimiento para producir vitamina D3 que comprende irradiar, con luz ultravioleta, 7DHC producido por el procedimiento de producción.

Medios para resolver los problemas

La presente invención está definida por las reivindicaciones independientes. Las formas de realización preferidas están definidas por las reivindicaciones dependientes.

La presente invención se refiere a los (1) a (6) siguientes.

(1) Un procedimiento para producir 7-deshidrocolesterol (en adelante, “7DHC”), que comprende:

cultivar, en un medio, un microorganismo de Labyrinthulea productor de 7DHC en el que la actividad de esterol 24-C-metiltransferasa (en adelante, “actividad de SMT”) se pierde en comparación a una cepa madre;

permitir que se produzca y acumule 7DHC en el cultivo; y

recoger el 7DHC del cultivo.

(2) El procedimiento de producción descrito en (1) anterior, en el que el microorganismo de Labyrinthulea en el que se pierde la actividad de SMT en comparación con la cepa madre es un microorganismo de Labyrinthulea en el que la actividad de SMT se pierde en comparación con la cepa madre mediante supresión, sustitución o adición de por lo menos una base en un gen que está presente en el ADN cromosómico de la cepa madre y codifica una proteína que presenta actividad de SMT.

(3) El procedimiento de producción descrito en (1) anterior, en el que el microorganismo de Labyrinthulea en el que se pierde la actividad de SMT en comparación con la cepa madre es un microorganismo de Labyrinthulea en el que la actividad de SMT se pierde en comparación con la cepa madre, que se obtiene transformando la cepa madre con un ADN que codifica un ARN que presenta una secuencia complementaria a un ARN mensajero transcrito a partir de un gen presente en el ADN cromosómico de la cepa madre y que codifica una proteína que presenta actividad de SMT, y forma un conjugado con el ARN mensajero.

(4) El procedimiento de producción descrito en (2) o (3) anteriormente, en el que el gen que codifica una proteína que presenta actividad de SMT es un gen que presenta cualquiera de los siguientes ADN [1] a [5]:

[1] un ADN que codifica una proteína que presenta la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº: 2;

[2] un ADN que codifica una proteína homóloga que presenta una identidad de por lo menos 95% con la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº: 2, y que presenta actividad de SMT;

[3] un ADN que presenta la secuencia de bases representada por SEC ID nº: 1;

[4] un ADN que se hibrida con un ADN que consiste en una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases representada por SEC ID nº: 1 en condiciones restrictivas, y codifica una proteína homóloga que presenta actividad de SMT; y

[5] un ADN que presenta una identidad de por lo menos 95% con la secuencia de bases representada por SEC ID nº: 1, y que codifica una proteína homóloga que presenta actividad de SMT.

(5) El procedimiento de producción descrito en uno cualquiera de (1) a (4) anteriores, en el que el microorganismo de Labyrinthulea es un microorganismo de Labyrinthulea del género *Schizochytorium, Thraustochytrium, Aurantiochytrium, Parietichytrium, Labyrinthula, Althornia, Aplanochytrium, Japonochytrium, Labyrinthuloides, Ulkenia, Oblongichytrium, Botryochytrium*, o *Sicyoidochytrium*.

(6) Un procedimiento para producir vitamina D3, que comprende producir 7DHC mediante un procedimiento para producir 7DHC según uno cualquiera de (1) a (5) anteriores; e irradiar el 7DHC producido anterior con luz ultravioleta.

Efectos de la invención

Según la presente invención, se puede proporcionar un procedimiento para producir 7DHC de manera eficiente usando un microorganismo de Labyrinthulea, y un procedimiento para producir vitamina D3 que comprende producir 7DHC mediante el procedimiento para producir 7DHC de la presente invención e irradiar, con luz ultravioleta, 7DHC producido por el procedimiento de producción.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una vista de la cromatografía de gases que representa que una cepa obtenida transformando una levadura en germinación deficiente en erg6 con un ADN que presenta la secuencia de bases representada por la SEC ID NO: 1 produce y acumula ergosterol. El eje horizontal representa el tiempo de retención (min) en la cromatografía de gases.

La figura 2 es una vista de la cromatografía de gases que muestra que un microorganismo de Labyrinthulea en

el que se pierde la actividad de SMT en comparación con una cepa madre produce y acumula 7DHC. El eje horizontal representa el tiempo de retención (min) en la cromatografía de gases.

Formas de realización para poner en práctica la invención

1. Microorganismo de Labyrinthulea utilizado en el procedimiento de producción de la presente invención

El microorganismo de Labyrinthulea utilizado en el procedimiento de producción de la presente invención es un Labyrinthulea productor de 7DHC en el que la actividad de SMT se pierde en comparación con una cepa madre.

En la presente memoria, “cepa madre” significa una cepa original sometida a modificación génica, transformación y similares.

Una cepa original sometida a transformación por introducción de genes asimismo se denomina “cepa hospedante”.

La cepa madre no está particularmente limitada, siempre que sea un microorganismo de Labyrinthulea que tenga la actividad de SMT y sea capaz de producir colesterol o 7DHC hasta el punto de que pueda recogerse de las células o el medio después del cultivo en un medio. Los ejemplos preferidos incluyen microorganismos de Labyrinthulea del género *Schizochytrium, Thraustochytrium, Aurantiochytrium, Parietichytrium, Labyrinthula, Althornia, Aplanochytrium, Japonochytrium, Labyrinthuloides, Ulkenia, Oblongichytrium, Botryochytrium*, o *Sicyoidochytrium*. Los ejemplos más preferidos incluyen microorganismos de Labyrinthulea del género *Schizochytorium, Thraustochytrium, Aurantiochytrium*, o *Parietichytrium*. Los ejemplos preferidos adicionales incluyen *Aurantiochytrium limacinum* ATCC MYA-1381, *Thraustochytrium aureum* ATCC34304, *Thraustochytrium sp*. ATCC26185, *Schizochytrium sp*. AL1Ac, *Schizochytrium aggregatum* ATCC28209, *Ulkenia sp*. ATCC 28207, *Schizochytrium sp*. SEK210 (NBRC 102615), *Schizochytrium sp*. SEK345 (NBRC 102616), *Botryochytrium radiatum* SEK353 (NBRC 104107), y *Parietichytrium sarkarianum* SEK364 (FERM ABP-11298). Los ejemplos muy preferidos incluyen *Aurantiochytrium limacinum* ATCC MYA-1381.

La actividad de SMT se refiere a una actividad para introducir un grupo metilo en la posición 24 de una cadena principal de esteroide de zimosterol.

Los ejemplos del microorganismo de Labyrinthulea en el que se pierde la actividad de SMT en comparación con una cepa madre incluyen un microorganismo de Labyrinthulea en el que la actividad de SMT se pierde en comparación con una cepa madre mediante la eliminación, sustitución o adición de por lo menos una base en un gen que está presente en el ADN cromosómico de la cepa madre y codifica una proteína que presenta actividad de SMT, y un microorganismo de Labyrinthulea en el que la actividad de SMT se pierde en comparación con una cepa madre, obteniéndose transformando la cepa madre con un ADN que codifica un ARN que presenta una secuencia complementaria a un ARN mensajero transcrito a partir del gen y forma un conjugado con el ARN mensajero.

La “proteína que presenta actividad de SMT” no está limitada, siempre que sea una proteína codificada por un gen en un cromosoma genómico de un microorganismo de Labyrinthulea, y que presente actividad de SMT, pero es preferentemente la siguiente proteína [1] o [2]:

[1] una proteína que presenta la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº: 2; o

[2] una proteína homóloga que presenta por lo menos 95%, preferentemente por lo menos 97%, más preferentemente por lo menos 98%, todavía más preferentemente por lo menos 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº: 2, y que presenta actividad de SMT.

La “proteína homóloga” se refiere a una proteína que poseen los organismos que se encuentran en la naturaleza, y está codificada por un gen que se cree que comparte el mismo origen evolutivo con un gen que codifica una proteína original, debido a que la proteína homóloga presenta una estructura y funciones similares a las de la proteína original.

