

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2010年12月23日(23.12.2010)

(10) 国際公開番号
WO 2010/147138 A1

PCT

(51) 国際特許分類:

<i>C12N 15/00</i> (2006.01)	<i>C12N 1/19</i> (2006.01)
<i>A23D 9/02</i> (2006.01)	<i>C12N 1/21</i> (2006.01)
<i>A61K 31/7088</i> (2006.01)	<i>C12N 5/10</i> (2006.01)
<i>A61K 31/713</i> (2006.01)	<i>C12N 9/00</i> (2006.01)
<i>A61K 36/06</i> (2006.01)	<i>C12N 15/09</i> (2006.01)
<i>A61P 1/14</i> (2006.01)	<i>C12P 7/64</i> (2006.01)
<i>A61P 25/18</i> (2006.01)	<i>C12Q 1/02</i> (2006.01)
<i>A61P 35/00</i> (2006.01)	<i>C12Q 1/04</i> (2006.01)
<i>A61P 43/00</i> (2006.01)	<i>C12Q 1/68</i> (2006.01)
<i>C12N 1/15</i> (2006.01)	

(21) 国際出願番号: PCT/JP2010/060186

(22) 国際出願日: 2010年6月16日(16.06.2010)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2009-145566 2009年6月18日(18.06.2009) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): サントリーホールディングス株式会社(SUNTORY HOLDINGS LIMITED) [JP/JP]; 〒5308203 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 落合 美佐 (OCHIAI, Misa) [JP/JP]; 〒6188503 大阪府三島郡島本町若山台1-1-1 サントリー研究センター内 Osaka (JP). 清水 昌 (SHIMIZU, Sakayu) [JP/JP]; 〒6168212 京都府京都市右京区常盤山下町6番地9 Kyoto (JP). 櫻谷 英治 (SAKURADANI, Eiji) [JP/JP]; 〒6170006 京都府向日市上

植野町車返8-10 京大向日職員宿舎4-205 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 小林 浩, 外 (KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲二丁目8番7号 福岡ビル9階 阿部・井窪・片山法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: GENE ENCODING FATTY ACID ELONGASE, AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: 脂肪酸鎖長延長酵素をコードする遺伝子およびその用途

(57) Abstract: A novel fatty acid elongase is provided. Disclosed are: a fatty acid elongase involved in a fatty acid chain extension reaction; a polynucleotide encoding the fatty acid elongase; and others. Specifically disclosed are: a polynucleotide comprising the nucleotide sequence depicted in SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:4; a polynucleotide encoding a protein comprising the amino acid sequence depicted in SEQ ID NO:2; an expression vector and a transformant, each of which carries the polynucleotide; a process for producing a food or the like using the transformant; a food produced by the process; a method for evaluating or selecting a fat-producing bacterium of interest; and others.

(57) 要約: 【課題】新規な脂肪酸鎖長延長酵素を提供する。【解決手段】本発明は、脂肪酸鎖長延長反応を担う脂肪酸鎖長延長酵素、それをコードするポリヌクレオチドなどに関する。本発明は、例えば、配列番号: 1または4の塩基配列を含有するポリヌクレオチド、配列番号: 2のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド、そのポリヌクレオチドを含有する発現ベクター及び形質転換体、該形質転換体を用いる食品等の製造方法、そのような製法によって製造された食品、被検脂質生産菌の評価もしくは選択方法などを提供する。

WO 2010/147138 A1

明 細 書

発明の名称：

脂肪酸鎖長延長酵素をコードする遺伝子およびその用途

技術分野

[0001] 本発明は、脂肪酸鎖長延長酵素をコードする遺伝子およびその用途に関する。

背景技術

[0002] 脂肪酸は、リン脂質やトリアシルグリセロール等の脂質を構成する重要な成分である。

新規脂肪酸合成は、脂肪酸合成酵素（FAS）により、アセチルC○AにマロニルC○Aが縮合・還元・脱水・還元の一連の反応により脱炭酸的に結合して炭素数が2つずつ伸長していき、各種飽和脂肪酸が合成される。炭素数16または18までの飽和脂肪酸は新規脂肪酸合成で生合成することが可能である。

一方、脂肪酸の鎖長延長は、アシルCoAに、マロニルCoAが縮合・還元・脱水・還元の一連の反応により脱炭酸的に結合して炭素数が2つずつ伸長していく。この反応には脂肪酸鎖長延長酵素（ELO）が関与している。

[0003] 脂肪酸鎖長延長酵素をコードする遺伝子は、ヒト、マウス、線虫、微生物などからクローン化されている。脂肪酸鎖長延長酵素は、基質とする脂肪酸の鎖長の特異性や不飽和結合の数や位置の特異性の違いから分類され、アミノ酸配列の系統樹解析においても大きく2つのグループに分けられる。一方は高度不飽和脂肪酸（PUFA）を基質とするグループであり、もう一方は飽和脂肪酸（SFA）もしくは1価不飽和脂肪酸（MUFA）などを基質とするグループ（非特許文献1：Biochem Biophys Res Commun. 2008 Sep 19;374(2):226-30）である。

[0004] 脂質生産菌であるモルティエレラ・アルピナ（*Mortierella alpina*）については、これまでに4つの脂肪酸鎖長延長酵素遺伝子が知られている。1つめは、GLELO（GenBank AF206662）であり、3個又は4個の二重結合を含み18

個の炭素原子を有する高度不飽和脂肪酸である γ -リノレン酸 (GLA ; 18:3n-6、18:3 Δ 6, 9, 12) 及びステアリドン酸 (STA ; 18:4n-3、18:3 Δ 6, 9, 12, 15) に基質特異性があり、これらの脂肪酸を、炭素原子が2個付加された脂肪酸であるジホモ γ -リノレン酸 (DGLA ; 20:3n-6、20:3 Δ 8, 11, 14) 及びエイコサテトラエン酸 (ETA ; 20:4n-3、20:4 Δ 8, 11, 14, 17) に変換する (非特許文献2 : Parker-Barnes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 97, No. 15, p. 8254-8289 (2000) ; 特許文献1 : 特表2002-523098号)。2つめは、MAELO (GenBank AF268031) であり、超長鎖飽和脂肪酸を鎖長延長する活性を有する (特許文献1 : 特表2002-523098号 ; 特許文献2 : 特開2005-287403号)。3つめは、ELO3 (GenBank GP050836) であり、パルミチン酸 (16:0) 選択的に鎖長延長し、炭素原子が2個付加された脂肪酸であるステアリン酸 (18:0) に変換する活性がある (特許文献3 : 特表2009-512437号)。4つ目は、MALCE1 (GenBank DL184064) あり、パルミチン酸 (16:0)、パルミトレイン酸 (16:1 Δ 9)、オレイン酸 (18:1 Δ 9)、リノール酸 (18:2 Δ 9, 12)、 α -リノレン酸 (18:3 Δ 9, 12, 15) に基質特異性があり、これらの脂肪酸を、炭素原子が2個付加された脂肪酸である18:0、シス-バクセン酸 (18:1 Δ 11)、エイコセン酸 (20:1 Δ 11)、エイコサジエン酸 (20:2 Δ 11, 14)、エイコサトリエン酸 (20:3 Δ 11, 14, 17) に変換する活性を有する (特許文献4 : 特開2008-73030号)。なお、ELO3とMALCE1の同一性は98.9%である。

[0005] パルミトレイン酸に作用し、シス-バクセン酸を生成する鎖長延長酵素としては、細胞性粘菌キイロタマホコリカビ (*Dictyostelium discoideum*) 由来のEloA遺伝子が知られている (非特許文献1 : Biochem Biophys Res Commun. 2008 Sep 19;374(2):226-30)。EloA遺伝子は、酵母で発現させた結果から、16:0、16:1 Δ 9と18:1 Δ 11に作用し、18:0、18:1 Δ 11と20:1 Δ 13に変換する活性を有することが示されている。

[0006] シス-バクセン酸には、結腸癌細胞増殖抑制作用 (非特許文献3 : Cancer Letters, 1995, Vol. 91, No. 1, pp. 55-61) や酸化ストレス抑制作用 (非特

許文献4 : American Journal of Physiology、1991、Vol.260、pp.L481-488
）などが報告され、その健康機能が注目されている。また、シス-バクセン酸
には、腸内環境の改善に有用な乳酸桿菌の増殖促進作用があることも報告さ
れている（特許文献5 : 特開2006-262778号）。

先行技術文献

非特許文献

- [0007] 非特許文献1 : Biochem Biophys Res Commun. 2008 Sep 19;374(2):226-30
非特許文献2 : Parker-Barnes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol
. 97, No. 15, p. 8254-8289 (2000)
非特許文献3 : Cancer Letters、1995、Vol.91、No.1、pp .55-61
非特許文献4 : American Journal of Physiology、1991、Vol.260、pp.L481-4
88

特許文献

- [0008] 特許文献1 : 特表2002-523098号
特許文献2 : 特開2005-287403号
特許文献3 : 特表2009-512437号
特許文献4 : 特開2008-73030号
特許文献5 : 特開2006-262778号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0009] 上述のような状況下で、M. alpinaをはじめとする脂質生産菌の脂
肪酸鎖長延長反応を担う新規脂肪酸鎖長延長酵素、およびそれをコードする
遺伝子を同定することが求められている。

課題を解決するための手段

- [0010] 本発明者らは、鋭意研究の結果、脂質生産菌であるM. alpinaの脂
肪酸鎖長延長反応を担う脂肪酸鎖長延長酵素遺伝子をクローニングすること
に成功し、本発明を完成した。すなわち、本発明は、以下のポリヌクレオチ

ド、タンパク質、発現ベクター、形質転換体、該形質転換体を用いる食品等の製造方法、そのような製法によって製造された食品等、ならびに被検脂質生産菌の評価もしくは選択方法を提供する。

[0011] [1] 以下の (a) ~ (e) よりなる群より選ばれるいずれかに記載のポリヌクレオチド：

(a) 配列番号：1 または 4 の塩基配列を含有するポリヌクレオチド；

(b) 配列番号：2 のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(c) 配列番号：2 のアミノ酸配列において、1 ~ 100 個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、および／もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ脂肪酸鎖長延長酵素活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；

