



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1894405 B

(45) 授权公告日 2011.02.02

(21) 申请号 200480037327.0

A23L 1/30(2006.01)

(22) 申请日 2004.12.14

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

419124/2003 2003.12.17 JP
097089/2004 2004.03.29 JP

WO 03093482 A2, 2003.11.13, 摘要.

US 6459018 B1, 2002.10.01, 摘要.

WO 9964616 A2, 1999.12.16, 摘要, 第4页第
23 - 30 行.

(85) PCT申请进入国家阶段日

2006.06.14

审查员 安玉苹

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2004/018638 2004.12.14

(87) PCT申请的公布数据

W02005/059130 JA 2005.06.30

(73) 专利权人 三得利控股株式会社

地址 日本大阪府

(72) 发明人 松井启祐 陈任

(74) 专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理
有限责任公司 11290

代理人 薛俊英 王维玉

(51) Int. Cl.

C12N 15/09(2006.01)

A01H 5/00(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 20 页 序列表 13 页
附图 3 页

(54) 发明名称

含有花生四烯酸的植物体及其利用

(57) 摘要

本发明涉及含有花生四烯酸的花生四烯酸植物体、大豆及其利用法。将与花生四烯酸生物合成有关的脂肪酸合成酶基因导入植物体,通过使用含有生产花生四烯酸的花生四烯酸生产过程的植物体生产方法得到的油脂原料植物体,可简便地获得含有花生四烯酸的植物体及大豆。根据本发明,可大量且廉价地获得花生四烯酸。

1. 一种用于转化大豆的表达载体,包含在大豆种子特异性启动子的下游区域,连接编码 $\Delta 6$ 去饱和酶的基因、编码脂肪酸链延长酶的基因和编码 $\Delta 5$ 去饱和酶的基因,且含有 $\Delta 15$ 去饱和酶的 RNAi 表达盒,上述大豆为生产花生四烯酸的大豆。
2. 权利要求 1 中所述的载体,其特征在于,上述的大豆种子特异性启动子是伴大豆球蛋白启动子。
3. 权利要求 2 中所述的载体,其特征在于,上述的 $\Delta 15$ 去饱和酶的 RNAi 表达盒是 pSPB1876。
4. 权利要求 3 中所述的载体,其特征在于,上述的载体含有 8 个碱基的限制性内切酶识别位点。
5. 权利要求 4 中所述的载体,其特征在于,上述的载体依次含有编码 GFP 的基因、编码脂肪酸链延长酶的基因、 $\Delta 15$ 去饱和酶的 RNAi 表达盒、编码 $\Delta 6$ 去饱和酶的基因、编码 $\Delta 5$ 去饱和酶的基因以及潮霉素抗性基因。
6. 权利要求 1 ~ 5 中任一项所述的载体,其特征在于,上述 $\Delta 6$ 去饱和酶是由序列号 1 中所示的氨基酸序列组成的蛋白质。
7. 权利要求 1 ~ 5 中任一项所述的载体,其特征在于,编码上述 $\Delta 6$ 去饱和酶的基因使用了具有将序列号 2 中所示的碱基序列作为开放阅读框区域的基因。
8. 权利要求 1 ~ 5 中任一项所述的载体,其特征在于,上述脂肪酸链延长酶是由序列号 3 中所示的氨基酸序列组成的蛋白质。
9. 权利要求 1 ~ 5 中任一项所述的载体,其特征在于,编码上述脂肪酸链延长酶的基因使用具有将序列号 4 中所示的碱基序列作为开放阅读框区域的基因。
10. 权利要求 1 ~ 5 中任一项所述的载体,其特征在于,上述 $\Delta 5$ 去饱和酶是由序列号 5 中所示的氨基酸序列组成的蛋白质。
11. 权利要求 1 ~ 5 中任一项所述的载体,其特征在于,编码上述 $\Delta 5$ 去饱和酶的基因使用具有将序列号 6 中所示的碱基序列作为开放阅读框区域的基因。
12. 权利要求 1 ~ 5 中任一项所述的载体,其特征在于,所述的 $\Delta 6$ 去饱和酶、脂肪酸链延长酶、 $\Delta 5$ 去饱和酶或编码该酶的基因来自被孢霉属。
13. 权利要求 1 ~ 5 中任一项所述的载体,其特征在于,所述的 $\Delta 6$ 去饱和酶、脂肪酸链延长酶、 $\Delta 5$ 去饱和酶或编码该酶的基因来自高山被孢霉。
14. 一种制备生产花生四烯酸的大豆的方法,其特征在于,所述方法包括使用权利要求 1 ~ 13 中任一项所述的载体对大豆进行转化。