La identidad de las secuencias de aminoácidos y las secuencias de bases se puede determinar usando el algoritmo BLAST [Pro. NATdomainl. Acad. Sci. USA, 90, 5873(1993)] por Karlin y Altschul, y FASTA [Methods Enzymol., 183, 63 (1990)]. Se han desarrollado programas denominados BLASTN y BLASTX basados en el algoritmo BLAST [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)]. Para el análisis de secuencias de bases usando BLASTN basado en BLAST, los parámetros son, por ejemplo, puntuación = 100, y longitud de palabra = 12. Para el análisis de secuencias de aminoácidos usando BLASTX basado en BLAST, los parámetros, por ejemplo, puntuación = 50, y longitud de palabra = 3. Cuando se usan los programas BLAST y BLAST con espacios vacíos, los programas se usan con sus parámetros predeterminados. Se conocen técnicas específicas para estos métodos de análisis.

El “gen que codifica una proteína que presenta actividad de SMT” no está limitado, siempre que sea un gen presente en un cromosoma genómico de un microorganismo de Labyrinthulea, y codifique una proteína que

presente actividad de SMT, pero preferentemente es un gen que presenta cualquiera de los ADN [3] a [6] siguientes:

[3] un ADN que codifica la proteína [1] o [2] anterior;

[4] un ADN que presenta la secuencia de bases representada por SEC ID nº: 1;

[5] un ADN que se hibrida con un ADN que consiste en una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases representada por SEC ID nº: 1 en condiciones restrictivas, y codifica una proteína homóloga que presenta actividad de SMT; y

[6] un ADN que presenta por lo menos 95%, preferentemente por lo menos 97%, más preferentemente por lo menos 98%, todavía más preferentemente por lo menos 99% de identidad con la secuencia de bases representada por SEC ID nº: 1, y que codifica una proteína homóloga que presenta actividad de SMT.

El “gen” se refiere a un ADN que puede comprender, además de una región codificante de proteínas, una región reguladora de la transcripción, una región promotora, una región terminadora, y similares.

El término “hibridar” significa que un ADN que presenta una secuencia de bases específica, o una parte del ADN, forma un conjugado con otro ADN de manera complementaria. En consecuencia, un ADN de una secuencia de bases específica, o una secuencia de bases parcial del ADN, puede ser un ADN que sea útil como sonda para el análisis de transferencia Northern o Southern, o un ADN de una longitud que pueda usarse como cebador oligonucleotídico para análisis de PCR. Los ejemplos del ADN usado como sonda incluyen el ADN de por lo menos 100 bases, preferentemente por lo menos 200 bases, más preferentemente por lo menos 500 bases. Los ejemplos del ADN usado como cebador incluyen el ADN de por lo menos 10 bases, preferentemente por lo menos 15 bases.

Las técnicas experimentales de hibridación de ADN son bien conocidas. Por ejemplo, los experimentos se pueden realizar después de establecer las condiciones de hibridación según los libros de texto estándar, incluyendo Molecular Cloning, Segunda Edición, Tercera Edición (2001), Methods for GenERdomainal and Molecular BactEriology, ASM Press (1994), e Immunology methods manual, Academic press (Molecular).

Además, asimismo según un manual de instrucciones que acompaña a un kit de hibridación disponible comercialmente, se puede obtener un ADN que hibrida en condiciones restrictivas. El kit de hibridación disponible en el mercado puede incluir, por Random Primed ADN Labeling Kit de etiquetado de ADN preparado al azar (fabricado por Roche Diagnostics GmbH), con el que se produce una sonda mediante un método de cebado aleatorio, y la hibridación se realiza en condiciones restrictivas, y similares.

Las condiciones restrictivas descritas anteriormente pueden incluir condiciones en las que un filtro en el que se ha inmovilizado un ADN y un ADN sonda se incuban durante la noche a 42ºC en una disolución que contiene formamida al 50%, 5 x SSC (cloruro de sodio 750 mM y citrato de sodio 75 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7.6), 5 x disolución de Denhardt, 10% de sulfato de dextrano y 20 μg/l de un ADN de esperma de salmón desnaturalizado, y después el filtro se lava, por ejemplo, con un 0.2 x disolución de SSC a aproximadamente 65ºC.

Las diversas condiciones descritas anteriormente asimismo se pueden establecer añadiendo o cambiando un reactivo de bloqueo que se usará para suprimir el fondo en el experimento de hibridación. La adición del reactivo de bloqueo puede ir acompañada de un cambio en las condiciones de hibridación para adaptar las condiciones.

El ADN que puede hibridarse en las condiciones restrictivas descritas anteriormente puede incluir un ADN que consiste en una secuencia nucleotídica que presenta por lo menos 95% o más, preferentemente 97% o más, más preferentemente 98% o más, y todavía más preferentemente 99% o más de identidad con la secuencia de bases representada por SEC ID Nº: 1 cuando se realiza el cálculo basado en los parámetros descritos anteriormente usando, por ejemplo, el programa tal como BLAST o FASTA descritos anteriormente.

Con respecto a la introducción de la eliminación, sustitución o adición de por lo menos una base en el gen que codifica una proteína que presenta actividad de SMT, el número y el tipo de base no están limitados, siempre que la eliminación, sustitución o adición de por lo menos una base elimine la actividad de SMT. Sin embargo, los ejemplos de los mismos incluyen en el promotor y la región reguladora de la transcripción, la eliminación de por lo menos una base, preferentemente por lo menos 10 bases, más preferentemente por lo menos 20 bases, más preferentemente toda la región; en la región codificante, la eliminación de por lo menos una base, preferentemente por lo menos 10 bases, más preferentemente por lo menos 20 bases, más preferentemente por lo menos 100 bases, particularmente preferentemente por lo menos 200 bases, todavía más preferentemente toda la región de la región codificante.

La sustitución de una o más bases puede ser una sustitución que introduce un codón sin sentido mediante la sustitución de por lo menos una base dentro de 150 bases, preferentemente 100 bases, más preferentemente 50 bases, particularmente preferentemente 30 bases, todavía más preferentemente 20 bases desde el extremo 5’ de la región codificante.

La adición de por lo menos una base puede ser una adición de un fragmento de ADN de por lo menos una base, preferentemente por lo menos 50 bases, más preferentemente por lo menos 100 bases, más preferentemente por lo menos 200 bases, particularmente preferentemente por lo menos 500 bases, todavía más preferentemente por lo menos 1 kb, inmediatamente después de una base dentro de 150 bases, preferentemente 100 bases, más preferentemente 50 bases, particularmente preferentemente 30 bases, todavía más preferentemente 20 bases desde el extremo 5' de la región codificante. Todavía más preferentemente, la adición de una o más bases es una inserción de un gen tal como un gen resistente a la higromicina.

Los ejemplos del ARN que presenta una secuencia complementaria a un ARN mensajero transcrito a partir de un gen que codifica una proteína que presenta actividad de SMT y forma un conjugado con el ARN mensajero incluyen un ARN que forma un conjugado con el ARN mensajero en 10 a 300 bases, preferentemente 10 a 200 bases, todavía más preferentemente 10 a 100 bases. La posición en la que se forma un conjugado de manera complementaria en el ARN mensajero puede ser cualquier posición siempre que se inhiba la traducción desde el ARN mensajero, pero es preferentemente el lado 5'-terminal del ARN mensajero.

Al ARN que forma un conjugado con el ARN mensajero de manera complementaria, se puede añadir un ARN que forma una estructura de orden superior para inhibir la traducción.

A un ADN que codifica el ARN que forma un conjugado con el ARN mensajero de manera complementaria, se puede añadir un promotor y un terminador para transcribir el ADN en un microorganismo de Labyrinthulea.

Los ejemplos de dicho promotor y terminador incluyen el promotor de piruvato cinasa y el terminador de actina descritos en el ejemplo 1.

Una reducción o pérdida de la actividad de SMT en comparación con la cepa madre se puede confirmar, por ejemplo, cuantificando la cantidad del transcrito del ADN de cualquiera de [3] a [6] anteriores por análisis Northern o RT-PCR, y comparando el resultado con la cepa madre; cuantificando el rendimiento de la proteína de [1] o [2] anterior mediante SDS-PAGE o un ensayo que usan un anticuerpo, y comparando el resultado con la cepa madre; o comparando la cantidad de esteroles subproducidos producidos por el microorganismo de Labyrinthulea de la presente invención con la de la cepa madre según el método descrito en el ejemplo 2.

Ser capaz de producir 7DHC significa la posesión de la capacidad de producir 7DHC hasta el punto de que el 7DHC se pueda recoger de las células o el medio de un microorganismo de Labyrinthulea cultivado en el que la actividad de SMT se reduce o se pierde en comparación con la cepa madre mencionada anteriormente.