(d) 配列番号：2 のアミノ酸配列に対して、60%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ脂肪酸鎖長延長酵素活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；および

(e) 配列番号：1 または 4 の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズし、かつ脂肪酸鎖長延長酵素活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

[0012] [2] 以下の (f) または (g) のいずれかに記載の上記 [1] に記載のポリヌクレオチド：

(f) 配列番号：2 のアミノ酸配列において 1 ~ 10 個のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／もしくは付加したアミノ酸配列からなり、かつ脂肪酸鎖長延長酵素活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；および

(g) 配列番号：2 のアミノ酸配列に対して、90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ脂肪酸鎖長延長酵素活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

[0013] [3] 配列番号：1 または 4 の塩基配列を含有する、上記 [1] に記載のポリヌクレオチド。

〔４〕配列番号：２のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする、上記〔１〕に記載のポリヌクレオチド。

〔５〕ＤＮＡである、上記〔１〕～〔４〕のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

[0014] 〔６〕上記〔１〕～〔５〕のいずれかに記載のポリヌクレオチドにコードされるタンパク質。

〔６ａ〕配列番号：２のアミノ酸配列を含むタンパク質。

〔６ｂ〕配列番号：２のアミノ酸配列における１もしくは複数個のアミノ酸が、欠失、置換、挿入、および／もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ脂肪酸鎖長延長酵素活性を有するタンパク質。

〔６ｃ〕配列番号：２のアミノ酸配列に対して６０％以上の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ脂肪酸鎖長延長酵素活性を有するタンパク質。

[0015] 〔７〕上記〔１〕～〔５〕のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有するベクター。

〔７ａ〕以下の（ａ）～（ｃ）の構成要素を含む発現カセットを含む上記〔７〕に記載のベクター：

（ａ）宿主細胞内で転写可能なプロモーター、

（ｂ）該プロモーターに結合した、上記〔１〕～〔５〕のいずれかに記載のポリヌクレオチド、および

（ｃ）ＲＮＡ分子の転写終結およびポリアダニル化に関し、宿主細胞内で機能するシグナル。

〔７ｂ〕上記宿主細胞が、脂質生産菌（例えば、*M. alpina*）または酵母（例えば、*S. cerevisiae*）である、上記〔７ａ〕に記載のベクター。

[0016] 〔８〕上記〔１〕～〔５〕のいずれかに記載のポリヌクレオチドが導入された非ヒト形質転換体。

〔９〕上記〔７〕に記載のベクターが導入された非ヒト形質転換体。

〔９ａ〕上記〔７〕に記載のベクターを導入することによって、上記〔７〕

に記載のベクターが導入されていない宿主よりも炭素数の多い脂肪酸、特にシスーバクセン酸を多く含む脂肪酸組成物を生産できる上記〔９〕に記載の形質転換体。

〔１０〕前記形質転換体が脂質生産菌である、上記〔８〕または〔９〕に記載の形質転換体。

〔１１〕前記脂質生産菌が、モルティエレラ・アルピナ（*Mortierella alpina*）である、上記〔１０〕に記載の形質転換体。

[0017] 〔１２〕上記〔８〕～〔１１〕のいずれかに記載の形質転換体を用いる脂質または脂肪酸組成物の製造方法。

〔１３〕上記〔８〕～〔１１〕のいずれかに記載の形質転換体を用いる食品、医薬品または工業原料の製造方法。

〔１３ａ〕前記食品が、油脂を含む食品である、上記〔１３〕に記載の製造方法。

〔１４〕上記〔１３〕に記載の方法で製造された食品、医薬品または工業原料。

〔１４ａ〕前記食品が、油脂を含む食品である、上記〔１４〕に記載の食品または工業原料。

[0018] 〔１５〕配列番号：１または４の塩基配列に基づいて設計したプライマーまたはプローブを用いて、被検脂質生産菌の脂肪酸鎖長延長能について評価する方法。

〔１５ａ〕上記〔１５〕の方法によって、脂肪酸鎖長延長能が高い脂質生産菌を選別する方法。

〔１５ｂ〕上記〔１５ａ〕に記載の方法によって選別された脂質生産菌を用いて油脂を製造する方法。

〔１６〕被検脂質生産菌を培養し、配列番号：１または４の塩基配列を含有する脂肪酸鎖長延長酵素遺伝子の発現量を測定することによって、被検脂質生産菌の脂肪酸鎖長延長能を評価する方法。

〔１６ａ〕上記〔１６〕に記載の方法で、被検脂質生産菌を評価し、上記脂

脂肪酸鎖長延長酵素遺伝子の発現量が高い脂質生産菌を選別する、シスーバクセン酸の生成能が高い脂質生産菌を選別する方法。

〔16b〕上記〔16a〕に記載の方法によって選別された脂質生産菌を用いて油脂を製造する方法。

〔17〕基準脂質生産菌および被検脂質生産菌を培養して配列番号：1または4の塩基配列を含有する脂肪酸鎖長延長酵素遺伝子の各脂質生産菌における発現量を測定し、基準脂質生産菌よりも該遺伝子が高発現している被検脂質生産菌を選択する、脂質生産菌の選択方法。

発明の効果

[0019] 本発明のポリヌクレオチドは、脂質生産菌（例えば、*M. alpina*）、酵母、植物等の形質転換に利用することができ、そのようにして得られる形質転換脂質生産菌、形質転換酵母または形質転換植物等は脂肪酸組成物、食品、化粧品、医薬、石鹸等の製造に利用することができる。

[0020] より具体的には、本発明の形質転換体は、結腸癌細胞増殖抑制作用、酸化ストレス抑制作用、腸内環境の改善に有用な乳酸桿菌の増殖促進作用などを有するシスーバクセン酸の生産効率が極めて良い。したがって、本発明は、シスーバクセン酸を含有する医薬品あるいは健康食品の製造に有効に使用することができる。

図面の簡単な説明

[0021] [図1]MALCE2のゲノム配列とCDS配列のアライメントを示す図である。

[図2]MALCE2のCDS配列を示す図である。

[図3]MALCE2と機能的に近い脂肪酸鎖長延長酵素（DdELOA（ACJ09597）、IgELO（AAV67801）、MALCE1（DL184064））のアミノ酸配列のアラインメントを示す図である。二重下線部は、膜の細胞質側に位置すると考えられているELOの保存領域を示す。

発明を実施するための形態

[0022] 本発明者らは、後述の実施例において詳細に記載するように、脂質生産菌

であるM. alpina 1S-4株由来の新規脂肪酸鎖長延長酵素遺伝子(MALCE2)の全長cDNAのクローニングに初めて成功した。また、M. alpina 1S-4株由来の脂肪酸鎖長延長酵素のゲノムDNAの塩基配列、および該脂肪酸鎖長延長酵素の推定アミノ酸配列も得られた。MALCE2のORF配列、MALCE2の推定アミノ酸配列、MALCE2のCDS配列及びMALCE2のゲノム配列は、それぞれ配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3および配列番号：4である。これらのポリヌクレオチド及び酵素は、後述の実施例に記載した手法、公知の遺伝子工学的手法、公知の合成手法などによって取得することが可能である。

[0023] 1. 本発明のポリヌクレオチド

まず、本発明は、以下の(a)～(e)よりなる群より選ばれるいずれかに記載のポリヌクレオチドを提供する。

- (a) 配列番号：1または4の塩基配列を含有するポリヌクレオチド；
- (b) 配列番号：2のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド；
- (c) 配列番号：2のアミノ酸配列において、1～複数個（例えば、100個）のアミノ酸が欠失、置換、挿入、および／もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ脂肪酸鎖長延長酵素活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；
- (d) 配列番号：2のアミノ酸配列に対して、60%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ脂肪酸鎖長延長酵素活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；および
- (e) 配列番号：1または4の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ脂肪酸鎖長延長酵素活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

[0024] 本明細書中、「ポリヌクレオチド」とは、DNAまたはRNAを意味する。

本明細書中、「ストリンジントな条件下でハイブリダイズするポリヌク

レオチド」とは、例えば、配列番号：1または4の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチド、又は配列番号：2のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドの全部または一部をプローブとして、コロニーハイブリダイゼーション法、プラークハイブリダイゼーション法またはサザンハイブリダイゼーション法などを用いることにより得られるポリヌクレオチドをいう。ハイブリダイゼーションの方法としては、例えば“Sambrook & Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual Vol. 3, Cold Spring Harbor, Laboratory Press 2001”、“Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons 1987-1997”などに記載されている方法を利用することができる。

[0025] 本明細書中、「ストリンジेंटな条件」とは、低ストリンジेंटな条件、中ストリンジेंटな条件及び高ストリンジेंटな条件のいずれでもよい。「低ストリンジेंटな条件」は、例えば、5×SSC、5×デンハルト溶液、0.5% SDS、50%ホルムアミド、32℃の条件である。また、「中ストリンジेंटな条件」は、例えば、5×SSC、5×デンハルト溶液、0.5% SDS、50%ホルムアミド、42℃の条件である。「高ストリンジेंटな条件」は、例えば、5×SSC、5×デンハルト溶液、0.5% SDS、50%ホルムアミド、50℃の条件である。これらの条件において、温度を上げるほど高い同一性を有するDNAが効率的に得られることが期待できる。ただし、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーに影響する要素としては温度、プローブ濃度、プローブの長さ、イオン強度、時間、塩濃度など複数の要素が考えられ、当業者であればこれら要素を適宜選択することで同様のストリンジエンシーを実現することが可能である。

[0026] なお、ハイブリダイゼーションに市販のキットを用いる場合は、例えばAlkphos Direct Labelling Reagents (ア

マシャムファルマシア社製）を用いることができる。この場合は、キットに添付のプロトコルにしたがい、標識したプローブとのインキュベーションを一晩行った後、メンブレンを55℃の条件下で0.1% (w/v) SDSを含む1次洗浄バッファーで洗浄後、ハイブリダイズしたDNAを検出することができる。

