

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5501952号
(P5501952)

(45) 発行日 平成26年5月28日 (2014. 5. 28)

(24) 登録日 平成26年3月20日 (2014. 3. 20)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 1/19 (2006. 01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 P 7/64 (2006. 01)

C 1 2 P 7/64

C 1 2 R 1/645 (2006. 01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 R 1:645

請求項の数 10 (全 59 頁)

(21) 出願番号 特願2010-503068 (P2010-503068)
 (86) (22) 出願日 平成20年4月10日 (2008. 4. 10)
 (65) 公表番号 特表2010-523147 (P2010-523147A)
 (43) 公表日 平成22年7月15日 (2010. 7. 15)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2008/004700
 (87) 国際公開番号 W02008/124194
 (87) 国際公開日 平成20年10月16日 (2008. 10. 16)
 審査請求日 平成23年3月16日 (2011. 3. 16)
 (31) 優先権主張番号 60/910, 831
 (32) 優先日 平成19年4月10日 (2007. 4. 10)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 390023674
 イー・アイ・デュポン・ドウ・ヌムール・
 アンド・カンパニー
 E. I. DU PONT DE NEMO
 URS AND COMPANY
 アメリカ合衆国、デラウェア州、ウイリミ
 ントン、マーケット・ストリート 100
 7
 (74) 代理人 100127926
 弁理士 結田 純次
 (74) 代理人 100140132
 弁理士 竹林 則幸
 (72) 発明者 ハワード・グレン・ダムード
 アメリカ合衆国デラウェア州19707.
 ホッケシン、ケンウィックロード4
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Δ8デサチュラーゼ、および多価不飽和脂肪酸の作成におけるそれらの使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) デルタ - 8 デサチュラーゼ 活性を有して、配列番号 2 1、配列番号 2 2、配列番号 2 3、および配列番号 2 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列と比較すると、C 1 u s t a l V 法のアラインメントに基づいて少なくとも 9 5 % のアミノ酸同一性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、

(b) デルタ - 8 デサチュラーゼ 活性を有するポリペプチドをコードして、配列番号 1 7、配列番号 1 8、配列番号 1 9、配列番号 2 0、および配列番号 3 9 からなる群から選択されるヌクレオチド配列と比較すると、B L A S T N 法のアラインメントに基づいて少なくとも 9 5 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列、または

(c) (a) または (b) のヌクレオチド配列の相補体であって、前記相補体および前記ヌクレオチド配列が同数のヌクレオチドからなって 1 0 0 % 相補的である、相補体を含む、単離されたポリヌクレオチドを含む 組み換えコンストラクト を含んでなる微生物宿主細胞。

【請求項 2】

単離されたポリヌクレオチドが、配列番号 2 1、配列番号 2 2、配列番号 2 3、および配列番号 2 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項 1 に記載の微生物宿主細胞。

【請求項 3】

単離されたポリヌクレオチドが、配列番号 1 7、配列番号 1 8、配列番号 1 9、配列番

10

20

号 20、および配列番号 39 からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項 2 に記載の微生物宿主細胞。

【請求項 4】

微生物宿主細胞が、酵母、藻類、細菌、ユーグレナ属、ストラメノパイル、および真菌からなる群から選択される、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の微生物宿主細胞。

【請求項 5】

細胞が油性酵母である、請求項 4 に記載の微生物宿主細胞。

【請求項 6】

油性酵母が、ヤロウシア、カンジダ、ロドトルラ、ロドスポリジウム、クリプトコッカス、トリコスボロン、およびリボマイセスからなる群から選択される、請求項 5 に記載の微生物宿主細胞。

10

【請求項 7】

油性酵母が、ヤロウシアである、請求項 6 に記載の微生物宿主細胞。

【請求項 8】

a) 請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の微生物宿主細胞であって、且つ、さらにエイコサジエン酸源を含んでなる微生物宿主細胞を提供するステップと、

b) デルタ - 8 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ヌクレオチド配列が発現されて、エイコサジエン酸がジホモ - ガンマ - リノール酸に変換される条件下で、該微生物宿主細胞を成長させるステップと、を含んでなる、ジホモ - ガンマ - リノール酸を生成する方法。

20

【請求項 9】

a) 請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の微生物宿主細胞であって、且つ、さらにエイコサトリエン酸源を含んでなる微生物宿主細胞を提供するステップと、

b) デルタ - 8 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ヌクレオチド配列が発現されて、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、該微生物宿主細胞を成長させるステップと、を含んでなる、エイコサテトラエン酸を生成する方法。

【請求項 10】

配列番号 40 に記載の アミノ酸配列を有するデルタ - 8 デサチュラーゼをコードするヌクレオチド配列 を含み、該ヌクレオチド配列の少なくとも 208 個のコドンがヤロウシア 種中での発現のためにコドン最適化されている、単離された核酸分子。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本明細書は、その内容全体を参照によって本明細書に援用する、2007年4月10日に出願された米国仮特許出願第60/910,831号明細書の優先権を主張する。

【0002】

本発明は生物工学の分野にある。より具体的には、本発明は、8 脂肪酸デサチュラーゼをコードするポリヌクレオチド配列の同定、および長鎖多価不飽和脂肪酸 (PUFA) の製造におけるこれらのデサチュラーゼの使用に関する。

40

【背景技術】

【0003】

今日、商業的 PUFA 生産の手段として、植物、藻類、真菌、ストラメノパイル、および酵母をはじめとする多様な異なる宿主が調査されている。遺伝子操作では、いくつかの宿主の天然の能力 (天然ではリノール酸 (LA; 18:2 - 6) または - リノレン酸 (ALA; 18:3 - 3) 脂肪酸生成に限定されるものでさえ) を実質的に改変して、様々な長鎖 - 3 / - 6 PUFA の高レベル生成をもたらすことができると実証されている。したがってアラキドン酸 (ARA; 20:4 - 6)、エイコサペンタエン酸 (EPA; 20:5 - 3)、およびドコサヘキサエン酸 (DHA; 22:6 -

50

3) の生成は、 8 デサチュラーゼの発現を必要とするかもしれない。

【0004】

これまでに同定された 8 デサチュラーゼ酵素は、エイコサジエン酸 (EDA; 20:2 - 6) をジホモ - リノレン酸 (DGLA; 20:3 - 6) に、エイコサトリエン酸 (ETRA; 20:3 - 3) をエイコサテトラエン酸 (ETA; 20:4 - 3) に変換する能力の双方を有する (ARA および EPA は 5 デサチュラーゼとの反応に続いて、それぞれ DGLA および ETA から引き続いて合成されるのに対し、DHA 合成には追加的な C_{20/22} エロンガーゼおよび 4 デサチュラーゼの引き続く発現が必要である)。

【0005】

例えば ARA、EPA、および DHA の合成において、 8 デサチュラーゼ酵素が果たす役割に基づいて、様々な起源からこれらの酵素を同定して特性決定するかなりの努力がなされている。初期の努力は、ミドリムシ (*Euglena gracilis*) からの 8 デサチュラーゼの単離および特性決定に集中し、ミドリムシ (*Euglena gracilis*) 8 デサチュラーゼ内のいくつかの配列バリエーションが報告されている (例えば非特許文献 1; 特許文献 1; 特許文献 2; 特許文献 3 を参照されたい)。さらに同一譲受人の同時係属特許文献 4 および 5 は、ミドリムシ (*Euglena gracilis*) 8 デサチュラーゼのアミノ酸および核酸配列を開示する。その他の研究では、同一譲受人の同時係属出願特許文献 6 および 7 は、ミドリムシ (*Euglena gracilis*) に由来する合成的に改変された変異 8 デサチュラーゼについて述べる。

【0006】

特許文献 8 は、パブロバ・サリナ (*Pavlova salina*) からの 8 デサチュラーゼ酵素のアミノ酸および核酸配列を開示し、同一譲受人の同時係属出願特許文献 9 は、パブロバ・ルセリ (*Pavlova lutheri*) (CCMP 459) からの 8 デサチュラーゼ酵素のアミノ酸および核酸配列を開示する一方、特許文献 10 は、テトルエトレプチア・ポムクテンシス (*Tetruetrepia pomquetensis*) CCMP 1491、ユートレプチエラ (*Eutreptiella*) 種 CCMP 389 およびユートレプチエラ・ギムナスチカ近種 (*Eutreptiella cf. gymnastica*) CCMP 1594 からの 8 デサチュラーゼ酵素のアミノ酸および核酸配列を開示する。Sayanova ら (非特許文献 2) は、アラビドプシス (*Arabidopsis*) 中で発現させると C₂₀ 8 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自由生活土壌アメーバ、アカントアメーバ・カステラーニ (*Acanthamoeba castellanii*) からの cDNA の単離および特性決定について述べる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献 1】国際公開第 2000/34439 号パンフレット

【特許文献 2】米国特許第 6,825,017 号明細書

【特許文献 3】国際公開第 2004/057001 号パンフレット

【特許文献 4】米国特許出願第 11/166,003 号明細書

【特許文献 5】米国特許第 7,256,033 号明細書

【特許文献 6】米国特許出願第 11/635258 号明細書

【特許文献 7】米国特許出願第 11/951697 号明細書

【特許文献 8】米国特許出願公開第 2005/027385 号明細書

【特許文献 9】米国特許出願第 11/737772 号明細書

【特許文献 10】米国特許出願第 11/876115 号明細書

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献 1】Wallis ら、Arch. Biochem. and Biophys

10

20

30

40

50

., 365 (2) : 307 ~ 316 (1999年)

【非特許文献2】F E B S L e t t . , 580 : 1946 ~ 1952 (2006年)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

上で言及した開示にも関わらず、遺伝的バリエーションのみを通じて多種多様な宿主細胞をPUFA生成のために最適化できるかもしれないので、 α -8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追加的な遺伝子に対する必要性がある。出願人は、ユーグレナ・アナベナ (Euglena anaebena) からの α -8脂肪酸デサチュラーゼをコードする遺伝子の単離を報告することにより、ここで述べた必要性に対処する。

10

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明は、 α -8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新しい遺伝子コンストラクト、およびPUFAを生成するための、藻類、細菌、酵母、ユーグレナ属、ストラメノパイル、および真菌におけるそれらの使用に関する。したがって本発明は、

(a) α -8デサチュラーゼ活性を有して、配列番号21、配列番号22、配列番号23、および配列番号24からなる群から選択されるアミノ酸配列と比較すると、アラインメントのClustal V法に基づいて少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、

(b) α -8デサチュラーゼ活性を有するポリペプチドをコードして、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、および配列番号39からなる群から選択されるヌクレオチド配列と比較すると、アラインメントのBLASTN法に基づいて少なくとも80%の配列同一性を有するヌクレオチド配列、

20

(c) α -8デサチュラーゼ活性を有するポリペプチドをコードして、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、および配列番号39からなる群から選択されるヌクレオチド配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列、または

(d) (a)、(b)または(c)のヌクレオチド配列の相補体を含んでなり、相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を含んでなる微生物宿主細胞を提供する。

30

【0011】

他の実施態様では本発明は、

a) (i) 配列番号21、配列番号22、配列番号23、および配列番号24からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較すると、アラインメントのClustal V法に基づいて少なくとも80%のアミノ酸同一性を有する α -8デサチュラーゼポリペプチドをコードする組み換えヌクレオチド分子、および

(ii) エイコサジエン酸源を含んでなる微生物宿主細胞を提供するステップと、

b) α -8デサチュラーゼポリペプチドをコードする核酸断片が発現されて、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)の微生物宿主細胞を成長させるステップと、

40

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を提供する。

【0012】

同様に本発明は、

a) (i) 配列番号21、配列番号22、配列番号23、および配列番号24からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較すると、アラインメントのClustal V法に基づいて少なくとも80%のアミノ酸同一性を有する α -5デサチュラーゼポリペプチドをコードする組み換えヌクレオチド分子、および

(ii) エイコサトリエン酸源

50

を含んでなる微生物宿主細胞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核酸断片が発現されて、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) の微生物宿主細胞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を提供する。

【0013】

他の実施態様では、本発明は配列番号39に記載の8 デサチュラーゼをコードして、少なくとも208個のコドンがヤロウィア (*Yarrowia*) 種中での発現についてコドン最適化されている、単離された核酸分子を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】様々な中間体を通じてミリスチン酸のDHAへの変換をもたらす、代表的な3および6脂肪酸生合成経路である。

【図2A】総脂質画分中に約17%のEDAを生成するヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) Y4001U株の開発を図示する。

【図2B】pZKLeuN-29E3のプラスミドマップを提供する。

【図2C】pY116のプラスミドマップを提供する。

【図3】実施例1で述べられるユーグレナ・アナベナ (*Euglena anabaena*) 細胞抽出物の脂質プロファイルのクロマトグラムを示す。

【図4A】EaD8Des1 (配列番号21)、EaD8Des2 (配列番号22)、EaD8Des3 (配列番号23)、およびEaD8Des4 (配列番号24) の8 デサチュラーゼ配列、および機能性変異体ミドリムシ (*Euglena gracilis*) 8 デサチュラーゼアミノ酸配列 (EgD8; 配列番号25; 国際公開第2006/012325号パンフレットでEg5として述べられる) のClustal Vアラインメントを示す。

【図4B】EaD8Des1 (配列番号21)、EaD8Des2 (配列番号22)、EaD8Des3 (配列番号23)、およびEaD8Des4 (配列番号24) の8 デサチュラーゼ配列、および機能性変異体ミドリムシ (*Euglena gracilis*) 8 デサチュラーゼアミノ酸配列 (EgD8; 配列番号25; 国際公開第2006/012325号パンフレットでEg5として述べられる) のClustal Vアラインメントを示す。

【図4C】EaD8Des1 (配列番号21)、EaD8Des2 (配列番号22)、EaD8Des3 (配列番号23)、およびEaD8Des4 (配列番号24) の8 デサチュラーゼ配列、および機能性変異体ミドリムシ (*Euglena gracilis*) 8 デサチュラーゼアミノ酸配列 (EgD8; 配列番号25; 国際公開第2006/012325号パンフレットでEg5として述べられる) のClustal Vアラインメントを示す。

【図5】(A) pY115 (配列番号34) および (B) pY175 (配列番号35) のプラスミドマップを提供する。

【図6】pY175、pY176、pY177、およびpY178を発現するヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) の脂肪酸プロファイルを提供する (実施例5参照)。

【図7A】EaD8Des3 (配列番号19) とEaD8S (配列番号39) とのヌクレオチド配列の比較を示す。

【図7B】EaD8Des3 (配列番号19) とEaD8S (配列番号39) とのヌクレオチド配列の比較を示す。

【図8】(A) pEaD8S (配列番号41) および (B) pZUFmEaD8S (配列番号51) のプラスミドマップを提供する。

【0015】

10

20

30

40

50

本発明は、本明細書の一部を形成する以下の詳細な説明および添付の配列説明からより完全に理解できる。

【 0 0 1 6 】

次の配列は、37 C . F . R . 1 . § 8 2 1 ~ 1 . 8 2 5 (「ヌクレオチド配列および/またはアミノ酸配列開示を含む特許出願の要件 - 配列規則」)を満たし、世界知的所有権機関(WIPO)標準ST . 2 5 (1998年)、およびEPOおよびPCTの配列表要件(規則5 . 2および49 . 5 (aの2))、および実施細則第208号および附属書C)に一致する。ヌクレオチドおよびアミノ酸配列データのために使用される記号および型式は、37 C . F . R . § 1 . 8 2 2 で述べられる規則に従う。

【 0 0 1 7 】

配列番号1、2、10、11、13 ~ 25、および28 ~ 51は、表1で同定されるORFがコーディングする遺伝子またはタンパク質(またはその一部)、またはプラスミドである。

【 0 0 1 8 】

【表 1】

表 1
核酸およびタンパク質配列番号の要約

説明および略語	核酸 配列番号	タンパク質 配列番号
ユーグレナ・アナベナ(<i>Euglena anabaena</i>)Δ8 デサチュラーゼ 部分配列	1 (604bp)	--
ミドリムシ(<i>Euglena gracilis</i>)Δ8 デサチュラーゼ CDS(「Eg5」)	2 (1263bp)	--
プラスミド pHD23-1	10 (4116bp)	--
ミドリムシ(<i>Euglena gracilis</i>)Δ8 デサチュラーゼ(NCBI 登録番号 AAD45877)	--	11 (419AA)
プラスミド pLF118-1	13 (4363bp)	--
プラスミド pLF118-2	14 (4307bp)	--
プラスミド pLF118-3	15 (4307bp)	--
プラスミド pLF118-4	16 (4297bp)	--
ユーグレナ・アナベナ(<i>Euglena anabaena</i>)Δ8 デサチュラーゼ 1 コード配列(「EaD8Des1」)	17 (1260bp)	21 (420AA)
ユーグレナ・アナベナ(<i>Euglena anabaena</i>)Δ8 デサチュラーゼ 2 コード配列(「EaD8Des2」)	18 (1260bp)	22 (420AA)
ユーグレナ・アナベナ(<i>Euglena anabaena</i>)Δ8 デサチュラーゼ 3 コード配列(「EaD8Des3」)	19 (1260bp)	23 (420AA)
ユーグレナ・アナベナ(<i>Euglena anabaena</i>)Δ8 デサチュラーゼ 4 コード配列(「EaD8Des4」)	20 (1260bp)	24 (420AA)
ミドリムシ(<i>Euglena gracilis</i>)Δ8 デサチュラーゼ(「EgD8」) (米国特許第 7,256,033 号明細書)	--	25 (421AA)
プラスミド pLF120-1	28 (4794bp)	--
プラスミド pLF120-2	29 (4794bp)	--
プラスミド pLF120-3	30 (4794bp)	--
プラスミド pLF120-4	31 (4794bp)	--
プラスミド pDMW263	32 (9472bp)	--
プラスミド pDMW237	33 (7879bp)	--
プラスミド pY115	34 (7783bp)	--
プラスミド pY175	35 (8254bp)	--

【表 2】

プラスミド pY176	36 (8254bp)	--
プラスミド pY177	37 (8254bp)	
プラスミド pY178	38 (8254bp)	--
ユーグレナ・アナベナ(<i>Euglena anabaena</i>)に由来して ヤロウィア・リポリティカ(<i>Yarrowia lipolytica</i>)(「EaD8S」)中での 発現のためにコドン最適化された合成 Δ8 デサチュラーゼ	39 (1260bp)	40 (420AA)
プラスミド pEaD8S	41 (3983bp)	--
プラスミド pZKLeuN-29E3	42 (14,688bp)	--
フザリウム・モニリフォルメ(<i>Fusarium moniliforme</i>)Δ12 デサチュラーゼ(「FmD12」)	43 (1434bp)	44 (477AA)
ミドリムシ(<i>Euglena gracilis</i>)に由来してヤロウィア・リポリティカ (<i>Yarrowia lipolytica</i>)(「EgD9eS」)中での発現のためにコドン最 適化された合成 Δ9 エロンガーゼ	45 (777bp)	46 (258AA)
Cre リコンビナーゼ酵素によって認識される大腸菌 (<i>Escherichia coli</i>)LoxP 組み換え部位	47 (34bp)	--
モルティエラ・アルピナ(<i>Mortierella alpina</i>)ELO3 に由来して ヤロウィア・リポリティカ(<i>Yarrowia lipolytica</i>)(「ME3S」)中での 発現のためにコドン最適化され合成 C _{16/18} エロンガーゼ	48 (828bp)	49 (275AA)
プラスミド pY116	50 (8739bp)	--
プラスミド pZUFmEaD8S	51 (8255bp)	--

【 0 0 2 0 】

配列番号 3 は、ベクター特異的プライマー p D o n o r 2 2 2 E g 5 - 1 のヌクレオチド配列である。

【 0 0 2 1 】

配列番号 4 ~ 7 は、ユーグレナ・アナベナ (*E u g l e n a a n a b a e n a*) U T E X 3 7 3 からの 8 デサチュラーゼ遺伝子の一部を増幅するのに使用される、縮重プライマー D 8 D E G 3 - 1、D 8 D E G 3 - 2、D 8 D E G 3 - 3、および D 8 D E G 3 - 4 にそれぞれ対応する。

【 0 0 2 2 】

配列番号 8 および 9 は、部分的推定上 8 デサチュラーゼ c D N A 断片を配列決定するのに使用される T 7 プライマーおよびプライマー M 1 3 - 2 8 R e v にそれぞれ対応する。

【 0 0 2 3 】

配列番号 1 2 は、e u g 1 c 8 デサチュラーゼクローンを全長解析に使用されるプライマー E a D 8 s e q - 1 のヌクレオチド配列である。

【 0 0 2 4 】

配列番号 2 6 および 2 7 は、E a D 8 D e s 1、E a D 8 D e s 2、E a D 8 D e s 3、および E a D 8 D e s 4 コード配列を増幅するのに使用されるプライマー E a D 8 - 5 および E a D 8 - 3 にそれぞれ対応する。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 5 】

健康に良い P U F A の生成のため生化学的経路を操作するために使用してもよい、新しいユーグレナ・アナベナ (*E u g l e n a a n a b a e n a*) 8 デサチュラーゼ酵素および同酵素をコードする遺伝子が、ここで開示される。P U F A またはその誘導体は、静脈内栄養補給を受ける患者のために、または栄養失調を予防または治療するために、食

10

20

30

40

50

餌代用物、または栄養補給剤、特に乳児用調製粉乳として使用される。代案としては、通常の使用において受容者が所望量の食事補給を受け入れるように調合された、料理用油、脂肪またはマーガリン中に、純化された P U F A (またはその誘導体) を組み込んでよい。P U F A はまた、乳児用調製粉乳、栄養補給剤またはその他の食品中に組み込んでよく、抗炎症薬またはコレステロール低下剤としての用途があるかもしれない。場合により組成物は、製薬用途 (ヒトまたは獣医) のために使用してもよい。

【 0 0 2 6 】

定義

本開示の文脈で、いくつかの用語および略語が使用される。以下の定義が提供される。

【 0 0 2 7 】

「読み取り枠」は O R F と略記される。

【 0 0 2 8 】

「ポリメラーゼ連鎖反応」は P C R と略記される。

【 0 0 2 9 】

「米国微生物系統保存機関」は A T C C と略記される。

【 0 0 3 0 】

「多価不飽和脂肪酸」は P U F A と略記される。

【 0 0 3 1 】

「トリアシルグリセロール」は T A G と略記される。

【 0 0 3 2 】

「発明」または「本発明」という用語は、ここでの用法では本発明の特定の実施態様のどれか 1 つへの限定を意図せず、特許請求の範囲および明細書で述べられるように、一般に本発明のあらゆる全ての実施態様に当てはまる。

【 0 0 3 3 】

ここでのおよび添付の特許請求の範囲の用法では、単数形「a」、「an」、および「the」は、特に断りのない限り複数の言及を含む。したがって例えば「植物 (a plant)」への言及は複数のこのような植物を含み、「細胞 (a cell)」への言及は 1 つ以上の細胞および当業者に知られているその同等物等を含む。

【 0 0 3 4 】

「脂肪酸」という用語は、(より長い、およびより短い鎖長の酸の双方も知られている) 約 C₁₂ ~ C₂₂ の様々な鎖長の長鎖脂肪酸 (アルカン酸) を指す。優勢な鎖長は C₁₆ ~ C₂₂ の間である。「飽和脂肪酸」対「不飽和脂肪酸」、「一価不飽和脂肪酸」対「多価不飽和脂肪酸」(または「P U F A」)、および「オメガ - 6 脂肪酸」(- 6 または n - 6) 対「オメガ - 3 脂肪酸」(- 3 または n - 3) の違いについて、さらに詳しくは米国特許第 7, 238, 482 号明細書で規定される。

【 0 0 3 5 】

脂肪酸は単純な表記体系「X : Y」によってここで記述され、X は特定の脂肪酸の炭素 (C) 原子の総数であり、Y は二重結合の数である。脂肪酸名に続く番号は、脂肪酸のカルボキシル末端からの二重結合の位置を示し、接辞「c」は二重結合の c i s 配置を示す (例えばパルミチン酸 (16 : 0)、ステアリン酸 (18 : 0)、オレイン酸 (18 : 1、9 c)、ペトロセリン酸 (18 : 1、6 c)、L A (18 : 2、9 c、12 c)、G L A (18 : 3、6 c、9 c、12 c)、および A L A (18 : 3、9 c、12 c、15 c))。特に断りのない限り、18 : 1、18 : 2、および 18 : 3 は、オレイン酸、L A、および A L A 脂肪酸をそれぞれ指す。特に断りのない限り、二重結合は c i s 配置にあると見なされる。例えば 18 : 2 (9, 12) 中の二重結合は c i s 配置にあると見なされる。