2. Método de producción del microorganismo de Labyrinthulea usado en el procedimiento de producción de la presente invención

El microorganismo de Labyrinthulea usado en el procedimiento de producción de la presente invención puede producirse eliminando la actividad de SMT en comparación con la cepa madre mediante la eliminación, sustitución o adición de por lo menos una base en un gen que está presente en el ADN cromosómico de la cepa madre y presenta el ADN de cualquiera de [3] a [6].

El método para introducir la supresión, sustitución o adición de por lo menos una base en un gen que está presente en el ADN cromosómico de la cepa madre no está limitado, y pueden usarse métodos habituales tales como la mutagénesis común, métodos de sustitución de genes que usan técnicas de ADN recombinante, y similares, siempre que se pueda introducir una mutación en el ADN cromosómico del microorganismo de Labyrinthulea.

La cepa madre puede ser una cepa de tipo salvaje, siempre que sea un microorganismo de Labyrinthulea capaz de producir colesterol y que presente actividad de SMT. Cuando la cepa de tipo salvaje carece de la capacidad de producir colesterol, la cepa madre puede ser una cepa reproductora que ha sido provista artificialmente de la capacidad de producir colesterol.

El microorganismo de Labyrinthulea puede dotarse artificialmente de la capacidad productora de colesterol usando, por ejemplo, los siguientes métodos:

(a) un método que debilita o cancela por lo menos uno de los mecanismos que controlan la biosíntesis del colesterol;

(b) un método que mejora la expresión de por lo menos una de las enzimas implicadas en la biosíntesis de colesterol;

(c) un método que aumenta el número de copias de por lo menos uno de los genes enzimáticos implicados en la biosíntesis del colesterol; y

(d) un método que selecciona una estirpe celular que presenta mayor resistencia a los análogos del colesterol en comparación con la cepa de tipo salvaje.

Estos métodos conocidos pueden usarse solos o en combinación.

La cepa madre que se puede usar para preparar el microorganismo de Labyrinthulea que presenta una capacidad productora de colesterol puede ser cualquier cepa, siempre que sea un microorganismo de Labyrinthulea al que se aplican los métodos anteriores (a) a (d). Los ejemplos preferidos incluyen microorganismos Labyrinthulea del género *Schizochytrium, Thraustochytrium, Aurantiochytrium, Parietichytrium, Labyrinthula, Althornia, Aplanochytrium, Japonochytrium, Labyrinthuloides, Ulkenia, Oblongichytrium, Botryochytrium*, y *Sicyoidochytrium*. Los ejemplos más preferidos incluyen microorganismos de Labyrinthulea del género *Schizochytorium, Thraustochytrium, Aurantiochytrium*, y *Parietichytrium*. Otros ejemplos preferidos incluyen *Aurantiochytrium limacinum* ATCC MYA-1381, *Thraustochytrium aureum* ATCC34304, *Thraustochytrium sp*. ATCC26185, *Schizochytrium sp*. AL1Ac, *Schizochytrium aggregatum* ATCC28209, *Ulkenia sp*. ATCC 28207, *Schizochytrium sp*. SEK210 (NBRC 102615), *Schizochytrium sp*. SEK345 (NBRC 102616), *Botryochytrium radiatum* SEK353 (NBRC 104107), y *Parietichytrium sarkarianum* SEK364 (FERM ABP-11298). Los ejemplos más preferidos incluyen *Aurantiochytrium limacinum* ATCC MYA-1381.

La mutagénesis se puede lograr, por ejemplo, mediante un método que usa N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) (Microorganism Experiment Manual, 1986, p. 131, Kodansha Scientific), por irradiación ultravioleta, o similares.

Como ejemplo de métodos de sustitución de genes que usan técnicas de ADN recombinante, se crea un ADN recombinante mediante la introducción de sustitución, supresión o adición de por lo menos una base a un gen *in vitro*, y el ADN recombinante se introduce en la cepa madre para sustituir el gen presente originalmente en el cromosoma mediante, por ejemplo, recombinación homóloga o similar.

Los ADN de [3] a [6] anteriores se pueden obtener, por ejemplo, mediante PCR usando un oligoADN diseñado y sintetizado a partir de la secuencia de bases representada por SEC ID nº: 1, y usando un ADN cromosómico molde preparado a partir de un microorganismo de Labyrinthulea, según el método de Saito et al. [BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA (1963) 72:619-629].

Los ejemplos del ADN específico que se puede obtener incluyen ADN que presenta la secuencia de bases representada por la SEC ID nº: 1.

El ADN asimismo puede obtenerse usando un método de hibridación que usa una parte o la totalidad del ADN como sonda, un método que sintetiza químicamente el ADN que presenta la secuencia de bases usando técnicas conocidas, o similares.

El ADN de [3] anterior que codifica la proteína homóloga de [2] anterior, y los ADN que codifican las proteínas homólogas de [5] y [6] pueden obtenerse, por ejemplo, buscando en una base de datos de secuencias de genes una secuencia de bases que presenta por lo menos 95%, preferentemente por lo menos 97%, más preferentemente por lo menos 98%, todavía más preferentemente por lo menos 99% de identidad con la secuencia de base representada por la SEC ID Nº: 1, o buscando en varias bases de datos de secuencias de proteínas una secuencia de aminoácidos que presenta por lo menos 95%, preferentemente por lo menos 97%, más preferentemente por lo menos 98%, todavía más preferentemente por lo menos 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº: 2, y llevando a cabo los mismos métodos usados para obtener los ADN anteriores, usando un ADN sonda o un ADN cebador que puede diseñarse a partir de la secuencia de bases o la secuencia de aminoácidos obtenida después de la búsqueda, y un microorganismo que presenta el ADN.

La secuencia de bases de ADN puede determinarse mediante análisis con un analizador de secuencias de bases, como un secuenciador de ADN 373A (fabricado por PerkinElmer Co., Ltd.), usando un método de análisis de secuencia de bases habitual, por ejemplo, como el método didesoxi [PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES (1977) 74(12):5463-5467].

Cuando se descubre que el ADN obtenido es un ADN de longitud parcial después de la determinación de su secuencia de bases, se puede obtener un ADN de longitud completa usando técnicas como la hibridación Southern con una biblioteca de ADN cromosómico, usando el ADN de longitud parcial como sonda.

Dichas técnicas se describen en, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001) [En la presente memoria en adelante, simplemente "Molecular Cloning, 3ª Ed."], Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997) (en la presente memoria en adelante, simplemente "Current Protocols in Molecular Biology"), Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982), Gene, 34, 315 (1985), Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985), J. Bacteriol., 182, 6884 (2000), Gene 77: 61-68, 1989, y similares.

Se puede usar cualquier método para la introducción del ADN recombinante en la cepa madre, siempre que el ADN se pueda introducir en un microorganismo de Labyrinthulea. Los ejemplos de tales métodos incluyen electroporación [Appl. Microbiol. Biotech., 52, 541 (1999)], y el método de protoplastos [J. Bacteriol., 159, 306 (1984)].

Si bien la sustitución de genes en un cromosoma de la cepa madre se puede lograr con métodos como el anterior, el método no se limita a los mismos, y asimismo se pueden usar otros métodos de sustitución de genes, siempre que se pueda sustituir un gen en un cromosoma de un microorganismo de Labyrinthulea.

Al introducir la eliminación, la sustitución o la adición de por lo menos una base en un gen en un cromosoma de la cepa madre, la actividad de la proteína codificada por el gen puede reducirse o eliminarse con buena probabilidad [An Introduction to Genetic Analysis. 7ª edición (2000), Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT et al., New York: W. H. Freeman]

Además, el microorganismo de Labyrinthulea usado en el procedimiento de producción de la presente invención asimismo puede producirse transformando la cepa madre con un ADN que codifica un ARN que presenta una secuencia complementaria a un ARN mensajero transcrito a partir de un gen que codifica una proteína que presenta actividad de SMT y forma un conjugado con el ARN mensajero.

El ADN que codifica un ARN que presenta una secuencia complementaria al ARN mensajero y forma un conjugado con el ARN mensajero puede prepararse, por ejemplo, permitiendo que se hibriden entre sí un oligoADN sintetizado basado en la secuencia de bases del ARN y un oligoADN que forma un conjugado con el oligoADN de manera complementaria.