含有花生四烯酸的植物体及其利用

技术领域

[0001] 本发明涉及含有花生四烯酸的植物体 [例如,大豆(黄豆、Glycinemax)] 及其利用,特别是涉及使用导入了与花生四烯酸合成体系有关的酶的基因的、含有花生四烯酸的植物体生产方法得到的植物体及其利用。

背景技术

[0002] 脂肪酸是生物三大营养要素之一脂质的主要成分,通常多指天然脂质的水解物脂肪族一元羧酸。一般的,脂肪族链为饱和时称饱和脂肪酸,含有双键或三键时称不饱和脂肪酸。根据链长,分为短链(碳数 2~4)、中链(碳数 5~11)、长链(碳数 16~18)、超长链(碳数为 20 或大于 20),当碳数为 n ,双键数为 m 时,多记为 $C_n:m$ 。

[0003] 这种脂肪酸是植物中细胞膜的主要成分,同时作为能量源,还是主要以甘油三酯的形式积累于种子及果实中的重要成分。积累于植物中的脂质的量及脂肪酸组成因植物种类的不同而不同。在这种植物中积累的脂肪酸,例如,为人所知的主要是碳数为 16(C_{16}) 的饱和脂肪酸棕榈酸($C_{16}:0$)、碳数为 18(C_{18}) 的饱和脂肪酸硬脂酸($C_{18}:0$),碳数为 18(C_{18}) 的不饱和脂肪酸、按以下具有 1、2、3 个双键(不饱和键)的顺序,为油酸($C_{18}:1$)、亚油酸($C_{18}:2$)、 α -亚麻酸($C_{18}:3\alpha$),含有这些脂肪酸较多的为大豆、油棕、向日葵、菜籽、椰子等,并作为油脂原料植物(也称油料作物)栽培。且碳数为 18 或大于 18、具有 2 个或大于 2 个不饱和键(双键或三键)的脂肪酸,总称为多不饱和脂肪酸(PUFA:Poly Unsaturated Fatty Acid)。

[0004] 高等动物一般不具有与亚油酸、 α -亚麻酸合成有关的去饱和酶,所以必须从植物(植物性食品)中摄取上述 PUFA,因此,亚油酸和 α -亚麻酸被称为必需脂肪酸。在高等动物的体内,以这些不饱和脂肪酸为底物,再反复进行去饱和与碳链延长,合成二高- γ -亚麻酸、花生四烯酸($C_{20}:4n-6$)、二十碳五烯酸(EPA)($C_{20}:5n-3$)、二十二碳六烯酸(DHA)($C_{22}:6n-3$)等。

[0005] 这些 PUFA,除在高等动物的体内代谢中显示出各种功能外,还作为前列腺素的直接前体,起着重要的作用。特别是老人及婴儿等由于生物合成二高- γ -亚麻酸、花生四烯酸、EPA、DHA 等的能力低下,所以需从食物中摄取。特别是花生四烯酸具有改善老年痴呆症的作用,以花生四烯酸为主要成分的健康食品也为市场销售,所以,对花生四烯酸的需求日益扩大。

[0006] 此花生四烯酸较多含有于鱼油中,目前一部分从鱼油中提取供给。但由于鱼资源的枯竭、供给量的变动及环境污染造成的油脂资源的污染等已成为问题,所以,近年来通过生产能力的控制、长期的稳定供给、清洁性等方面优异,且纯化上较容易被孢霉属(Mortierella)等微生物的发酵,进行花生四烯酸的生产[(例如,参照文献 1:Appl. Microbiol. Biotechnol., 31, p11(1987))。但是现状中也指出如生产成本低、放大生产中需设备投资,所以放大生产并不容易的很多问题点。

[0007] 因此,如可用油料作物制造这些 PUFA,尤其是花生四烯酸,将可期待生产过程的大

幅度效率化和成本的降低。近年来,PUFA 生物合成中必需的去饱和酶及链延长酶基因已相继从动植物、霉菌及酵母中被分离,通过将些基因导入高等植物,可望在高等植物中生产 PUFA。