[0027] 上記以外にハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドとしては、FASTA、BLASTなどの相同性検索ソフトウェアにより、デフォルトのパラメータを用いて計算したときに、配列番号：1または4のDNA、または配列番号：2のアミノ酸配列をコードするDNAと約60%以上、約70%以上、71%以上、72%以上、73%以上、74%以上、75%以上、76%以上、77%以上、78%以上、79%以上、80%以上、81%以上、82%以上、83%以上、84%以上、85%以上、86%以上、87%以上、88%以上、89%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、99.1%以上、99.2%以上、99.3%以上、99.4%以上、99.5%以上、99.6%以上、99.7%以上、99.8%以上、または99.9%以上の同一性を有するDNAをあげることができる。

[0028] なお、アミノ酸配列や塩基配列の同一性は、カーリンおよびアルチュールによるアルゴリズムBLAST (proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, 1990; proc Natl Acad Sci USA 90:5873, 1993) を用いて決定できる。BLASTのアルゴリズムに基づいたBLASTNやBLASTXと呼ばれるプログラムが開発されている (Altschul SF, et al: J Mol Biol 215:403, 1990)。BLASTNを用いて塩基配列を解析する場合は、パラメータは、例えばscore=100、wordlength=12とする。また、BLASTXを用いてアミノ酸配列を解析する場合は、パラメータは、例えばscore=50、wordlength=3とする。BLASTとGapp

e d B L A S T プログラムを用いる場合は、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。

[0029] 上記した本発明のポリヌクレオチドは、公知の遺伝子工学的手法または公知の合成手法によって取得することが可能である。

[0030] 2. 本発明のタンパク質

本発明は、次に示すタンパク質を提供する。

〔6〕 上記ポリヌクレオチドにコードされるタンパク質。

〔6 a〕 配列番号：2 のアミノ酸配列を含むタンパク質。

〔6 b〕 配列番号：2 のアミノ酸配列における1もしくは複数個のアミノ酸が、欠失、置換、挿入、および／もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ脂肪酸鎖長延長酵素活性を有するタンパク質。

〔6 c〕 配列番号：2 のアミノ酸配列に対して60%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ脂肪酸鎖長延長酵素活性を有するタンパク質。

[0031] 上記（6 b）または（6 c）に記載のタンパク質は、代表的には、天然に存在する配列番号：2 のタンパク質の変異体であるが、例えば、“Sambrook & Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual Vol. 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001”、“Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons 1987-1997”、“Nuc. Acids. Res., 10, 6487 (1982)”、“Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982)”、“Gene, 34, 315 (1985)”、“Nuc. Acids. Res., 13, 4431 (1985)”、“Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)”等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、人為的に取得することができるものも含まれる。

[0032] 本明細書中、「配列番号：2のアミノ酸配列における1もしくは複数個のアミノ酸が、欠失、置換、挿入および／もしくは付加されたアミノ酸配列からなる、脂肪酸鎖長延長酵素活性を有するタンパク質」としては、配列番号：2のアミノ酸配列において、例えば、1～100個、1～90個、1～80個、1～70個、1～60個、1～50個、1～40個、1～39個、1～38個、1～37個、1～36個、1～35個、1～34個、1～33個、1～32個、1～31個、1～30個、1～29個、1～28個、1～27個、1～26個、1～25個、1～24個、1～23個、1～22個、1～21個、1～20個、1～19個、1～18個、1～17個、1～16個、1～15個、1～14個、1～13個、1～12個、1～11個、1～10個、1～9個（1～数個）、1～8個、1～7個、1～6個、1～5個、1～4個、1～3個、1～2個、または1個のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ脂肪酸鎖長延長酵素活性を有するタンパク質が挙げられる。上記アミノ酸残基の欠失、置換、挿入および／もしくは付加の数は、一般的には小さい程好ましい。

[0033] また、このようなタンパク質としては、配列番号：2のアミノ酸配列と約60%以上、約70%以上、71%以上、72%以上、73%以上、74%以上、75%以上、76%以上、77%以上、78%以上、79%以上、80%以上、81%以上、82%以上、83%以上、84%以上、85%以上、86%以上、87%以上、88%以上、89%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上、99.1%以上、99.2%以上、99.3%以上、99.4%以上、99.5%以上、99.6%以上、99.7%以上、99.8%以上、または99.9%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ脂肪酸鎖長延長酵素活性を有するタンパク質が挙げられる。上記同一性の数値は一般的に大きい程好ましい。

なお、脂肪酸鎖長延長酵素活性は、例えば、当該酵素をコードするポリヌクレオチドを発現させることができるベクターを導入した形質転換体と、発

現させることができないベクター（例えば当該酵素遺伝子を含まない空ベクター）を導入した形質転換体の脂肪酸組成を比較し、前者が、炭素数の多い脂肪酸を多く含む場合には、脂肪酸鎖長延長活性があるといえることができる。例えば、前者のパルミトレイン酸の比率が減少し（例えば、10%以上の減少、好ましくは20%以上の減少）、シスーバクセン酸の比率が上昇している場合（例えば、10%以上の増加、好ましくは20%以上の増加）には、当該酵素にパルミトレイン酸に対する脂肪酸鎖長延長活性があるといえることができる。

[0034] 本発明のタンパク質のアミノ酸配列において1以上のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入および／または付加されたとは、同一配列中の任意かつ1もしくは複数のアミノ酸配列中の位置において、1または複数のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入及び／又は付加があることを意味し、欠失、置換、挿入及び付加のうち2種以上が同時に生じてよい。

以下に、相互に置換可能なアミノ酸残基の例を示す。同一群に含まれるアミノ酸残基は相互に置換可能である。A群：ロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、バリン、ノルバリン、アラニン、2-アミノブタン酸、メチオニン、*o*-メチルセリン、*t*-ブチルグリシン、*t*-ブチルアラニン、シクロヘキシルアラニン；B群：アスパラギン酸、グルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸；C群：アスパラギン、グルタミン；D群：リジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸；E群：プロリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン；F群：セリン、スレオニン、ホモセリン；G群：フェニルアラニン、チロシン。

[0035] また、本発明のタンパク質は、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（*t*-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によっても製造することができる。また、アドバンスドケムテック社製、パーキンエルマー社製、ファルマシア社製、プロテインテクノロジーインストゥルメント社製、シンセセルーベガ社製、パーセプティブ社製、島津製作

所等のペプチド合成機を利用して化学合成することもできる。

[0036] 3. 本発明のベクター及びこれを導入した形質転換体

本発明はまた、別の実施形態において、本発明のポリヌクレオチドを含有する発現ベクターを提供する。

本発明のベクターは、通常、(i) 宿主細胞内で転写可能なプロモーター；(ii) 該プロモーターに結合した、上記(a)～(g)のいずれかに記載のポリヌクレオチド；及び(iii) RNA分子の転写終結およびポリアダニル化に関し、宿主細胞内で機能するシグナルを構成要素として含む発現カセットを含むように構成される。このように構築されるベクターは、宿主細胞に導入される。本発明において使用される適切な宿主細胞の例としては、脂質生産菌、酵母等が挙げられる。

[0037] 脂質生産菌としては、例えば、MYCOTAXON, Vol. XLIV, No. 2, pp. 257-265 (1992)に記載されている菌株を使用することができ、具体的には、モルティエレラ (*Mortierella*) 属に属する微生物、例えば、モルティエレラ・エロンガタ (*Mortierella elongata*) IFO8570、モルティエレラ・エキシグア (*Mortierella exigua*) IFO8571、モルティエレラ・ヒグロフィラ (*Mortierella hygrophila*) IFO5941、モルティエレラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) IFO8568、ATCC16266、ATCC32221、ATCC42430、CBS 219.35、CBS224.37、CBS250.53、CBS343.66、CBS527.72、CBS528.72、CBS529.72、CBS608.70、CBS754.68等のモルティエレラ亜属 (subgenus *Mortierella*) に属する微生物、またはモルティエレラ・イザベリナ (*Mortierella isabellina*) CBS194.28、IFO6336、IFO7824、IFO7873、IFO7874、IFO8286、IFO8308、IFO7884、モルティエレラ・ナナ (*Mortierella nan*

a) IFO8190、モルティエレラ・ラマニアナ (*Mortierella ramanniana*) IFO5426、IFO8186、CBS112.08、CBS212.72、IFO7825、IFO8184、IFO8185、IFO8287、モルティエレラ・ヴィナセア (*Mortierella vinacea*) CBS236.82等のマイクロムコール亜属 (subgenus *Micromucor*) に属する微生物等を挙げることができる。とりわけ、モルティエレラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) が好ましい。

[0038] また、酵母の例としては、サッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) NBRC1951、NBRC1952、NBRC1953、NBRC1954等が挙げられる。本発明のベクターで形質転換されたこれらの宿主細胞は、本発明のベクターで形質転換されていない宿主細胞に比べて、炭素数の多い脂肪酸を多く含む脂肪酸組成物を産生することができ、特に、シス-バクセン酸を多く含む脂肪酸組成物を高効率で産生することができる。

脂質生産菌に導入する際に用いるベクターとしては、例えば、pDura5 (Appl. Microbiol. Biotechnol., 65, 419-425, (2004)) が利用可能であるが、これに限定されない。

[0039] 酵母に導入する際に用いるベクターとしては、多コピー型 (YEp型)、単コピー型 (YCp型)、染色体組み込み型 (YIp型) のいずれもが利用可能である。例えば、YEp型ベクターとしてはYEp24 (J. R. Broach et al., Experimental Manipulation of Gene Expression, Academic Press, New York, 83, 1983)、YCp型ベクターとしてはYCp50 (M. D. Rose et al., gene, 60, 237, 1987)、YIp型ベクターとしてはYIp5 (K. Struhl et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USP, 76, 1035, 1979) が知られて

おり、容易に入手することができる。

[0040] 宿主細胞中での遺伝子発現を調節するためのプロモーター／ターミネーターとしては、宿主細胞中で機能する限り、任意の組み合わせでよい。例えば、脂質生産菌で利用する場合は *histonH4*、1 遺伝子のプロモーター、グリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子のプロモーターなどを利用可能である。

形質転換の際に用いる選択マーカーとしては、栄養要求性マーカー (*ura5*、*niaD*)、薬剤耐性マーカー (*hygromycine*、ゼオシン)、ジェネチシン耐性遺伝子 (*G418r*)、銅耐性遺伝子 (*CUP1*) (Marin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 337 1984)、セルレニン耐性遺伝子 (*fas2m*, *PDR4*) (それぞれ猪腰淳嗣ら, 生化学, 64, 660, 1992; Hussain et al., gene, 101, 149, 1991) などが利用可能である。