Para producir un ARN que presenta una secuencia complementaria a un ARN mensajero transcrito a partir de un gen que codifica una proteína que presenta actividad de SMT y forma un conjugado con el ARN mensajero en una célula del microorganismo de Labyrinthulea, por ejemplo, asimismo es posible añadir promotor de piruvato cinasa y terminador de actina al ADN según el método descrito en el ejemplo 1.

Los ejemplos del método para transformar la cepa madre incluyen un método para sustituir una región de ADN cromosómico que no tiene influencia en la producción de 7DHC por el ADN usando un método de sustitución de genes a través de la técnica de ADN recombinante descrita anteriormente, o similar.

La producción y acumulación de 7DHC en un medio cultivado de un microorganismo de Labyrinthulea creado mediante los métodos anteriores puede confirmarse homogeneizando el microorganismo de Labyrinthulea con, por ejemplo, un ultrasonido o un Dyno-Mill después de separar las células del cultivo, y detectando el 7DHC presente en el extracto por cromatografía de gases después de la extracción con disolvente con, por ejemplo, cloroformo, hexano, butanol o similares.

3. Procedimiento de producción de 7DHC de la presente invención

Un procedimiento de producción de 7DHC de la presente invención es un procedimiento para producir 7DHC que comprende cultivar el microorganismo de Labyrinthulea creado mediante el uso de los métodos de la sección 2 anterior en un medio, y permitir que se produzca y acumule 7DHC en el medio, y recoger el 7DHC del cultivo.

El microorganismo de Labyrinthulea puede cultivarse inoculándolo en un medio adecuado, y cultivando las células según un método habitual.

El medio puede ser cualquier medio conocido. Los ejemplos de fuentes de carbono incluyen, además de hidratos de carbono tales como glucosa, fructosa y galactosa, aceites y grasas tales como ácido oleico y aceite de soja, y glicerol y acetato de sodio. La fuente de carbono puede usarse en una concentración de, por ejemplo, 20 a 300 g por litro de medio. En una forma de realización particularmente preferida, la fuente de carbono puede alimentarse para continuar el cultivo después de que se hayan consumido todas las fuentes de carbono originalmente contenidas en el medio. Al realizar el cultivo en estas condiciones, se puede consumir más fuente de carbono, y puede aumentar el rendimiento de 7DHC.

Los ejemplos de fuentes de nitrógeno incluyen nitrógeno orgánico tales como extractos de levadura, licores de maíz fermentados, polipeptona, glutamato de sodio y urea, y nitrógeno inorgánico tales como acetato de amonio, sulfato de amonio, cloruro de amonio, nitrato de sodio, nitrato de amonio, y amoníaco.

Las sales minerales, tal como el fosfato de potasio, se pueden usar en combinaciones apropiadas.

Preferentemente, después de preparar el medio, el pH del mismo se ajusta al intervalo de 4.0 a 9.5 añadiendo un ácido o base adecuado, y luego el medio se esteriliza con un autoclave.

Preferentemente, la temperatura de cultivo del microorganismo de Labyrinthulea se controla a una temperatura

que permite la producción de 7DHC. Típicamente, la temperatura de cultivo es 10 a 45ºC, preferentemente 20 a 37ºC.

Durante el cultivo, el pH es típicamente 3.5 a 9.5, preferentemente 4.5 a 9.5, todavía más preferentemente 5.0 a 8.0.

El período de cultivo puede ser, por ejemplo, 2 a 7 días, y el cultivo puede realizarse en condiciones de agitación aireada.

El microorganismo de Labyrinthulea que ha acumulado una alta concentración de 7DHC durante el cultivo puede obtenerse en alta concentración, típicamente de aproximadamente 20 a 100 g en términos de peso de células secas por litro del medio. La separación del medio de cultivo y el microorganismo de Labyrinthulea del cultivo puede realizarse usando un método habitual conocido por un experto en la materia, por ejemplo tal como centrifugación y filtración.

El microorganismo de Labyrinthulea separado del cultivo se homogeneiza con, por ejemplo, un ultrasonido o un Dyno-Mill, y se puede obtener 7DHC después de la extracción con disolvente, por ejemplo cloroformo, hexano o butanol. El método para extraer 7DHC y otros esteroles de las células de los microorganismos se describe en L. Parks et al. [Methods in Enzymology 111 Editado (1985) por L Rilling, L. Parks, C. Bottema, R. Rodriguez and Thomas Lewis, p. 333-339].

El 7DHC bruto así obtenido puede purificarse adicionalmente usando un método conocido por un experto en la materia, en particular el método descrito en Boselli E, Velazco V, Caboni Mf y Lercker G J, Chromatogr A. 2001 May 11; 917 (1-2): 239-44.

Asimismo es posible usar otros métodos, tales como los métodos usados para extraer el colesterol de la lana. En particular, un experto en la materia puede referirse a los métodos descritos en la patente US nº 2.688.623, o la patente US nº 2.650.929, o las patentes británicas nºs GB690879, GB646227 o GB613778.

En una forma de realización preferida de la presente invención, el 7DHC está presente en las células de Labyrinthulea en una proporción de más de 5%, preferentemente más de 10% del esterol total producido por el microorganismo de Labyrinthulea creado usando el método descrito en la sección 2 anterior.

4. Procedimiento de producción de vitamina D3 de la presente invención

Un procedimiento de producción de vitamina D3 de la presente invención es un procedimiento para producir vitamina D3 que comprende producir 7DHC mediante el procedimiento para producir 7DHC con un procedimiento de producción como se describe en la sección 3 anterior, e irradiar el 7DHC producido con luz ultravioleta.

La vitamina D3 puede producirse irradiando el 7DHC obtenido usando el procedimiento de producción de la sección 3 anterior con luz ultravioleta, tal como con una lámpara de mercurio, seguido de calentamiento. La temperatura de calentamiento es preferentemente 50 a 100ºC, todavía más preferentemente 80ºC a 100ºC. El tiempo de calentamiento es preferentemente 5 a 300 minutos, más preferentemente 10 a 100 minutos.

La vitamina D3 obtenida puede concentrarse mediante el uso de técnicas como la cromatografía de líquidos de alto rendimiento, y la cromatografía supercrítica, y puede recogerse para obtener vitamina D3 purificada altamente concentrada.

[Ejemplo 1 de referencia]

Una búsqueda de microorganismo de Labyrinthulea que acumula una cantidad significativa de colesterol

El 7DHC presenta una estructura en la cual se introduce un doble enlace en el carbono 7 del colesterol. Para crear un microorganismo de Labyrinthulea que produzca cantidades significativas de 7DHC a través de la modificación metabólica, en consecuencia es deseable que la cepa madre sea un microorganismo de Labyrinthulea que acumule una cantidad significativa de colesterol.

Con este fin, en el contexto de la presente invención se examina la productividad del colesterol de los microorganismos de Labyrinthulea depositados en instituciones oficiales, de la siguiente manera.

Aurantiochytrium sp. NBRC103268, *Aurantiochytrium sp*. NBRC103269, *Parietichytrium sarkarianum* NBRC104108, *Schizochytrium sp*. ATCC20888, y *Aurantiochytrium limacinum* ATCC MYA-1381 se cultivaron en medio líquido de evaluación (9% de glucosa, 1% de extracto de levadura, 1% de peptona, 50% de agua de mar artificial) a 30ºC durante 72 horas.

Los lípidos se extrajeron de cada cultivo según el método de Bligh y Dyer [Bligh EG y Dyer WJ, Can. J. Biochem.

Physiol. 37 911 (1959)], y se secaron a presión reducida. Los lípidos secos se disolvieron en KOH-metanol 0.1 N, y se procesaron a 60ºC durante 30 minutos para saponificarlos. Para la extracción de los esteroles libres obtenidos después del procedimiento de saponificación, se añadió una cantidad igual de agua, y la disolución se extrajo tres veces con hexano usado en dos veces el volumen de agua. La fracción de hexano extraída se concentró a presión reducida, y se analizó por cromatografía de gases. Para la cuantificación, se añadió 5α colestano (fabricado por Sigma) en una etapa temprana de extracción, y se usó como patrón interno. Para la identificación del colesterol, se utilizó colesterol (fabricado por Tokyo Chemical Industry) como patrón externo.

Los resultados se presentan en la tabla 1. Como se puede apreciar en la tabla 1, se descubre que Aurantiochytrium limacunum ATCC MYA-1381 tenía una alta capacidad productora de colesterol.