【 0 0 3 6 】

本開示において P U F A を既述するのに使用される命名法を下の表 2 に示す。「略記法」と題された欄では、オメガ - 参照システムが使用されて炭素数、二重結合数、およびオメガ炭素 (この目的では番号 1) から数えて、オメガ炭素に最も近い二重結合の位置を示

10

20

30

40

50

唆する。表の残りは、 - 3 および - 6 脂肪酸およびそれらの前駆物質の一般名、本明細書全体で使用される残りの略語、および各化合物の化学名を要約する。

【 0 0 3 7 】

【 表 3 】

表 2
多価不飽和脂肪酸および前駆物質の命名法

一般名	略語	化学名	略記法
ミリスチン酸	--	テトラデカン酸	14:0
パルミチン酸	PA または パルミチン酸	ヘキサデカン酸	16:0
パルミトレイン酸	--	9-ヘキサデセン酸	16:1
ステアリン酸	--	オクタデカン酸	18:0
オレイン酸	--	cis-9-オクタデセン酸	18:1
リノール酸	LA	cis-9,12-オクタデカジエン酸	18:2 ω -6
γ -リノレン酸	GLA	cis-6,9,12-オクタデカトリエン酸	18:3 ω -6
エイコサジエン酸	EDA	cis-11,14-エイコサジエン酸	20:2 ω -6
ジホモ- γ -リノレン酸	DGLA	cis-8,11,14-エイコサトリエン酸	20:3 ω -6
シアドン酸	SCI	cis-5,11,14-エイコサトリエン酸	20:3b ω -6
アラキドン酸	ARA	cis-5,8,11,14-エイコサテトラエン酸	20:4 ω -6
α -リノレン酸	ALA	cis-9,12,15-オクタデカトリエン酸	18:3 ω -3
ステアリドン酸	STA	cis-6,9,12,15-オクタデカテトラエン酸	18:4 ω -3
エイコサトリエン酸	ETra または ERA	cis-11,14,17-エイコサトリエン酸	20:3 ω -3
エイコサ-テトラエン酸	ETA	cis-8,11,14,17-エイコサテトラエン酸	20:4 ω -3
ジュニペロン酸	JUP	cis-5,11,14,17-エイコサトリエン酸	20:4b ω -3
ドコサトリエン酸	DRA	cis-10,13,16-ドコサトリエン酸	22:3 ω -6
ドコサ-テトラエン酸	DTA	cis-7,10,13,16-ドコサテトラエン酸	22:4 ω -6
ドコサ-ペンタエン酸	DPAn-6	cis-4,7,10,13,16-ドコサペンタエン酸	22:5 ω -6
エイコサ-ペンタエン酸	EPA	cis-5,8,11,14,17-エイコサペンタエン酸	20:5 ω -3
ドコサ-ペンタエン酸	DPA	cis-7,10,13,16,19-ドコサペンタエン酸	22:5 ω -3
ドコサ-ヘキサエン酸	DHA	cis-4,7,10,13,16,19-ドコサヘキサエン酸	22:6 ω -3

【 0 0 3 8 】

「トリアシルグリセロール」、「油」、および「TAG」という用語は、グリセロール分子とエステル化する 3 個の脂肪酸アシル残基から構成される中性脂質を指す（そしてこのような用語は、本開示の全体を通して区別なく使用される）。このような油は、長鎖 PUFA、ならびにより短い飽和および不飽和脂肪酸、および鎖長のより長い飽和脂肪酸を含有できる。したがって「油生合成」は、一般に細胞中での TAG 合成を指す。

【 0 0 3 9 】

「総脂質および油画分中のパーセント（％）PUFA」とは、これらの画分中の全脂肪

10

20

30

40

50

酸に対する P U F A のパーセントを指す。「全脂質画分」または「脂質画分」という用語は、どちらも油性生物中の全脂質（すなわち中性および極性）の合計を指すので、ホスファチジルコリン（P C）画分、ホスファチジルエタノールアミン（P E）画分、およびトリアシルグリセロール（T A G または油）画分内に位置する脂質を含む。しかし「脂質」および「油」という用語は、本明細書全体で同義的に使用される。

【 0 0 4 0 】

代謝経路または生合成経路は、生化学的意味において、細胞内で起きて酵素によって触媒され、細胞によって使用されまたは保存される代謝産物の形成、または別の代謝経路の開始（流束発生ステップと称される）のどちらかを達成する一連の化学反応と見なすことができる。これらの経路の多くは複雑であり、開始物質を所望の正確な化学構造を有する生成物に成形する段階を追った改変を伴う。

10

【 0 0 4 1 】

「P U F A 生合成経路」という用語は、オレイン酸を L A、E D A、G L A、D G L A、A R A、D R A、D T A、および D P A n - 6 などの - 6 脂肪酸と、A L A、S T A、E T r A、E T A、E P A、D P A、および D H A などの - 3 脂肪酸とに変換する代謝過程を指す。この過程は、文献で詳しく述べられる（例えば国際公開第 2 0 0 6 / 0 5 2 8 7 0 号パンフレットを参照されたい）。簡単に述べると、この過程は、小胞体膜中に存在する一連の特別な不飽和化酵素および延長酵素（すなわち「P U F A 生合成経路酵素」）による、炭素原子の添加を通じた炭素鎖延長、および二重結合付加を通じた分子不飽和化を伴う。より具体的には「P U F A 生合成経路酵素」とは、9 エロンガーゼ、C₁₄/₁₆ エロンガーゼ、C₁₆/₁₈ エロンガーゼ、C₁₈/₂₀ エロンガーゼ、C₂₀/₂₂ エロンガーゼ、4 デサチュラーゼ、5 デサチュラーゼ、6 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 デサチュラーゼおよび / または 8 デサチュラーゼをはじめとする、P U F A 生合成と関連付けられている酵素（および前記酵素をコードする遺伝子）のいずれかを指す。

20

【 0 0 4 2 】

「- 3 / - 6 脂肪酸生合成経路」という用語は、適切な条件下で発現すると、- 3 および - 6 脂肪酸の片方または双方の生成を触媒する酵素をコードする一組の遺伝子を指す。典型的に - 3 / - 6 脂肪酸生合成経路に関与する遺伝子は、P U F A 生合成経路酵素をコードする。代表的な経路を図 1 に示し、様々な中間体を経由するミリスチン酸の D H A への変換を提供して、- 3 および - 6 脂肪酸の双方が共通の原料からどのように生成できるかを実証する。経路は自然に 2 つの部分に別れ、1 つの部分は - 3 脂肪酸、別の部分は - 6 脂肪酸を発生させる。

30

【 0 0 4 3 】

「機能性」という用語は、ここで - 3 / - 6 脂肪酸生合成経路に関する文脈で、経路中の遺伝子のいくつか（または全て）が、活性酵素を発現し、生体内触媒作用または基質変換をもたらすことを意味する。いくつかの脂肪酸産物はこの経路の遺伝子のサブセットの発現のみを必要とするので、「- 3 / - 6 脂肪酸生合成経路」または「機能性 - 3 / - 6 脂肪酸生合成経路」は、全ての P U F A 生合成経路酵素遺伝子が要求されることを暗示しないものと理解される。

40

【 0 0 4 4 】

「6 デサチュラーゼ / 6 エロンガーゼ経路」という用語は、少なくとも 1 つの 6 デサチュラーゼおよび少なくとも 1 つの C₁₈/₂₀ エロンガーゼ（6 エロンガーゼとも称される）を最低限含み、それによって G L A および / または S T A を中間体脂肪酸として、それぞれ L A および A L A から D G L A および / または E T A を生合成できるようにする P U F A 生合成経路を指す。その他のデサチュラーゼおよびエロンガーゼの発現があれば、A R A、E P A、D P A、および D H A もまた合成されるかもしれない。

【 0 0 4 5 】

「9 エロンガーゼ / 8 デサチュラーゼ経路」という用語は、少なくとも 1 つの 9 エロンガーゼおよび少なくとも 1 つの 8 デサチュラーゼを最低限含み、それによって E

50

D Aおよび/またはE T r Aを中間体脂肪酸として、それぞれL AおよびA L AからD G L Aおよび/またはE T Aを生成できるようにするP U F A生成経路を指す。その他のデサチュラーゼおよびエロンガーゼの発現があれば、A R A、E P A、D P A、およびD H Aもまた合成されるかもしれない。

【0046】

「中間体脂肪酸」という用語は、脂肪酸代謝経路においてその他の代謝経路酵素の作用によって、意図される生成物脂肪酸にさらに変換できる、この経路内で生成されるあらゆる脂肪酸を指す。例えば 9 エロンガーゼ/ 8 デサチュラーゼ経路を使用してE P Aが生成される場合、E D A、E T r A、D G L A、E T A、およびA R Aが生成され、これらの脂肪酸は、その他の代謝経路酵素の作用を通じてE P Aにさらに変換できるので、「中間体脂肪酸」と見なすことができる。

10

【0047】

「副産物脂肪酸」という用語は、経路の意図される脂肪酸生成物でなく、また経路の「中間体脂肪酸」でもない、脂肪酸代謝経路内で生成されるあらゆる脂肪酸を指す。例えば 9 エロンガーゼ/ 8 デサチュラーゼ経路を使用してE P Aが生成される場合、それぞれE D AまたはE T r Aのどちらかに対する 5 デサチュラーゼの作用によって、シアドン酸(S C I)およびジュニペロン酸(J U P)もまた生成され得る。それらはどちらもその他の代謝経路酵素の作用によってE P Aにさらに変換されないので、「副産物脂肪酸」と見なされる。

【0048】

20

「デサチュラーゼ」という用語は、不飽和化できる、すなわち1個もしくはそれ以上の脂肪酸に二重結合を導入して、対象とする脂肪酸または前駆物質を生じさせるポリペプチドを指す。特定の脂肪酸を指すために、本明細書全体を通じた 参照システムの使用にもかかわらず、デルタシステムを使用して基質のカルボキシル末端から数えることで、デサチュラーゼの活性を示す方が都合よい。ここで特に興味深いのは、例えばE D AからD G L Aへの、および/またはE T r AからE T Aへの変換を触媒できる、分子のカルボキシル末端から数えて8番目と9番目の炭素原子間で脂肪酸を不飽和化する 8 デサチュラーゼである。その他の脂肪酸デサチュラーゼとしては、例えば(1) D G L AからA R Aおよび/またはE T AからE P Aへの変換を触媒する 5 デサチュラーゼ、(2) L AからG L Aおよび/またはA L AからS T Aへの変換を触媒する 6 デサチュラーゼ、(3) D P AからD H Aおよび/またはD T AからD P A n - 6への変換を触媒する 4 デサチュラーゼ、(4) オレイン酸からL Aへの変換を触媒する 12 デサチュラーゼ、(5) L AからA L Aおよび/またはG L AからS T Aへの変換を触媒する 15 デサチュラーゼ、(6) A R AからE P Aおよび/またはD G L AからE T Aへの変換を触媒する 17 デサチュラーゼ、および(7) パルミチン酸からパルミトレイン酸(16:1)および/またはステアリン酸からオレイン酸(18:1)への変換を触媒する 9 デサチュラーゼが挙げられる。当該技術分野では、 15 および 17 デサチュラーゼはまた、 - 6 脂肪酸をそれらの - 3 対応物に変換するそれらの能力(例えばそれぞれL AからA L Aへ、およびA R AからE P Aへの変換)に基づいて、時に「オメガ3 デサチュラーゼ」、「w - 3 デサチュラーゼ」および/または「 - 3 デサチュラーゼ」とも称される。いくつかの実施態様では、脂肪酸デサチュラーゼの遺伝子によって適切な宿主を形質転換し、宿主の脂肪酸プロファイルに対するその影響を判定することで、特定の脂肪酸デサチュラーゼの特異性を経験的に判定することが最も望ましいかもしれない。

30

40

【0049】

「E a D 8 D e s 1」という用語は、ユーグレナ・アナベナ(E u g l e n a a n a b a e n a)から単離され、ここで配列番号17によってコードされる 8 デサチュラーゼ酵素(配列番号21)を指す。「E a D 8 D e s 2」という用語は、ここで配列番号18によってコードされるE . アナベナ(a n a b a e n a)から単離された 8 デサチュラーゼ酵素(配列番号22)を指す。同様に「E a D 8 D e s 3」という用語は、E . アナベナ(a n a b a e n a)から単離され、ここで配列番号19によってコードされる

50

8 デサチュラーゼ酵素（配列番号 23）を指す。「E a D 8 D e s 4」という用語は、E . アナベナ（*a n a b a e n a*）から単離され、ここで配列番号 20 によってコードされる 8 デサチュラーゼ酵素（配列番号 24）を指す。同様に「E a D 8 S」という用語は、E . アナベナ（*a n a b a e n a*）に由来してヤロウィア・リポリティカ（*Y a r r o w i a l i p o l y t i c a*）中での発現についてコドン最適化された合成 8 デサチュラーゼ（すなわち配列番号 39 および 40）を指す。

【0050】

「E g D 8」という用語は、ミドリムシ（*E u g l e n a g r a c i l l i s*）から単離された（配列番号 2 で記載されるヌクレオチド配列によってコードされる） 8 デサチュラーゼ酵素を指す。国際公開第 2006/012325 号パンフレットおよび国際公開第 2006/012326 号パンフレット（すなわち米国特許第 7,256,033 号明細書の配列番号 2）で述べられるように、E g D 8 は「E g 5」と 100% 同一で機能的に同等である。

【0051】

「変換効率」および「% 基質変換」という用語は、それによって特定の酵素（例えばデサチュラーゼ）が基質を生成物に変換できる効率を指す。変換効率は以下の式に従って評価される。 $([生成物] / [基質 + 生成物]) \times 100$ 。式中、「生成物」には、直接生成物およびそれに由来する経路中の全生成物が含まれる。

【0052】

「エロンガーゼ」という用語は、脂肪酸炭素鎖を延長して、エロンガーゼが作用する脂肪酸基質よりも炭素 2 個分長い酸を生成できるポリペプチドを指す。この延長過程は、米国特許出願公開第 2005/013244 号明細書で述べられているように、脂肪酸シンターゼと関連している多段階機序で起きる。エロンガーゼ系によって触媒される反応の例は、G L A から D G L A へ、S T A から E T A へ、L A から E D A へ、A L A から E T r A へ、A R A から D T A へ、および E P A から D P A への変換である。

【0053】

一般にエロンガーゼの基質選択性はいくぶん広いが、鎖長および不飽和の程度の双方によって区別される。例えば $C_{14/16}$ エロンガーゼは C_{14} 基質（例えばミリスチン酸）を利用し、 $C_{16/18}$ エロンガーゼは C_{16} 基質（例えばパルミチン酸）を利用し、 $C_{18/20}$ エロンガーゼ（同義的に使用できる用語として 6 エロンガーゼとしてもまた知られている）は C_{18} 基質（例えば G L A、S T A）を利用し、 $C_{20/22}$ エロンガーゼは C_{20} 基質（例えば A R A、E P A）を利用する。同様に「9 エロンガーゼ」は L A から E D A へ、および / または A L A から E T r A への変換を触媒できる。いくつかのエロンガーゼは広い特異性を有し、したがって単一酵素がいくつかのエロンガーゼ反応を触媒できるかもしれないことに留意することが重要である（例えば $C_{16/18}$ エロンガーゼおよび $C_{18/20}$ エロンガーゼの双方として作用する）。脂肪酸エロンガーゼの遺伝子で適切な宿主を形質転換して、宿主の脂肪酸プロファイルに対するその影響を判定することで、脂肪酸エロンガーゼの特異性を経験的に判定することが望ましいかもしれない。

【0054】

「油性」という用語は、それらのエネルギー源を脂質の形態で保存する傾向がある生物を指す（Weete、「*Fungal Lipid Biochemistry*」、第 2 版、Plenum、1980 年）。油性微生物内では、細胞性油または T A G 含量は一般に S 字形曲線に従って、脂質濃度は対数後期または静止増殖期初期でそれが最大に達するまで増大し、次に静止後期および死滅期において徐々に減少する（Yongmanitichai および Ward, *Appl. Environ. Microbiol.*, 57:419~25 (1991 年)）。油性微生物がそれらの乾燥細胞重量の約 25% 超を油として蓄積することは珍しくない。

【0055】

「油性酵母」という用語は、油を作ることができる酵母に分類される微生物を指す。油性酵母の例としては、ヤロウィア（*Yarrowia*）、カンジダ（*Candida*）、

10

20

30

40

50

ロドトルラ (*Rhodotorula*)、ロドスポリジウム (*Rhodosporidium*)、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*) 属が挙げられるが、これにどのようなにも限定されるものではない。本発明で使用するものが好ましいのは、ヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) の油性株である。

【0056】

「ミドリムシ綱 (*Euglenophyceae*)」という用語は、淡水、海洋、土壌、および寄生性環境に生息する一群の単細胞無色のまたは光合成鞭毛虫 (「ユーグレナ属」) を指す。本綱は単生の単細胞によって特徴づけられ、ほとんどは自由遊泳性であり、レザバーとして知られる前部陥入から生える2本の鞭毛を有する (その1つは非出現性であってもよい)。光合成ユーグレナ属は1個から多数の葉緑体を含むし、それは微小円盤から幅広いプレートまたはリボン状と多様である。無色のユーグレナ属は、栄養素同化作用のために浸透栄養または摂食栄養に依存する。約1000種について記載されており、約40の属と6つの目に分類される。ミドリムシ綱 (*Euglenophyceae*) の例としては、ユーグレナ (*Euglena*)、ユートレプトチエラ (*Eutreptiella*)、およびテトルエトレプトチア (*Tetruetreptia*) 属が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0057】

ここでの用法では、「核酸」はポリヌクレオチドを意味し、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド塩基の一本鎖または二本鎖ポリマーを含む。核酸はまた、断片および修飾ヌクレオチドを含んでもよい。したがって「ポリヌクレオチド」、「核酸配列」、「ヌクレオチド配列」または「核酸断片」という用語は同義的に使用され、一本鎖または二本鎖であり、場合により合成、非天然または改変ヌクレオチド塩基を含む、RNAまたはDNAのポリマーを指す。DNAポリマーの形態のポリヌクレオチドは、cDNA、ゲノムDNA、合成DNA、またはそれらの混合物の1つ以上のセグメントを含んでもよい。ヌクレオチド (通常それらの5' - リン酸塩形態で見られる) は、次のようなそれらの一文字名によって言及される。「A」はアデニル酸またはデオキシアデニル酸 (それぞれRNAまたはDNAについて)、「C」はシチジル酸またはデオキシシチジル酸、「G」はグアニル酸またはデオキシグアニル酸、「U」はウリジル酸、「T」はデオキシチミジル酸、「R」はプリン (AまたはG)、「Y」はピリミジン (CまたはT)、「K」はGまたはT、「H」はAまたはCまたはT、「I」はイノシン、および「N」はあらゆるヌクレオチド。

【0058】

「保存ドメイン」または「モチーフ」という用語は、進化的に関連したタンパク質の整合配列に沿って、特定位置で保存されたアミノ酸のセットを意味する。その他の位置のアミノ酸は相同的なタンパク質の間で変動できるが、特定の位置で高度に保存されたアミノ酸は、タンパク質の構造、安定性、または活性において必須のアミノ酸を示唆する。それらはタンパク質相同体ファミリーの整合配列中のそれらの高度な保存の程度によって識別されるので、それらを識別子または「シグネチャー」として使用して、新たに判定された配列のタンパク質が、以前同定されたタンパク質ファミリーに属するかどうかを判定できる。

【0059】

「相同性」、「相同的」、「実質的に類似」、および「実質的に一致」という用語はここで同義的に使用される。それらは1つ以上のヌクレオチド塩基における変化が、核酸断片が遺伝子発現を仲介し、または特定の表現型を生じる能力に影響しない核酸断片を指す。これらの用語はまた、最初の未変性断片と比べて、得られる核酸断片の機能特性を実質的に変化させない、1個もしくはそれ以上のヌクレオチドの欠失または挿入などの本発明の核酸断片の変更改も指す。したがって当業者によって理解されるように、本発明は具体的な例示的配列を超えるものを包含する。

【0060】

さらに当業者は、本発明に包含される実質的に類似した核酸配列が、ここで例示する配列と、またはここで開示される核酸配列のいずれかと機能的に同等であるここで開示されるヌクレオチド配列のあらゆる部分と、（例えば $0.5 \times \text{SSC}$ 、 $0.1\% \text{SDS}$ 、 60 などの中程度にストリンジェントな条件下で）ハイブリダイズするそれらの能力によってもまた定義されることを認識する。ストリンジェンシー条件を調節して、遠縁の生物からの相同配列などの中程度に類似した断片や、近縁関係にある生物からの機能的酵素を複製する遺伝子などの類似性の高い断片をスクリーンできる。ハイブリダイゼーション後洗浄が、ストリンジェンシー条件を決定する。

【0061】

「選択的にハイブリダイズする」という用語は、その非標的核酸配列へのハイブリダイゼーションよりも検出できる程度により大きい（例えばバックグラウンドの少なくとも2倍）、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下における核酸配列の規定の核酸標的配列へのハイブリダイゼーション、および非標的核酸の実質的な排除への言及を含む。選択的にハイブリダイズする配列は、互いに典型的に少なくとも約80%の配列同一性、または90%の配列同一性、および100%までの配列同一性（すなわち完全に相補的）を有する。

【0062】

「ストリンジェントな条件」または「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」という用語は、その下でプローブがその標的配列と選択的にハイブリダイズする条件への言及を含む。ストリンジェントな条件は配列依存性であり、異なる状況では異なる。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーおよび/または洗浄条件を調製することで、プローブと100%相補的な標的配列を同定できる（相同的プロービング）。代案としては、ストリンジェンシー条件を調節して、より低い程度の類似性が検出されるように配列中のいくつかのミスマッチを可能にできる（異種性プロービング）。一般にプローブは、長さが約1000ヌクレオチド未満であり、場合により長さは500ヌクレオチド未満である。

【0063】

典型的にストリンジェントな条件は、その中で $\text{pH } 7.0 \sim 8.3$ において、塩濃度が約 1.5 M の Na イオン未満、典型的に約 $0.01 \sim 1.0 \text{ M}$ の Na イオン濃度（またはその他の塩）のものであり、温度は短いプローブ（例えば10～50ヌクレオチド）では少なくとも約30、および長いプローブ（例えば50ヌクレオチドを超える）では少なくとも約60である。ストリンジェントな条件はまた、ホルムアミドなどの不安定化剤の添加によって達成されてもよい。例示的な低ストリンジェンシー条件としては、37における30～35%ホルムアミド、 1 M NaCl 、 $1\% \text{SDS}$ （ドデシル硫酸ナトリウム）の緩衝液溶液によるハイブリダイゼーション、および50～55における $1 \times \sim 2 \times \text{SSC}$ （ $20 \times \text{SSC} = 3.0 \text{ M NaCl} / 0.3 \text{ M}$ クエン酸三ナトリウム）中での洗浄が挙げられる。例示的な中程度のストリンジェンシー条件としては、37における40～45%ホルムアミド、 1 M NaCl 、 $1\% \text{SDS}$ 中でのハイブリダイゼーション、および55～60における $0.5 \times \sim 1 \times \text{SSC}$ による洗浄が挙げられる。例示的な高ストリンジェンシー条件としては、37における50%ホルムアミド、 1 M NaCl 、 $1\% \text{SDS}$ 中でのハイブリダイゼーション、および60～65における $0.1 \times \text{SSC}$ による洗浄が挙げられる。

【0064】

特異性は典型的にハイブリダイゼーション後洗浄の関数であり、重要な要因は最終洗浄溶液のイオン強度および温度である。DNA-DNAハイブリッドでは、 T_m は Meinkothら 、*J. Anal. Biochem.*, 138: 267～284 (1984年) の式、 $T_m = 81.5 + 16.6 (\log M) + 0.41 (\% \text{GC}) - 0.61 (\% \text{form}) - 500 / L$ （式中 M は一価のカチオンのモル濃度であり、 $\% \text{GC}$ はDNA中のグアノシンおよびシトシンヌクレオチドの百分率であり、 $\% \text{form}$ はハイブリダイゼーション溶液中のホルムアミドの百分率であり、 L は塩基対中のハイブリッド長である）から