[0041] 宿主細胞の形質転換方法としては一般に用いられる公知の方法が利用できる。例えば、脂質生産菌の場合、エレクトロポレーション法 (Mackenzie D. A. et al. Appl. Environ. Microbiol., 66, 4655-4661, 2000) やパーティクルデリバリー法 (特開 2005-287403 「脂質生産菌の育種方法」に記載の方法) が利用できる。また、酵母の場合は、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 p1929 (1978))、酢酸リチウム法 (J. Bacteriology, 153, p163 (1983))、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 p1929 (1978)、Methods in yeast genetics, 2000 Edition: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual などに記載の方法で実施可能であるが、これらに限定されない。

[0042] より具体的には、脂質生産菌の場合、宿主を Czapek-Dox 培地に植菌し、28

℃にて2週間培養し、胞子を形成させる。つづいて胞子を回収し、パーティクルデリバリー法（特開2005-287403「脂質生産菌の育種方法」に記載の方法）などにより遺伝子を導入する。その後、選択マーカーとして用いる抗生物質等を含む標準寒天培地上あるいは、栄養要求性マーカーを用いる場合は、マーカーとして用いる栄養素を欠いた寒天培地上に植えつけ、形質転換体を取得する。また、酵母の場合は、宿主を標準栄養培地（例えば、YEPD培地“Genetic Engineering. Vol. 1, Plenum Press, New York, 117 (1979)”等）で、OD600nmの値が1~6となるように培養する。この培養細胞を遠心分離して集め、洗浄し、濃度約0.1~0.2Mのアルカリ金属イオン、好ましくはリチウムイオンで前処理する。この細胞を約30℃で、約60分間静置した後、導入するDNA（約1~20 μ g）とともに約30℃で、約60分間静置する。ポリエチレングリコール、好ましくは約4,000ダルトンのポリエチレングリコールを、最終濃度が約20%~50%となるように加える。約30℃で、約30分間静置した後、この細胞を約42℃で約5分間加熱処理する。好ましくは、この細胞懸濁液を標準栄養培地で洗浄し、所定量の新鮮な標準栄養培地に入れて、約30℃で約60分間静置する。その後、選択マーカーとして用いる抗生物質等を含む標準寒天培地上あるいは、栄養要求性マーカーを用いる場合は、マーカーとして用いる栄養素を欠いた寒天培地上に植えつけ、形質転換体を取得する。その他、一般的なクローニング技術に関しては、“Sambrook & Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual Vol. 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001”、“Methods in Yeast Genetics, A laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)”等を参照することができる。

[0043] 4. 本発明の脂質または脂肪酸組成物の製造方法

本発明はまた、別の実施形態において、上記の形質転換脂質生産菌または酵母を用いる脂質または脂肪酸組成物の製造方法を提供する。

本明細書中、「脂質」とは、脂肪酸とアルコールとがエステル結合した化合物（例えば、グリセリド）またはその類似体（例えば、コレステロールエステル）などを含む単純脂質、単純脂質の一部にさらにリン酸、アミノ酸、糖などが結合した複合脂質、および脂質の加水分解物で水に溶けない誘導脂質をいうものとする。

本明細書中、「油脂」とは、グリセロールと脂肪酸のエステル（グリセリド）のことをいう。

本明細書中、「脂肪酸」とは、一般式 RCOOH （Rはアルキル基）で表される脂肪族モノカルボン酸（カルボキシル基を一個有し、炭素原子が鎖状に連結したカルボン酸）のことをいう。脂肪酸には、炭化水素鎖中に二重結合を有さない飽和脂肪酸と、二重結合を含む不飽和脂肪酸とが含まれる。

[0044] 本発明の脂質または脂肪酸組成物は、本発明に従って形質転換した菌体から以下のようにして抽出することができる。生物（例えば、脂質生産菌または酵母）の形質転換株について、培養終了後、遠心分離法、ろ過等の常法に従って培養菌体を得る。菌体を十分水洗し、好ましくは乾燥する。乾燥は、凍結乾燥、風乾等によって行うことができる。乾燥菌体を、必要に応じて、ダイノミルや超音波などにより破碎した後、好ましくは窒素気流下で有機溶媒によって抽出処理する。有機溶媒としてはエーテル、ヘキサン、メタノール、エタノール、クロロホルム、ジクロロメタン、石油エーテル等を用いることができ、またはメタノールおよび石油エーテルの交互抽出またはクロロホルム-メタノール-水の一層系の溶媒を用いた抽出によっても良好な結果を得ることができる。抽出物から減圧下で有機溶媒を留去することにより、脂肪酸を含有する脂質を得ることができる。

[0045] さらに、上記脂肪酸を含有する脂質からの脂肪酸の分離は、混合脂肪酸または混合脂肪酸エステルの状態で、常法（例えば、尿素付加法、冷却分離法

、カラムクロマトグラフィー法など）により濃縮分離することにより行うことができる。

本発明の脂質または脂肪酸組成物の製造方法によれば、例えば、酵母を宿主として用いた場合、炭素数の多い脂肪酸、特にシス - バクセン酸の含有比率の高い脂質または脂肪酸組成物が得られるため、このような脂肪酸組成物を大量におよび／または効率よく生産することが必要な場合に、特に有用である。

このようにして得られた脂質または脂肪酸組成物は、常法に従って、例えば、油脂を含む食品、医薬品、工業原料（化粧品、石鹼等の原料）の製造などの用途に使用することができる。

より具体的には、本発明の形質転換体は、結腸癌細胞増殖抑制作用、酸化ストレス抑制作用、腸内環境の改善に有用な乳酸桿菌の増殖促進作用などを有するシス-バクセン酸の生産効率が極めて良い。したがって、本発明は、シス-バクセン酸を含有する医薬品（例えば、抗癌剤、酸化ストレス抑制剤など）あるいは健康食品（乳酸桿菌の増殖促進作用を有する食品など）の製造に有効に使用することができる。

[0046] 本発明はまた、別の実施形態において、本発明の形質転換脂質生産菌または形質転換酵母を用いる食品、化粧品、医薬、石鹼等の製造方法を提供する。この方法は、本発明の形質転換脂質生産菌または形質転換酵母を用いて脂質または脂肪酸を生成する工程を包含する。生成された脂質または脂肪酸を含有する食品、化粧品、医薬、石鹼等の調製は、常法による。このように、本発明の製造方法によって製造された食品、化粧品、医薬、石鹼等は、本発明の形質転換脂質生産菌または形質転換酵母を用いて生成された脂質または脂肪酸を含有する。本発明はさらに、そのような方法によって製造された食品、化粧品、医薬、石鹼等を提供する。

[0047] 本発明の化粧品（組成物）または医薬（組成物）の剤型は、特に限定されず、溶液状、ペースト状、ゲル状、固体状、粉末状等任意の剤型をとることができる。また、本発明の化粧品組成物または医薬組成物は、オイル、ロー

ション、クリーム、乳液、ゲル、シャンプー、ヘアリンス、ヘアコンディショナー、エナメル、ファンデーション、リップスティック、おしろい、パック、軟膏、香水、パウダー、オーデコロン、歯磨、石鹸、エアロゾル、クレンジングフォーム等の化粧品もしくは皮膚外用薬の他、皮膚老化防止改善剤、皮膚炎症防止改善剤、浴用剤、養毛剤、皮膚美容液、日焼け防止剤あるいは、外傷、あかぎれ、ひびわれ等による肌荒れの防止改善剤等に用いることができる。

[0048] 本発明の化粧品組成物は、必要に応じてさらに、その他の油脂、および／または色素、香料、防腐剤、界面活性剤、顔料、酸化防止剤等を適宜配合することができる。これらの配合比率は、目的に応じて当業者が適宜決定し得る（例えば、油脂は、組成物中に、1～99.99重量%、好ましくは、5～99.99重量%、より好ましくは、10～99.95重量%含有され得る）。また、本発明の医薬組成物は、必要に応じてさらに、その他の医薬活性成分（例えば、消炎成分）または補助成分（例えば、潤滑成分、担体成分）を含んでいても良い。例えば、化粧品あるいは皮膚外用薬におけるその他の常用成分としては、にきび用薬剤、ふけ・かゆみ防止剤、制汗防臭剤、熱傷用薬剤、抗ダニ・シラミ剤、角質軟化剤、乾皮症用薬剤、抗ウイルス剤、経皮吸収促進剤等が挙げられる。

[0049] 本発明の食品の例としては、栄養補助食品、健康食品、機能性食品、幼児用食品、乳児用調製乳、未熟児用調製乳、老人用食品などが挙げられる。本明細書中、食品は、固体、流動体、および液体、ならびにそれらの混合物であって、摂食可能なものの総称である。

栄養補助食品とは、特定の栄養成分が強化されている食品をいう。健康食品とは、健康的なまたは健康によいとされる食品をいい、栄養補助食品、自然食品、ダイエット食品などを含む。機能性食品とは、体の調節機能を果たす栄養成分を補給するための食品をいい、特定保健用途食品と同義である。幼児用食品とは、約6歳までの子供に与えるための食品をいう。老人用食品とは、無処理の食品と比較して消化および吸収が容易であるように処理され

た食品をいう。乳児用調製乳とは、約1歳までの子供に与えるための調製乳をいう。未熟児用調製乳とは、未熟児が生後約6ヶ月になるまで与えるための調製乳をいう。

[0050] これらの食品の形態の例としては、肉、魚、ナッツなどの天然食品（油脂で処理したもの）、中華料理、ラーメン、スープなどの調理時に油脂を加える食品、天ぷら、フライ、油揚げ、チャーハン、ドーナッツ、かりん糖などの熱媒体として油脂を用いた食品、バター、マーガリン、マヨネーズ、ドレッシング、チョコレート、即席ラーメン、キャラメル、ビスケット、クッキー、ケーキ、アイスクリームなどの油脂食品または加工時に油脂を加えた加工食品、おかき、ハードビスケット、あんパンなどの加工仕上げ時に油脂を噴霧または塗布した食品などを挙げることができる。しかしながら、油脂を含む食品に限定されるわけではなく、例えば、パン、麺類、ごはん、菓子類（キャンデー、チューインガム、グミ、錠菓、和菓子）、豆腐およびその加工品などの農産食品、清酒、薬用酒、みりん、食酢、醤油、みそなどの発酵食品、ヨーグルト、ハム、ベーコン、ソーセージなどの畜産食品、かまぼこ、揚げ天、はんぺんなどの水産食品、果汁飲料、清涼飲料、スポーツ飲料、アルコール飲料、茶などであってもよい。