[Condiciones de cromatografía de gases]

Columna: HR-52 (Shinwa Chemical Industries Ltd.) 0.25 mm × 30 cm, 0.25 mm

Gas portador: N_2, 31 ml/min

Temperatura de la columna: 280ºC

Detección: FID

[Tabla 1]

Microorganismo de Labyrinthulea	Crecimiento (OD 660)	Colesterol (mg/l)
NBRC103268	14 ± 3.2	58 ± 18
NBRC103269	30 ± 7.4	161 ± 19
NBRC104108	3.6 ± 0.2	7.6 ± 3.5
ATCC MYA-1381	35 ± 5.7	205 ± 37
ATCC 20888	21 ± 4.9	151 ± 4.2

[Ejemplo 2 de referencia]

Identificación de ADN que codifica proteína que presenta actividad de SMT del microorganismo Labyrinthulea

Se confirmó que el ADN que presenta la secuencia de bases representada por SEC ID nº: 1 codifica una proteína que presenta actividad de SMT mediante si el ADN es complementario al gen (erg6) que codifica una proteína que presenta actividad de SMT de una levadura en germinación. Los detalles se describirán a continuación.

Se preparó un ADN genómico de una cepa de levadura en germinación S288C (obtenida de Euroscarf) usando un método habitual.

Los fragmentos de ADN se amplificaron por PCR, usando los ADN que consisten en las secuencias de bases designadas como “conjunto de cebadores” en la tabla 2 como conjuntos de cebadores, y el ADN genómico como molde.

[Tabla 2]

Conjunto de cebadores (SEC ID Nº:)	Fragmento de ADN amplificado
3 y 4	región en dirección 5’ de erg6
5 y 6	gen leu2 de levadura en germinación
7 y 8	región en dirección 3’ de erg6

Al usar una mezcla de estos tres fragmentos de ADN amplificados como molde, la PCR se realizó usando los ADN que consisten en las secuencias de bases representadas por SEC ID nº: 3 y 8 como un conjunto de cebadores. Debido a que SEC ID nº: 4 y 5, y SEC ID nº: 6 y 7 presentan secuencias complementarias en los extremos 5’, los tres fragmentos de ADN pueden unirse mediante la PCR. Es decir, la PCR se realizó para preparar un fragmento de casete de expresión de Leu2 en el que el gen Leu2 de la levadura en germinación se interpone entre una región en dirección 5’ y una región en dirección 3’ de erg6.

El fragmento de casete de expresión Leu2 se introdujo en una cepa BY4742 de levadura en germinación deficiente en el gen Leu2 por electroporación. Al realizar la selección usando un medio mínimo que no contenía leucina, se obtuvo una cepa BY4742Δerg6 en la que el fragmento de casete de expresión Leu2 se introdujo en una región del gen erg6 mediante recombinación homóloga. Posteriormente, usando un método habitual, se preparó un ADN genómico de Aurantiochytrium limacinum ATCC MYA-1381 (denominado en adelante “MYA1381”) que se encontró que acumula una cantidad significativa de colesterol en el ejemplo 1 de referencia.

Un fragmento de ADN que presenta la secuencia de bases representada por SEC ID nº: 1 se amplificó por PCR usando los ADN que consisten en las secuencias de bases representadas por SEC ID nº: 9 (se añadió una secuencia de reconocimiento HindIII) y SEC ID nº: 10 (se añadió una secuencia reconocimiento XbaI) como un conjunto de cebadores, y el ADN genómico como molde.

El fragmento de ADN y un vector de expresión de levadura en germinación pYes2CT (Life Technologies Japan Ltd.) se trataron con HindIII y XbaI, y se ligaron entre sí, y después, E. coli DH5α se transformó usando un método habitual. El plásmido obtenido se denominó "pYes2CT-SMT". pYes2CT-SMT se introdujo en la cepa BY4742Δerg6 por electroporación. Por cierto, como control, pYes2CT asimismo se introdujo simultáneamente. La colonia obtenida se aisló, se suspendió en 50 ml de un medio SCG-Ura (base de nitrógeno de levadura al 0.67% sin aminoácidos, galactosa al 2%, lisina 40 mg/l, histidina 20 mg/l) y se cultivó durante 2 días a 30ºC y 220 rpm. En este momento, una cepa obtenida introduciendo de pYes2CT en la cepa madre BY4742 asimismo se cultivó como control.

Después de completar el cultivo, las células de levadura se recogieron por centrifugación a 3000 g durante 10 minutos, y se liofilizaron a presión reducida. A las células de levadura liofilizadas (50 mg), se les añadieron 5 ml de KOH al 33%/metanol (1:4 vol/vol), y se realizó un tratamiento a 70ºC durante 1 hora. Al líquido después del tratamiento, se le añadieron 10 ml de hexano, y se recogió una capa de hexano. La capa de hexano se sometió a concentración a vacío, y se realizó un análisis por espectrometría de masas con cromatografía de gases (GCMS2010, fabricado por Shimadzu Corporation).

Los resultados se muestran en la figura 1. La cepa BY4742Δerg6/pYes2CT no produjo ergosterol, pero acumuló 7-deshidrodesmosterol como se describe en informes anteriores (Biochem. Biophys. Res. Commun. (1988) 155: 509-517, Metabolic Engineering (2011) 13: 555-569, y documento JP-A-2012-239412). Por otro lado, la cepa BY4742Δerg6/pYes2CT-SMT acumuló ergosterol de la misma manera que la cepa madre en la que no se interrumpió erg6. Es decir, el ADN que presenta la secuencia de bases representada por SEC ID nº: 1 era complementario a erg6 que codifica la proteína que presenta actividad de SMT de la levadura en germinación.

A partir de los resultados, se descubre que el ADN que presenta la secuencia de bases representada por SEC ID nº: 1 codifica la proteína (SEC ID nº: 2) que presenta actividad de SMT.

Los ejemplos de la presente invención se muestran a continuación, pero la presente invención no está limitada por los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Creación del microorganismo Labyrinthulea en el que se pierde la actividad de SMT

La actividad de SMT de la cepa MYA1381 se eliminó como se expone a continuación.

Los fragmentos de ADN se amplificaron realizando PCR, usando los ADN que consisten en las secuencias de bases designadas como "conjunto de cebadores" en la tabla 3 como conjuntos de cebadores, y el ADN genómico de la cepa MYA1381 preparado en el ejemplo 2 de referencia como molde.

[Tabla 3]

Conjunto de cebadores (SEC ID nº:)	Fragmento de ADN amplificado
11 y 12	Promotor de piruvato cinasa
13 y 14	Terminador de actina

Además, el gen resistente a la higromicina se amplificó por PCR, usando los ADN de las secuencias de bases representadas por SEC ID nº: 15 y 16 como un conjunto de cebadores, y un casete de expresión del gen resistente a fármacos (fabricado por Genebridges) como molde.

Usando una mezcla de estos tres fragmentos de ADN amplificados como molde, la PCR se realizó usando los ADN de las secuencias de bases representadas por SEC ID nº: 11 y 14 como un conjunto de cebadores. Debido a que SEC ID nº: 12 y 15, y SEC ID nº: 16 y 13 presentan secuencias complementarias en los extremos 5', los tres fragmentos de ADN pueden unirse en la PCR. Es decir, la PCR se realizó para preparar un fragmento de casete de expresión de un gen resistente a la higromicina que presenta un promotor de piruvato cinasa derivado de MYA1381 y un terminador de actina.

Cada fragmento de ADN se amplificó por PCR, usando los ADN de las secuencias de bases indicadas como "conjunto de cebadores" en la tabla 4 como conjuntos de cebadores, y ADN genómico de MYA-1381 como molde. La secuencia de enzimas de restricción descrita en "secuencia de enzimas de restricción" de la tabla 3 se añadió a cada fragmento de ADN.

[Tabla 4]

Conjunto de cebadores (SEC ID nº:)	Fragmento de ADN amplificado	Secuencia de enzima de restricción
17 y 18	región en dirección 5' de ADN que consiste en la secuencia de bases representada por SEC ID nº: 1	EcoRI y BamHI
19 y 20	región en dirección 3' de ADN que consiste en la secuencia de bases representada por SEC ID nº: 1	Sse8387I y BamHI

El fragmento amplificado en la región en dirección 5' se trató con EcoRI y BamHI, y el fragmento amplificado en la región en dirección 3' se trató con Sse8387I y BamHI, y se ligaron al vector pUC18Not tratado con EcoRI y Sse8387I (Biomedal SL Sevilla, España) para obtener un plásmido.