近似することができる。 T_m は(規定のイオン強度およびpH下で)50%の相補的標的配列が、完全にマッチするプローブとハイブリダイズする温度である。 T_m はそれぞれ1%のミスマッチ毎に約1℃低下する。したがって T_m 、ハイブリダイゼーションおよび/または洗浄条件を調節して、所望の同一性の配列にハイブリダイズすることができる。例えば、90%同一性の配列が求められる場合、 T_m を10℃低下させることができる。一般にストリンジェントな条件は、規定のイオン強度およびpHにおいて、特定の配列とその相補体の熱融点(T_m)よりも約5℃低くなるように選択される。しかし厳しくストリンジェントな条件は、熱融点(T_m)よりも1、2、3、または4℃低いハイブリダイゼーションおよび/または洗浄を利用でき、中程度にストリンジェントな条件は、熱融点(T_m)よりも6、7、8、9、または10℃低いハイブリダイゼーションおよび/または洗浄を利用でき、低いストリンジェンシー条件は熱融点(T_m)よりも11、12、13、14、15、または20℃低いハイブリダイゼーションおよび/または洗浄を利用できる。式、ハイブリダイゼーションおよび洗浄組成物、および所望の T_m を使用して、当業者は、ハイブリダイゼーションおよび/または洗浄溶液のストリンジェンシーのバリエーションについて、本質的に述べられていることを理解するであろう。所望のミスマッチ度が45(水溶液)または32(ホルムアミド溶液)未満の T_m をもたらすようであれば、より高い温度が使用できるようにSSC濃度を増大させることが好ましい。核酸ハイブリダイゼーションの詳しいガイドは、Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Acid Probes, Part I, Chapter 2「Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays」, Elsevier, New York(1993年);およびCurrent Protocols in Molecular Biology, Chapter 2, Ausubelら編, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York(1995年)にある。ハイブリダイゼーションおよび/または洗浄条件は、少なくとも10、30、60、90、120または240分間適用できる。

【0065】

核酸またはポリペプチド配列の文脈における「配列同一性」または「同一性」とは、規定の比較ウィンドウ上の最大一致について整列させると同一である、2つの配列内の核酸塩基またはアミノ酸残基を指す。

【0066】

したがって「配列同一性」百分率とは、比較ウィンドウ上で2つの最適に整合した配列を比較して判定された値を指し、比較ウィンドウ内のポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の一部は、2つの配列の最適アラインメントのための参照配列(付加または欠失を含まない)と比較して、付加または欠失(すなわちギャップ)を含んでなってもよい。百分率は、双方の配列中に同一の核酸塩基またはアミノ酸残基がある位置の数を判定して整合位置数を求め、比較ウィンドウ内の整合位置数を位置総数で除して、配列同一性百分率を得るために結果に100を乗じて計算される。配列同一性百分率の有用な例は、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%または95%、または50%~100%のあらゆる整数百分率が挙げられるが、これに限定されるものではない。これらの同一性は、ここで述べられるプログラムのいずれかを使用して判定できる。

【0067】

配列アラインメントおよび%同一性または類似性の計算は、「DNASTAR Inc.(Madison, WI)」からのLASERGENEバイオインフォマティクス演算スイートのMegAlign™プログラムをはじめとするが、これに限定されるものではない、相同的な配列を検出するようにデザインされた多様な比較法を使用して判定されてもよい。本明細書の文脈では、分析のために配列分析ソフトウェアが使用される場合、特

に断りのない限り、分析結果は言及されるプログラムの「デフォルト値」を基準にするものと理解される。ここでの用法では「デフォルト値」とは、最初に初期化した際に、ソフトウェアと共に当初ロードされるあらゆる値またはパラメーターのセットを意味する。

【0068】

「アラインメントのClustal V法」は、Clustal Vと標識されるアラインメント法(HigginsおよびSharp, CABIOS, 5:151~153(1989年); Higgins, D. G.ら、Comput. Appl. Biosci., 8:189~191(1992年))で述べられている)に対応し、「DNASTAR Inc. (Madison, WI)」からのLASERGENEバイオインフォマティクス演算スイートのMegAlign™プログラムにある。多重アラインメントでは、デフォルト値はGAP PENALTY = 10およびGAP LENGTH PENALTY = 10に対応する。Clustal V法を使用した、タンパク質配列のペアワイズアラインメントおよび%同一性の計算のデフォルトパラメーターは、K TUPLE = 1、GAP PENALTY = 3、WINDOW = 5、およびDIAGONALS SAVED = 5である。核酸では、これらのパラメーターはK TUPLE = 2、GAP PENALTY = 5、WINDOW = 4、およびDIAGONALS SAVED = 4である。Clustal Vプログラムを使用した配列アラインメント後、同一プログラム中の「配列距離」表を見ることで「%同一性」を得ることができる。

10

【0069】

「アラインメントのBLASTN法」は、国立バイオテクノロジー情報センター(NCBI)によって提供される、デフォルトパラメーターを使用してヌクレオチド配列を比較するためのアルゴリズムである。

20

【0070】

当業者は、同一または類似機能または活性を有するその他の種からのポリペプチドを同定するのに、多くのレベルの配列同一性が有用であることを良く理解するであろう。有用な%同一性の例としては、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%、または50%~100%のあらゆる整数百分率が挙げられるが、これに限定されるものではない。実際、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%など、50%~100%のあらゆる整数のアミノ酸同一性が、本発明について述べるのに有用かもしれない。またこの単離されたヌクレオチド断片のあらゆる全長または部分的相補体も興味深い。

30

【0071】

「コドン縮重」とは、コードされるポリペプチドのアミノ酸配列に影響しないヌクレオチド配列の変動を可能にする遺伝子コードの性質を指す。したがって本発明は、配列番号21、22、23、および24に記載の本ユーグレナ属ポリペプチドをコードするアミノ酸配列の全て、またはかなりの部分をコードするあらゆる核酸断片に関する。当業者は、特定のアミノ酸を特定化するヌクレオチドコドンの使用における、特定の宿主細胞によって示される「コドンバイアス」についてよく知っている。したがって宿主細胞中の改善された発現のために遺伝子を合成する場合、そのコドン使用頻度が、宿主細胞の好むコドン使用頻度に近くなるように遺伝子をデザインすることが望ましい。

40

【0072】

「合成遺伝子」は、当業者に公知の手順を使用して化学的に合成されるオリゴヌクレオチド構成単位からアセンブルできる。これらの構成単位をライゲーションシアニールして遺伝子セグメントを形成し、次にそれを酵素的にアセンブルして遺伝子全体を構築する。したがって遺伝子をヌクレオチド配列の最適化に基づいて、最適な遺伝子発現のために個別に調整し、宿主細胞のコドンバイアスを反映させることができる。当業者は、コドン利

50

用が宿主によって好まれるコドンに偏っている場合の遺伝子発現成功の可能性を理解する。好ましいコドンの判定は、配列情報が利用できる宿主細胞由来の遺伝子の調査に基づくことができる。

【0073】

「遺伝子」とは特定のタンパク質を発現する核酸断片を指し、それはコード領域のみを指してもよく、またはコード配列に先行する（5'非コード配列）およびそれに続く（3'非コード配列）制御配列を含んでもよい。「天然遺伝子」とは、自然界にそれ自体の制御配列と共に見られる遺伝子を指す。「キメラ遺伝子」とは、自然界に共に見られない制御およびコード配列を含んでなる天然遺伝子でないあらゆる遺伝子を指す。したがってキメラ遺伝子は、異なる起源由来の制御配列およびコード配列、あるいは同一起源由来であるが、自然界に見られるのとは異なる様式で配列される制御配列およびコード配列を含んでなってもよい。「内在性遺伝子」とは、生物ゲノム中のその天然位置にある天然遺伝子を指す。「外来性」遺伝子とは、宿主生物中に常態では見られないが、遺伝子移入によって宿主生物に導入された遺伝子を指す。外来遺伝子は非天然生物中に挿入された天然遺伝子、またはキメラ遺伝子を含んでなることができる。「導入遺伝子」とは、形質転換によってゲノム中に導入された遺伝子である。「コドン最適化遺伝子」とは、そのコドン使用頻度が宿主細胞の好むコドン使用頻度を模倣するようにデザインされた遺伝子である。

10

【0074】

「コード配列」とは、特定のアミノ酸配列をコードするDNA配列を指す。「制御配列」とは、コード配列の上流（5'非コード配列）、その中、または下流（3'非コード配列）に位置し、関連したコード配列の転写、RNAプロセッシングまたは安定性、または翻訳に影響を与えるヌクレオチド配列を指す。制御配列としては、プロモーター、翻訳リーダー配列、イントロン、ポリアデニル化認識配列、RNAプロセッシング部位、エフェクター結合部位、およびステムループ構造が挙げられるが、これに限定されるものではない。

20

【0075】

「プロモーター」とは、コード配列または機能性RNAの発現を調節できるDNA配列を指す。一般にコード配列はプロモーター配列に対して3'に位置する。プロモーターはその全体が天然遺伝子に由来しても良く、あるいは自然界に見られる異なるプロモーター由来の異なる要素からなっても良く、あるいは合成DNAセグメントを含んでなってさえ良い。異なるプロモーターが、異なる組織または細胞タイプ中で、あるいは異なる発育段階で、あるいは異なる環境条件に呼応して、遺伝子の発現を導いても良いことが当業者には理解される。ほとんどの場合にほとんどの細胞タイプ中で遺伝子の発現を引き起こすプロモーターは、一般に「構造プロモーター」と称される。ほとんどの場合、制御配列の正確な境界は完全に画定されていないので、いくつかのバリエーションのDNA断片が、同一プロモーター活性を有してもよいこともさらに認識される。

30

【0076】

プロモーター配列は、近位およびより遠位の上流要素からなってもよく、後者の要素はエンハンサーと称されることが多い。したがって「エンハンサー」はプロモーター活性を刺激できるDNA配列であり、プロモーターの固有要素であっても、またはプロモーターのレベルまたは組織特異性を増強するために挿入された異種要素であってもよい。

40

【0077】

「翻訳リーダー配列」とは、遺伝子のプロモーター配列とコード配列との間に位置するポリヌクレオチド配列を指す。翻訳リーダー配列は、翻訳開始配列上流の完全に加工されたmRNAに存在する。翻訳リーダー配列は一次転写物のmRNAへのプロセッシング、mRNAの安定性または翻訳効率に影響を与えるかもしれない。翻訳リーダー配列の例については述べられている（Turner, R. および Foster, G. D., Mol. Biotechnol., 3: 225 ~ 236 (1995年)）。

【0078】

「3'非翻訳配列」、「終結配列」および「転写ターミネーター」という用語は、コード配列下流に位置するDNA配列を指す。これには、mRNAプロセッシングまたは遺伝

50

子発現に影響できる調節シグナルをコードするポリアデニル化認識配列、およびその他の配列が含まれる。ポリアデニル化シグナルは、通常、mRNA前駆物質の3'末端へのポリアデニル酸トラクトの付加に影響することで特徴づけられる。3'領域は、関連したコード配列の転写、RNAプロセッシングまたは安定性、または翻訳に影響できる。

【0079】

「RNA転写物」とは、RNAポリメラーゼが触媒するDNA配列転写から得られる生成物を指す。「RNA転写物」がDNA配列の完全な相補的コピーである場合、それは一次転写物と称される。RNA転写物が一次転写物の転写後プロセッシングに由来するRNA配列である場合、それは成熟RNAと称される。「メッセンジャーRNA」または「mRNA」とは、イントロンがなく細胞がタンパク質に翻訳できるRNAを指す。「cDNA」とは、mRNAテンプレートに相補的であり、逆転写酵素を使用してそれから合成されるDNAを指す。cDNAは一本鎖であることができ、またはDNAポリメラーゼIのクレノウ(Klenow)断片を使用して二本鎖形態に変換できる。「センス」RNAとは、mRNAを含み細胞内または生体外でタンパク質に翻訳できるRNA転写物を指す。「アンチセンスRNA」とは、標的一次転写物またはmRNAの全部または一部に相補的で、標的遺伝子の発現を阻止するRNA転写物を指す(米国特許第5,107,065号明細書)。アンチセンスRNAの相補性は、特定の遺伝子転写物のあらゆる部分、すなわち5'非コード配列、3'非コード配列、イントロン、またはコード配列との相補性であってもよい。「機能性RNA」とは、翻訳されないかもしれないがなおも細胞プロセスに影響を与える、アンチセンスRNA、リボザイムRNA、またはその他のRNAを指す。「相補体」および「逆相補体」という用語は、ここでmRNA転写物に関して同義的に使用され、メッセージのアンチセンスRNAを定義することが意図される。

【0080】

「作動的に結合した」という用語は、1つの機能が他方の機能による影響を受けるような、単一核酸断片上の核酸配列のつながりを指す。例えばプロモーターがコード配列の発現に影響を及ぼすことができる(すなわちコード配列がプロモーターの転写調節下にある)場合、それはそのコード配列と作動的に結合する。コード配列は、センスまたはアンチセンス方向で制御配列に作動的に結合できる。

【0081】

「組み換え」という用語は、例えば化学合成による、または遺伝子操作技術を通じた核酸の単離セグメントの操作による、2つのさもなければ別々の配列セグメントの人為的組み合わせを指す。

【0082】

「発現」という用語は、ここでの用法では、本発明の核酸断片由来のセンス(mRNA)またはアンチセンスRNAの転写と安定した蓄積を指す。発現はまた、mRNAのタンパク質(前駆または成熟のいずれか)への翻訳も指す。

【0083】

「成熟」タンパク質とは、翻訳後処理されたポリペプチド、すなわち一次翻訳生成物中に存在するあらゆるプレまたはプロペプチドがそれから除去されたものを指す。「前駆」タンパク質とは、mRNAの翻訳の一次生成物、すなわちプレまたはプロペプチドが依然として存在するものを指す。プレまたはプロペプチドは、細胞内局在化シグナルであってもよい(が、これに限定されるものではない)。

【0084】

「プラスミド」および「ベクター」という用語は、細胞の中央代謝の一部でない遺伝子を保有することが多く、通常は環状二本鎖DNA断片の形態である染色体外要素を指す。このような要素は、あらゆる起源に由来する一本鎖または二本鎖のDNAまたはRNAの直線または環状、自己複製配列、ゲノム組み込み配列、ファージまたはヌクレオチド配列であってもよく、その中ではいくつかのヌクレオチド配列が結合または組み換えされて、細胞に発現カセットを導入できるユニークな構造になる。

【0085】

「発現カセット」という用語は、選択された遺伝子のコード配列と、選択された遺伝子産物の発現に必要である、コード配列に先行する（5'非コード配列）およびそれに続く（3'非コード配列）制御配列とを含んでなるDNA断片を指す。したがって発現カセットは、典型的に（1）プロモーター配列、（2）コード配列（すなわちORF）、および（3）真核生物では通常はポリアデニル化部位を含有する3'非翻訳領域（すなわちターミネーター）から構成される。発現カセットは通常はベクターに含まれて、クローニングおよび形質転換を容易にする。各宿主に対して妥当な制御配列を使用さえすれば、異なる発現カセットを細菌、酵母、植物、および哺乳類細胞をはじめとする異なる生物に形質転換できる。

【0086】

「組み換えDNAコンストラクト」（ここで同義的に「発現コンストラクト」および「コンストラクト」とも称される）は、例えば自然界に一緒には見られない制御およびコード配列などの核酸断片の人為的組み合わせを含んでなる。例えば組み換えDNAコンストラクトは、異なる起源に由来する制御配列およびコード配列、または同一起源に由来するが自然界で見られるのとは異なる様式で配列する制御配列およびコード配列を含んでなってもよい。このようなコンストラクトは単独で使用してもよく、またはベクターと併せて使用してもよい。ベクターを使用する場合、当業者に良く知られているように、ベクターの選択は宿主細胞を形質転換するのに使用される方法に依存する。例えばプラスミドベクターが使用できる。当業者は、本発明の単離された核酸断片のいずれかを含んでなる宿主細胞を成功裏に形質転換、選択、および増殖するために、ベクター上に存在しなくてはならない遺伝的要素を十分承知している。当業者は、異なる独立した形質転換事象が、異なる発現レベルおよびパターンをもたらすであろうこと（Jonesら、EMBOJ., 4: 2411~2418（1985年）；De Almeidaら、Mol. Gen. Genetics, 218: 78~86（1989年））、したがって所望の発現レベルとパターンを示す系統を得るためには、複数の事象をスクリーンしなくてはならないこともまた認識するであろう。このようなスクリーニングは、特にDNAのサザン分析、mRNA発現のノーザン分析、タンパク質発現の免疫ブロット分析、または表現型分析によって達成されてもよい。

【0087】

「導入される」という用語は、細胞に核酸（例えば発現カセット）またはタンパク質を提供することを意味する。導入されるとは、真核または原核細胞への核酸の組み込みへの言及を含み、核酸は細胞のゲノム中に組み込まれてもよく、細胞への核酸またはタンパク質の一時的提供への言及を含む。導入されるとは、安定したまたは一時的形質転換法、ならびに有性交雑への言及を含む。したがって細胞中への核酸断片（例えば組み換えDNAコンストラクトまたは発現カセット）挿入の文脈において「導入される」とは、「形質移入」または「形質転換」または「形質導入」を意味し、真核または原核細胞中への核酸断片の組み込みへの言及を含み、核酸断片は、細胞（例えば染色体、プラスミド、色素体またはミトコンドリアDNA）のゲノム中に組み込まれても、自律性レプリコンに変換されても、または一時的に発現されてもよい（例えば形質移入mRNA）。

【0088】

「安定した形質転換」とは、遺伝的に安定した遺伝形質をもたらす、核および細胞小器官ゲノムの双方を含む核酸断片の宿主生物ゲノム中への転移を指す。対照的に「一時的形質転換」とは、組み込みまたは安定した遺伝形質なしに遺伝子発現をもたらす、宿主生物の核、またはDNA含有細胞小器官中への核酸断片の転移を指す。形質転換された核酸断片を含有する宿主生物は、「遺伝子導入」生物または「組み換え」または「形質転換」生物と称される。

【0089】

ここでの用法では、「遺伝子導入」とは、そのゲノム中に異種のポリヌクレオチドを含んでなる細胞を指す。好ましくは異種のポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドが次に続く世代に受け継がれるようにゲノム中に安定して組み込まれる。異種のポリヌクレオチド

10

20

30

40

50

を単独でまたは発現カセットの一部として、ゲノム中に組み込んでもよい。遺伝子導入は、最初からそのように改変された遺伝子導入、ならびに最初の遺伝子導入から有性交配または無性繁殖によって作り出されたものをはじめとする、その遺伝子型が異種の核酸の存在によって改変されているあらゆる細胞または細胞系を含めてここで使用される。「遺伝子導入」という用語は、ここでの用法では、ランダム他家受精、非組み換えウィルス感染、非組み換え細菌形質転換、非組み換え遺伝子転位、または自然突然変異などの天然事象によるゲノム（染色体または染色体外）の改変を包含しない。

【0090】

ここで使用される標準組み換えDNAおよび分子クローニング技術については、当該技術分野でよく知られており、Sambrook, J., Fritsch, E. F. および Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1989年); Silhavy, T. J., Bennan, M. L. および Enquist, L. W., Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1984年); および Ausubel, F. M. ら、Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience, Hoboken, NJ (1987年) でより詳しく述べられている。形質転換法については当業者に良く知られており、下の An Overview: Microbial Biosynthesis Of Fatty Acids And Triacylglycerols で述べられている。

【0091】

一般に油性微生物中の脂質蓄積は、増殖培地中に存在する全体的な炭素対窒素比に応じて始動する。油性微生物中での遊離パルミチン酸（16：0）の新規合成につながるこの過程は、米国特許第7,238,482号明細書で詳細に述べられている。パルミチン酸は、エロンガーゼとデサチュラーゼの作用を通じて形成される、より鎖長の長い飽和および不飽和脂肪酸誘導体の前駆物質である（図1）。

【0092】

TAG（脂肪酸の主要な貯蔵単位）は、以下が関与する一連の反応によって形成される。1.) アシルトランスフェラーゼによる1分子のアシル-CoAのグリセロール-3-リン酸塩へのエステル化がリゾホスファチジン酸を生じ、2.) アシルトランスフェラーゼによる第2のアシル-CoA分子のエステル化が1,2-ジアシルグリセロールリン酸塩（一般にホスファチジン酸として同定される）を生じ、3.) ホスファチジン酸ホスファターゼによるリン酸塩の除去が1,2-ジアシルグリセロール（DAG）を生じ、4.) アシルトランスフェラーゼの作用による第3の脂肪酸の付加がTAGを形成する。飽和および不飽和脂肪酸および短鎖および長鎖脂肪酸をはじめとする、幅広い脂肪酸をTAGに組み込むことができる。

【0093】

オメガ脂肪酸の生合成

オレイン酸が $n-3$ / $n-6$ 脂肪酸に変換される代謝プロセスは、炭素原子付加を通じた炭素鎖の延長、および二重結合添加を通じた分子の不飽和化を伴う。これは、小胞体膜内に存在する一連の特別な不飽和化酵素および延長酵素を必要とする。しかし図1に示され下で述べられるように、特定 $n-3$ / $n-6$ 脂肪酸生成のための複数の代案の経路があることが多い。

【0094】

具体的には全ての経路は、1,2-デサチュラーゼによる、オレイン酸から第1の $n-6$ 脂肪酸であるLAへの最初の変換を必要とする。次に「 $n-9$ エロンガーゼ/ $n-8$ デサチュラーゼ経路」および基質としてLAを使用して、長鎖 $n-6$ 脂肪酸が次のように形成される。（1）LAが $n-9$ エロンガーゼによってEDAに変換され、（2）EDAが $n-8$ デサ

10

20

30

40

50

チュラーゼによってDGLAに変換され、(3)DGLAが5デサチュラーゼによってARAに変換され、(4)ARAがC_{20/22}エロンガーゼによってDTAに変換され、(5)DTAが4デサチュラーゼによってDPAn-6に変換される。代案としては「9エロンガーゼ/8デサチュラーゼ経路」は、基質としてALAを使用して、次のように長鎖-3脂肪酸を生成できる。(1)LAが15デサチュラーゼによって第1の-3脂肪酸であるALAに変換され、(2)ALAが9エロンガーゼによってETRAに変換され、(3)ETRAが8デサチュラーゼによってETAに変換され、(4)ETAが5デサチュラーゼによってEPAに変換され、(5)EPAがC_{20/22}エロンガーゼによってDPAに変換され、(6)DPAが4デサチュラーゼによってDHAに変換される。場合により-6脂肪酸が-3脂肪酸に変換されてもよく、例えばALAが15デサチュラーゼ活性によってLAから生成され、ETAおよびEPAが17デサチュラーゼ活性によってDGLAおよびARAからそれぞれ生成される。

10

【0095】

-3/-6脂肪酸を生合成するための代案の経路は、6デサチュラーゼおよびC_{18/20}エロンガーゼ(すなわち「6デサチュラーゼ/6エロンガーゼ経路」)を利用する。より具体的にはLAおよびALAが6デサチュラーゼによってそれぞれGLAおよびSTAに変換されてもよく、次にC_{18/20}エロンガーゼがGLAをDGLAにおよび/またはSTAをETAに変換する。下流PUFAは、引き続いて上述のように形成される。

【0096】

20

-3/-6脂肪酸の生成のために特定の宿主生物中に導入することが必要とされる特定の機能性は、宿主細胞(およびその天然PUFAプロファイルおよび/またはデサチュラーゼ/エロンガーゼプロファイル)、基質の可用性、および所望の最終産物に左右されることが考察される。前者の経路によって生成されるPUFAはGLAおよび/またはSTAを欠くので、例えば実施態様によっては、6デサチュラーゼ/6エロンガーゼ経路の発現とは対照的に、9エロンガーゼ/8デサチュラーゼ経路の発現が好ましいかもしれない。