[0008] 实际上,作为通过基因重组,改变植物中含有的油脂组成的实例,制备了 (i) 生产月桂酸的菜籽 [从含有较多月桂酸的月桂树中,将在 C12:0-ACP(酰基载体蛋白)中起特异性作用,游离月桂酸的中链酰基-ACP 硫酯酶基因与菜籽的种子贮藏蛋白质的 napin 基因的启动子连接,并导入到菜籽中:参照文献 2:Science,257, p72(1992)]、(ii) 含有高硬脂酸的菜籽(通过反义基因的导入抑制 C18:0-ACP 去饱和酶基因的表达,而使硬脂酸的含量提高到 40%的重组体菜籽:参照文献 3:Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,89, p2624(1992))、(iii) 高芥子酸(C22:1)菜籽(通过导入酵母的 LPAAT 基因,使芥子酸含量提高到 90%的菜籽:参照文献 4:Plant Cell,9,p909(1997))、(iv) 生产高油酸的大豆(通过抑制在大豆种子中表达的 $\Delta 12$ 去饱和酶基因 Fad2 的表达,抑制从油酸向亚油酸合成途径的结果,使油酸含量从约 23%提高到 80%左右的大豆。且控制 Fad2 的启动子,使用来源于大豆种子贮藏蛋白质的 β -伴大豆球蛋白(conglycinin)基因中的物质)、(v) 生产 γ -亚油酸的菜籽(导入了从琉璃苣中分离的 $\Delta 6$ 去饱和酶基因的菜籽:参照文献 5:Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,94,p4211(1997))等。且有使来源于硅藻的 $\Delta 6$ 去饱和酶基因、和 $\Delta 5$ 去饱和酶基因,与来源于小立碗藓中的链延长酶基因在亚麻中表达,以生产花生四烯酸及 EPA 的报道(参照文献 6:J. Biol. Chem. 278, p35115, (2003))。

[0009] 另外,也有关于以下尝试的报道,为生产产生多不饱和脂肪酸的大豆,将从多不饱和脂肪酸产生菌被孢霉中分离的 $\Delta 6$ 去饱和酶、链长延长酶、 $\Delta 5$ 去饱和酶的 cDNA 与各种启动子连接,以进行转基因(例如,参照文献 11:平成 14 年度《植物利用能量使用合理化生产技术的研究开发成果报告书》;12:田中良和著、为了地球环境·食粮·资源的植物生物工程学第 160 委员会 第 8 次研究会资料(日本学术振兴会)、p14-16、平成 15 年 6 月 13 日召开)。且此处所述内容不特别描述时,依据文献 7:《植物代谢工程学》NTS 公司 2002 年(ISBN4-86043-004-2C3045)p574-586 或文献 8:J. Plant Physiol. 160, p779(2003)。

[0010] 但是,报道了使花生四烯酸在植物体中生产的上述文献 6 中的叙述并不明确,其公开内容也不充分。

[0011] 更详细地说,在植物体中导入异种生物的基因,从而改变油脂的组成及性质时,需进行与决定碳链长有关的酶的基因、决定双键数量·位置的去饱和酶的基因的表达控制。且生产其植物本不具备的脂肪酸时,为使该脂肪酸对宿主植物的生长发育无不良影响,应考虑脂肪酸合成的时期、部位、在细胞内的存在形态等。

[0012] 而且在植物中,使异种生物特别是植物以外的基因表达时,有时转录产物会被加工,此时,例如,需进行密码子的改变等处理(例如,参照文献 9:Bio/Technology 11 p194, 1993)。

[0013] 与一系列生物合成反应有关的酶在细胞内形成复合体,其代谢物有时经过分子通道进行代谢(例如,参照文献 10:Proc Natl Acad Sci USA. 96p 12929(1999))。而此时,比如与生物合成有关的酶的基因已公知,基因的导入方法也公知,但通过来源于导入的异种基因的基因生产的酶在宿主植物中能起何种程度的作用,能否生产目的物质,对其预测还是非常困难的。

[0014] 而上述文献 6 中对这些问题点全然未记述,其公开也不得不说是不充分的。如上所述,对于脂肪酸生物合成未知的部分还很多,而且异种生物、例如被孢霉的脂肪酸生物合成基因的转录·翻译在植物体中是否能有效进行,这些基因编码的酶在植物体中是否能良好地发挥作用,这些酶在植物体的脂质合成酶群与细胞内是否能协调起作用,在脂肪酸的积累中虽需以甘油三酯的形态作为油体,但即使合成花生四烯酸,其是否能积累等均属未知数。即,为使异种生物的基因导入植物体,生产花生四烯酸,需进行相当多的反复试验。