El plásmido se trató con BamHI, y se ligó al fragmento de casete de expresión del gen resistente a higromicina obtenido anteriormente que se trató con BamHI. Esto produjo un plásmido en el que el casete de expresión del gen resistente a higromicina se introdujo en las regiones en dirección 5' y en dirección 3' del ADN de la secuencia de bases representada por la SEC ID nº: 1. El plásmido se denominó pUCSMT-hyg.

El pUCSMT-hyg se trató con NotI para obtener un fragmento de ADN que tenía el casete de expresión del gen resistente a higromicina insertado en las regiones en dirección 5' y dirección 3' del ADN que consiste en la secuencia de bases representada por la SEC ID nº: 1.

El fragmento de ADN se introdujo en MYA1381 por electroporación para obtener una cepa resistente a higromicina. Esta cepa se denominó MYA1381Δ7DHCR.

Se confirmó por PCR que MYA1381Δ7DHCR tuvo una sustitución del ADN que consiste en la secuencia de bases representada con la SEC ID nº: 1 con el fragmento de ADN que presenta el casete de expresión del gen resistente a higromicina insertado en las regiones en dirección 5' y en dirección 3' del ADN que consiste en la secuencia de bases representada por SEC ID nº: 1.

Ejemplo 2

Producción de 7DHC

Las cepas MYA1381 (cepa madre) y MYA1381ΔSMT se cultivaron de la misma manera que en el ejemplo 1 de referencia, usando un medio líquido [0.4% de glucosa, 0.02% de extracto de levadura, 0.05% de glutamato de sodio, 50% de agua de mar artificial (DAIGO)].

Después del cultivo, se extrajeron los lípidos de cada disolución de cultivo según el método de Bligh y Dyer [Bligh EG y Dyer WJ, Can. J. Biochem. Physiol. 37 911 (1959)], y se secaron a presión reducida. Los lípidos secos se disolvieron en KOH-metanol 0.1 N y se trataron a 60ºC durante 30 minutos para realizar el tratamiento de saponificación. Para la extracción de los esteroles libres obtenidos por el tratamiento de saponificación, se añadió una cantidad igual de agua, y la extracción se realizó tres veces con hexano en dos veces la cantidad de agua. La fracción de hexano extraída se concentró a presión reducida, y se realizó un análisis por cromatografía de gases para examinar la cantidad de los esteroles y la composición de los mismos en la disolución de cultivo. Para el tratamiento de cuantificación, se añadió 5α colestano (fabricado por Sigma) en una etapa temprana de extracción, y se usó como patrón interno. Para la identificación del colesterol, se usó colesterol (fabricado por Tokyo Chemical Industry) como patrón externo. Las condiciones para la cromatografía de gases fueron las mismas que en el ejemplo 1 de referencia.

Los resultados se muestran en la tabla 5 y la figura 2. En la cepa MYA1381ΔSMT, se redujo el colesterol que se produjo y se acumuló en la cepa madre, y se produjo y se acumuló 7DHC que no se produjo ni acumuló en la cepa madre. Además, los esteroles subproducidos que se produjeron y se acumularon en la cepa madre desaparecieron.

Se considera que la desaparición de los esteroles subproducidos produce la ventaja de la producción de 7DHC, porque, por ejemplo, no es necesario eliminar los esteroles subproducidos en una etapa de purificación.

[Tabla 5]

Microorganismo de Labyrinthulea	Cholesterol (mg/l)	7DHC (mg/l)
MYA1381	3.3 ± 0.5	0.0 ± 0.0
MYA1381ΔSMT	2.0 ± 0.5	2.3 ± 0.5

Ejemplo 3

Producción de vitamina D3

El 7DHC fabricado en el ejemplo 2 se irradia con luz UV de 300 nm, y se procesa a 100ºC durante 30 minutos. El producto se analiza luego por cromatografía de gases de la manera descrita en el ejemplo de referencia.

Aplicabilidad industrial

Según la presente invención, se puede proporcionar un procedimiento para producir 7DHC de manera eficiente usando un microorganismo de Labyrinthulea, y un procedimiento para producir vitamina D3 que comprende irradiar, con luz ultravioleta, 7DHC producido por el procedimiento de producción.

Texto libre de listado de secuencias

SEC ID nº: 3 - Descripción de secuencia artificial: ADN sintético
SEC ID nº: 4 - Descripción de secuencia artificial: ADN sintético
SEC ID nº: 5 - Descripción de secuencia artificial: ADN sintético
SEC ID nº: 6 - Descripción de secuencia artificial: ADN sintético
SEC ID nº: 7 - Descripción de secuencia artificial: ADN sintético
SEC ID nº: 8 - Descripción de secuencia artificial: ADN sintético
SEC ID nº: 9 - Descripción de secuencia artificial: ADN sintético
SEC ID nº: 10 - Descripción de secuencia artificial: ADN sintético
SEC ID nº: 11 - Descripción de secuencia artificial: ADN sintético
SEC ID nº: 12 - Descripción de secuencia artificial: ADN sintético
SEC ID nº: 13 - Descripción de secuencia artificial: ADN sintético
SEC ID nº: 14 - Descripción de secuencia artificial: ADN sintético
SEC ID nº: 15 - Descripción de secuencia artificial: ADN sintético
SEC ID nº: 16 - Descripción de secuencia artificial: ADN sintético
SEC ID nº: 17 - Descripción de secuencia artificial: ADN sintético
SEC ID nº: 18 - Descripción de secuencia artificial: ADN sintético
SEC ID nº: 19 - Descripción de secuencia artificial: ADN sintético
SEC ID nº: 20 - Descripción de secuencia artificial: ADN sintético

Listado de secuencias

<110> KYOWA HAKKO BIO CO., LTD.
Tetsuro, Ujihara

<120> Procedimiento para producir 7-deshidrocolesterol y vitamina D3

<130> 1000P12349

<150> JP 2014-207009
<151> 2014-10-08

<160> 20

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 1005
<212> ADN
<213> *Aurantiochytrium limacinum*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1005)