【0097】

当業者は、-3/-6脂肪酸生合成のために所望される各酵素をコードする、様々な候補遺伝子を同定できるであろう。有用なデサチュラーゼおよびエロンガーゼ配列はあらゆる供給源に由来してもよく、例えば天然供給源(細菌、藻類、真菌、植物、動物など)から単離され、半合成経路によって生成され、または新規(*de novo*)合成される。宿主中に導入されるデサチュラーゼおよびエロンガーゼ遺伝子の特定の供給源は重大でないが、デサチュラーゼまたはエロンガーゼ活性を有する特異的ポリペプチド選択のための考慮事項としては以下が挙げられる。1.)ポリペプチドの基質特異性、2.)ポリペプチドまたはその構成要素が律速酵素であるかどうか、3.)デサチュラーゼまたはエロンガーゼが所望のPUFA合成に必須であるかどうか、4.)ポリペプチドが必要とする補助因子、および/または、5.)ポリペプチドが、その生成後に修飾されたかどうか(例えば、キナーゼまたはプレニルトランスフェラーゼによって)。発現したポリペプチドは、好ましくは宿主細胞中のその位置の生化学的環境に適したパラメーターを有する(米国特許第7,238,482号明細書を参照されたい)。

30

40

【0098】

特定の各デサチュラーゼおよび/またはエロンガーゼの変換効率を考慮することもまた有用であろう。各酵素は、基質を生成物に変換するのに100%効率では滅多に機能しないので、宿主細胞中で生成される非精製油の最終脂質プロファイルは、典型的に、所望の-3/-6脂肪酸、ならびに様々な上流中間PUFAからなる様々なPUFAの混合物になるであろう。したがって所望の脂肪酸の生合成を最適化するにあたって、各酵素の変換効率を考慮しなくてはならない。

【0099】

上の各考察を念頭に置いて、公的に入手可能な文献(例えばGenBank)、特許文

50

献、および P U F A 生成能力を有する生物の実験的分析に従って、適切なデサチュラーゼおよびエロンガーゼ活性（例えば 6 デサチュラーゼ、C_{18/20}エロンガーゼ、5 デサチュラーゼ、17 デサチュラーゼ、15 デサチュラーゼ、9 デサチュラーゼ、12 デサチュラーゼ、C_{14/16}エロンガーゼ、C_{16/18}エロンガーゼ、9 エロンガーゼ、8 デサチュラーゼ、4 デサチュラーゼ、および C_{20/22}エロンガーゼ）を有する候補遺伝子を同定できる。これらの遺伝子は生物の P U F A 合成を可能にし、または増強するために、特定の宿主生物に導入するのに適するであろう。

【 0 1 0 0 】

新しい 8 デサチュラーゼの配列同定

本発明では、下の表 3 で要約するように 8 デサチュラーゼをコードするヌクレオチド配列が、ユーグレナ・アナベナ (*E u g l e n a a n a b a e n a*) から単離されている。

【 0 1 0 1 】

【表 4】

表 3

ユーグレナ・アナベナ(*Euglena anabaena*)Δ8 デサチュラーゼの要約

略語	ヌクレオチド配列番号	アミノ酸配列番号
EaD8Des1	17	21
EaD8Des2	18	22
EaD8Des3	19	23
EaD8Des4	20	24
EaD8S	39	40

* 注記: 配列番号 40 は配列番号 23 と配列が同一である

【 0 1 0 2 】

したがって本発明は、

(a) 8 デサチュラーゼ活性を有して、配列番号 2 1、配列番号 2 2、配列番号 2 3 または配列番号 2 4 に記載のアミノ酸配列と比較すると、アラインメントの C l u s t a l V 法に基づいて少なくとも 8 0 % のアミノ酸同一性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、

(b) 8 デサチュラーゼ活性を有するポリペプチドをコードして、配列番号 1 7、配列番号 1 8、配列番号 1 9、配列番号 2 0 または配列番号 3 9 に記載のヌクレオチド配列と比較すると、アラインメントの B L A S T N 法に基づいて少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列、または

(c) (a) または (b) のヌクレオチド配列の相補体を含んでなり、相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 1 0 0 % 相補的である、単離されたポリヌクレオチド、およびポリヌクレオチドを含んでなる宿主細胞に関する。

【 0 1 0 3 】

なおも別の態様では、本発明は、8 デサチュラーゼ活性を有するポリペプチドをコードして、配列番号 1 7、配列番号 1 8、配列番号 1 9、配列番号 2 0 または配列番号 3 9 に記載のヌクレオチド配列と比較すると、アラインメントの B L A S T N 法に基づいて少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなる、単離されたポリヌクレオチドに関する。

【 0 1 0 4 】

少なくとも約 8 0 % ~ 9 0 % 同一のより好ましいアミノ酸断片が特に適切であり、少なくとも約 9 0 % ~ 9 5 % 同一の配列が最も好ましい。同様に本 O R F に対応する核酸配列

をコードする好ましい 8 デサチュラーゼは、活性タンパク質をコードして少なくとも約 80% ~ 90% 同一のものであり、少なくとも約 90% ~ 95% 同一の配列が最も好ましい。

【0105】

別の実施態様では、本 E a D 8 D e s 1、E a D 8 D e s 2、E a D 8 D e s 3 および / または E a D 8 D e s 4 デサチュラーゼ配列を特定の宿主生物中での発現についてコドン最適化できる。一般に宿主が好むコドンは、対象とする特定の宿主種中で、タンパク質（好ましくは最大量で発現するもの）中のコドン使用頻度を調べ、どのコドンが最高頻度で使用されるかを判定することで判定できる。次に宿主種中で好まれるコドンを使用して、例えばデサチュラーゼ活性を有する対象とするポリペプチドのコード配列が、全体的にまたは部分的に合成できる。全ての（または一部の）DNA を合成して、転写された mRNA 中に存在する二次構造のあらゆる不安定化配列または領域を除去することもできる。全ての（または一部の）DNA を合成して、所望の宿主細胞中で塩基組成物をより好ましいものに改変することもできる。

10

【0106】

本発明の一実施態様では、E a D 8 D e s 3（配列番号 19）は、ヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）中での発現についてコドン最適化された。これは以前の Y・リポリティカ（*lipolytica*）コドン使用頻度プロファイルの判定、好ましいコドンの同定、および「ATG」開始コドン周辺の共通配列の判定に基づいて可能であった（参照によって本明細書に援用する米国特許第 7, 238, 482 号明細書および米国特許第 7, 125, 672 号明細書を参照されたい）。得られた合成遺伝子は E a D 8 S（配列番号 39）と称される。コドン最適化 8 デサチュラーゼ遺伝子によってコードされるタンパク質配列（すなわち配列番号 40）は、野生型タンパク質配列（すなわち配列番号 23）と同一である。類似の技術を利用して、Y・リポリティカ（*lipolytica*）中での発現のために、E a D 8 D e s 1、E a D 8 D e s 2 および / または E a D 8 D e s 4 に由来する合成 8 デサチュラーゼを生成できる。

20

【0107】

当業者はここでの教示を使用して、野生型 E a D 8 D e s 1、E a D 8 D e s 2、E a D 8 D e s 3 および / または E a D 8 D e s 4 配列に基づいて、代案の宿主中での最適発現に適した、様々なその他のコドン最適化 8 デサチュラーゼタンパク質を作り出すことができる。したがって本発明は、野生型ヌクレオチド配列 E a D 8 D e s 1（配列番号 17）、E a D 8 D e s 2（配列番号 18）、E a D 8 D e s 3（配列番号 19）または E a D 8 D e s 4（配列番号 20）に由来する、あらゆるコドン最適化 8 デサチュラーゼタンパク質に関する。これとしては、合成 8 デサチュラーゼタンパク質（すなわち E a D 8 S）をコードしてヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）中での発現についてコドン最適化された配列番号 39 に記載のヌクレオチド配列が挙げられるが、これに限定されるものではない。代案の実施態様では、E a D 8 D e s 1、E a D 8 D e s 2、E a D 8 D e s 3 および / または E a D 8 D e s 4 をコードするコドンの一部を修正して、植物または植物の部分をはじめとするが、これに限定されるものではない宿主生物における遺伝子発現を増強することが望ましいかもしれない。

30

40

【0108】

相同体の同定および単離

本デサチュラーゼ配列（すなわち E a D 8 D e s 1、E a D 8 D e s 2、E a D 8 D e s 3、E a D 8 D e s 4、E a D 8 S）のいずれかまたはその一部を使用して、同一のまたはその他の細菌、藻類、真菌、ユーグレナまたは植物種中で配列分析ソフトウェアを使用して、8 デサチュラーゼ相同体を検索してもよい。一般には、このようなコンピューターソフトウェアは、様々な置換、欠失、およびその他の改変に相同性の程度を割り当てて同様の配列をマッチする。

【0109】

代案としては 8 デサチュラーゼ相同体の同定のために、本デサチュラーゼ配列または

50

その部分のいずれかをハイブリダイゼーション試薬として用いてもよい。核酸ハイブリダイゼーション試験の基本的構成要素には、プローブ、対象とする遺伝子または遺伝子断片を含有することが疑われるサンプル、および特定のハイブリダイゼーション法が含まれる。本発明のプローブは、典型的に、検出される核酸配列に相補的な一本鎖核酸配列である。プローブは、検出される核酸配列と「ハイブリダイズ可能」である。プローブの長さは、5個の塩基から数万個の塩基の間で変動してもよいが、典型的に約15個の塩基から約30個の塩基のプローブ長が適切である。プローブ分子の一部のみが、検出される核酸配列に相補的であればよい。さらにプローブと標的配列との間の相補性は完璧でなくてもよい。ハイブリダイゼーションは不完全に相補的な分子間でも生じ、その結果、ハイブリダイズした領域の特定塩基の一部は、適切な相補的塩基と対合形成しない。

10

【0110】

ハイブリダイゼーション法については、良く定義されている。典型的には、プローブおよびサンプルは、核酸ハイブリダイゼーションを可能にする条件下で混合されなくてはならない。これは適切な濃度および温度条件下において、無機または有機塩存在下で、プローブとサンプルを接触させることを伴う。プローブとサンプル核酸の間であらゆる可能なハイブリダイゼーションが起きるように、プローブおよびサンプル核酸は、十分長い時間接触しなくてはならない。混合物中のプローブまたは標的濃度が、ハイブリダイゼーションが生じるのに必要な時間を決定する。プローブまたは標的濃度が高いほど、必要なハイブリダイゼーションインキュベーション時間は短くなる。場合により、カオトロピック剤を添加してもよい（塩化グアニジニウム、グアニジニウムチオシアネート、ナトリウムチオシアネート、テトラクロロ酢酸リチウム、過塩素酸ナトリウム、テトラクロロ酢酸ルビジウム、ヨウ化カリウム、およびトリフルオロ酢酸セシウム）。所望するならば、ハイブリダイゼーション混合物にホルムアミドを典型的に30～50%（v/v）添加できる。

20

【0111】

様々なハイブリダイゼーション溶液を用いることができる。それらは典型的に約20～60容量%、好ましくは30容量%の極性有機溶剤からなる。一般的なハイブリダイゼーション溶液は、約30～50% v/vのホルムアミドと、約0.15～1Mの塩化ナトリウムと、（例えばクエン酸ナトリウム、トリス-HCl、PIPESまたはHEPES（pH範囲約6～9）などの）約0.05～0.1Mの緩衝液と、（例えばドデシル硫酸ナトリウムなどの）約0.05～0.2%の洗剤、または0.5～20mMのEDTA、ファーマシア（Pharmacia Inc.）からのFICOLL（約300～500kDa）、ポリビニルピロリドン（約250～500kDa）、および血清アルブミンを用いる。また典型的なハイブリダイゼーション溶液には、約0.1～5mg/mLの非標識の担体核酸、（例えば仔ウシ胸腺またはサケ精子DNA、または酵母菌RNAなどの）核酸DNA断片、および場合により約0.5～2%重量/体積のグリシンも含まれる。様々な（例えばポリエチレングリコールなどの）極性水溶性または水性膨張剤、（例えばポリアクリレートまたはポリメチルアクリレートなどの）陰イオンポリマー、（例えば硫酸デキストランなどの）陰イオン糖類ポリマーをはじめとする体積排除剤などのその他の添加剤を含めてもよい。

30

【0112】

核酸ハイブリダイゼーションは多様なアッセイ型式に適合できる。最も適切なもの1つは、サンドイッチアッセイ型式である。サンドイッチアッセイは、特に非変性条件下でのハイブリダイゼーションに適合できる。サンドイッチタイプのアッセイの主要構成要素は、固体担体である。固体担体は、未標識で配列の一部と相補的である固定化核酸プローブをそれに吸着し、またはそれと共有結合する。

40

【0113】

さらに別の実施態様では、ここで述べられる8デサチュラーゼ核酸断片（または同定されたそのあらゆる相同体）のいずれかを使用して、同一または別の細菌、藻類、真菌、ユーグレナ属または植物種から、相同的なタンパク質をコードする遺伝子を単離してもよい。配列依存プロトコールを使用した相同的遺伝子の単離は、当該技術分野で周知である

50

。配列依存プロトコールの例としては以下が挙げられるが、これに限定されるものではない。1.) 核酸ハイブリダイゼーション法、2.) 核酸増幅技術の様々な使用で例示されるようなDNAおよびRNA増幅法[例えばMullisらに付与された米国特許第4,683,202号明細書のポリメラーゼ連鎖反応(PCR); Tabor, S.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 82, 1074(1985年)のリガーゼ連鎖反応(LCR); または(Walkerら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 89, 392(1992年)の連鎖置換増幅(SDA)]、および3.) 相補性によるライブラリー構築およびスクリーニング法。

【0114】

例えば当業者に良く知られている方法を使用して、ライブラリーをスクリーンするためのDNAハイブリダイゼーションプローブとして本核酸断片の全てまたは一部を使用して、例えばあらゆる所望の酵母または真菌(DGLAおよび/またはETAを生成する生物が好ましい)から、ここで述べられる8デサチュラーゼに類似したタンパク質またはポリペプチドをコードする遺伝子を直接単離できる。本核酸配列に基づく特異的オリゴヌクレオチドプローブは、当該技術分野で既知の方法によってデザインおよび合成できる(Maniatis, 前出)。さらに当業者に既知の方法(例えばランダムプライマーDNA標識、ニック翻訳または末端標識技術)によって、配列全体を直接使用してDNAプローブを合成でき、または利用できる生体外転写システムを使用してRNAプローブを合成できる。さらに特異的プライマーをデザインして使用し、本配列の一部(または全長)を増幅できる。得られた増幅生成物を増幅反応中に直接標識し、または増幅反応後に標識して、適切なストリンジェンシー条件下でプローブとして使用し、完全長DNA断片を単離できる。

【0115】

典型的にPCR-タイプ増幅技術では、プライマーは異なる配列を有し、互いに相補的でない。所望の試験条件次第で、プライマーの配列は、標的核酸の効率的かつ忠実な複製を提供するようにデザインされるべきである。PCRプライマーデザインの方法は当該技術分野で一般的であり、よく知られている。(K. E. Davis編、「Human Genetic Diseases: A Practical Approach」よりTheinおよびWallace、「The use of oligonucleotide as specific hybridization probes in the Diagnosis of Genetic Disorders」(1986年)33~50、IRL: Herndon, VA; およびWhite, B. A. 編、「Methods in Molecular Biology」よりRychlik, W., 「PCR Protocols: Current Methods and Applications」(1993年)第15巻、31~39、Humana: Totowa, NJ)。

【0116】

一般に本配列の2本の短い断片をPCRプロトコールで使用して、DNAまたはRNAからの相同遺伝子をコードするより長い核酸断片を増幅してもよい。またクローンされた核酸断片ライブラリーに対して、1つのプライマーの配列が本核酸断片に由来し、別のプライマーの配列が真核生物の遺伝子をコードするmRNA前駆物質の3'末端のポリアデニル酸トラクトの存在を利用する、PCRを実施してもよい。

【0117】

代案としては第2のプライマー配列は、クローニングベクターに由来する配列に基づいてもよい。例えば当業者は、RACEプロトコール(Frohmanら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 85: 8998(1988年))に従って、PCRを使用して転写物の一点と3'または5'末端との間の領域のコピーを増幅し、cDNAを作り出すことができる。3'および5'方向を向いたプライマーは、本配列からデザインできる。Gibco/BRL(Gaithersburg, MD)から市販される3'RACEまたは5'RACEシステムを使用して、特定の3'または5'cDNA断

片を単離できる (Oharaら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.、86:5673 (1989年); Lohら、Science 243:217 (1989年))。

【0118】

別の実施態様では、新しい改善された脂肪酸デサチュラーゼを作り出すために、ここで述べられるいずれの 8 デサチュラーゼ核酸断片 (または同定されるそのいずれの相同体) を使用してもよい。当該技術分野でよく知られているように、生体外変異誘発および選択、化学的突然変異誘発、「遺伝子シャフリング」法またはその他の手段を用いて、天然デサチュラーゼ遺伝子の変異を得ることができる (このような変異としては、欠失、挿入、および点突然変異、またはそれらの組み合わせが挙げられる)。これによって、生体内で、宿主細胞中における機能について、所望の P U F A のより長い半減期またはより高い生成速度などのより望ましい物理学および動態学的パラメーターがそれぞれあるデサチュラーゼ活性を有するポリペプチドの生成が可能になる。所望ならば、通例の変異誘発、得られた変異ポリペプチドの発現、およびそれらの活性の定量を通じて、酵素活性に重要である関心のあるポリペプチド (すなわち 8 デサチュラーゼ) の領域を判定できる。これらの技術の概要については米国特許第 7, 238, 482 号明細書で述べられている。E a D 8 D e s 1、E a D 8 D e s 2、E a D 8 D e s 3、E a D 8 D e s 4、および E a D 8 S に由来するこのような全ての変異タンパク質およびそれらをコードするヌクレオチド配列は、本発明の範囲内である。

【0119】

代案としては、ドメイン交換によって改善された脂肪酸を合成してもよく、ここで述べられる 8 デサチュラーゼ核酸断片のいずれかからの機能ドメインが代案のデサチュラーゼ遺伝子中の機能ドメインと交換され、それによって新しいタンパク質がもたらされる。ここでの用法では「ドメイン」または「機能ドメイン」とは、植物または酵母中において生物学的反応を引き起こすことができる核酸配列を指す。

【0120】

様々なオメガ 3 および / またはオメガ 6 脂肪酸を生成する方法

適切なプロモーター制御下における、ここで述べられる 8 デサチュラーゼをコードするキメラ遺伝子 (すなわち E a D 8 D e s 1、E a D 8 D e s 2、E a D 8 D e s 3、E a D 8 D e s 4、E a D 8 S またはその他の変異酵素、コドン最適化された酵素またはそれらの相同体) の導入は、形質転換宿主生物中における D G L A および / または E T A 生成の増大をもたらすことが予期される。したがって本発明は、基質が所望の脂肪酸生成物 (すなわち D G L A および / または E T A、それぞれ) に変換されるように、脂肪酸基質 (すなわち E D A および / または E T r A) をここで述べられるデサチュラーゼ酵素 (例えば E a D 8 D e s 1、E a D 8 D e s 2、E a D 8 D e s 3、E a D 8 D e s 4 または E a D 8 S) に曝露するステップを含んでなる、P U F A の直接生成法を包含する。

【0121】

より具体的には、

a) 配列番号 21、配列番号 22、配列番号 23、および配列番号 24 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較すると、アラインメントの C l u s t a l V 法に基づいて少なくとも 80% のアミノ酸同一性を有する 8 デサチュラーゼポリペプチドをコードする組み換えヌクレオチド分子、および

b) E D A 源

を含んでなる微生物宿主細胞 (例えば酵母、藻類、細菌、ユーグレナ属、ストラモノパイルおよび真菌) 中で D G L A を生成する方法を提供することが本発明の目的であり、微生物宿主細胞は、8 デサチュラーゼをコードする核酸断片が発現されて、E D A が D G L A に変換されるような条件下で成長させ、D G L A は場合により回収される。

【0122】

本発明の代案の実施態様では、E T r A から E T A への変換のために 8 デサチュラーゼを使用してもよい。したがって本発明は E T A を生成する方法を提供し、微生物宿主細胞

胞は、

a) 配列番号 21、配列番号 22、配列番号 23、および配列番号 24 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較すると、アラインメントの Clustal V 法に基づいて少なくとも 80% のアミノ酸同一性を有する 8 デサチュラーゼポリペプチドをコードする組み換えヌクレオチド分子、および

b) ETrA 源

を含んでなり、微生物宿主細胞は 8 デサチュラーゼをコードする核酸断片が発現されて、ETrA が ETA に変換されるような条件下で成長させ、ETA は場合により回収される。

【0123】

代案としては、様々な -6 および -3 PUFA を製造するために、ここで述べられる各 8 デサチュラーゼ遺伝子およびその対応する酵素生成物を間接的に使用できる (図 1 および米国特許第 7,238,482 号明細書を参照されたい)。 $-3 / -6$ PUFA の間接的生成は、脂肪酸基質が所望の脂肪酸生成物に間接的に変換される中間ステップまたは経路中間体の手段を通じて起きる。したがって PUFA 生合成経路の酵素 (例えば 6 デサチュラーゼ、 $C_{18/20}$ エロンガーゼ、17 デサチュラーゼ、8 デサチュラーゼ、15 デサチュラーゼ、9 デサチュラーゼ、12 デサチュラーゼ、 $C_{14/16}$ エロンガーゼ、 $C_{16/18}$ エロンガーゼ、9 エロンガーゼ、5 デサチュラーゼ、4 デサチュラーゼ、 $C_{20/22}$ エロンガーゼ) をコードする追加的遺伝子と併せて、ここで述べられる 8 デサチュラーゼ (すなわち EaD8Des1、EaD8Des2、EaD8Des3、EaD8Des4、EaD8S またはその他の変異酵素、コドン最適化された酵素またはそれらの相同体) を発現させて、より鎖長の長い $-3 / -6$ 脂肪酸 (例えば ARA、EPA、DTA、DPAn-6、DPA および / または DHA) のより高レベルの生成をもたらしてもよいことが考察される。

【0124】

好ましい実施態様では、本発明の 8 デサチュラーゼは、最低限 (例えばイソクリシス・ガルバナ (*Isochrysis galbana*) からの [国際公開第 2002/077213 号パンフレット]、ミドリムシ (*Euglena gracilis*) からの [国際公開第 2007/061845 号パンフレット] ; およびユートレプチエラ (*Eutreptiella*) 種 CCMP389 からの [国際公開第 2007/061742 号パンフレット]) 9 エロンガーゼと併せて発現される。しかし特定の発現カセットに含まれる特定の遺伝子は、宿主細胞 (およびその PUFA プロフィールおよび / または デサチュラーゼ / エロンガーゼプロフィール)、基質の可用性、および所望の最終産物に左右される。

【0125】

いくつかの実施態様では、2 つ以上の 8 デサチュラーゼ (すなわち同一または異なる 8 デサチュラーゼ) を発現して、副産物脂肪酸を最小化することが有用かもしれない。副産物脂肪酸の相対存在量は、総 8 デサチュラーゼ活性を増大させることにより低下させることができる。副産物脂肪酸を最小化させる 1 つのアプローチは、2 つ以上の 8 デサチュラーゼを発現させることである。例えばシアドン酸 (SCI) および / またはジュニペロン酸 (JUP) の存在 [一般にマツ科 (*Pinaceae*) (松) のものなどの裸子植物の種子脂質中に見られる (Wolff ら、*Lipids*, 35 (1) : 1~22 (2000 年))] は、6 デサチュラーゼ / 6 エロンガーゼ経路または 9 エロンガーゼ / 8 デサチュラーゼ経路の副産物脂肪酸と見なされるかもしれない。これらの脂肪酸は、それ自体は様々な健康促進特性を有すると見なされるが (Nakane ら、*Biol. Pharm. Bull.*, 23 : 758~761 (2000 年))、油料種子作物中などの改変された PUFA 経路内の副産物脂肪酸としてのそれらの存在は、用途次第で望ましくないかもしれない。

【0126】

時に、6 エロンガーゼは、意図される脂肪酸以外の脂肪酸を延長するかもしれない。

例えば 6 エロンガーゼは一般に G L A を D G L A に変換するが、いくつかの 6 エロンガーゼは、L A または A L A をそれぞれ E D A または E T r A にするなど、意図されない基質もまた変換するかもしれない。6 デサチュラーゼ / 6 エロンガーゼ経路内では、E D A および E T r A は、「副産物脂肪酸」と見なされる。6 デサチュラーゼ / 6 エロンガーゼ経路への 8 デサチュラーゼの添加は、「副産物脂肪酸」E D A および E T r A を変換して、それぞれ「中間体脂肪酸」D G L A および E T A に戻す手段を提供するであろう。