[0051] 本発明の食品はまた、カプセルなどの医薬製剤の形態、またはタンパク質、糖類、脂肪、微量元素、ビタミン類、乳化剤、香料などに本発明の油脂が配合された自然流動食、半消化態栄養食、および成分栄養食、ドリンク剤、経腸栄養剤などの加工形態であってもよい。

[0052] 5. 本発明の被験脂質生産菌の脂肪酸産生能の評価方法および脂質生産菌の選択方法

本発明はまた、別の実施形態において、（i）配列番号：1または4の塩基配列を有する脂肪酸鎖長延長酵素遺伝子の塩基配列に基づいて設計したプライマーまたはプローブを用いて、被検脂質生産菌の脂肪酸鎖長延長能について評価する方法、（ii）被検脂質生産菌を培養し、配列番号：1または4の塩基配列を有する脂肪酸鎖長延長酵素遺伝子の発現量を測定することに

よって、被検脂質生産菌の脂肪酸鎖長延長能を評価する方法、および (i i) 基準脂質生産菌および被検脂質生産菌を培養して配列番号：1または4の塩基配列を有する脂肪酸鎖長延長酵素遺伝子の各脂質生産菌における発現量を測定し、基準脂質生産菌よりも該遺伝子が高発現している被検脂質生産菌を選択する、脂質生産菌の選択方法を提供する。

[0053] このような評価方法の一般的手法は公知であり、例えば、WO 01/040514号公報、特開平8-205900号公報などに記載されている。以下、この評価方法について簡単に説明する。

まず、被検脂質生産菌のゲノムを調製する。調製方法は、DNeasy plant kit (QIAGEN社) などの市販のキットを用いるなど、公知の如何なる方法を用いることができる。得られたゲノムを対象にして、配列番号：1または4の脂肪酸鎖長延長酵素遺伝子の塩基配列に基づいて設計したプライマーまたはプローブを用いて、被検脂質生産菌のゲノムにその遺伝子あるいはその遺伝子に特異的な配列が存在するか否かを調べる。プライマーまたはプローブの設計は公知の手法を用いて行うことができる。

遺伝子または特異的な配列の検出は、公知の手法を用いて実施することができる。例えば、特異的配列の一部または全部を含むポリヌクレオチドまたはその塩基配列に対して相補的な塩基配列を含むポリヌクレオチドを一つのプライマーとして用い、もう一方のプライマーとしてこの配列よりも上流あるいは下流の配列の一部または全部を含むポリヌクレオチドまたはその塩基配列に対して相補的な塩基配列を含むポリヌクレオチドを用いて、PCR法によって脂質生産菌の核酸を増幅し、増幅物の有無、増幅物の分子量の大きさなどを測定する。プライマーに使用するポリヌクレオチドの塩基数は、通常、10bp以上であり、15～25bpであることが好ましい。また、挟み込む部分の塩基数は、通常、300～2000bpが適当である。

[0054] PCR法の反応条件は、特に限定されないが、例えば、変性温度：90～98℃、アニーリング温度：40～60℃、伸長温度：60～75℃、サイクル数：10回以上などの条件を用いることができる。得られる反応生成物

はアガロースゲルなどを用いた電気泳動法等によって分離され、増幅産物の分子量を測定することができる。この方法により、増幅産物の分子量が特異部分のDNA分子を含む大きさかどうかによって、その脂質生産菌の脂肪酸鎖長延長能について予測・評価する。また、増幅物の塩基配列を分析することによって、さらに上記性能についてより正確に予測・評価することが可能である。

また、本発明においては、被検脂質生産菌を培養し、配列番号：1または4の塩基配列を有する脂肪酸鎖長延長酵素遺伝子の発現量を測定することによって、被検脂質生産菌の脂肪酸鎖長延長能を評価することもできる。この場合は、被検脂質生産菌を培養し、配列番号：1または4の塩基配列を有する脂肪酸鎖長延長酵素遺伝子の産物であるmRNAまたはタンパク質を定量することによって可能である。mRNAまたはタンパク質の定量は、公知の手法を用いて行うことができる。例えば、mRNAの定量は例えばノーザンハイブリダイゼーションや定量的RT-PCRによって、タンパク質の定量は例えばウエスタンブロッティングによって行うことができる（Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons 1994-2003）。

[0055] さらに、被検脂質生産菌を培養して、配列番号：1または4の塩基配列を有する脂肪酸鎖長延長酵素遺伝子の発現量を測定し、目的とする脂肪酸鎖長延長能に応じた前記遺伝子発現量の被検脂質生産菌を選択することによって、好適な脂質生産菌を選択することができる。また、基準脂質生産菌および被検脂質生産菌を培養し、各脂質生産菌における前記遺伝子発現量を測定し、基準脂質生産菌と被検脂質生産菌の前記遺伝子発現量を比較して、所望の被検脂質生産菌を選択してもよい。具体的には、例えば、基準脂質生産菌および被検脂質生産菌を培養して配列番号：1または4の塩基配列を有する脂肪酸鎖長延長酵素遺伝子の各脂質生産菌における発現量を測定し、基準脂質生産菌よりも該遺伝子が高発現している被検脂質生産菌を選択することによって好適な脂質生産菌を選択することができる。

[0056] あるいは、被検脂質生産菌を培養して、脂肪酸鎖長延長能の高いまたは低い、あるいは脂肪酸鎖長延長酵素活性の高いまたは低い脂質生産菌を選択することによって、所望の被検脂質生産菌を選択することができる。これらの場合、被検脂質生産菌または基準脂質生産菌としては、例えば、上述した本発明のベクターを導入した脂質生産菌、上述した本発明のポリヌクレオチド（DNA）の発現が抑制された脂質生産菌、突然変異処理が施された脂質生産菌、自然変異した脂質生産菌などが使用され得る。脂肪酸鎖長延長能は、菌体内の脂肪酸組成を比較することにより測定することができる。

[0057] このように、本発明により、脂質生産菌（例えば、*M. alpina*）の脂肪酸鎖長延長能を評価し、所望の脂質生産菌（例えば、脂肪酸鎖長延長能の高い脂質生産菌

すなわち、より炭素数の多い脂肪酸を生産できる脂質生産菌）を選択することができるため、効率よく所望の組成の油脂を製造することができる。

さらに、当該遺伝子の発現量を指標にして、脂肪酸生産を効率よく行うための培養条件の検討、培養管理、などにも利用できる。

実施例

[0058] 以下、実施例を用いて本発明をより具体的に説明するが、本発明の範囲は、これらの実施例によって限定されない。

[0059] モルティエレラ・アルピナのゲノム解析

M. alpina 1S-4株を100mlのGY2:1培地（2%グルコース、1%酵母エキス、pH6.0）に植菌し、28℃で2日間振とう培養した。濾過により菌体を集菌し、DNeasy (QIAGEN) を用いてゲノムDNAを調製した。

上記ゲノムDNAの塩基配列を、Roche 454 GS FLX Standard を用いて決定した。その際、フラグメントライブラリーの塩基配列決定を2ラン分、メイトペアライブラリーの塩基配列決定を3ラン分を行った。得られた塩基配列をアセンブリすることにより、300個のスーパーコンティグ（Super Contig）が得られた。

[0060] cDNAライブラリーの作製

M. alpina 1S-4株を100mlの培地（1.8%グルコース、1%酵母エキス、pH6.0）に植菌し、4日間28℃で振とう培養した。菌体を回収し、塩酸グアニン/CsCl法でtotal RNAを調製した。Oligotex-dT30<Super>mRNA Purification Kit（タカラバイオ）を用いて、total RNAからpoly(A)⁺RNAの精製を行った。これを用いて、ZAP-cDNA GigapackIII Gold Cloning Kit (STRATAGENE)により、cDNA ライブラリーを作製した。

[0061] 新規脂肪酸鎖長延長酵素のクローニング

M. alpina 1S-4株のゲノム情報に対して、既知の脂肪酸鎖長延長酵素（ELO）遺伝子との相同性検索を行い、新たなELOホモログと考えられる配列（配列番号：4）を含む配列番号：5を見出した。配列番号：5の塩基配列をもとに、目的遺伝子の開始コドンの直前の配列と終始コドンの直後の配列から以下のプライマーを作成した。

MALCE2-1 5' - ctocgattcaagtcctgtcatttcaacc-3' （配列番号：6）

MALCE2-2 5' - ccattgagggtgattcttttatgcgaac-3' （配列番号：7）

これらのプライマーを用いて、*M. alpina* 1S-4株のcDNAライブラリーより、PCR法を用いて当該遺伝子のcDNAの増幅を試みた。DNA PolymeraseはPrime STAR™ (TaKaRa)を用い、反応は、（98℃を10秒間、55℃を15秒間、72℃を2分間）を30サイクルという温度条件で行った。

[0062] 得られたPCR産物を、pUC118ベクターの制限酵素HincIIサイトに挿入し、プラスミドpUC-MALCE2を得た。

このプラスミドpUC-MALCE2挿入断片の塩基配列を解析したところ、MALCE2のCDSの塩基配列である配列番号：3の配列が得られた。MALCE2のゲノム配列（配列番号：4）とMALCE2のCDS配列（配列番号：3）を比較した（図1）。MALCE2遺伝子には3つのイントロンがあり、エキソンは配列番号：4の1-428、579-649、757-936、および1050-1318の位置にあると考えられた。