<400> 1

```
atg gtg cag ctt tgg gag aag ggc gag aac tac tcg tct gat cag ttc        48
Met Val Gln Leu Trp Glu Lys Gly Glu Asn Tyr Ser Ser Asp Gln Phe
1               5                   10                  15

gtt ggc gcc atc aac tac gcc agc aag aac acc gtg gac aac cag gac        96
Val Gly Ala Ile Asn Tyr Ala Ser Lys Asn Thr Val Asp Asn Gln Asp
            20                  25                  30

gac gag aag aac tac gcc ccc gtt gtg aag agc ttc tac gcc tcc gtt       144
Asp Glu Lys Asn Tyr Ala Pro Val Val Lys Ser Phe Tyr Ala Ser Val
        35                  40                  45

gcc acc agc ctc tac gag tac ggc tgg ggc aag tcc ttc cac ttt gct       192
Ala Thr Ser Leu Tyr Glu Tyr Gly Trp Gly Lys Ser Phe His Phe Ala
    50                  55                  60

ccc cgc aac aag ggt gag ggc ttc cac gcc tct ctc ctc cgc cag gag       240
Pro Arg Asn Lys Gly Glu Gly Phe His Ala Ser Leu Leu Arg Gln Glu
65                  70                  75                  80

cac tgg ctt gcc ggc cag ctc gga atc cgc cct ggc cag gat gtc tgt       288
His Trp Leu Ala Gly Gln Leu Gly Ile Arg Pro Gly Gln Asp Val Cys
                85                  90                  95

gat ctc ggc tgc ggt gtc tgc ggt ccc ctt gtg aac att gcc aag ttc       336
Asp Leu Gly Cys Gly Val Cys Gly Pro Leu Val Asn Ile Ala Lys Phe
            100                 105                 110

acc cgc gcc aac atc acc ggt atc act atc tct gac ttc cag atc gct       384
Thr Arg Ala Asn Ile Thr Gly Ile Thr Ile Ser Asp Phe Gln Ile Ala
        115                 120                 125

cgc ggt aac gcc tgg atc gcc aag aac aac ctc tcc aac cgc tgc aag       432
Arg Gly Asn Ala Trp Ile Ala Lys Asn Asn Leu Ser Asn Arg Cys Lys
    130                 135                 140
```

```
gcc atc gag ggt gac ttc cac gag ctc ccc ttc gcg gac aac tcc ttc      480
Ala Ile Glu Gly Asp Phe His Glu Leu Pro Phe Ala Asp Asn Ser Phe
145                 150                 155                 160

gat gcc ggt tac gac atg gag gcc act gcc cac tcc act aag ctc aac      528
Asp Ala Gly Tyr Asp Met Glu Ala Thr Ala His Ser Thr Lys Leu Asn
                165                 170                 175

cag ttc ttc tct gag gtt cac cgt gtg ctc cgc ccc ggt ggt gtc ttc      576
Gln Phe Phe Ser Glu Val His Arg Val Leu Arg Pro Gly Gly Val Phe
            180                 185                 190

ggt ggc ttc gcc tgg gtg acc ctc ccc aag tac aac ccg gaa gac aag      624
Gly Gly Phe Ala Trp Val Thr Leu Pro Lys Tyr Asn Pro Glu Asp Lys
        195                 200                 205

gtc gag aag aag atc ctc gat gac ctc gcc ttc tcc aac gct att gcc      672
Val Glu Lys Lys Ile Leu Asp Asp Leu Ala Phe Ser Asn Ala Ile Ala
    210                 215                 220

atc ctt cac agc ttc gac gac tac gtc gcc gcc atc aaa gca aac cct      720
Ile Leu His Ser Phe Asp Asp Tyr Val Ala Ala Ile Lys Ala Asn Pro
225                 230                 235                 240

ggt ctt gag ctc gtt gag gcc tac gat gcc aac aag ctc ggc gac gac      768
Gly Leu Glu Leu Val Glu Ala Tyr Asp Ala Asn Lys Leu Gly Asp Asp
                245                 250                 255

ttc gag tgg tac gac ccc ctc cag cct ggc ttc tcc ctc gag ggt atc      816
Phe Glu Trp Tyr Asp Pro Leu Gln Pro Gly Phe Ser Leu Glu Gly Ile
            260                 265                 270

ctc cgc tct tgg gct ggc cgc cag ttc acc tct gtt ttg acc cgc atc      864
Leu Arg Ser Trp Ala Gly Arg Gln Phe Thr Ser Val Leu Thr Arg Ile
        275                 280                 285

acc gag gcc atc ggc ctt gcc ccc aag ggt acc tac cag gct tcc cag      912
Thr Glu Ala Ile Gly Leu Ala Pro Lys Gly Thr Tyr Gln Ala Ser Gln
    290                 295                 300

gtt ctc gag atc gct gcc cag tcc ctc gtt gag tcc ggt gtc cgc ggt      960
Val Leu Glu Ile Ala Ala Gln Ser Leu Val Glu Ser Gly Val Arg Gly
305                 310                 315                 320

atc tac acc ccc atc tac tac tac aag gtc cga aag gtc tcc aac         1005
Ile Tyr Thr Pro Ile Tyr Tyr Tyr Lys Val Arg Lys Val Ser Asn
                325                 330                 335
```

<210> 2
<211> 335
<212> PRT
<213> *Aurantiochytrium limacinum*

<400> 2

```
Met Val Gln Leu Trp Glu Lys Gly Glu Asn Tyr Ser Ser Asp Gln Phe
1               5                   10                  15

Val Gly Ala Ile Asn Tyr Ala Ser Lys Asn Thr Val Asp Asn Gln Asp
            20                  25                  30
```

Asp Glu Lys Asn Tyr Ala Pro Val Val Lys Ser Phe Tyr Ala Ser Val
35 40 45

Ala Thr Ser Leu Tyr Glu Tyr Gly Trp Gly Lys Ser Phe His Phe Ala
50 55 60

Pro Arg Asn Lys Gly Glu Gly Phe His Ala Ser Leu Leu Arg Gln Glu
65 70 75 80

His Trp Leu Ala Gly Gln Leu Gly Ile Arg Pro Gly Gln Asp Val Cys
85 90 95

Asp Leu Gly Cys Gly Val Cys Gly Pro Leu Val Asn Ile Ala Lys Phe
100 105 110

Thr Arg Ala Asn Ile Thr Gly Ile Thr Ile Ser Asp Phe Gln Ile Ala
115 120 125

Arg Gly Asn Ala Trp Ile Ala Lys Asn Asn Leu Ser Asn Arg Cys Lys
130 135 140

Ala Ile Glu Gly Asp Phe His Glu Leu Pro Phe Ala Asp Asn Ser Phe
145 150 155 160

Asp Ala Gly Tyr Asp Met Glu Ala Thr Ala His Ser Thr Lys Leu Asn
165 170 175

Gln Phe Phe Ser Glu Val His Arg Val Leu Arg Pro Gly Gly Val Phe
180 185 190

Gly Gly Phe Ala Trp Val Thr Leu Pro Lys Tyr Asn Pro Glu Asp Lys
195 200 205

Val Glu Lys Lys Ile Leu Asp Asp Leu Ala Phe Ser Asn Ala Ile Ala
210 215 220

Ile Leu His Ser Phe Asp Asp Tyr Val Ala Ala Ile Lys Ala Asn Pro
225 230 235 240

Gly Leu Glu Leu Val Glu Ala Tyr Asp Ala Asn Lys Leu Gly Asp Asp
245 250 255

Phe Glu Trp Tyr Asp Pro Leu Gln Pro Gly Phe Ser Leu Glu Gly Ile
260 265 270

Leu Arg Ser Trp Ala Gly Arg Gln Phe Thr Ser Val Leu Thr Arg Ile

275 280 285

Thr Glu Ala Ile Gly Leu Ala Pro Lys Gly Thr Tyr Gln Ala Ser Gln
290 295 300

Val Leu Glu Ile Ala Ala Gln Ser Leu Val Glu Ser Gly Val Arg Gly
305 310 315 320

Ile Tyr Thr Pro Ile Tyr Tyr Tyr Lys Val Arg Lys Val Ser Asn
325 330 335

<210> 3
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ADN sintético

<400> 3
gctcgctatc ctcgccatca cgtgtacc 28

<210> 4
<211> 57
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ADN sintético

<400> 4
actagaagtt ctcctcgact taaatcgaaa gtaaaacaga taagggaaac ttgaatg 57

<210> 5
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ADN sintético

<400> 5
actttcgatt taagtcgagg agaacttcta gtatatctac atacc 45

<210> 6
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ADN sintético

<400> 6
actttcgatt taagtcgagg agaacttcta gtatatctac atacc 45

<210> 7
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ADN sintético

<400> 7
ttattgagtt gctcgactac gtcgttaagg ccgtttctga cagag 45

<210> 8
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ADN sintético

<400> 8
ggtggtaaca gtacatgggg aggtcattaa tc 32

<210> 9
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ADN sintético

<400> 9
cccaagctta acacaatggt gcagctttgg gagaagg 37

<210> 10
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ADN sintético

<400> 10
gctctagatt agttggagac ctttcggacc ttgtag 36

<210> 11
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ADN sintético

<400> 11
cgggatccaa tgcaatgtaa tgcagtgcaa tgc 33

<210> 12
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ADN sintético

<400> 12
gcggtgagtt caggcttttt catcttcgag caagcctttg cacag 45

<210> 13
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ADN sintético

<400> 13
cgacgccccg gatgacacgt cattggagtg atggaatgcc ctctc 45

<210> 14
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ADN sintético

<400> 14
cgggatccgg acgtgattgc tacatcataa agcg 34

<210> 15
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ADN sintético

<400> 15
gcaaaggctt gctcgaagat gaaaaagcct gaactcaccg cg 42

<210> 16
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ADN sintético

<400> 16
atcactccaa tgacgtgtca tccggggcgt cggtttccac tatcg 45

<210> 17
<211> 41
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ADN sintético

<400> 17
cggaattcga ttgattgact tcttattgtt tgcatggtct c 41

<210> 18
<211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ADN sintético

<400> 18
cgggatccat tatactatgt ggttgttgta ctttgaatgt tcac 44

<210> 19
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ADN sintético

<400> 19
cgggatccgg tccgaaaggt ctccaactaa aattgtgtaa cg 42

<210> 20
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ADN sintético

<400> 20
atatgccctg caggaaagca agcgtggaat aagccatcgg aagtg 45

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir 7-deshidrocolesterol (en adelante, “7DHC”), que comprende:

cultivar, en un medio, un microorganismo de Labyrinthulea que produce 7DHC en el que la actividad de esterol 24-C-metiltransferasa (en adelante, “actividad de SMT”) se pierde en comparación con una cepa madre;

permitir que se produzca y acumule 7DHC en el cultivo; y

recoger el 7DHC del cultivo.