【0127】

微生物発現系、カセット、およびベクター

ここで述べられる 8 デサチュラーゼ遺伝子および遺伝子産物（すなわち E a D 8 D e s 1、E a D 8 D e s 2、E a D 8 D e s 3、E a D 8 D e s 4、E a D 8 S またはその他の変異酵素、コドン最適化された酵素またはそれらの相同体）は、異種の微生物宿主細胞中、特に油性酵母（例えばヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*））細胞中で発現されてもよい。

10

【0128】

外来タンパク質の高レベル発現を導く制御配列を含有する、微生物発現システムおよび発現ベクターは、当業者によく知られている。これらのいずれも本配列の遺伝子生成物のいずれかを生成するためのキメラ遺伝子を構築するのに使用できる。次に形質転換を通じてこれらのキメラ遺伝子を適切な微生物に導入して、コードされた酵素の高レベル発現を提供できる。

20

【0129】

適切な微生物宿主細胞の形質転換のために有用なベクター（例えばコンストラクト、プラスミド）および D N A 発現カセットについては、当該技術分野でよく知られている。コンストラクト中に存在する配列の特定の選択は、所望の発現産物（前出）、宿主細胞の性質、および形質転換細胞と非形質転換細胞とを分離するのに提案される手段に左右される。しかし典型的にベクターは、少なくとも1つの発現カセット、選択可能なマーカー、および自律複製または染色体組み込みを可能にする配列を含有する。適切な発現カセットは、転写を制御する遺伝子（例えばプロモーター）の 5' 領域、遺伝子コード配列、および転写終結を制御する D N A 断片の 3' 領域（すなわちターミネーター）を含んでなる。双方の制御領域が、形質転換された微生物宿主細胞からの遺伝子に由来することが最も好ましいが、このような制御領域は、生成宿主として選択された特定種に天然の遺伝子に必ずしも由来しないと理解される。

30

【0130】

所望の微生物宿主細胞中において、本 8 デサチュラーゼ O R F の発現を推進する有用な転写制御領域（開始制御領域またはプロモーターとも）は多数あり、当業者によく知られている。選択された宿主細胞中において、これらの遺伝子の発現を誘導できる実質的にあらゆるプロモーター（すなわち天然、合成、またはキメラ）が本発明に適するが、宿主種からの転写および翻訳領域が特に有用である。微生物宿主細胞中での発現は、誘導性または構成的な様式で達成できる。誘導性発現は関心のある遺伝子と作動的に連結する制御可能プロモーターの活性を誘導することで達成できるのに対し、構成的な発現は関心のある遺伝子と作動的に連結する構成的プロモーターを使用することで達成できる。例として宿主細胞が酵母である場合、特に宿主種からの酵母細胞中で機能する転写および翻訳領域が提供される（例えばヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）で使用される好ましい転写開始調節領域については、米国特許出願公開第 2006 - 0115881 - A 1 号明細書を参照されたい）。構成的または誘導的転写が所望されるかどうか、対象とする O R F を発現する上でのプロモーター効率、構築の容易さなど次第で、いくつかの調節配列のいずれか1つを使用できる。

40

【0131】

翻訳開始コドン「A T G」周辺のヌクレオチド配列は、酵母細胞中での発現に影響を与えることが分かった。所望のポリペプチドが酵母中で不十分に発現される場合、外来性遺

50

伝子のヌクレオチド配列を修飾して効率的な酵母翻訳開始配列を含めて、最適遺伝子発現を得ることができる。酵母中での発現では、これは好ましくは高度に発現される遺伝子である内在性酵母遺伝子に非効率的発現遺伝子をインフレームで融合させることにより、それを部位特異的に変異誘発して実施できる。代案としては、宿主中でコンセンサス翻訳開始配列を判定し、関心のある宿主中でのそれらの最適発現のためにこの配列を異種の遺伝子に導入できる。

【0132】

終結領域は、それから開始領域が得られた遺伝子の3'領域に、または異なる遺伝子に由来することができる。多数の終結領域が知られており、(それらが由来するのと同じおよび異なる属および種の双方で使用した際に)多様な宿主において満足に機能する。終結領域は、通常特定の特性のためと言うよりも便宜的に選択される。終結制御領域もまた、好ましい宿主に天然の様々な遺伝子に由来してもよい。代案の実施態様では、当業者は入手できる情報を利用して転写ターミネーターとして機能する3'領域配列をデザインおよび合成できるので、3'領域はまた合成することもできる。場合により終結部位は不必要かもしれないが、含まれることが最も好ましい。

【0133】

当業者は認識しているように、遺伝子をクローニングベクターに単に挿入するだけでは、それが必要なレベルで成功裏に発現することは確証されない。高発現率の必要性に答えて、転写、翻訳、タンパク質安定性、酸素限界、および微生物宿主細胞からの分泌の側面を制御するいくつかの異なる遺伝的要素を操作することで、多くの特殊化した発現ベクターが作り出されている。より具体的には、遺伝子発現を制御するために操作される分子の特徴のいくつかとしては、関連する転写プロモーターおよびターミネーター配列の性質；クローンされる遺伝子のコピー数(追加的コピーを単一発現コンストラクト中にクローンしてもよく、および/またはプラスミドコピー数を増大させることで、またはクローン遺伝子のゲノム中への複数組み込みによって、追加的コピーを宿主細胞中に導入してもよい)；遺伝子がプラスミド媒介性であるかまたは宿主細胞ゲノム中に組み込まれるかどうか；合成された外来性タンパク質の最終細胞内所在；宿主生物中の翻訳効率およびタンパク質の正確な折りたたみ；宿主細胞中のクローン遺伝子のmRNAおよびタンパク質の固有の安定性；およびその頻度が宿主細胞の好ましいコドン使用頻度近づくようなクローン遺伝子中のコドン使用頻度が挙げられる。これらの各タイプの改変は、ここで述べられる8デサチュラーゼの発現をさらに最適化する手段として本発明に包含される。

【0134】

微生物宿主細胞の形質転換

ひとたび適切な微生物宿主細胞中での発現に適したDNAカセット(例えばプロモーター、ORF、およびターミネーターを含んでなるキメラ遺伝子)が得られたら、それを宿主細胞中で自律複製できるプラスミドベクターに入れ、またはそれを宿主細胞のゲノムに直接組み込む。発現カセットの組み込みは、宿主ゲノム中で無作為に起きることができ、または宿主遺伝子座での遺伝子組み換えを標的とするのに十分な宿主ゲノムとの相同性領域を含有するコンストラクトの使用を通じて、標的を定めることができる。コンストラクトが内在性遺伝子座に標的を定めれば、全てまたはいくつかの転写および翻訳調節領域を内在性遺伝子座によって提供できる。

【0135】

別々の複製ベクターから2つ以上の遺伝子が発現する場合、各ベクターは異なる選択手段を有することが望ましく、他のコンストラクトに対する相同性を欠いて、安定した発現を維持し、コンストラクト中の要素の再集合を防止すべきである。調節領域、選択手段、および導入コンストラクト増殖方法の思慮深い選択は、全ての導入された遺伝子が必要なレベルで発現して、所望の生成物の合成を提供するように実験的に判定できる。

【0136】

関心のある遺伝子を含んでなるコンストラクトは、あらゆる標準技術によって微生物宿主細胞中に導入されてもよい。これらの技術としては、形質転換(例えば酢酸リチウム形

10

20

30

40

50

質転換 [Methods in Enzymology, 194: 186 ~ 187 (1991年)]、プロトプラスト融合、弾道衝撃、電気穿孔、微量注入、または関心のある遺伝子を宿主細胞に導入するあらゆるその他の方法が挙げられる。

【0137】

便宜上、DNA配列（例えば発現カセット）を取り込ませるあらゆる方法で操作された宿主細胞は、ここで「形質転換された」、「形質転換体」または「組み換え」と称される。形質転換宿主は少なくとも1つの発現コンストラクトのコピーを有し、発現カセットがゲノムに組み込まれるのか、または複数コピー数を有する染色体外要素上に存在するののかどうかによって、2つ以上を有してもよい。

【0138】

形質転換宿主細胞は、米国特許第7,238,482号明細書および米国特許第7,259,255号明細書、および国際公開第2006/052870号パンフレットで述べられるような様々な選択技術によって同定できる。

【0139】

形質転換に続いて、本 8 デサチュラーゼ（そして場合により、宿主細胞内で同時発現するその他のPUFA酵素）に適した基質が、宿主によって自然にまたは遺伝子導入的に生成されてもよく、またはそれらは外来性に提供されてもよい。

【0140】

組み換え発現のための好ましい微生物宿主細胞

本遺伝子および核酸断片発現のための微生物宿主細胞としては、広範な温度とpH値にわたり、単純または複合糖質、脂肪酸、有機酸、油、およびアルコール、および/または炭化水素をはじめとする多様な原材料上で成長する宿主が挙げられる。本発明で述べられる遺伝子は油性酵母（ヤロウシア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）油性株）中で発現されているが、転写、翻訳、およびタンパク質合成装置は高度に保存されているので、あらゆる細菌、酵母、藻類、ユーグレナ属、ストラメノパイルおよび/または真菌が、本核酸断片の発現に適した微生物宿主であることが考察される。

【0141】

好ましい微生物宿主は油性酵母などの油性生物である。これらの生物は天然に油を合成および蓄積でき、油は細胞乾燥重量の約25%を超え、より好ましくは細胞乾燥重量の約30%を超え、最も好ましくは細胞乾燥重量の約40%を超えて構成できる。油性であつてもよい株を含んでなるとして典型的に同定された属としては、ヤロウシア（*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*）が挙げられるが、これに限定されるものではない。より具体的には、例示的な油合成酵母として、ロドスポリジウム・トルロイデス（*Rhodospiridium toruloides*）、リボマイセス・スターケイ（*Lipomyces starkeyi*）、L. リボフェラス（*lipoferus*）、カンジダ・レブカウフィ（*Candida reevkaufi*）、C. プリケリーマ（*pulcherrima*）、C. トロピカリス（*tropicalis*）、C. ユチリス（*utilis*）、トリコスポロン・プランズ（*Trichosporon pullans*）、T. クタネウム（*cutaneum*）、ロドトルラ・グルチヌス（*Rhodotorula glutinus*）、R. グラミニス（*graminis*）、およびヤロウシア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）（以前はカンジダ・リポリチカ（*Candida lipolytica*）に分類された）が挙げられる。代案の実施態様では、微生物宿主細胞（例えば酵母）が細胞乾燥重量の25%を超える油を生成でき、その結果油性と見なされるように油合成を遺伝子改変してもよい。

【0142】

好ましい油性酵母はヤロウシア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）の油性株であり、特に好ましいのはATCC # 20362、ATCC # 8862、

10

20

30

40

50

ATCC#18944、ATCC#76982および/またはLGAMS(7)1と称される*Y.リポリティカ*(*lipolytica*)株である(Papanikolaou S.およびAggelis G., *Bioresour. Technol.*, 82(1):43~9(2002年))。

【0143】

油性酵母(すなわちヤロウィア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*))の形質転換に適用できる特定の教示としては、米国特許第4,880,741号明細書、米国特許第5,071,764号明細書、およびChen, D.C.ら(*Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 48(2):232~235(1997年))が挙げられる。*Y.リポリティカ*(*lipolytica*)中のARA、EP A、およびDHA生成の操作に適用できる特定の教示は、それぞれ米国特許出願第11/264784号明細書、米国特許出願第11/265761号明細書、および米国特許出願第11/264737号明細書で提供される。

【0144】

この酵母中で遺伝子を発現する好ましい方法は、宿主のゲノム中への線状DNAの組み込みによる。ゲノム中の複数位置への組み込みは、遺伝子の高レベル発現が所望される場合に特に有用であることができる[例えばUra3遺伝子座(GenBank登録番号AJ306421)、Leu2遺伝子座(GenBank登録番号AF260230)、Lys5遺伝子座(GenBank登録番号M34929)、Aco2遺伝子座(GenBank登録番号AJ001300)、Pox3遺伝子座(Pox3:GenBank登録番号XP_503244;またはAco3:GenBank登録番号AJ001301)、12デサチュラーゼ遺伝子座(米国特許第7,214,491号明細書)、Lip1遺伝子座(GenBank登録番号Z50020)、Lip2遺伝子座(GenBank登録番号AJ012632)および/またはPex10遺伝子座(GenBank登録番号CAG81606)中への]。

【0145】

ヤロウィア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)において使用される好ましい選択方法は、カナマイシン、ハイグロマイシン、およびアミノグリコシドG418に対する抵抗性、ならびにウラシル、ロイシン、リジン、トリプトファンまたはヒスチジンを欠く培地に生育する能力である。さらに、5-フルオロオロト酸(5-フルオロウラシル-6-カルボン酸一水和物、「5-FOA」)が、酵母Ura⁻突然変異体の選択のために使用される。化合物はオロチジン5'-リン酸デカルボキシラーゼ(OMPデカルボキシラーゼ)をコードする機能性URA3遺伝子を有する酵母細胞に対して有毒であり、この毒性ゆえに、5-FOAはUra⁻突然変異酵母株の選択および同定のために特に有用である(Bartel, P.L.およびFields, S., 「Yeast 2-Hybrid System」、Oxford University:New York、第7巻、109~147、1997年;ヤロウィア(*Yarrowia*)における5-FOAの使用について国際公開第2006/052870号パンフレットもまた参照されたい)。

【0146】

ヤロウィア(*Yarrowia*)中で使用される代案の好ましい選択法は、スルホニル尿素(「E.I. du Pont de Nemours & Co., Inc. (Wilmington, DE)」からのクロリムロンエチル)抵抗性に基づく、ヤロウィア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)の顕性非抗生物質マーカーに依存する。より具体的にはマーカー遺伝子は、スルホニル尿素除草剤抵抗性を与える単一アミノ酸変化(W497L)を有する天然アセトヒドロキシ酸シンターゼ(AHASまたはアセト乳酸シンターゼ;E.C.4.1.3.18)である(国際公開第2006/052870号パンフレット)。AHASは分枝鎖アミノ酸(すなわちバリン、ロイシン、イソロイシン)生合成経路内の最初の共通酵素であり、スルホニル尿素およびイミダゾリノン除草剤の標的である。

【0147】

その他の好ましい微生物宿主としては、油性細菌、藻類、ユーグレナ属、ストラモノイル、およびその他の真菌が挙げられ、その多くはオメガ3脂肪酸生成のために遺伝子改変されていてもよい。したがって例えば誘導性プロモーターまたは調節プロモーターの制御下にある本 8 デサチュラーゼ遺伝子のいずれかをを用いた、(ARA生成のために商業的に使用される)モルティエラ・アルピナ(*Mortierella alpina*)の形質転換は、増大された量のDGLAを合成できる形質転換体を生じることができる。M. アルピナ(*alpina*)の形質転換の方法は、MacKenzieら(*Appl. Environ. Microbiol.*, 66:4655(2000年))によって述べられている。同様にヤブレッツボカビ目(*Thraustochytriales*)微生物(例えばスラウストキトリウム(*Thraustochytrium*)、シゾキトリウム(*Schizochytrium*))の形質転換の方法は、米国特許第7,001,772号明細書で開示されている。

10

【0148】

ここで述べられる 8 デサチュラーゼ発現のために選択される宿主に関わりなく、複数の形質転換体をスクリーンして、所望の発現レベルおよびパターンを示す株を得ることが必要かもしれない。このようなスクリーニングは、DNAプロットのサザン分析(*Southern, J. Mol. Biol.*, 98:503(1975年))、mRNA発現のノーザン分析(*Kroczeck, J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 618(1~2):133~145(1993年))、タンパク質発現のウェスタンおよび/またはELISA分析、PUFA産物の表現型分析またはGC分析によって達成されてもよい。

20

【0149】

したがって本発明の範囲は、

(a)(i) 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第1の組み換えヌクレオチド分子、および

(ii) それぞれEDAおよび/またはETRAからなるデサチュラーゼ基質源を含んでなる油性酵母(例えばヤロウィア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*))を提供するステップと、

(b) 適切な発酵性炭素源の存在下でステップ(a)の酵母を成長させて、8 デサチュラーゼポリペプチドをコードする遺伝子が発現されて、EDAがDGLAに変換され、および/またはETRAがETAに変換されるステップと、

30

(c) 場合によりステップ(b)のDGLAおよび/またはETAをそれぞれ回収するステップと

を含んでなる、DGLAまたはETAのどちらかをそれぞれ生成する方法を含む。

【0150】

基質の供給が必要かもしれない。

【0151】

8 デサチュラーゼをコードする遺伝子のヌクレオチド配列は、配列番号17、配列番号18、配列番号19、および配列番号20からなる群から選択されてもよい。代案の実施態様では、8 デサチュラーゼポリペプチドをコードする遺伝子のヌクレオチド配列は、配列番号39で記載される(配列番号19と比較して、少なくとも208個のコドンがヤロウィア(*Yarrowia*)中での発現について最適化されている)。

40

【0152】

油性酵母中で天然に生成されるPUFAは、18:2脂肪酸(すなわちLA)と、一般的ではないが18:3脂肪酸(すなわちALA)とに限定されているので、油性酵母を遺伝子改変して、ここで述べられる 8 デサチュラーゼに加えて、長鎖PUFA生合成に必要な複数の酵素を発現させる(それによって例えばARA、EPA、DPA、およびDHAの生成を可能にする)。具体的には一実施態様では、本発明は、

(a) 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

50

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) 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、少なくとも1つの追加的組み換えDNAコンストラクトを含んでなる油性酵母に関する。

【0153】

特に好ましい実施態様では、少なくとも1つの追加的組み換えDNAコンストラクトが、 9 エロンガーゼ活性を有するポリペプチドをコードする。

【0154】

微生物中におけるオメガ3および/またはオメガ6 脂肪酸生合成の代謝エンジニアリング

本 8 デサチュラーゼの配列知識は、様々な宿主細胞中で - 3 および/または - 6 脂肪酸生合成を操作するのに有用であろう。生化学的経路を操作する方法は当業者によく知られており、油性酵母中で、特にヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 中で、 - 3 および/または - 6 脂肪酸生合成を最大化するのに多数の操作が可能ながことが予期される。この操作は、直接にPUFA生合成経路内の代謝エンジニアリング、または炭素からPUFAへの生合成経路に寄与する経路の追加的操作を必要とするかもしれない。望ましい生化学的経路をアップレギュレートして、望ましくない生化学的経路をダウンレギュレートする有用な方法は当業者によく知られている。例えばエネルギーまたは炭素について - 3 および/または - 6 脂肪酸生合成経路と競合する生化学的経路、または特定のPUFA最終産物の生成を妨げる天然PUFA生合成経路酵素を遺伝子破壊によって排除し、またはその他の手段(例えばアンチセンスmRNA)によってダウンレギュレートしてもよい。

【0155】

ARA、EPAまたはDHAを増大させる手段としてのPUFA生合成経路内の操作の詳細な考察(およびその関連技術)は、それぞれ米国特許出願公開第2006-0094092-A1号明細書、米国特許出願公開第2006-0115881-A1号明細書、および米国特許出願公開第2006-0110806-A1号明細書にあり、TAG生合成経路およびTAG分解経路内の望ましい操作(およびその関連技術)についても同様である。

【0156】

本発明の文脈で、上述の戦略のいずれか1つによって脂肪酸生合成経路の発現を調節することが有用かもしれない。例えば本発明は、 - 3 および/または - 6 脂肪酸生成のために、 9 エロンガーゼ/ 8 デサチュラーゼ生合成経路内の鍵酵素をコードする遺伝子を油性酵母中に導入する方法を提供する。宿主生物の代謝エンジニアリングのための様々な手段を使用して、 - 3 および/または - 6 脂肪酸生合成経路を天然に有さない油性酵母中で本 8 デサチュラーゼ遺伝子を発現させて、これらの遺伝子の発現を調整し、好ましいPUFA産物の生成を最大化させることは特に有用であろう。

【0157】

PUFA生成のための微生物の発酵過程

形質転換された微生物宿主細胞は、キメラデサチュラーゼおよびエロンガーゼ遺伝子の発現を最適化する条件下で成長させて、最大かつ最も経済的な所望のPUFA収率を生じさせる。一般に、最適化されてもよい培地条件としては、炭素源のタイプおよび量、窒素源のタイプおよび量、炭素-対-窒素比、異なる無機イオンの量、酸素レベル、生育温度、pH、バイオマス生成相の長さ、油蓄積相の長さ、および細胞収穫時間および方法が挙げられる。油性酵母のような、対象の微生物(例えば、ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*))は、一般に複合培地(例えば酵母菌抽出

10

20

30

40

50

物 - ペプトン - デキストロース液体培地 (YPD)) で、または生育に必要な構成要素が欠如することで所望の発現力セットの選択を強要する合成最少培地 (例えば D I F C O Laboratories (Detroit, MI) からの酵母菌室素ベース) 上で成長させる。

【0158】

本発明における発酵培地は適切な炭素源を含有しなくてはならない。適切な炭素源については、米国特許第 7, 238, 482 号明細書で教示されている。本発明で利用される炭素源は多種多様な炭素含有源を包含してもよいことが考察されるが、好ましい炭素源は糖、グリセロール、および / または脂肪酸である。最も好ましいのはグルコースおよび / または 10 ~ 22 個の炭素を含有する脂肪酸である。

10

【0159】

窒素は、無機 (例えば $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) または有機 (例えば尿素またはグルタミン酸) 源から供給されてもよい。適切な炭素および窒素源に加えて、発酵培地はまた、適切なミネラル、塩、補助因子、緩衝液、ビタミン、および油性宿主の生育と、PUFA 生成に必須の酵素的経路の促進とに適した、当業者に既知であるその他の構成要素を含有しなくてはならない。脂質および PUFA の合成を促進するいくつかの金属イオン (例えば Fe^{+2} 、 Cu^{+2} 、 Mn^{+2} 、 Co^{+2} 、 Zn^{+2} 、 Mg^{+2}) が注目されている (D. J. Kyle および R. Collin 編、"Ind. Appl. Single Cell Oil" より、Nakahara, T. ら、61 ~ 97 (1992 年))。

【0160】

20

本発明における好ましい増殖培地は、D I F C O Laboratories (Detroit, MI) からの酵母菌室素ベースなどの一般的な市販の調製培地である。その他の合成または人工増殖培地もまた使用されてもよく、形質転換宿主細胞の生育に適する培地は、微生物学または発酵科学の当業者に知られている。発酵に適した pH 範囲は、典型的に約 pH 4.0 ~ pH 8.0 の間であり、pH 5.5 ~ pH 7.5 が初期生育条件の範囲として好ましい。発酵は好気性または好気性条件下で実施されてもよく、微好気条件が好ましい。

【0161】

典型的に油性酵母菌細胞中の PUFA の高レベルの蓄積は、代謝状態が生育と脂肪合成 / 貯蔵との間で「平衡状態」でなくてはならないので、二段階過程を必要とする。したがって最も好ましくは、油性酵母 (例えばヤロウィア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica)) における PUFA 生成には、二段階発酵過程が必要である。このアプローチについては米国特許第 7, 238, 482 号明細書で述べられ、様々な適切な発酵過程デザイン (すなわちバッチ、供給バッチ、および連続) および成長中の考察事項についても同様に述べられる。

30

【0162】

PUFA 油の精製および処理

PUFA は、宿主微生物中に遊離脂肪酸として、またはアシルグリセロール、リン脂質、スルホ脂質または糖脂質などのエステル化形態で含まれるかもしれず、当該技術分野で良く知られている多様な手段を通じて宿主細胞から抽出されてもよい。酵母脂質の抽出技術、品質分析、および許容基準に関する総説は、Z. Jacobs (Critical Reviews in Biotechnology, 12 (5/6): 463 ~ 491 (1992 年)) によるものである。A. Singh および O. Ward (Adv. Appl. Microbiol., 45: 271 ~ 312 (1997 年)) による後処理プロセスの短いレビューもまた入手できる。

40

【0163】

一般に PUFA を精製する手段は、有機溶剤による抽出 (例えば米国特許第 6, 797, 303 号明細書および米国特許第 5, 648, 564 号明細書)、超音波処理、(例えば二酸化炭素を使用した) 超臨界流体抽出、鹸化、およびプレスなどの物理的手段、またはそれらの組み合わせを含んでもよい。さらに詳しくは米国特許第 7, 238, 482 号