[0063] 配列解析

MALCE2のCDSの塩基配列（配列番号：3）から導かれるアミノ酸配列を、図2に示す。

*M. alpina*由来のEL0遺伝子としてすでに報告されているものに、MALCE1、MAELO、およびGLELOがある。これらとMALCE2のアミノ酸配列の同一性を比較したところ、それぞれ51.1%、21.1%、および21.7%の同一性であった。MALCE1は、Genebankに登録されているアミノ酸配列の中でMALCE2と最も同一性が高かったものの、それでもその同一性は51.1%と低いものであった。他に、*Rhizopus oryzae*由来のEL0ホモログ（CAX48926）（同一性45.1%）や、*Isochrysis galbana*由来の $\Delta 9$ -PUFA特異的な脂肪酸鎖長延長酵素（CAD58540）（同一性24.1%）なども相同検索によって見つかった。また、あとで述べるように、MALCE2と同様にパルミトレイン酸に作用して18:1 Δ 11を生成することが知られている*D. discoideum*由来のEloAとは20.3%の同一性であった。MALCE2と既知の鎖長延長酵素とのアミノ酸配列のアラインメントを図3に示す。二重下線で示したEL0の保存領域は、本発明のMALCE2でも保存されていた。

[0064] 酵母発現用ベクターの構築

MALCE2のCDSを酵母発現用ベクターpYE22m(Biosci. Biotech. Biochem., 59, 1221-1228, 1995)に挿入するために、開始コドンの上流にEcoRIサイトを、終止コドンの下流にXhoIサイトをもつプライマーを作成した。下線部が各制限酵素サイトである。

MALCE2-3 5' -ggaattcatggagtcattcagatcttg-3' （配列番号：8）

MALCE2-4 5' -gctcgagcttactcttcttcttggc-3' （配列番号：9）

上述のとおり作成したプラスミドpUC-MALCE2を鋳型として、上記（鎖長延長酵素遺伝子のクローニング）と同様の条件でPCRを行った。このPCR産物及び酵母発現用ベクターpYE22mを、制限酵素EcoRIとXhoIにより切断した後、DN

A Ligation Kit <Mighty Mix> (TaKaRa) を用いてライゲーションし、得られたプラスミドを pYE-MALGE2 とした。一方、MALGE1 の酵母用発現ベクターとしてはプラスミド pYM3EL020 (特開2008-73030) を用いた。

[0065] 形質転換酵母の取得

プラスミド pYEMALGE2、pYM3EL020、pYE22m を用いて酢酸リチウム法により、酵母 EH13-15 (trp1, MAT α) (Appl. Microbiol. Biotechnol., 30, 515-520, 1989) を形質転換した。形質転換株は、SC-Trp (1 l あたり、Yeast nitrogen base w/o amino acids (DIFCO) 6.7 g、グルコース 20 g アミノ酸パウダー (アデニン硫酸塩 1.25 g、アルギニン 0.6 g、アスパラギン酸 3 g、グルタミン酸 3 g、ヒスチジン 0.6 g、ロイシン 1.8 g、リジン 0.9 g、メチオニン 0.6 g、フェニルアラニン 1.5 g、セリン 11.25 g、チロシン 0.9 g、バリン 4.5 g、スレオニン 6 g、ウラシル 0.6 g を混合したもの) 1.3 g、) 寒天培地 (2% アガー) 上で生育するものとして選抜した。

[0066] 形質転換酵母の脂肪酸組成分析

任意の形質転換株各 2 株ずつを、SC-Trp 液体培地 10 ml に植菌し、30°C、1 日間振とう培養した。得られた培養物 1 ml を YPD (酵母エキス 2%、ポリペプトン 1%、グルコース 2%) 液体培地 10 ml または SR-Trp 液体培地 (1 l あたり、Yeast nitrogen base w/o amino acids (DIFCO) 6.7 g、ラフィノース 20 g、アミノ酸パウダー (アデニン硫酸塩 1.25 g、アルギニン 0.6 g、アスパラギン酸 3 g、グルタミン酸 3 g、ヒスチジン 0.6 g、ロイシン 1.8 g、リジン 0.9 g、メチオニン 0.6 g、フェニルアラニン 1.5 g、セリン 11.25 g、チロシン 0.9 g、バリン 4.5 g、スレオニン 6 g、ウラシル 0.6 g を混合したもの) 1.3 g、) に植菌し、30°C で 2 日間振とう培養した。

培養物をネジロ試験管に移し、遠心分離により菌体のみ回収し、水洗したあと、凍結乾燥した。塩酸メタノール法により菌体の脂肪酸をメチルエステルに誘導し、ガスクロマトグラフィーにより脂肪酸分析を行った。結果を表 1

(YPD) と表 2 (SR-T r p) に示す。

[0067] [表1]

表 1 形質転換酵母の菌体脂肪酸組成 (YPD)

	コントロール		MALCE1		MALCE2	
	#1	#2	#1	#2	#1	#2
16:0	5.05	4.67	3.45	3.49	3.44	2.90
16:1 Δ 9	42.23	41.84	23.90	24.27	20.00	18.09
18:0	3.70	4.08	3.18	3.23	1.72	1.39
18:1 Δ 9	45.62	45.70	52.23	51.69	37.25	36.04
18:1 Δ 11	1.96	2.12	7.45	7.48	32.93	36.35
20:1 Δ 11	0.00	0.00	6.63	6.60	0.00	0.00
other	1.43	1.59	3.16	3.24	4.65	5.23
total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

[0068] [表2]

表 2 形質転換酵母の菌体脂肪酸組成 (SR-T r p)

	コントロール		MALCE1		MALCE2	
	#1	#2	#1	#2	#1	#2
16:0	6.42	6.29	1.46	1.67	5.93	5.34
16:1 Δ 9	38.41	37.40	7.30	7.64	19.27	17.17
18:0	5.40	5.15	5.93	6.22	3.76	3.61
18:1 Δ 9	45.48	46.74	57.46	56.87	40.36	41.89
18:1 Δ 11	2.03	1.72	5.16	5.27	27.75	29.60
20:1 Δ 11	0.00	0.00	17.02	17.04	0.70	0.86
others	2.26	2.71	5.68	5.27	2.23	1.53

既知のMALCE1発現株では、コントロールに比べて18:1 Δ 9、18:1 Δ 11および20:1 Δ 11の比率が上昇し、炭素数16の脂肪酸が減少していた。一方、本発明のMALCE2発現株では、コントロールに比べてシス-バクセン酸 (18:1 Δ 11) の比率が顕著に増加し、パルミトレイン酸 (16:1 Δ 9) が減少していた。シス-バクセン酸は、結腸癌細胞増殖抑制作用、酸化ストレス抑制作用、腸内環境の改善に有用な乳酸桿菌の増殖促進作用などを有するため、医薬品、健康食品などの原料として有用である。また、本発明のMALCE2発現株では、20:1 Δ 11はSR-T r p培地で培養した場合は僅かに生成した。

すなわち、既知のMALCE1はパルミチン酸 (16:0)、16:1 Δ 9、18:1 Δ 9を鎖長延長する活性を有するのに対して、MALCE2は主に16:1 Δ 9を18:1 Δ 11に鎖長延長する活性を有し、16:0や18:1 Δ 9を鎖長延長する活性を僅かながら有することが分かった。

[0069] 次に、本培養の培地としてSR-T r p液体培地にtritonX-100を0.1%、各種脂肪酸が50 μ g / m l となるよう添加したものを使って、上記と同様に培

養し、菌体の脂肪酸組成を分析した。なお、15:0と17:0を添加した場合、培地に完全に溶解しなかったがそのまま培養した。結果を表3-6に示す。

[0070] [表3]

表3 形質転換酵母の菌体の脂肪酸組成比 (SR+18:2Δ9,12)

	コントロール		MALCE1		MALCE2	
	#1	#2	#1	#2	#1	#2
18:2Δ9,12	23.23	26.37	16.48	15.45	23.00	25.41
20:2Δ11,14	0.00	0.00	5.17	4.88	0.00	0.00

[0071] [表4]

表4 形質転換酵母の菌体の脂肪酸組成比 (SR+18:3Δ9,12,15)

	コントロール		MALCE1		MALCE2	
	#1	#2	#1	#5	#1	#2
18:3Δ9,12,15	27.49	33.67	13.20	12.86	28.41	26.70
20:3Δ11,14,17	0.00	0.00	10.33	10.63	1.00	1.20

[0072] [表5]

表5 形質転換酵母の菌体の脂肪酸組成比 (SR+15:0)

	コントロール		MALCE1		MALCE2	
	#1	#2	#1	#5	#1	#2
15:0	2.56	2.47	1.30	0.90	2.41	2.34
15:1Δ9	4.35	3.48	0.69	0.84	1.34	1.24
17:0	1.52	1.47	1.13	1.24	1.52	1.71
17:1Δ9	4.29	3.75	2.86	3.48	6.04	6.46
17:1Δ11	3.13	2.74	1.46	1.78	6.89	7.15
19:0	0.00	0.00	0.71	0.79	0.00	0.00
19:1Δ11	0.00	0.00	8.42	9.92	0.67	0.64

[0073] [表6]

表6 形質転換酵母の菌体の脂肪酸組成比 (SR+17:0)

	コントロール		MALCE1		MALCE2	
	#1	#2	#1	#5	#1	#2
17:0	1.49	2.13	1.77	1.11	0.89	1.34
17:1Δ9	3.93	5.11	0.97	0.76	2.16	3.62
17:1Δ11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
19:1Δ11	0.00	0.00	2.62	1.32	+	+

+ : 僅かにピークが検出される。

[0074] 既知のMALCE1発現株では、Δ9脂肪酸である18:2Δ9,12と18:3Δ9,12,15を鎖長延長して20:2Δ11,14と20:3Δ11,14,17を生成するが、本発明のMALCE2は、18:2Δ9,12をまったく鎖長延長せず、18:3Δ9,12,15を僅かに鎖長延長するが、MALCE1と比べるとその変換率は、1/10以下であっ

た。

- [0075] 奇数鎖脂肪酸であるペンタデカン酸（15：0）やヘプタデカン酸（17：0）を添加した結果（表5および表6）から、既知のMALCE1は、15：0を17：0に、17：1 Δ 9を19：1 Δ 11にそれぞれ鎖長延長する活性が高く、一方、本発明のMALCE2は、15：1 Δ 9を17：1 Δ 11に鎖長延長する活性が高いと考えられる。またMALCE2は、15：0を17：0、17：1 Δ 9を19：1 Δ 11に鎖長延長する活性も僅かに有することが分かった。