2. Procedimiento de producción según la reivindicación 1, en el que el microorganismo de Labyrinthulea en el que se pierde la actividad de SMT en comparación con la cepa madre es un microorganismo de Labyrinthulea en el que la actividad de SMT se pierde en comparación con la cepa madre mediante supresión, sustitución o adición de por lo menos una base en un gen que está presente en el ADN cromosómico de la cepa madre y codifica una proteína que presenta una actividad de SMT.

3. Procedimiento de producción según la reivindicación 1, en el que el microorganismo de Labyrinthulea en el que se pierde la actividad de SMT en comparación con la cepa madre es un microorganismo de Labyrinthulea en el que la actividad de SMT se pierde en comparación con la cepa madre, que se obtiene transformando la cepa madre con un ADN que codifica un ARN que presenta una secuencia complementaria a un ARN mensajero transcrito a partir de un gen presente en el ADN cromosómico de la cepa madre y que codifica una proteína que presenta una actividad de SMT y forma un conjugado con el ARN mensajero.

4. Procedimiento de producción según la reivindicación 2 o 3, en el que el gen que codifica una proteína que presenta una actividad de SMT es un gen que presenta cualquiera de los ADN [1] a [5] siguientes:

[1] un ADN que codifica una proteína que presenta la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº: 2;

[2] un ADN que codifica una proteína homóloga que presenta una identidad de por lo menos 95% con la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº: 2, y que presenta una actividad de SMT;

[3] un ADN que presenta la secuencia de bases representada por SEC ID nº: 1;

[4] un ADN que se hibrida con un ADN que consiste en una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases representada por SEC ID nº: 1 bajo condiciones restrictivas y codifica una proteína homóloga que presenta una actividad de SMT; y

[5] un ADN que presenta una identidad de por lo menos 95% con la secuencia de bases representada por SEC ID nº: 1 y que codifica una proteína homóloga que presenta una actividad de SMT.

5. Procedimiento de producción según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el microorganismo de Labyrinthulea es un microorganismo de Labyrinthulea del género *Schizochytorium*, *Thraustochytrium*, *Aurantiochytrium*, *Parietichytrium*, *Labyrinthula*, *Althornia*, *Aplanochytrium, Japonochytrium, Labyrinthuloides, Ulkenia, Oblongichytrium, Botryochytrium* o *Sicyoidochytrium*.

6. Procedimiento para producir vitamina D3, que comprende

producir 7DHC mediante un procedimiento para producir 7DHC según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5; e

irradiar el 7DHC producido con luz ultravioleta para producir vitamina D3.

7. Procedimiento de producción según la reivindicación 6, en el que la vitamina D3 obtenida se concentra y se recoge.

Fig. 1

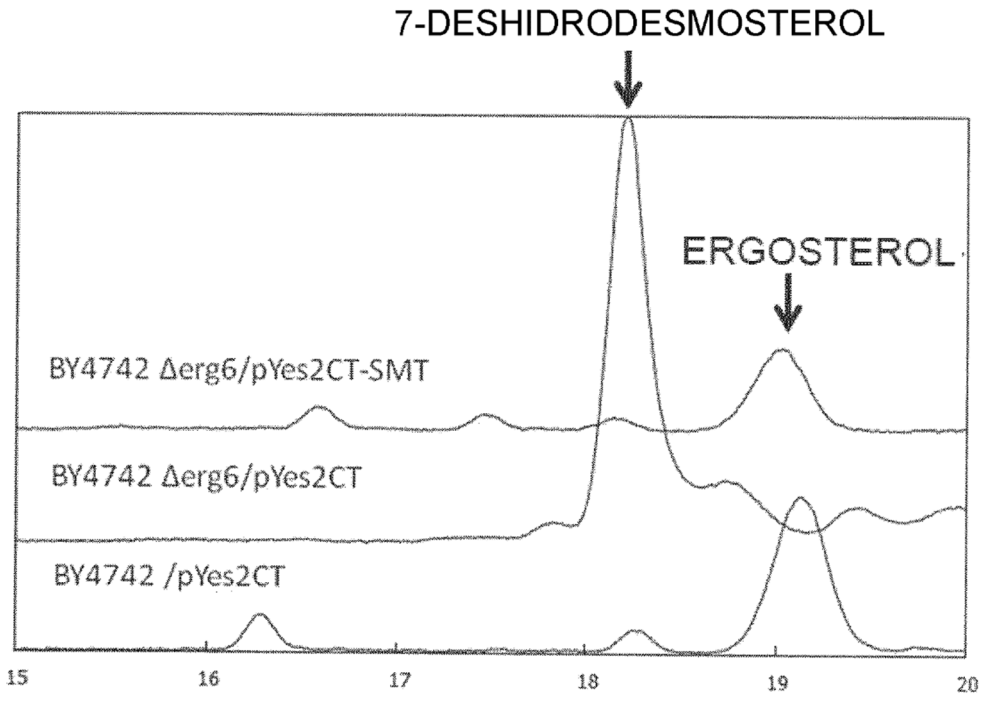
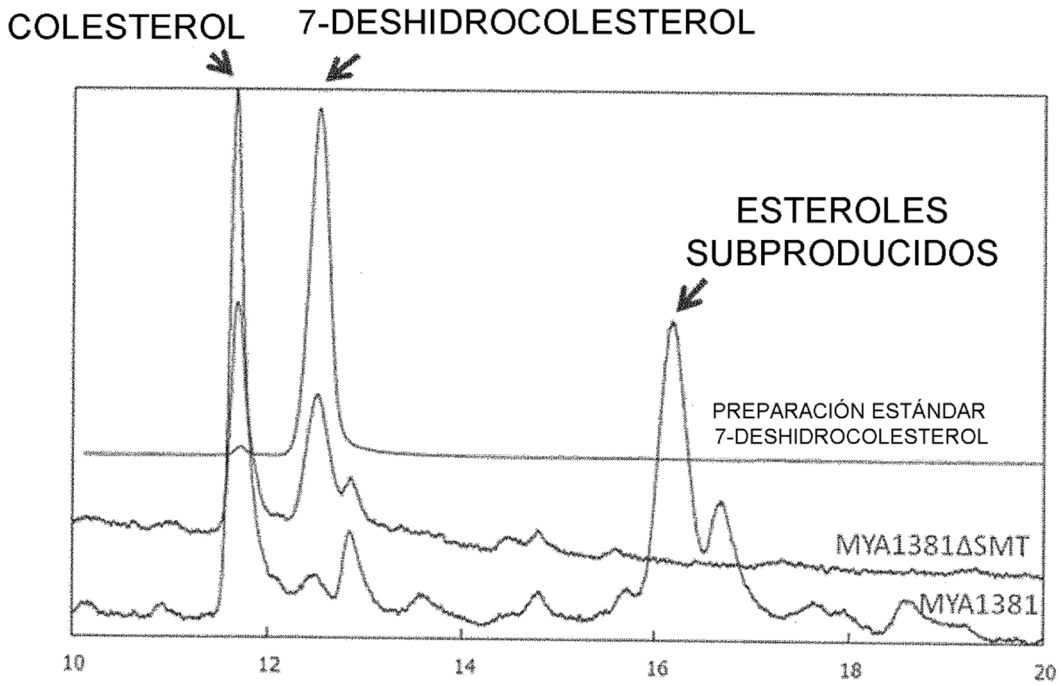

7-DESHIDRODESMOSTEROL
ERGOSTEROL
BY4742 Δerg6/pYes2CT-SMT
BY4742 Δerg6/pYes2CT
BY4742 /pYes2CT
15
16
17
18
19
20

Fig. 2


COLESTEROL
7-DESHIDROCOLESTEROL
ESTEROLES
SUBPRODUCIDOS
PREPARACIÓN ESTÁNDAR
7-DESHIDROCOLESTEROL
MYA1381ΔSMT
MYA1381
10
12
14
16
18
20