50

明細書の教示を参照されたい。

【0164】

食材、健康食品、医薬品、および動物飼料で使用するためのPUFA含有油

市場は、目下 - 3 および / または - 6 脂肪酸 (例えば特にALA、GLA、ARA、EPA、DPA、およびDHA) を組み込んだ多岐にわたる食物および飼料製品をサポートする。長鎖PUFAを含んでなる微生物由来資源、PUFAを含んでなる部分的に精製された微生物由来資源、PUFAを含んでなる精製された微生物油、および / または精製されたPUFAは、食物および飼料製品中で機能して本調合物の健康上の利点を与えるであろうことが考察される。より具体的には - 3 および / または - 6 脂肪酸を含有する本発明の油は、類似食品、肉製品、穀物製品、ベーكد食品、スナック食品、および乳製品をはじめとするが、これに限定されるものではない多様な食物および飼料製品中で使用するのに適する (詳細については米国特許出願公開第2006/0094092号明細書を参照されたい)。

10

【0165】

さらに本組成物を調合物中で使用して、医療栄養物、栄養補助食品、乳児用調製粉乳ならびに医薬品をはじめとするメディカルフードに健康上の利点を与えてもよい。食品加工および食物調合の当業者は、どのように食物または飼料製品に本油の量および組成物を添加してもよいかを理解するであろう。このような量はここで「効果的」量と称され、食物または飼料製品、製品が栄養補給することが意図される食餌またはメディカルフード、または医療栄養物が矯正または治療することが意図される疾患に左右される。

20

【実施例】

【0166】

特に断りのない限り、部および百分率は重量を基準とし、温度は摂氏である、次の実施例中で本発明をさらに定義する。これらの実施例は、発明の好ましい実施態様を示しながら、あくまで例示のために提供されるものとする。上の考察およびこれらの実施例から、当業者は本発明の必須特性を把握でき、その趣旨と範囲を逸脱することなく、本発明の様々な変更および改変を行って、それを様々な使用法および条件に適合できる。したがってここで提示され述べられるものに加えて、本発明の様々な修正は、前述の説明から当業者には明白であろう。このような修正もまた、添付の特許請求の範囲内に入ることが意図される。

30

【0167】

一般方法

実施例で使用する標準組み換えDNAおよび分子クローニング技術は、当該技術分野でよく知られており、1.) Sambrook, J., Fritsch, E. F. および Maniatis, T., 「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1989年) (Maniatis); 2.) T. J. Silhavy, M. L. Bannan, および L. W. Enquist, 「Experiments with Gene Fusions」、Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1984年); および 3.) Ausubel, F. M. ら, 「Current Protocols in Molecular Biology」、Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience による出版、Hoboken, NJ (1987年) で述べられる。

40

【0168】

微生物培養の維持および生育に適した材料および方法は、当該技術分野でよく知られている。以下の実施例で使用するのに適した技術については、次で述べられている。Phillipp Gerhardt, R. G. E. Murray, Ralph N. Costilow, Eugene W. Nester, Willis A. Wood, Noel R. Krieg, および G. Briggs Phillips 編, 「Manual of

50

Methods for General Bacteriology」、American Society for Microbiology、Washington, D.C. (1994年)、またはThomas, D. Brock、「Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology」、第2版、Sinauer Associates: Sunderland, MA (1989年)。微生物細胞の生育および維持のために使用される全ての試薬制限酵素および材料は、特に断りのない限り、Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI)、DIFCO Laboratories (Detroit, MI)、GIBCO/BRL (Gaithersburg, MD)、またはSigma Chemical Company (St. Louis, MO) から得た。大腸菌 (*E. coli*) (XL1-Blue) コンピテント細胞は、Stratagene Company (San Diego, CA) から購入した。大腸菌 (*E. coli*) 株は、典型的にルリア・ベルターニ (*Luria Bertani*) (LB) プレート上で37℃で成長させた。

10

【0169】

一般分子クローニングは、標準法に従って実施した (Sambrookら、前出)。DNA配列は、ベクターとインサート特異的プライマーとの組み合わせを使用して、染料ターミネーター技術 (米国特許第5,366,860号明細書、欧州特許第272,007号明細書) を使用して、ABI自動シーケンサー上で生成した。配列編集を「Gene Codes Corporation (Ann Arbor, MI)」からのSequencher中で実施した。全ての配列は、両方向で少なくとも2回のカバレッジを表す。遺伝子配列の比較は「DNASTAR Inc. (Madison, WI)」からのDNASTARソフトウェアを使用して達成された。

20

【0170】

略語の意味は以下の通り。「sec」は秒を意味し、「min」は分を意味し、「h」または「hr」は時間を意味し、「d」は日を意味し、「μL」はマイクロリットルを意味し、「mL」はミリリットルを意味し、「L」はリットルを意味し、「μM」はマイクロモル濃度を意味し、「mM」はミリモル濃度を意味し、「M」はモル濃度を意味し、「mmol」はミリモルを意味し、「μmole」はマイクロモルを意味し、「g」はグラムを意味し、「μg」はマイクログラムを意味し、「ng」はナノグラムを意味し、「U」は単位を意味し、「bp」は塩基対を意味し、「kB」はキロベースを意味する。

30

【0171】

発現カセット命名法:

発現カセット構造は、「X::Y::Z」の簡便表記体系によって表され、Xはプロモーター断片を示し、Yは遺伝子断片を示し、Zはターミネーター断片を示して、全て互いに作動的に連結する。

【0172】

ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) の形質転換および培養:

ATCC登録番号#20362、#76982、および#90812のヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 株は、米国微生物系統保存機関 (Rockville, MD) から購入した。ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 株は、典型的に下に示す処方に従っていくつかの培地内で28~30℃で成長させた。標準法に従って各液体培地に20g/Lの寒天を添加して、寒天プレートが必要に応じて調製した。

40

【0173】

YPD寒天培地 (1Lあたり): 10gの酵母抽出物 [Difco]、20gのBactoペプトン [Difco]、および20gのグルコース。

【0174】

基礎最少培地 (MM) (1Lあたり): 20gのグルコース、1.7gのアミノ酸非含

50

有酵母窒素ベース、1.0 gのプロリン、pH 6.1 (調節なし)。

【0175】

最少培地 + ロイシン (MM + ロイシンまたはMM Leu) (1 Lあたり) : MM培地を上記のように調製して0.1 gのロイシンを添加する。

【0176】

最少培地 + ロイシン + ウラシル (MM Leu Ura) (1 Lあたり) : MM培地を上記のように調製して、0.1 gのロイシン、0.1 gのウラシル、および0.1 gのウリジンを添加する。

【0177】

最少培地 + 5 - フルオロオロト酸 (MM + 5 - FOA) (1 Lあたり) : 20 gのグルコース、6.7 gの酵母窒素ベース、75 mgのウラシル、75 mgのウリジン、および (供給元から受領された各バッチ内にバリエーションがあるため) 100 mg/Lから1000 mg/Lまでの一連の濃度に対して試験されたFOA活性に基づく適量の「Zymo Research Corp. (Orange, CA)」からのFOA。

【0178】

高グルコース培地 (HGM) (1 Lあたり) : 80のグルコース、2.58 gの KH_2PO_4 、および5.36 gの K_2HPO_4 、pH 7.5 (調節不要)。

【0179】

ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) の形質転換は、特に断りのない限り Chen, D. C. ら (Appl. Microbiol. Biotechnol., 48 (2) : 232 ~ 235 (1997年)) の方法に従って実施した。簡単に述べると、ヤロウィア (*Yarrowia*) をYPDプレート上に画線培養し、30 °Cでおよそ18時間成長させた。いくつかの山盛り白金耳量の細胞をプレートから掻き取って、次を含んでなる1 mLの形質転換緩衝液に再懸濁した。2.25 mLの50 % PEG、平均MW 3350 ; 0.125 mLの2 M 酢酸リチウム、pH 6.0 ; 0.125 mLの2 M DTT ; および (場合により) 50 μ gの剪断サケ精子DNA。次におよそ500 ngの直線化プラスミドDNA (または100 ngの環状プラスミド) を100 μ Lの再懸濁した細胞中でインキュベートし、15分間隔でボルテックス混合しながら39に1時間保った。細胞を選択培地プレートに播種して、30 °Cに2 ~ 3日間保った。

【0180】

ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) の脂肪酸分析
特に明記しない限り、脂肪酸分析のために、Bligh, E. G. および Dyer, W. J.、Can. J. Biochem. Physiol. 37 : 911 ~ 917 (1959年) で述べられるように、細胞を遠心分離して収集し、脂質を抽出した。ナトリウムメトキシドでの脂質抽出物のエステル交換反応によって、脂肪酸メチルエステルを調製し (Roughan, G. および Nishida, I.、Arch Biochem Biophys. 276 (1) : 38 ~ 46 (1990年))、引き続き Hewlett - Packard からの30 mm x 0.25 mm (内径) HP - INNOWAXカラムを装着した Hewlett - Packard 6890 GCで分析した。オープン温度は3.5 /分、170 °C (25分間保持) から185 °Cであった。

【0181】

直接塩基エステル交換のために、ヤロウィア (*Yarrowia*) 培養物 (3 mL) を収集し、蒸留水で1回洗浄し、スピードバック (Speed - Vac) 内で真空下において5 ~ 10分乾燥させた。ナトリウムメトキシド (100 μ Lの1%) をサンプルに添加して、次にサンプルをボルテックスし20分間振盪した。3滴の1 M NaClおよび400 μ Lのヘキサンを添加した後、サンプルをボルテックスして遠心分離した。上層を除去して上述のようにGCで分析した。

【0182】

ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) Y4001U株の構築 :

10

20

30

40

50

Y. リポリティカ (*lipolytica*) Y 4 0 0 1 U 株を下記の実施例 7 で宿主として使用した。以下の説明は、ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) ATCC # 2 0 3 6 2 に由来して、 9 エロンガーゼ / 8 デサチュラーゼ経路の発現を通じて総脂質に対して約 1 7 % の E D A を生成でき、 L e u - および U r a - 表現型を有する Y 4 0 0 1 U 株の構築の要約である (図 2 A)。

【 0 1 8 3 】

Y 4 0 0 1 U 株の開発は、Y 2 2 2 4 株 (野生型ヤロウィア (*Yarrowia*) ATCC # 2 0 3 6 2 株の U r a 3 遺伝子の自律突然変異からの F O A 抵抗性変異体)、および Y 4 0 0 1 株 (L e u - 表現型で 1 7 % の E D A を生成する) の構築を必要とする。

【 0 1 8 4 】

Y 2 2 2 4 株の発生 :

Y 2 2 2 4 株を次の様式で単離した。Y P D 寒天プレートからのヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) ATCC # 2 0 3 6 2 細胞を 2 5 0 m g / L の 5 - F O A (Z y m o R e s e a r c h) を含有する M M プレート (各 7 5 m g / L のウラシルおよびウリジン、6 . 7 g / L 硫酸アンモニア添加 Y N B、アミノ酸無添加、および 2 0 g / L グルコース) 上に画線培養した。プレートを 2 8 ° でインキュベートし、得られたコロニーの内 4 つを 2 0 0 m g / m L 5 - F O A 含有 M M プレート上、およびウラシルおよびウリジンを欠く M M プレート上に別々にパッチして、ウラシル U r a 3 栄養要求性を確認した。

【 0 1 8 5 】

総脂質の約 1 7 % の E D A を生成する Y 4 0 0 1 株の発生 :

コンストラクト p Z K L e u N - 2 9 E 3 (図 2 B) の組み込みを通じて、Y 4 0 0 1 株を作り出した。4 個のキメラ遺伝子 (すなわち 1 2 デサチュラーゼ、C_{16/18} エロンガーゼ、および 2 個の 9 エロンガーゼ) を含んでなるこのコンストラクトを Y 2 2 2 4 株の L e u 2 遺伝子座に組み込み、それによって E D A の生成を可能にした。

【 0 1 8 6 】

コンストラクト p Z K L e u N - 2 9 E 3 は、下の表 4 に示す構成要素を含有する。

【 0 1 8 7 】

10

20

【表 5】

表 4
プラスミド pZKLeuN-29E3(配列番号 42)の説明

配列番号 42 中の RE 部位および ヌクレオチド	断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明	
BsiWI/AscI (7797~7002)	ヤロウィア(Yarrowia)Leu2 遺伝子(Genbank 登録番号 AF260230)の 788bp の 3'部分	
SphI/PacI (4302~3591)	ヤロウィア(Yarrowia)Leu2 遺伝子(Genbank 登録番号 AF260230)の 703bp の 5'部分	10
SwaI/BsiWI (10533~7797)	次を含んでなる GPD::FmD12::Pex20 <ul style="list-style-type: none"> GPD:ヤロウィア・リポリティカ(Yarrowia lipolytica)GPD プロモーター (米国特許第 7,259,255 号明細書) FmD12:フザリウム・モニリフォルメ(Fusarium moniliforme)Δ12 デサ チュラーゼ遺伝子(配列番号 43)(図中「F. D12」と標識される;国際公 開第 2005/047485 号パンフレット) Pex20:ヤロウィア(Yarrowia)Pex20 遺伝子からの Pex20 ターミネー ター配列(Genbank 登録番号 AF054613) 	
BglII/SwaI (12559~10533)	次を含んでなる EXP1::EgD9eS::Lip1 <ul style="list-style-type: none"> EXP1:ヤロウィア・リポリティカ(Yarrowia lipolytica)輸送タンパク質 (EXP1)プロモーター(図中「Exppro」と標識される;国際公開第 2006/052870 号パンフレットおよび米国特許出願第 11/265761 号明 細書) EgD9eS:ミドリムシ(Euglena gracilis)に由来するコドン最適化された Δ9 エロンガーゼ(配列番号 45)(図中「EgD9E」と標識される;国際公開 第 2007/061742 号パンフレット) Lip1:ヤロウィア(Yarrowia)Lip1 遺伝子からの Lip1 ターミネーター配列 (Genbank 登録番号 Z50020) 	20
PmeI/ClaI (12577~1)	次を含んでなる FBAINm::EgD9eS::Lip2 <ul style="list-style-type: none"> FBAINm:ヤロウィア・リポリティカ(Yarrowia lipolytica)FBAINm プロ モーター(米国特許第 7,202,356 号明細書) EgD9eS:ミドリムシ(Euglena gracilis)に由来するコドン最適化された Δ9 エロンガーゼ遺伝子(配列番号 45)(図中「EgD9ES」と標識される; 国際公開第 2007/061742 号パンフレット) Lip2:ヤロウィア(Yarrowia)Lip2 遺伝子からの Lip2 ターミネーター配列 (Genbank 登録番号 AJ012632) 	30
ClaI/EcoRI (1-1736)	次を含んでなる LoxP::Ura3::LoxP <ul style="list-style-type: none"> LoxP 配列(配列番号 47) ヤロウィア(Yarrowia)Ura3 遺伝子(Genbank 登録番号 AJ306421) LoxP 配列(配列番号 47) 	
EcoRI/PacI (1736~3591)	次を含んでなる YAT1::ME3S::Pex16 <ul style="list-style-type: none"> YAT1:ヤロウィア・リポリティカ(Yarrowia lipolytica)YAT1 プロモーター (図中「YAT」と標識される;米国特許公開第 2006/0094102-A1 号明 細書) ME3S:M. アルピナ(alpina)に由来するコドン最適化された C_{16/18} エロンガーゼ遺伝子(配列番号 48)(国際公開第 2007/046817 号 パンフレット) Pex16:ヤロウィア(Yarrowia)Pex16 遺伝子の Pex16 ターミネーター 配列(Genbank 登録番号 U75433) 	40

【 0 1 8 8 】

一般方法に従って、プラスミド pZKLeuN-29E3 を AscI / SphI で消化し、次に Y. リポリティカ (lipolytica) Y2224 株 (すなわち ATCC #

20362 Ura3-) の形質転換のために使用した。形質転換体細胞を MMLeu 培地プレート上に播種して 30 に 2 ~ 3 日間保った。コロニーを拾って、MM および MMLeu 選択プレート上に画線培養した。MMLeu プレート上では成長できたが、MM プレートでは成長できなかったコロニーを Leu - 株として選択した。次に Leu - 株の単一コロニーを 30 の液体 MMLeu に接種して、250 rpm / 分で 2 日間振盪した。遠心分離によって細胞を収集し、脂質を抽出してエステル交換により脂肪酸メチルエステルを調製して、引き続いて Hewlett - Packard 6890 GC で分析した。

【0189】

GC 分析は、pZKLeuN - 29E3 の 4 個のキメラ遺伝子を含有する形質転換体中の EDA の存在を示したが、ヤロウィア (Yarrowia) Y2224 対照株中には示されなかった。選択された 36 個の Leu - 株のほとんどは総脂質の約 12 ~ 16.9 % の EDA を生成した。総脂質の約 17.4 %、17 %、および 17.5 % の EDA を生成した 3 株 (すなわち株 # 11、# 30、および # 34) があり、それらをそれぞれ Y4001、Y4002、および Y4003 株と称した。

【0190】

Y4001、Y4002、および Y4003 株の単一コロニーを 30 で液体 MMLeu に接種して、250 rpm / 分で 2 日間振盪した。細胞を遠心分離により収集して高グルコース培地に再懸濁し、次に 250 rpm / 分で 5 日間振盪した。細胞を遠心分離により収集して脂質を抽出し、エステル交換によって脂肪酸メチルエステルを調製し、引き続いて Hewlett - Packard 6890 GC で分析した。GC 分析は Y4001、Y4002、および Y4003 株が、総脂質の約 24 % の EDA を生成したことを示した。

【0191】

Y4001U 株 (Leu -、Ura -) の作成：

Y4001 株内でプラスミド pY116 中の Cre リコンビナーゼ酵素の一時的な発現を通じて、Leu - および Ura - 表現型を生成し Y4001U 株を作り出した (図 2C)。コンストラクト pY116 は、次の構成要素を含有した。

【0192】

【表 6】

表 5
プラスミド pY116(配列番号 50)の説明

配列番号 50 中の RE 部位およびヌクレオチド	断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明
1328~448	ColE1 プラスミド複製起点
2258~1398	大腸菌(E. coli)中における選択のためのアンピシリン抵抗性遺伝子(Amp ^R)
3157~4461	ヤロウィア(Yarrowia)自律複製配列(ARS18; Genbank 登録番号 A17608)
Swal/PacI 6667~4504	ヤロウィア(Yarrowia)Leu2 遺伝子(Genbank 登録番号 AF260230)
Swal/PmeI (6667~218)	次を含んでなる GPAT::Cre::XPR2 <ul style="list-style-type: none"> GPAT:ヤロウィア・リポリティカ(Yarrowia lipolytica)GPAT プロモーター (米国特許第 7,264,949 号明細書) Cre:リコンビナーゼタンパク質のための腸内細菌ファージ P1Cre 遺伝子(Genbank 登録番号 X03453) XPR2:ヤロウィア(Yarrowia)Xpr 遺伝子の約 100bp の the3'領域 (Genbank 登録番号 M17741)

【0193】

一般方法に従って、新鮮に成長させたY4001細胞の形質転換のためにプラスミドpY116を使用した。280 µg/mLスルホニル尿素(「E. I. du Pont de Nemours & Co., Inc. (Wilmington, DE)」からのクロリムロンエチル)を含有するMMLeuUraプレート上に、形質転換体細胞を播種して30に3~4日間保った。4個のコロニーを拾って3mL液体YPD培地に30で接種し、250 rpm/分で1日間振盪した。液体MMLeuUra培地で培養物を1:50,000に希釈して、100 µLを新しいYPDプレートの上に播種し30に2日間保った。コロニーを拾ってMMLeuおよびMMLeuUra選択プレート上に画線培養した。MMLeuUraプレート上で成長できたがMMLeuプレート上で成長できなかったコロニーを選択し、GCによって分析してC20:2(EDA)の存在を確認した。Leu-およびUra-表現型を有するいくつかの株は総脂質の約17%のEDAを生成し、Y4001Uと総称された。これらの株の1つをY4001U1と称した。

10

【0194】

実施例1

ユーグレナ・アナベナ(Euglena anabaena)UTEX 373からのcDNAライブラリーの合成

本例はユーグレナ・アナベナ(Euglena anabaena)UTEX 373からのcDNAライブラリーの合成について述べる。この作業は、RNAの調製、cDNAの合成、およびcDNAライブラリーの作成を含んだ。

【0195】

20

ユーグレナ・アナベナ(Euglena anabaena)UTEX 373の成長およびRNAの調製

ユーグレナ・アナベナ(Euglena anabaena)UTEX 373は、ミシガン州立大学(East Lansing, MI)のRichard Triemer博士の研究室から入手した。およそ2mLの培養物を脂質分析のために除去し、1,800 × gで5分間遠心分離した。ペレットを水で1回洗浄し、再度遠心分離した。得られたペレットを真空下で5分間乾燥させ、100 µLの水酸化トリメチルスルホニウム(TMSH)に再懸濁して、振盪しながら室温で15分間インキュベートした。このステップの後0.5mLのヘキサンを添加して、バイアルを振盪しながら室温で15分間インキュベートした。脂肪酸メチルエステル(ヘキサン層から5 µLを注入)を分離させ、Omega 320 溶融石英キャピラリーカラム(Supelco Inc., カタログ番号24152)を装着したHewlett-Packard 6890ガスクロマトグラフを使用して定量化した。オープン温度をプログラムして170に1.0分間保ち、5 / 分で240に上昇させ、次にさらに1.0分間保った。キャリアガスはWhatman水素発生装置によって供給された。滞留時間を市販される標準メチルエステル(Nu-Chek Prep, Inc., カタログ番号U-99-A))と比較して、得られたクロマトグラムを図3に示す。脂肪酸プロファイル中のEDA、ERA、EPA、およびDHAの存在は、GLAおよびSTAの不在と共に、ユーグレナ・アナベナ(Euglena anabaena)が長鎖(LC)PUFA生合成のために9エロンガーゼ/8デサチュラーゼ経路を使用すること、および8デサチュラーゼなどをはじめとするが、これに限定されるものではない、LC-PUFA生合成遺伝子の良好な起源になり得ることを示唆した。

30

40

【0196】

残る5mLの活発に成長する培養物を125mLガラスフラスコ内の25mLのAF-6培地(Watanabe & Hiroki, NIES-Collection List of Strains, 第5版, National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, 127 pp(2004年))中に移した。ユーグレナ・アナベナ(Euglena anabaena)培養物を非常に穏やかに攪拌しながら、16時間の明期と8時間の暗期のサイクルで22で2週間成長させた。

50

【0197】

2週間後、培養物(25mL)を500mLガラス瓶内の100mLのAF-6培地に移し、上述のように培養物を1ヶ月間成長させた。この期間後、2つの50mLのアリコートに250mLのAF-6培地を含有する2つの別個の500mLガラス瓶内に移し、上述のように培養物を2ヶ月間成長させた(合計約600mLの培養物を得た)。次に培養物を1,800×gで10分間遠心分離してペレット化し、水で1回洗浄して再度遠心分離した。「TEL-TEST, Inc. (Friendswood, TX)」からのRNA STAT-60TM試薬を使用し、提供された製造業者のプロトコル(5mLの試薬を使用してRNAを0.5mLの水に溶解する)に従って、得られたペレットの1つから全RNAを抽出した。このようにして340μgの全RNA(680μg/mL)がペレットから得られた。残りのペレットを液体窒素内で凍結し-80に保存した。(「Amersham Biosciences (Piscataway, NJ)」からのmRNA精製キットを使用して提供された製造業者のプロトコルに従って、340μgの全RNAの全てからmRNAを単離した。このようにして9.0μgのmRNAを得た。

10

【0198】

ユーグレナ・アナベナ(*Euglena anabaena*) cDNAの調製およびcDNAライブラリーeug1cの作成

「Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA)」からのCloneminerTM cDNAライブラリー構築キット(カタログ番号18249-029)を使用し、提供された製造業者のプロトコル(バージョンB、25-0608)に従ってcDNAライブラリーを作成した。非放射標識法を使用して、5.12μgの(上述の)mRNAから、ピオチン-attB2-オリゴ(dT)プライマーを使用してcDNAを合成した。第1および第2のストランドの合成後、attB1アダプターを添加してライゲートし、カラムクロマトグラフィーを使用してcDNAをサイズ分画した。画分からのDNAを濃縮し、pDONRTM222に遺伝子組み換えして、大腸菌(*E. coli*) ElectroMAXTM DH10BTM T1ファージ-抵抗性細胞(Invitrogen Corporation)に形質転換した。ユーグレナ・アナベナ(*Euglena anabaena*)ライブラリーをeug1cと命名した。