産業上の利用可能性

- [0076] 本発明は炭素数の多い脂肪酸を多く含む脂肪酸組成物、特にシス - バクセン酸を多く含む脂肪酸組成物の製造、および／または所望の脂肪酸を含有する食品、化粧品および／または石鹼等の製造に有用である。

請求の範囲

- [請求項1] 以下の（a）～（e）よりなる群より選ばれるいずれかに記載のポリヌクレオチド：
- （a）配列番号：1または4の塩基配列を含有するポリヌクレオチド；
- （b）配列番号：2のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド；
- （c）配列番号：2のアミノ酸配列において、1～100個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、および／もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ脂肪酸鎖長延長酵素活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；
- （d）配列番号：2のアミノ酸配列に対して、60%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ脂肪酸鎖長延長酵素活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；および
- （e）配列番号：1または4の塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ脂肪酸鎖長延長酵素活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。
- [請求項2] 以下の（f）または（g）のいずれかに記載の請求項1に記載のポリヌクレオチド：
- （f）配列番号：2のアミノ酸配列において1～10個のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／もしくは付加したアミノ酸配列からなり、かつ脂肪酸鎖長延長酵素活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド；および
- （g）配列番号：2のアミノ酸配列に対して、90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ脂肪酸鎖長延長酵素活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。
- [請求項3] 配列番号：1または4の塩基配列を含有する、請求項1に記載のポ

リヌクレオチド。

- [請求項4] 配列番号：2のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする、請求項1に記載のポリヌクレオチド。
- [請求項5] DNAである、請求項1～4のいずれかに記載のポリヌクレオチド。
- [請求項6] 請求項1～5のいずれかに記載のポリヌクレオチドにコードされるタンパク質。
- [請求項7] 請求項1～5のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含有するベクター。
- [請求項8] 請求項1～5のいずれかに記載のポリヌクレオチドが導入された非ヒト形質転換体。
- [請求項9] 請求項7に記載のベクターが導入された非ヒト形質転換体。
- [請求項10] 前記形質転換体が脂質生産菌である、請求項8または9に記載の形質転換体。
- [請求項11] 前記脂質生産菌が、モルティエラ・アルピナ（*Mortierella alpina*）である、請求項10に記載の形質転換体。
- [請求項12] 請求項8～11のいずれかに記載の形質転換体を用いる脂質または脂肪酸組成物の製造方法。
- [請求項13] 請求項8～11のいずれかに記載の形質転換体を用いる食品、医薬品または工業原料の製造方法。
- [請求項14] 請求項13に記載の方法で製造された食品、医薬品または工業原料。
- [請求項15] 配列番号：1又は4の塩基配列に基づいて設計したプライマーまたはプローブを用いて、被検脂質生産菌の脂肪酸鎖長延長能について評価する方法。
- [請求項16] 被検脂質生産菌を培養し、配列番号：1または4の塩基配列を含有する脂肪酸鎖長延長酵素遺伝子の発現量を測定することによって、被検脂質生産菌の脂肪酸鎖長延長能を評価する方法。

[請求項17] 基準脂質生産菌および被検脂質生産菌を培養して配列番号：1または4の塩基配列を含有する脂肪酸鎖長延長酵素遺伝子の各脂質生産菌における発現量を測定し、基準脂質生産菌よりも該遺伝子が高発現している被検脂質生産菌を選択する、脂質生産菌の選択方法。

[図1]

```

1
genome ATGGAGTGCATTGAGATCTTGAAGGACCTGGGACAAAGTAGCTTGGTGTCAAGTTTACGACGACGGGGTATCTTCCACAATAGTGATAACTGGGCGA
100
CDS ATGGAGTGCATTGAGATCTTGAAGGACCTGGGACAAAGTAGCTTGGTGTCAAGTTTACGACGACGGGGTATCTTCCACAATAGTGATAACTGGGCGA
101
200
genome TGGACGGGACGGGACAGGACATCTTTACGACAAATATTATGATCTTCTGTCAATTGGGACAGCTCTTGGTGGTGGTGGACTTTACGTCCTGATGGT
201
CDS TGGACGGGACGGGACAGGACATCTTTACGACAAATATTATGATCTTCTGTCAATTGGGACAGCTCTTGGTGGTGGTGGACTTTACGTCCTGATGGT
201
300
genome TGTGCTTCTGAAGCTTAAGCAGGGCAAGGTCTCAAGGCTGTTGGGCGGATAAAGCGGCAGGACAGATCAAGCAAGAGGAGCAACTCTCTCAATCG
301
CDS TGTGCTTCTGAAGCTTAAGCAGGGCAAGGTCTCAAGGCTGTTGGGCGGATAAAGCGGCAGGACAGATCAAGCAAGAGGAGCAACTCTCTCAATCG
301
400
genome TGGCGCTTCATGACTGGCTGGTTTTGTTCCACAGACAGATGCTGTGCTTACTCTGGTGGAGCTTTTACGGCATGTTCTTTGGTGGGAAAGAGCTG
401
CDS TGGCGCTTCATGACTGGCTGGTTTTGTTCCACAGACAGATGCTGTGCTTACTCTGGTGGAGCTTTTACGGCATGTTCTTTGGTGGGAAAGAGCTG
401
500
genome TGTCAAGCCATACCTTCATGAGGCTGTAAAGTGTTTTTGGGGGACAGAGGGTTATTTACTTTTGAAGGGGTCGAGAAATATTGGCAAAAAGCACA
501
CDS TGTCAAGCCATACCTTCATGAGGCTGT-----
501
600
genome AAAACAGCTTCTCAATTGCGATGTAACTGATCTCAGCTCCGACTCTCTTTTGCATTGTTGTCGTGGACATAGGTGTGGGATACCGAGGGAGTTTG
601
CDS -----GTGGGATACCGAGGGAGTTTG
601
700
genome TGGGAAAGGCTGGCTTACTACTGCTACTACTTTTAACTGTCCAAATAGCTGAGGTGACATGGCTTGATCAGAAGTTGAGAAAAATAGTTGAGTGATATAT
701
CDS TGGGAAAGGCTGGCTTACTACTGCTACTACTTTTAACTGTCCAAATAGCT-----
701
800
genome TGGGTGGGAAAGGACATCTCAACTAAGCTTTGTCAAGCCAGTTTCTGGCTTTAGAGGAAATTGGGACCAATCATTTATGCTCTCAAGGGCGGGCT
801
CDS -----AGGAAATTGGGACCAATCATTTATGCTCTCAAGGGCGGGCT
801
900
genome TGGTGGGCTTGGGAGAGTACGACAGCGCGGTTGCAATTATGACCATGTATATGGCTACAGCTACGGCGACAGCCGATCTGGATCTTCAGGAGCTTGA
901
CDS TGGTGGGCTTGGGAGAGTACGACAGCGCGGTTGCAATTATGACCATGTATATGGCTACAGCTACGGCGACAGCCGATCTGGATCTTCAGGAGCTTGA
901
1000
genome ACTGGTTGGTTGATACCATTTATGATGGCTACTAGGTAAAGCTGCTTTTGAAGACTACATGTCATAGAAGAAGCGGCAAAATGTGGCAAGTGGTTGT
1001
CDS ACTGGTTGGTTGATACCATTTATGATGGCTACTAGGT-----
1001
1100
genome AGATTTTATACCATGTGCGACGGTGTGTACATTTACTATGACCATTAAGTGGGACTTCCATTGGAGTTAAGGCTCGGGTAAGAAGTACATGAGCTGGA
1101
CDS -----CTGGGACTTCCATTGGAGTTAAGGCTCGGGTAAGAAGTACATGAGCTGGA
1101
1200
genome TGGAAATCACTCAATTCTGGAGCGGACAGGCTCTGGGCTTCTGATATGAGCTGGGCTGTCCAGAGGATGCTTCAACAAAGGTGATGGGCTTTGGGAT
1201
CDS TGGAAATCACTCAATTCTGGAGCGGACAGGCTCTGGGCTTCTGATATGAGCTGGGCTGTCCAGAGGATGCTTCAACAAAGGTGATGGGCTTTGGGAT
1201
1300
genome CTGGACTGTGCTGTACGTTTTGGCTTTGATCTAGCTGTTACGGGCTTTGCGAGGAAGATGTACGGCAGCAGAAACAGGGCGGCTGCCGCCGCAAA
1301
CDS CTGGACTGTGCTGTACGTTTTGGCTTTGATCTAGCTGTTACGGGCTTTGCGAGGAAGATGTACGGCAGCAGAAACAGGGCGGCTGCCGCCGCAAA
1301
1310
genome GCCAAGAGGAGAGTAA
1311
CDS GCCAAGAGGAGAGTAA

```

[図2]

```

1  ATGGAGTCCATTGAGATGTTGAAGGAGGTCGGCACAAAAGTACCTTCGTCTCAACCTTTGAC
    M E S I Q I L K D L G T K Y L R L N F D
61  GAGGACCCCGCTATCTCCACAATACTGATAACTGGGCGATCGGACCCCAAGCCCAAGGAC
    D D R R I F H N T D N W A I A P Q P K D
121  ATGCTTTAGGAGAAATATTATGATCTTCTTGTCAATTGGCGCACACCCTTCGTGGTGGCT
    I L Y P E Y Y D L L V N W R T P F V V A
181  GCACCTTACGTCTCATGTTGTGTTGTGAAGGCTAAGCAGGGCAAGGTCTCAAGGGTC
    A I Y V L M V V L L N P K Q G K V S R V
241  GTTGGGGCGGATAACCGCGGCAAGCCAGGATCAAGCAAGAGGAGGAAGTCTCTCAATCC
    V A A D N A A K A G S S K K Q E L S G S
301  TGGGGTTGATGAGTGGCTGTTTTCGTCCACAACAGATGCTGTGGATTACTCTGCG
    S P F M T A L V F V H N T I L C I Y S A
361  TGGACCTTTTACGGCATGTTCTTTGGCTGGAAGAAAGGCTCTCTCAACCAATACCTTCATG
    W I F Y G M F F A W K K A L S T H T F M
421  GAGGCTGTCTCCATACCGACGGCACTTTCTGGGAAAGGCTGCTTACTACTGCTACTAG
    E A V C D T D G T F W E S L G Y Y S Y Y
481  TTTTACCTGTCCAAATACTACGAAATTGTGGACACAATCATTATGCTGCAAGGGGCGG
    F Y L S K Y Y E I V D T I I I L L K G R
541  CGTTCTCCCTTGTGAGAGGTAGGACGAGCGCGGTGCAATTATCACCATGTATATGGG
    R S S L L Q T Y H H A G A I I T M Y M G
601  TACAACCTACCGGCGACACCGCATGTGGATGTTCAAGAGCTTCAACTCGTTCCTTCATACC
    Y N Y R A H P I W I F T T F N S F V H T
661  ATTATGTATGCTACTACCTGCCACITCCATTTGGAGTTAAGGCTGGGGAAGAAGTAC
    I M Y A Y Y A A T C I G V K P P G K K Y
721  ATGAGGTGATGGAAATCACTCAATTCTGGACCGGCAAGGCTCTCGGCTTGTGGTATGAG
    I I S M Q I T Q F W T G T A L A F W Y E
781  CTCGGCTCTCCAAAGGATGCTTCAAGAGGCTGGATCCGCTTTCCGCATCTGGACTGTG
    L G S P K G G F T N P G S R F A I W T V
841  CTGCTGTACGTTTTCCCTTTGATCTACCTGTTGAGGGGCTTTGCCAGGAAGATGTACGGC
    L V Y V F P L I Y L F T A F A R K M Y G
901  AGCAGAATCAGGGCGGCTGCGCGCGGCAAGCCAAAGGAAGGAAGTAA
    S R I R A A A A A K A K K E E *

```

[図3]

```

1                               50
DdE1oA -----MEH1HDINQDEFKDP
IgELO -----MALANDAGERIWAA
MALCE1 -----MESCPMPAGTPPEYYDFF
MALCE2 MESIQILKOLGTKYLRLNFDDRRIFHNTDNWIAPOPKDILYPEYDILL

51                               100
DdE1oA 1GTIDRFNKNEVPFSNIEFFIVCSFGYLALFYGLGIFMK-----NKK
IgELO 1TDPEILIGTFSYLLKPLER-N-----SCLVDEKKGYR-----TSMI
MALCE1 MDNKTPLAIAATYTVAGLFNPKVGRVSRVAKSANAKP-----AERTQS
MALCE2 VNRTPFVVAALYVLMVLLNPKVGRVSRVAAADNAKAGCSKKOELSDS

101                               150
DdE1oA EIKLHGFAMFNFLCLLSLMELGIVPMAYSPHGLYNIICKPIDSG
IgELO WYNVLLALFSALSFYVTATAGNDYGTGANLRROTGDTPLPLFGCPSPVW
MALCE1 GAAMTAFVFNHLELCVYSGLTFYHNEPAMVKNFRHTLHEAYDDTDGSL
MALCE2 SPFMIALVFVNHTILGYSAMTFYGMFAKKALSTHTFMEAYDDTDGTF

151                               200
DdE1oA L-----VQFSYYIEYLSKYVEFVDTIIVLRKKSILFLHVNHFITLWLVNA
IgELO DSKLFTWTAKAFYYSKYVEYLDIAWLVLGGKRVSLQAFHFAAPWDVYL
MALCE1 WNNALGYNGLYYLSKYVEFVDTITILLKGRSSLLQTYHAGAIITMNS
MALCE2 W-ESLGYYSYTYLSKYVEFVDTITILLKGRSSLLQTYHAGAIITMYN

201                               250
DdE1oA NLKYDTGCONVDISANCFVHIVMYTYFQTERGINFWKKHITTCQITQF
IgELO GIRLNHEGVNIFMFFNSFIRTIMYTYGLTAAGYKFKAQPLITAMQIQF
MALCE1 GINYQATPINIFVVFNSFIRTIMYCYAFTSTGFIHPGKKYLTSMQITQF
MALCE2 GYNRAHPINIFTFNSFVITIMYAYYAATSIQVKPPGKKYITSMQITQF

251                               300
DdE1oA IYDMSSHLAWHYDTCGNHNCNYCCGTNATSAFSDFVILSFLGLEIQEFV
IgELO VGGFLVNDYINVR-----CFNSDKGKLEQWAFNYAYVGSVFLFCHIFY
MALCE1 LVGIIIVSYLVR-----GGIRTPGAGMAYWINVGYLEPLIYLEVDQAK
MALCE2 WTGTALAFWYELGSPK-----GGFTNPGSREAIWTVLYVYFPLIYLETAEAR

301                               320
DdE1oA KAYKKKCSIKKKTN-----
IgELO GDNLATKKSAAKQQL-----
MALCE1 RTYSKRTAAAKKAA-----
MALCE2 KMYGSHIRAAAAKAKKEE--

```

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/060186

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/00, A23D9/02, A61K31/7088, A61K31/713, A61K36/06, A61P1/14, A61P25/18, A61P35/00, A61P43/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/00, C12N15/09, C12P7/64, C12Q1/02, C12Q1/04, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2010 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2010

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	JP 2006-262778 A (Tohoku University), 05 October 2006 (05.10.2006), (Family: none)	14/1-13, 15-17
X/A	Sakuradani E, Nojiri M, Suzuki H, Shimizu S. Identification of a novel fatty acid elongase with a wide substrate specificity from arachidonic acid-producing fungus Mortierella alpina 1S-4. Appl Microbiol Biotechnol., 2009 Sep, Vol.84, No.4, p.709-716. Epub 2009 May 5.	1,5-17/2-4
A	JP 2009-512437 A (E.I. Du Pont De Nemours & Co.), 26 March 2009 (26.03.2009), & WO 2007/046817 A1 & US 2007/087420 A1 & EP 1937704 A1	1-17

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
04 August, 2010 (04.08.10)

Date of mailing of the international search report
17 August, 2010 (17.08.10)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/060186

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2008-073030 A (Kyoto University), 03 April 2008 (03.04.2008), (Family: none)	1-17
A	JP 2004-097134 A (President of Hiroshima University), 02 April 2004 (02.04.2004), (Family: none)	1-17
A	Kawashima H, Akimoto K, Shirasaka N, Shimizu S. Inhibitory effects of alkyl gallate and its derivatives on fatty acid desaturation. Biochim Biophys Acta., 1996, Vol.1299, No.1, p.34-38.	1-17
A	Eiji SAKURADANI et al., "Production of functional lipids by microorganisms: arachidonic acid and related polyunsaturated fatty acids", Protein, nucleic acid and enzyme, 2009 May, vol.54, no.6, pages 725 to 734	1-17
A	Kuni ITO et al., "Expression of elongase gene from microalgae Pavlova sp. in oleaginous fungus Mortierella alpina 1S-4", Abstracts of the 59th Annual Meeting of the Society for Biotechnology, Japan, 2007, page 110(3D12-1)	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/060186

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

(International Patent Classification (IPC))

C12N15/00(2006.01)i, *A23D9/02*(2006.01)i, *A61K31/7088*(2006.01)i,
A61K31/713(2006.01)i, *A61K36/06*(2006.01)i, *A61P1/14*(2006.01)i,
A61P25/18(2006.01)i, *A61P35/00*(2006.01)i, *A61P43/00*(2006.01)i,
C12N1/15(2006.01)i, *C12N1/19*(2006.01)i, *C12N1/21*(2006.01)i,
C12N5/10(2006.01)i, *C12N9/00*(2006.01)i, *C12N15/09*(2006.01)i,
C12P7/64(2006.01)i, *C12Q1/02*(2006.01)i, *C12Q1/04*(2006.01)i,
C12Q1/68(2006.01)i

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national
classification and IPC)

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. 特別ページ参照

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N15/00, A23D9/02, A61K31/7088, A61K31/713, A61K36/06, A61P1/14, A61P25/18, A61P35/00, A61P43/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N9/00, C12N15/09, C12P7/64, C12Q1/02, C12Q1/04, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 0 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 0 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 0 年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)、GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq、UniProt/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/ A	JP 2006-262778 A （国立大学法人東北大学） 2006.10.05 （ファミリーなし）	14 / 1-13, 15-17
X/ A	Sakuradani E, Nojiri M, Suzuki H, Shimizu S. Identification of a novel fatty acid elongase with a wide substrate specificity from arachidonic acid-producing fungus <i>Mortierella alpina</i> 1S-4. Appl Microbiol Biotechnol., 2009 Sep, Vol.84, No.4, p.709-716. Epub 2009 May 5.	1, 5-17 / 2-4

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 4 . 0 8 . 2 0 1 0

国際調査報告の発送日

1 7 . 0 8 . 2 0 1 0

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

横田 倫子

4 B

3 7 6 4

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2009-512437 A (イー・アイ・デュポン・ヌムール・アンド・カンパニー) 2009.03.26 & WO 2007/046817 A1 & US 2007/087420 A1 & EP 1937704 A1	1-17
A	JP 2008-073030 A (国立大学京都大学) 2008.04.03 (ファミリーなし)	1-17
A	JP 2004-097134 A (広島大学長) 2004.04.02 (ファミリーなし)	1-17
A	Kawashima H, Akimoto K, Shirasaka N, Shimizu S. Inhibitory effects of alkyl gallate and its derivatives on fatty acid desaturation. Biochim Biophys Acta., 1996, Vol.1299, No.1, p.34-38.	1-17
A	櫻谷英治 他、 機能性脂質の微生物による生産 アラキドン酸に関連する油脂の発酵生産を中心として 蛋白質 核酸 酵素, 2009 May, Vol.54, No.6, p.725-734	1-17
A	伊東久仁 他、 微細藻 <i>Pavlova</i> sp. の脂肪酸鎖長延長酵素遺伝子の油糧微生物 <i>Mortierella alpina</i> 1S-4 での発現 第 59 回日本生物工学会大会講演要旨集, 2007, p.110 (3D12-1)	1-17

発明の属する分野の分類

C12N15/00(2006.01)i, A23D9/02(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i,
A61K31/713(2006.01)i, A61K36/06(2006.01)i, A61P1/14(2006.01)i, A61P25/18(2006.01)i,
A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i,
C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N9/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i,
C12P7/64(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, C12Q1/04(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i