20

【0199】

cDNAライブラリーeug1cをLB+カナマイシンプレート上に播種して(およそ100,000個のコロニー)、コロニーを掻き取り「Qiagen Inc. (Valencia, CA)」からのQIAprep(登録商標)¹ Spin Miniprepキットを使用し製造業者のプロトコルに従ってDNAを単離した。このようにしてeug1cからのプラスミドDNA下位ライブラリーを得た。

30

【0200】

実施例2

ユーグレナ・アナベナ(*Euglena anabaena*) UTEX 373からの部分的 8デサチュラーゼをコードするcDNA断片の単離

本実施例は、ミドリムシ(*Euglena gracilis*) 8デサチュラーゼ配列(配列番号2)に基づいて縮重オリゴヌクレオチドを使用した、cDNAライブラリーのPCR増幅に基づいた、ユーグレナ・アナベナ(*Euglena anabaena*) UTEX 373からの部分的 8デサチュラーゼをコードするcDNA断片(配列番号1)の同定について述べる。

40

【0201】

部分的推定上 8デサチュラーゼをコードするcDNA断片の同定

ミドリムシ(*Euglena gracilis*) 8脂肪酸デサチュラーゼのヌクレオチド配列に基づく縮重プライマー(配列番号2、国際公開第2006/012325号パンフレットでEg5として記載されている)、およびベクター特異的プライマーpDonor222Eg5-1(配列番号3)を使用した縮重PCRのためのテンプレートとして、実施例1で述べられるプラスミドDNA下位ライブラリーを使用した。使用された4

50

つの縮重プライマーを表6に示す。

【0202】

【表7】

表6

ユーグレナ・アナベナ(*Euglena anabaena*)UTEX 373からの
Δ8 デサチュラーゼ遺伝子の一部を増幅するのに使用された縮重オリゴヌクレオチ

プライマー	ヌクレオチド配列	配列番号
D8DEG3-1	RTTGTGNCKATCTTTCCACCA	配列番号4
D8DEG3-2	RTTGTGNCKGTCTTTCCACCA	配列番号5
D8DEG3-3	RTTGTGNCKATCCTTCCACCA	配列番号6
D8DEG3-4	RTTGTGNCKGTCTTCCACCA	配列番号7

【0203】

cDNAサンプルのために合計5つの反応を設定した。反応混合物は、1μLのcDNA、各1μLのベクター特異的縮重プライマー(20μM)、および「Finnzymes Oy (Finland)」からのPhusion™ High-Fidelity DNAポリメラーゼ(カタログ番号F553S)を含有した。製造業者のプロトコールに従ってPCRを実施した。得られたDNA断片をZero Blunt(登録商標)PCRクローニングキット(Invitrogen Corporation)を使用して製造業者のプロトコールに従って、pCR-Blunt(登録商標)クローニングベクターにクローンした。

【0204】

得られたクローンからのプラスミドDNAをQIAprep(登録商標)Spin Miniprepキット(Qiagen Inc.)を使用し製造業者のプロトコールに従って精製し、ABI BigDyeバージョン3 Prism配列決定キットを用いて、ベクターで予め刺激されたT7プライマー(配列番号8)およびM13rev-28プライマー(配列番号9)を使用して、DNA挿入断片を384ウェルプレート内で末端配列決定した。配列決定反応のために、100~200ngのテンプレートおよび6.4pmolのプライマーを使用して、以下の反応条件を25回繰り返した。96℃で10秒間、50℃で5秒間、および60℃で4分間。エタノールベースの精製後、Perkin-Elmer ABI 3700自動化配列決定装置上で、サイクル配列決定反応生成物を解析して検出した。

【0205】

得られた個々の配列から共通配列をアセンブルし、コンセンサスと同一の配列を有するpHD23-1(配列番号10)と称される1つの代表的なクローンをさらなる研究のために選択した。

【0206】

BLAST「nr」データベース(全ての非重複性GenBank CDS翻訳と、三次元構造Brookhavenタンパク質データバンク、SWISS-PROTタンパク質配列データベースの最新メジャーリリース、EMBLおよびDDBJデータベースに由来する配列とを含んでなる)に含有される配列との類似性を検索する、BLAST(Basic Local Alignment Search Tool; Altschulら、J. Mol. Biol., 215:403~410(1993年))を使用して、部分的Δ8デサチュラーゼとしてのpHD23-1(配列番号1)中の部分的cDNA挿入断片の同定を確認した。得られた部分的cDNA配列(配列番号1)を全ての読み枠で翻訳し、NCBIによって提供されるBLASTXアルゴリズム(GishおよびStates, Nat. Genet., 3:266~272(1993年))をデフォルトパラメーターでフィルターをオフにして使用して、「nr」データベースに含有される全ての

公的に入手可能なタンパク質配列との類似性について比較した。便宜上、BLASTによる計算で、cDNA配列と検索されるデータベース中に含有される配列とのマッチが単なる偶然で観察されるP値(確率)をここで報告されるP値の対数の負数に相当する「pLog」値として報告する。したがってpLog値が大きいほど、cDNA配列およびBLAST「hit」が相通的なタンパク質を表す可能性が大きい。

【0207】

pHD23-1からのヌクレオチド配列挿入を使用したBLASTX検索は、部分的cDNA(配列番号1)によってコードされるタンパク質と、ミドリムシ(*Euglena gracilis*) 8デサチュラーゼアミノ酸配列(配列番号11)(NCBI登録番号AAD45877(GI 5639724)、遺伝子座AAD45877、CDS AF139720; WallisおよびBrowse, Arch. Biochem. Biophys., 365:307~316(1999年))との類似性を明らかにし、63.4のpLog値(4e-63のE値)が得られた。

10

【0208】

実施例3

ユーグレナ・アナベナ(*Euglena anabaena*) UTEX 373からの全長 8デサチュラーゼの単離

LB+50 µg/mLカナマイシン寒天培地をそれぞれ含有する「Corning(Corning, NY)」からの3個の大型正方形(24 cm×24 cm)ペトリ皿に、cDNAライブラリーeug1cのおよそ17,000個のクローンを播種した。細胞を37 で一晩成長させ、次にプレートを室温に冷却した。

20

【0209】

コロニーリフト

「Pall Corporation(Pensacola, FL)」からのBiodyne B 0.45 µm膜(カタログ番号60207)をおよそ22 cm×22 cmに裁断し、膜を寒天上に気泡を避けて注意深く載せた。室温で2分間のインキュベーション後、膜の方向性を標識してピンセットで持ち上げ、0.5 M水酸化ナトリウムと1.5 M塩化ナトリウムに浸した濾紙にコロニー面を上にして載せた。4分間の変性後、0.5 M Tris-HCl(pH 7.5)と1.5 M塩化ナトリウムに4分間浸した濾紙に膜を載せて、水酸化ナトリウムを中和した。ステップを繰り返し、2×SSC緩衝液(20×SSCは3 M塩化ナトリウム、0.3 Mクエン酸ナトリウム、pH 7.0)中で膜を手早くすすぎ、濾紙上で風乾した。

30

【0210】

ハイブリダイゼーション

膜を200 mLハイブリダイゼーション溶液中で、65 で2時間プレハイブリダイズした。ハイブリダイゼーション溶液は、6×SSPE(20×SSPEは3 M塩化ナトリウム、0.2 Mリン酸ナトリウム、20 mM EDTA、pH 7.4)、5×デンハルト試薬(100×デンハルト試薬は2%(w/v) Ficoll、2%(w/v) ポリビニルピロリドン、2%(w/v) アセチル化ウシ血清アルブミン)、0.5%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、100 µg/mL剪断サケ精子DNA、および5%硫酸デキストランを含有した。

40

【0211】

「Invitrogen(Carlsbad, CA)」からのRadPrime DNA標識システム(カタログ番号18428-011)を使用し製造業者の使用説明書に従って、P³²dCTPで標識したpHD23-1(実施例2)からのユーグレナ・アナベナ(*Euglena anabaena*) 8デサチュラーゼDNA部分断片を含有するアガロースゲル精製 EcoRI DNA断片を使用して、DNAプローブを作成した。「Amersham Biosciences(Piscataway, NJ)」からのNICKカラム(カタログ番号17-0855-02)を使用し製造業者の使用説明書に従って、取り込まれなかったP³²dCTPを分離した。プローブを100 で5分間変性させ

50

氷の上に3分間載せて、半分をハイブリダイゼーション溶液に添加した。

【0212】

穏やかに振盪しながら、膜をプローブと65℃で一晩ハイブリダイズし、次に翌日0.5%のSDSを含有する2×SSCで2回(各5分間)、0.1%のSDSを含有する0.2×SSCで2回(各15分間)洗浄した。洗浄後、「Amersham Biosciences (Piscataway, NJ)」からのhyperfilm(カタログ番号RPN30K)を-80℃で一晩、膜に曝露した。

【0213】

曝露されたhyperfilmとプレートのアラインメントに基づいて、パスツールピペットの平滑末端を使用して陽性コロニーを1mLの水中に拾い上げ、ボルテックスした。希釈を何回か行って50μg/mLカナマイシン添加LB培地を含有する小型円形ペトリ皿(82mm)上に播種し、単一プレート上に約100個の良好に単離されたコロニーを得た。「Schleicher & Schuell (Keene, NH)」からのNytranNメンブランサークル(カタログ番号10416116)を使用したこと以外は上述のようにして持ち上げて、残りの放射標識プローブを使用して100mL中でハイブリダイゼーションを実施した。このようにして陽性のクローンを確認した。

10

【0214】

個々の陽性クローンをLB+50μg/mLカナマイシン液体培地中で37℃で成長させ、QIAprep(登録商標)Spin Miniprepキット(Qiagen Inc.)を使用し製造業者のプロトコールに従ってプラスミドを精製した。

20

【0215】

ベクターで予め刺激されたT7プライマー(配列番号8)、ベクターで予め刺激されたM13rev-28プライマー(配列番号9)、およびpoly(A)tailで予め刺激されたWobbleTオリゴヌクレオチドを使用して、実施例2で述べられるようにして、ABI BigDyeバージョン3 Prism配列決定キットによりプラスミド挿入断片を配列決定した。簡単に述べるとWobbleTプライマーは、cDNAクローンの3'末端を配列決定するのに使用される、21mer poly(T)A、poly(T)C、およびpoly(T)Gの等モル混合物である。最初の配列データに基づいて、オリゴヌクレオチドEaD8seq-1(配列番号12)を使用し、同様にして追加的な内部断片配列を得た。このようにしてeug1c 8デサチュラーゼクローンの全長解析を得た。

30

【0216】

「Gene Codes Corporation (Ann Arbor, MI)」からのSequencher™(バージョン4.2)を使用して配列を整列させて比較することで、クローンを挿入断片配列に基づいて4つの異なる群(EaD8Des1、EaD8Des2、EaD8Des3またはEaD8Des4と称する)の1つに分類できた。各配列クラスについてcDNAを含有する代表的なクローンをさらなる研究のために選択し、代表的な各プラスミドの配列(すなわちpLF118-1、pLF118-2、pLF118-3、およびpLF118-4)をそれぞれ配列番号13、配列番号14、配列番号15、および配列番号16によって示す。NNNNの文字列によって示される配列は、配列決定されなかったpolyA tailの領域に相当する。EaD8Des1、EaD8Des2、EaD8Des3、およびEaD8Des4のコード配列をそれぞれ配列番号17、配列番号18、配列番号19、および配列番号20で示す。EaD8Des1、EaD8Des2、EaD8Des3、およびEaD8Des4に対応するアミノ酸配列をそれぞれ配列番号21、配列番号22、配列番号23、および配列番号24で示す。EaD8Des1、EaD8Des2、EaD8Des3、およびEaD8Des4は、EaD8Des遺伝子と総称される。

40

【0217】

実施例4

ユーグレナ・アナベナ(Euglena anabaena)UTEX 373の8デ

50

サチュラーゼ配列の一次配列分析およびミドリムシ (*Euglena gracilis*) の 8 デサチュラーゼ配列との比較

L A S E R G E N E バイオインフォマティクス演算スイート (D N A S T A R I n c .) の M e g A l i g n TM v 6 . 1 プログラムを多重アラインメントのためのデフォルトパラメーター (G A P P E N A L T Y = 1 0 、 G A P L E N G T H P E N A L T Y = 0 . 2 、 D e l a y D i v e r g e n S e q s (%) = 3 0 、 D N A T r a n s i t i o n W e i g h t = 0 . 5 、 P r o t e i n W e i g h t M a t r i x = G o n n e t S e r i e s 、 D N A W e i g h t M a t r i x = I U B) で使用して、C l u s t a l W 法を使用して、E a D 8 D e s 1 (配列番号 2 1) 、E a D 8 D e s 2 (配列番号 2 2) 、E a D 8 D e s 3 (配列番号 2 3) 、および E a D 8 D e s 4 (配列番号 2 4) のアミノ酸配列を比較した。

10

【 0 2 1 8 】

E a D 8 D e s 1 (配列番号 2 1) と比較して、E a D 8 D e s 2 (配列番号 2 2) は 3 個のアミノ酸置換 (すなわち T 1 1 0 S 、 M 2 2 3 I 、および K 2 5 1 T ; E a D 8 D e s 1 の番号付けに基づく) を有し、E a D 8 D e s 3 (配列番号 2 3) は 2 個のアミノ酸置換 (すなわち T 1 1 0 S および K 2 5 1 T) を有し、E a D 8 D e s 4 (配列番号 2 4) は 1 個のアミノ酸置換 (すなわち T 1 1 0 S) を有する。

【 0 2 1 9 】

B L A S T 「 n r 」 データベース (前出、実施例 2) 中に含有される配列との類似性を検査する B L A S T P (B a s i c L o c a l A l i g n m e n t S e a r c h T o o l ; A l t s c h u l r , J . M o l . B i o l . , 2 1 5 : 4 0 3 ~ 4 1 0 (1 9 9 3 年)) によって、デフォルトパラメーターを使用してフィルターをオフにして、E a D 8 D e s 1 (配列番号 2 1) 、E a D 8 D e s 2 (配列番号 2 2) 、E a D 8 D e s 3 (配列番号 2 3) 、および E a D 8 D e s 4 (配列番号 2 4) のアミノ酸配列を評価した。便宜上、B L A S T による計算で、c D N A 配列と検索されるデータベース中に含まれる配列とのマッチが単なる偶然で観察されることの P 値 (確率) は、ここで報告された P 値の対数の負数に相当する「 p L o g 」値として報告される。

20

【 0 2 2 0 】

「 n r 」データベースと比較すると、4 つの配列は全てミドリムシ (*Euglena gracilis*) 8 デサチュラーゼアミノ酸配列 (配列番号 1 1) (N C B I 登録番号 A A D 4 5 8 7 7 (G I 5 6 3 9 7 2 4) 、遺伝子座 A A D 4 5 8 7 7 、C D S A F 1 3 9 7 2 0 ; W a l l i s および B r o w s e , A r c h . B i o c h e m . B i o p h y s . , 3 6 5 : 3 0 7 ~ 3 1 6 (1 9 9 9 年)) に対して、1 7 7 の p L o g 値 (e - 1 7 7 の P 値) をもたらした。B L A S T スコアおよび確率は、本核酸断片がユーグレナ・アナベナ (*Euglena anabaena*) 8 脂肪酸デサチュラーゼの全体をコードすることを示唆する。

30

【 0 2 2 1 】

次に配列比較の B l a s t P (デフォルトパラメーター、フィルターオフ) 、C l u s t a l V 、および J o t u n H e i n 法を使用して、E a D 8 D e s 1 (配列番号 2 1) 、E a D 8 D e s 2 (配列番号 2 2) 、E a D 8 D e s 3 (配列番号 2 3) 、および E a D 8 D e s 4 (配列番号 2 4) のアミノ酸配列と、機能性変異ミドリムシ (*Euglena gracilis*) 8 デサチュラーゼアミノ酸配列 (ここで E g D 8 として同定され配列番号 2 5 で記載される ; 国際公開第 2 0 0 6 / 0 1 2 3 2 5 号パンフレットで E g 5 として述べられる) とを比較し、各方法を使用した % 同一性を表 7 に示す。

40

【 0 2 2 2 】

C l u s t a l V 法 (H i g g i n s , D . G . および S h a r p , P . M . , C o m p u t . A p p l . B i o s c i . , 5 : 1 5 1 ~ 1 5 3 (1 9 8 9 年) ; H i g g i n s ら、C o m p u t . A p p l . B i o s c i . , 8 : 1 8 9 ~ 1 9 1 (1 9 9 2 年)) によって実施された配列 % 同一性計算は、「D N A S T A R I n c . (M a d i s o n , W I) 」からの L A S E R G E N E バイオインフォマティクス演算スイートの M e g

50

AlignTMv6.1プログラムをペアワイズアラインメントのデフォルトパラメーター (KTUPLE = 1、GAP PENALTY = 3、WINDOW = 5およびDIAGONALS SAVED = 5およびGAP LENGTH PENALTY = 10) で使用して行った。Jotun Hein法 (Hein, J. J., Meth. Enz., 183: 626 ~ 645 (1990年)) によって実施された配列%同一性計算は、「DNA STAR Inc. (Madison, WI)」からのLASERGENEバイオインフォマティクス演算スイートのMegAlignTMv6.1プログラムをペアワイズアラインメントのデフォルトパラメーター (KTUPLE = 2) で使用して行った。

【0223】

【表8】

10

表7

EaD8Des1(配列番号21)、EaD8Des2(配列番号22)、EaD8Des3(配列番号23)、およびEaD8Des4(配列番号24)とEgD8(配列番号25)との配列比較

デサチュラーゼ	BLASTPによる EgD8(配列番号25) との%同一性	Jotun Hein 法による EgD8(配列番号25) との%同一性	Clustal V 法による EgD8(配列番号25) との%同一性
EaD8Des1	73%	74.4%	72.1%
EaD8Des2	73%	74.2%	71.9%
EaD8Des3	73%	74.2%	71.9%
EaD8Des4	73%	74.2%	71.9%

20

【0224】

これらの5個のアミノ酸配列のClustal Vアラインメントは、図4A、4B、および4Cにある。下の表8は、図4A、4B、および4Cで整列される5個の8デサチュラーゼ配列間の%同一性(上半分三角形で示す)および%相違(下半分三角形で示す)の比較を示す。

【0225】

【表9】

30

表8

EaD8Des1(配列番号21)、EaD8Des2(配列番号22)、EaD8Des3(配列番号23)、EaD8Des4(配列番号24)、およびEgD8(配列番号25)間の%同一性および%相違

	EaD8Des1	EaD8Des2	EaD8Des3	EaD8Des4	EgD8
EaD8Des1	--	99.3	99.5	99.8	72.1
EaD8Des2	0.7	--	99.8	99.5	71.9
EaD8Des3	0.5	0.2	--	99.8	71.9
EaD8Des4	0.2	0.5	0.2	--	71.9
EgD8	31.4	31.8	31.8	31.8	--

40

【0226】

実施例5

ヤロウィア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) 中におけるユーグレナ・アナベナ (Euglena anabaena) UTEX 373 8デサチュラーゼの機能解析

本実施例は、ヤロウィア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) 中におけるEaD8Des1(配列番号21)、EaD8Des2(配列番号22)、EaD8Des3(配列番号23)、およびEaD8Des4(配列番号24)の機能解析

50

について述べる。この研究は、(1) 実施例2で述べられるプラスミドから、クローニングのための適切な制限部位がある各 8 デサチュラーゼをPCR増幅するステップと、(2) EaD8DesのPCR産物をクローニングベクターpCR-Blunt(登録商標)(Invitrogen Corporation)にクローニングしてpY120-1、pY120-2、pY120-3、およびpY120-4を得るステップと、(3) EaD8Des遺伝子をヤロウシア(Yarrowia)発現ベクターpY115にクローニングしてpY175、pY176、pY177、およびpY178を得るステップと、(4) 基質供給後にpY175、pY176、pY177、およびpY178を含んだ。なる形質転換生物中の脂質プロファイルと比較するステップとを含んだ。

【0227】

ユーグレナ・アナベナ(Euglena anabaena) 8 デサチュラーゼ遺伝子のPCR増幅

NotIおよびNcoI制限部位をコード配列の5'末端に、NotI部位をコード配列の3'末端に導入するために、EaD8Desの各遺伝子をPCR増幅した。「Finzymes Oy(Finland)」からのPhusionTM High-Fidelity DNAポリメラーゼ(カタログ番号F553S)を使用し製造業者のプロトコールに従って、オリゴヌクレオチドプライマーEaD8-5(配列番号26)およびEaD8-3(配列番号27)を用いて、EaD8Des1(配列番号17)、EaD8Des2(配列番号18)、EaD8Des3(配列番号19)、およびEaD8Des4(配列番号20)のコード配列をpLF118-1(配列番号13)、pLF118-2(配列番号14)、pLF118-3(配列番号15)、およびpLF118-4(配列番号16)からそれぞれ増幅した。得られたDNA断片をZero Blunt(登録商標)PCRクローニングキット(Invitrogen Corporation)を使用し製造業者のプロトコールに従って、pCR-Blunt(登録商標)クローニングベクターにクローンして、pLF120-1(配列番号28)、pLF120-2(配列番号29)、pLF120-3(配列番号30)、およびpLF120-4(配列番号31)をそれぞれ得た。

【0228】

ヤロウシア(Yarrowia)発現ベクターpY115、pY175、pY176、pY177、およびpY178の構築

プラスミドpY5-30(米国特許第7,259,255号明細書で述べられている)は、大腸菌(E.coli)およびヤロウシア・リポリティカ(Yarrowia lipolytica)の双方の中で複製できるシャトルプラスミドである。プラスミドpY5-30は、ヤロウシア(Yarrowia)自律複製配列(ARS18)、ColE1プラスミド複製起点、大腸菌(E.coli)中における選択のためのアンピシリン抵抗性遺伝子(Amp^R)、ヤロウシア(Yarrowia)中における選択のためのヤロウシア(Yarrowia)LEU2遺伝子、およびキメラTEF::GUS::XPR遺伝子を含有する。当業者によく知られている技術を使用して、TEFプロモーターをヤロウシア・リポリティカ(Yarrowia lipolytica)FBAINmプロモーター(米国特許第7,202,356号明細書)で置換して、プラスミドpDMW263(配列番号32)をpY5-30から作り出した。簡単に述べるとこのプロモーターは、fba1遺伝子によってコードされる果糖-ビスホスフェートアルドラーゼ酵素(E.C.4.1.2.13)の「ATG」翻訳開始コドン前の5'上流非翻訳領域に位置して発現に必要な修飾プロモーターと、イントロンを有する5'コード領域の部分とを指し、FBAINmは、FBAINプロモーターのATG翻訳開始コドンおよびイントロン間の52bpの欠失(その結果N-末端の22個のアミノ酸のみを含む)と、イントロン後の新しい翻訳コンセンサスモチーフとを有する。表9はpDMW263(配列番号32)の構成要素を要約する。

【0229】

【表 10】

表 9
プラスミド pDMW263 の構成要素

配列番号 32 中の RE 部位および ヌクレオチド	断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明
4992~4296	ARS18 配列(Genbank 登録番号 A17608)
Sall/SacII (8505~2014)	次を含んでなる FBAINm::GUS::XPR <ul style="list-style-type: none"> • FBAINm:ヤロウィア・リポリティカ(<i>Yarrowia lipolytica</i>)FBAINm プロモーター(米国特許第 7,202,356 号明細書) • GUS:β-グルクロニダーゼをコードする大腸菌(<i>E. coli</i>)遺伝子(Jefferson, R. A., Nature, 14:342:837~838(1989 年)) • XPR:ヤロウィア(<i>Yarrowia</i>)Xpr 遺伝子の約 100bp の 3'領域(Genbank 登録番号 M17741)
6303~8505	ヤロウィア(<i>Yarrowia</i>)Leu2 遺伝子(Genbank 登録番号 AF260230)

10

【 0 2 3 0 】

ヤロウィア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)FBAINm プロモーターを含有する pDMW263 (配列番号 32) からの NcoI / SalI DNA 断片を(その内容を参照によって本明細書に援用する)国際公開第 2006/012325 号パンフレットで以前述べられており、イソクリシス・ガルバナ(*Isocorysis galbana*)に由来してヤロウィア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)中での発現についてコドン最適化された合成 9 エロンガーゼ遺伝子を含有する pDMW237 (配列番号 33)の NcoI / SalI DNA 断片にクローンして、pY115 (配列番号 34、図 5 A)を生成した。図 5 A および図 5 B 中では、修飾 FBAINm プロモーターは FBA1 + イントロンと標識される。

20

【 0 2 3 1 】

EaD8Des をそれぞれ含有する pLF120-1 (配列番号 28)、pLF120-2 (配列番号 29)、pLF120-3 (配列番号 30)、および pLF120-4 (配列番号 31)からの NcoI / NotI DNA 断片をヤロウィア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)FBAINm プロモーターを含有する pY115 からの NcoI / NotI DNA 断片にクローンして、pY175 (配列番号 35、図 5 B)、pY176 (配列番号 36)、pY177 (配列番号 37)、および pY178 (配列番号 38)をそれぞれ生成した。

30

【 0 2 3 2 】

ヤロウィア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)Y2224 株中におけるユーグレナ・アナベナ(*Euglena anabaena*)8 デサチュラーゼ遺伝子の機能解析

一般方法で述べられるようにして、Y2224 株(一般方法参照)を pY175 (配列番号 35)、pY176 (配列番号 36)、pY177 (配列番号 37)、および pY178 (配列番号 38)で形質転換した。

40

【 0 2 3 3 】

pY175、pY176、pY177、および pY178 を含有する形質転換体ヤロウィア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)の単一コロニーを 0.2% タージトールを添加したウラシルを欠く 3 mL の最少培地中で、30 で 1 日間成長させた。その後、0.1 mL を EDA (20:2 (11, 14))または ETrA (20:3 (11, 14, 17))を 0.175 mM に添加した 3 mL の同一培地に移した。これらを 30、250 rpm で 16 時間インキュベートして、次に遠心分離によりペレットを得た。細胞を水で 1 回洗浄し、遠心分離によってペレット化し風乾した。500 μ L

50

の1%ナトリウムメトキシドを用いて50 で30分間ペレットをエステル交換し(Roughan, G. およびNishida, I., Arch. Biochem. Biophys., 276(1):38~46(1990年))、その後500 μ Lの1M塩化ナトリウムおよび100 μ Lのヘプタンを添加した。完全な混合および遠心分離後、脂肪酸メチルエステル(FAME)をGCによって分析した。FAME(ヘキサン層から5 μ Lを注入)を分離させ、Omegawax 320溶融石英キャピラリーカラム(カタログ番号24152、Supelco Inc.)を装着したHewlett-Packard 6890ガスクロマトグラフを使用して定量化した。オープン温度をプログラムして、220 に2.6分間保ち、20 /分で240 に上昇させ、次にさらに2.4分間保った。キャリアガスはWhatman水素発生装置によって供給された。滞留時間を市販される標準メチルエステル(Nu-Chek Prep, Inc.)と比較した。

10

【0234】

pY175、pY176、pY177、およびpY178を発現するヤロウシア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)の脂肪酸プロファイルを図6に示す。どちらの基質(すなわちEDAまたはERA)が供給されたのかによって、DGLAの重量%をEDAとDGLAの重量%の和で除して%として表現するために100を乗じる、またはETAの重量%をERAとDTAの重量%の和で除して%として表現するために100を乗じるのどちらかで、%C20不飽和化(「C20% 8 desat」)を計算した。平均は適切な見出しに続くAve.で示す。EDAとERAとの不飽和化の比率は、EDAのAve. C20% 8 desatをERAのそれで除して計算される。

20

【0235】

ユーグレナ・アナベナ(*Euglena anabaena*) 8デサチュラーゼは全てヤロウシア(*Yarrowia*)中で同様に良好に機能し、供給されたEDAのおよそ50%をDGLAに変換する。EDA/ERA比は1.1~1.2で、ERAよりもEDAに対するわずかな選択性があるようである。

【0236】

実施例6

ヤロウシア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)のためにコドン最適化された 8デサチュラーゼ遺伝子(EaD8S)の合成

国際公開第2004/101753号パンフレットおよび米国特許第7,125,672号明細書で述べられているのと類似した方法で、ユーグレナ・アナベナ(*Euglena anabaena*)の 8デサチュラーゼ遺伝子(EaD8Des3、配列番号19)のコドン使用頻度をヤロウシア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)中での発現について最適化した。具体的にはヤロウシア(*Yarrowia*)コドン使用頻度パターン(国際公開第2004/101753号パンフレット)、「ATG」翻訳開始コドン周辺の共通配列、およびRNA安定性の原則(Guhaniyogi, G. およびJ. Brewer, Gene, 265(1~2):11~23(2001年))に従ってEaD8Des3(配列番号19および23)のコード配列に基づいて、コドン最適化された 8デサチュラーゼ遺伝子(「EaD8S」と称する、配列番号39)をデザインした。翻訳開始部位の修飾に加えて、1260bpコード領域の231bp(18.3%)を修飾して、208個のコドン(49.5%)を最適化した。GC含量を野生型遺伝子(すなわちEaD8Des3)中の56.8%から合成遺伝子(すなわちEaD8S)中の54.8%に低下させた。NcoI部位およびNotI部位をEaD8S(配列番号39)の翻訳開始コドン周辺および停止コドンの後にそれぞれ組み込んだ。図7Aおよび7Bは、EaD8Des3(配列番号19)およびEaD8S(配列番号39)のヌクレオチド配列の比較を示す。コドン最適化された遺伝子(すなわち配列番号40)によってコードされるタンパク質配列は、野生型EaD8Des3のタンパク質配列(すなわち配列番号23)と同一である。デザインされたEaD8S遺伝子は「GenScript Corporation(Piscataway, NJ)」によって合成され、pUC57(Genbank登録番号Y14837)中にクローンされて、pEaD8S(配

30

40

50

列番号 41、図 8A) が作り出された。

【0237】

実施例 7

ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 中での発現についてコドン最適化された (ユーグレナ・アナベナ (*Euglena anabaena*) に由来する) 合成 8 デサチュラーゼ遺伝子 (EaD8S) を含んでなるヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 発現ベクター pZUFmEaD8S の構築および機能解析

本実施例は、キメラ FBAINm::EaD8S::Pex20 遺伝子を含んでなるヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) ベクター pZUFmEaD8S の機能発現について述べ、EaD8S はユーグレナ・アナベナ (*Euglena anabaena*) に由来する合成 8 デサチュラーゼであってヤロウィア (*Yarrowia*) 中での発現についてコドン最適化されている (実施例 6)。プラスミド pZUFmEaD8S (図 8B) は以下の構成要素を含んだ。

【0238】

【表 11】

表 10
プラスミド pZUFmEaD8S (配列番号 51) の構成要素

配列番号 51 中の RE 部位およびヌクレオチド	断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明
Swal/BsiWI (7333~1584)	次を含んでなる FBAINm::EaD8S::Pex20 <ul style="list-style-type: none"> • FBAINm: ヤロウィア・リポリティカ (<i>Yarrowia lipolytica</i>) FBAIN プロモーター (米国特許第 7,202,356 号明細書) • EaD8S: ユーグレナ・アナベナ (<i>Euglena anabaena</i>) に由来するコドン最適化された Δ8 デサチュラーゼ (配列番号 39) • Pex20: ヤロウィア (<i>Yarrowia</i>) Pex20 遺伝子の Pex20 ターミネーター配列 (Genbank 登録番号 AF054613)
2620~1740	ColE1 プラスミド複製起点
3550~2690	大腸菌 (<i>E. coli</i>) 中における選択のためのアンピシリン抵抗性遺伝子 (Amp ^R)
4449~5753	ヤロウィア (<i>Yarrowia</i>) 自律複製配列 (ARS18; Genbank 登録番号 A17608)
7297~5796	ヤロウィア (<i>Yarrowia</i>) Ura3 遺伝子 (Genbank 登録番号 AJ306421)

【0239】

pZUFmEaD8S を含んでなるヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 形質転換体の機能解析

一般方法で述べられるようにして、プラスミド pZUFmEaD8S (配列番号 51、図 8B) を Y4001U 株に形質転換した。形質転換体を MMLeu プレート上で選択した。30 で 2 日間の生育後、形質転換体を拾って新鮮な MMLeu プレート上に再度画線培養した。ひとたび成長したら、これらの株を個々に 3 mL の液体 MMLeu に 30 で接種して、250 rpm / 分で 2 日間振盪した。細胞を遠心分離により収集して脂質を抽出し、エステル交換によって脂肪酸メチルエステルを調製して、引き続いて Hewlett-Packard 6890 GC で分析した。

GC 分析は 7 つの形質転換体の全てで、総脂質の約 6.5% の DGLA および 9.4% の EDA が生成されたことを示し、これらの 7 つ株の EDA から DGLA への変換効率は約 41% と判定された。

【0240】

以上、本発明を要約すると下記のとおりである。

1. (a) 8 デサチュラーゼ活性を有して、配列番号 21、配列番号 22、配列番号 2

3、および配列番号24からなる群から選択されるアミノ酸配列と比較すると、C l u s t a l V法のアラインメントに基づいて少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、

(b) 8デサチュラーゼ活性を有するポリペプチドをコードして、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、および配列番号39からなる群から選択されるヌクレオチド配列と比較すると、B L A S T N法のアラインメントに基づいて少なくとも80%の配列同一性を有するヌクレオチド配列、

(c) 8デサチュラーゼ活性を有するポリペプチドをコードして、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、および配列番号39からなる群から選択されるヌクレオチド配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列、または

(d) (a)、(b)または(c)のヌクレオチド配列の相補体であって、前記相補体および前記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、相補体

を含む、単離されたポリヌクレオチドを含んでなる微生物宿主細胞。

2. 単離されたポリヌクレオチドが、配列番号21、配列番号22、配列番号23、および配列番号24からなる群から選択されるアミノ酸配列をコードする、上記1に記載の微生物宿主細胞。

3. 微生物宿主細胞が、酵母、藻類、細菌、ユーグレナ属、ストラメノパイル、および真菌からなる群から選択される、上記1に記載の微生物宿主細胞。

4. 細胞がモルティエラ属の真菌である、上記3に記載の微生物宿主細胞。

5. 細胞が、スラウストキトリウム種、およびシゾキトリウム種からなる群から選択されるストラメノパイルである、上記3に記載の微生物宿主細胞。

6. 酵母が油性酵母である、上記3に記載の微生物宿主細胞。

7. 油性酵母が、ヤロウィア、カンジダ、ロドトルラ、ロドスポリジウム、クリプトコッカス、トリコスポロン、およびリボマイセスからなる群から選択される、上記6に記載の微生物宿主細胞。

8. a) (i) 配列番号21、配列番号22、配列番号23、および配列番号24からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較すると、C l u s t a l V法のアラインメントに基づいて少なくとも80%のアミノ酸同一性を有する 8デサチュラーゼポリペプチドをコードする組み換えヌクレオチド分子、および

(ii) エイコサジエン酸源

を含んでなる微生物宿主細胞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核酸断片が発現されて、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)の微生物宿主細胞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。

9. a) (i) 配列番号21、配列番号22、配列番号23、および配列番号24からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較すると、C l u s t a l V法のアラインメントに基づいて少なくとも80%のアミノ酸同一性を有する 5デサチュラーゼポリペプチドをコードする組み換えヌクレオチド分子、および

(ii) エイコサトリエン酸源

を含んでなる微生物宿主細胞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核酸断片が発現されて、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)の微生物宿主細胞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。

10

20

30

40

50

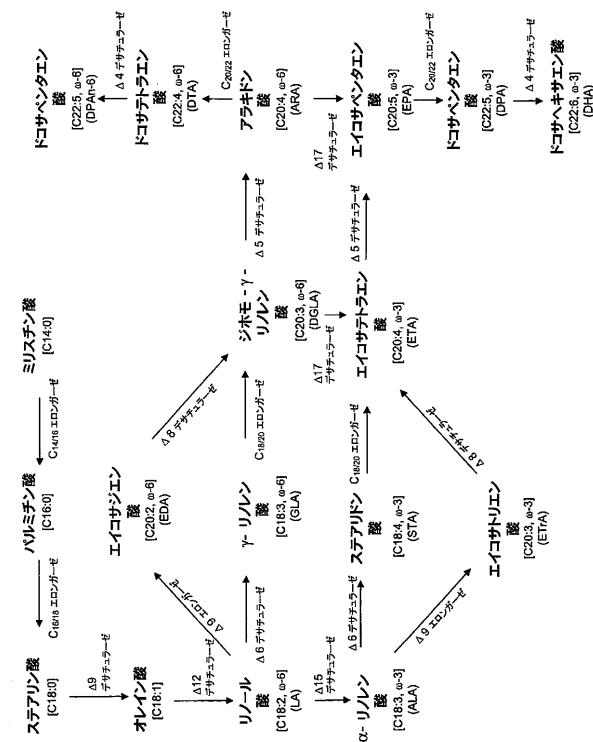
10. 微生物宿主細胞が配列番号39に記載の 8 デサチュラーゼポリペプチドをコードする組み換えヌクレオチド分子を含んでなるヤロウィア種であり、組み換えヌクレオチド分子がヤロウィア中での発現について最適化された少なくとも208個のコドンを含んでなる、上記8または9に記載の方法。

11. a.) 組み換え核酸分子が、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、および配列番号39からなる群から選択される核酸配列を有し、

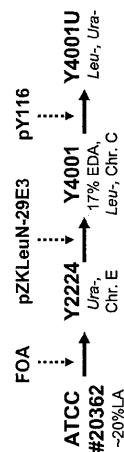
b.) 宿主細胞がヤロウィア・リポリティカである、上記8または9に記載の方法。

12. 配列番号39に記載の 8 デサチュラーゼをコードして、少なくとも208個のコドンがヤロウィア種中での発現のためにコドン最適化されている、単離された核酸分子。

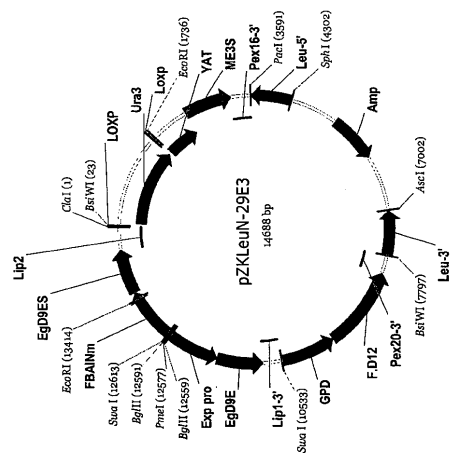
【図1】



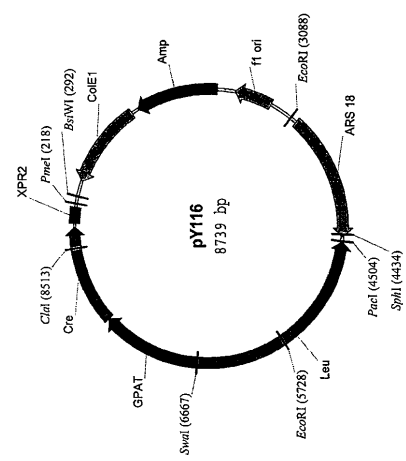
【図2A】



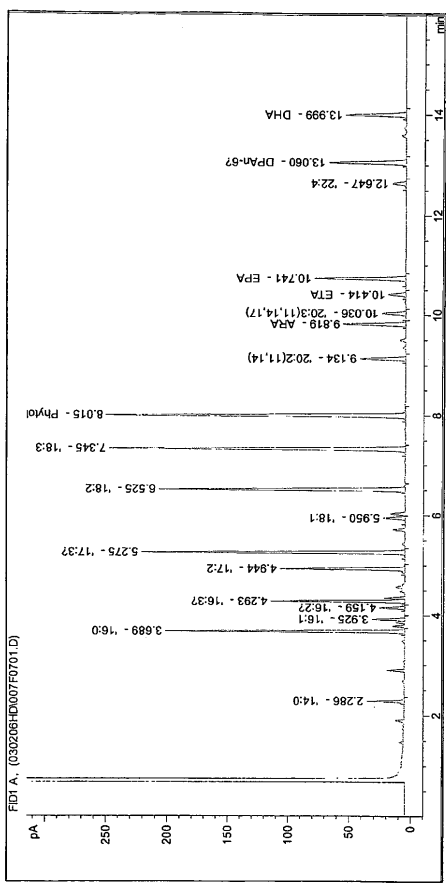
【図 2 B】



【図 2 C】



【図 3】



【図 4 A】

M...KR...ALPIT...DG...TYDVSAN...N...HPGGA...I...IENY...GRDATD...FWMHNS...コンセンサス #1	
1	M-VKRPALPLITVDGVTYDVSANLHHFGGADI IENYGRDATDVFWMHNS Ead8Dea1 (配列番号 21).pro
1	M-VKRPALPLITVDGVTYDVSANLHHFGGADI IENYGRDATDVFWMHNS Ead8Dea2 (配列番号 22).pro
1	M-VKRPALPLITVDGVTYDVSANLHHFGGADI IENYGRDATDVFWMHNS Ead8Dea3 (配列番号 23).pro
1	M-VKRPALPLITVDGVTYDVSANLHHFGGADI IENYGRDATDVFWMHNS Ead8Dea4 (配列番号 24).pro
1	MKSQKALPLITDGTITDVSANVNFHFGGAEI IENYGRDATDVFWMHNS Ead8 (配列番号 25).pro
...A...KL...RMP...PSS...L...PP...E...QEDPKLR...ELIA...GMFDA...コンセンサス #1	
50	ENAVSKLRMP...MEPSPLITPTPKPNSDEPQEDPKRLDELIAAGMFDA Ead8Dea1 (配列番号 21).pro
50	ENAVSKLRMP...MEPSPLITPTPKPNSDEPQEDPKRLDELIAAGMFDA Ead8Dea2 (配列番号 22).pro
50	ENAVSKLRMP...MEPSPLITPTPKPNSDEPQEDPKRLDELIAAGMFDA Ead8Dea3 (配列番号 23).pro
50	ENAVSKLRMP...MEPSPLITPTPKPNSDEPQEDPKRLDELIAAGMFDA Ead8Dea4 (配列番号 24).pro
51	QEAFLKLRMP...KINPSEL...PQAAVMEAGQEDPKRLDELIAAGMFDA Ead8 (配列番号 25).pro
SP...WY...YK...TLGLGLV...LM...Q...Y...LG...H...QQMGWLSHDI...コンセンサス #1	
100	SPMWYAYKTLTTLGLGLVAVLMTQHWYLVGAIVLGHFQQMGWLSHDI Ead8Dea1 (配列番号 21).pro
100	SPMWYAYKTLTTLGLGLVAVLMTQHWYLVGAIVLGHFQQMGWLSHDI Ead8Dea2 (配列番号 22).pro
100	SPMWYAYKTLTTLGLGLVAVLMTQHWYLVGAIVLGHFQQMGWLSHDI Ead8Dea3 (配列番号 23).pro
100	SPMWYAYKTLTTLGLGLVAVLMTQHWYLVGAIVLGHFQQMGWLSHDI Ead8Dea4 (配列番号 24).pro
98	SPLWYAYKTLTTLGLGLVAVLMTQHWYLVGAIVLGHFQQMGWLSHDI Ead8 (配列番号 25).pro

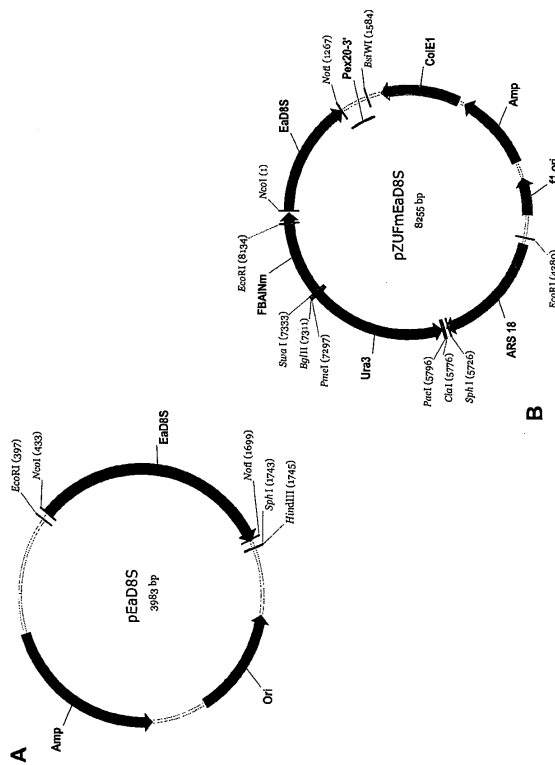
【 図 7 A 】

[illegible]

【 図 7 B 】

651	C C G T T C F C A C G G C G A T A T C A A T A C A G C A A T A C T A C T C T C T C T A	(配列番号 19)
651	C C G G T T C T C C A T E G A T C A G A T A C A C A G A T T A C T C T C T C T C	(配列番号 19)
701	T C G T G C C C T C T A G G T C A T T C T G T G T C T C A G A T C A C A C A C C	(配列番号 19)
701	T C G T G C C C T C T G G A T T C A T C T G G T C T C T C A G T C A T A C G C C	(配列番号 39)
751	A C C G C C C A G A G G A T C G C A C A C A G I A C T A C C A G A C A G A T A G A A	(配列番号 19)
751	A C C G C C C A G A G A T C A A C A A T A G A T A T A C A A G A A G A T A G A A A	(配列番号 39)
801	A G A C A G C G G G G C T G G C C C T C A G T G G G C T G A G C G T T G T A C T	(配列番号 19)
801	G G A G T C C C T C G G T G T G C A T E T C A G T G G G T C T C A G G C C T G T A C T	(配列番号 39)
851	A C T T T A T T C C C A C G T C T T G A C C G A T C A T G T G T T C T G C C C	(配列番号 19)
851	A T T T C A T C A C C C T C T T C C A G G A T C A T G T G T T C T T G C C C	(配列番号 39)
901	G A G A T G C T T G G G T T C G G A T C C C A C A G T C T G T C T A G A A C A C T A	(配列番号 19)
901	C A C G C G T G T T G G T G C T G A T T T C C A G T C C T G T C T A G A A C A C T A	(配列番号 39)
951	C C C C T G G A G A A G A T C A G A C T T G T G T G C A T G G T C A G G T C T G T G	(配列番号 19)
951	C C C T T G G A G A G A T C A G A C T T G T G T G C A T G G T C A G G T C T G T G	(配列番号 39)
1001	C C B C A G A T T C A C A A A C A T G A C G T C A C C G G G A C T C G T C A G G A C	(配列番号 19)
1001	C T G A C A G A T C A C A G A C A T G A C G T C A C C G G G A C C C T C A G G A C	(配列番号 39)
1051	F G G T T C T T C C G T G C G T T A T A C A A T A G A G C C A C A T G T G G C G A C	(配列番号 19)
1051	F G G T T C T T C G T G C G C A C C A C A G A T C A G A C C T A C C T G T G G C G A C	(配列番号 39)
1101	G C T C C C C C A C A C T C A C C G G G C C A C A T C A A G T A G A C A C T G T	(配列番号 19)
1101	T C T T C C C A A C A C A C T C A C C G G G C C A C A T C A A G T A G A C A C T G T	(配列番号 39)
1151	G C A A A G C A C A C A C C G G C C A C C C C C A C T C C C T C C A G G G G T G C	(配列番号 19)
1151	G C A A A G C A C A C A C C G G C C A C C C C C A C T C C C C A C G A G G T G C	(配列番号 39)
1201	G G A C A C T G T A C G T A C C T G G C A C C T T G C C G A T A G T G C A A G C C	(配列番号 19)
1201	G G A T C T C T C T C A C C T G G C A C C T T G C C T A A T A G T T C C A A G C C	(配列番号 39)
1251	C G A C A A G G G C	(配列番号 19)
1251	A G A C A A A G G C	(配列番号 39)

【 図 8 】



【配列表】

0005501952000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 クイン・クン・ズュー

アメリカ合衆国ペンシルベニア州 19382 . ウェストチェスター . リヴィアロード 544

審査官 小倉 梢

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2005 / 0287652 (US , A1)

Nucleic Acids Res. , 2002年 , Vol.30, No.5 , p.1247-1254

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12N 1 / 19

C12N 15 / 00 - 15 / 90

C12P 7 / 64

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

U n i P r o t / G e n e S e q

P u b M e d

T h o m s o n I n n o v a t i o n