[0015] 豆科植物特别是大豆,其通过转基因的转化困难性已被指出,所以有关大豆转化的情报量也很少。根据数件报道例,因大豆中的转化率、再生率极低,所以可转化的品种也受到了限制[例如,参照文献 13 :SantaremER and Finer JJ(1999)、InVitro Cell.Dev. Biol.-Plant 35 :451-455]。因此,(i) 需开发转基因困难的大豆的转化体系,(ii) 还需开发使多不饱和脂肪酸合成中必需的复数的基因稳定表达的多基因稳定表达体系。而且(iii) 实际上,来源于异种生物基因产物(与脂肪酸合成有关的酶)在大豆中以蛋白质水平表达,所以需确认有无酶活性、即转基因大豆的脂质组成是否发生了变化。

[0016] 因此,在大豆中生产多不饱和脂肪酸是极困难的技术,需很多阶段的技术开发。所以,在上述文献 11、12 的报道中,还未得到生产多不饱和脂肪酸的转基因大豆(植物体)。

[0017] 进一步地说,上述文献 6、11、12 中,还全然没有关于能获得子代可继承生产多不饱和脂肪酸(例如,花生四烯酸)性状的转基因植物体的报道。即,为生产多不饱和脂肪酸而转化植物,本身就伴随着相当困难的技术性,因此,可以说,要获得继承其性状的子代的植物体则更加困难。

[0018] 所以,为解决上述种种问题点,不断进行反复试验,将实际上来源于异种生物的基因导入植物,不仅能进行 DNA 水平表达的鉴定,还可进行蛋白质水平的酶表达、及酶的功能鉴定,从而真正能生产含有花生四烯酸的植物体、特别是大豆,是被强烈需求的。进一步说,被强烈需求的,是获得子代能继承生产多不饱和脂肪酸性状的转基因植物体。

发明内容

[0019] 鉴于上述问题点,本发明的目的是,提供含有花生四烯酸的植物体及其利用方法。

[0020] 本发明者等鉴于上述课题,锐意研究的结果,将来源于被孢霉属的 $\Delta 6$ 去饱和酶、脂肪酸链延长酶、 $\Delta 5$ 去饱和酶的 3 种基因连接于大豆种子特异性启动子的下游,再附加终止子,制备构建在同一载体上的重组表达载体,通过将其导入大豆胚中,制备了转基因大豆,并首次证实了来源于异种生物的基因产物在大豆内以蛋白质水平表达,同时可发挥酶的功能,生产花生四烯酸,且独家发现了该转基因大豆含有花生四烯酸,使本发明得以完成。

[0021] 即,为解决上述课题,本发明涉及的含有花生四烯酸的植物体,其特征在于,其通过包含将与花生四烯酸生物合成有关的脂肪酸合成酶基因导入植物体,从而生产花生四烯酸的花生四烯酸生产过程的植物体的生产方法获得。

[0022] 并且,上述花生四烯酸生产过程,优选含有将包含编码与上述花生四烯酸生物合成有关的脂肪酸合成酶的基因的重组表达载体导入植物细胞的转化过程。

[0023] 且上述花生四烯酸生产过程,优选包含构建上述重组表达载体的重组表达载体构建过程。

[0024] 另外,上述重组表达载体构建过程,优选包含在大豆种子特异性启动子的下游区域,连接编码与花生四烯酸生物合成有关的脂肪酸合成酶的基因的过程。

[0025] 与上述花生四烯酸生物合成有关的脂肪酸合成酶,优选为 $\Delta 6$ 去饱和酶、脂肪酸链延长酶、及 $\Delta 5$ 去饱和酶。

[0026] 且上述 $\Delta 6$ 去饱和酶,优选为以下 (a) 或 (b) 中所述的蛋白质。

[0027] (a) 由序列号 1 中所示的氨基酸序列组成的蛋白质。

[0028] (b) 由序列号 1 中所示的氨基酸序列中,1 个或多个氨基酸被取代、缺失、插入、及/或附加了的氨基酸序列组成的,具有催化在脂肪族一元羧酸的 $\Delta 6$ 位导入不饱和键反应功能的蛋白质。

[0029] 编码上述 $\Delta 6$ 去饱和酶的基因,优选使用以下 (c) 或 (d) 中所述的基因。

[0030] (c) 具有将序列号 2 中所示的碱基序列作为开放阅读框区域的基因。

[0031] (d) 与由序列号 2 中所示的碱基序列组成的基因的互补碱基序列组成的基因在严谨条件下杂交,且编码具有催化在脂肪族一元羧酸的 $\Delta 6$ 位导入不饱和键反应功能的蛋白质的基因。

[0032] 上述脂肪酸链延长酶,优选为以下 (e) 或 (f) 中所述的蛋白质。

[0033] (e) 由序列号 3 中所示的氨基酸序列组成的蛋白质。

[0034] (f) 由序列号 3 中所示的氨基酸序列中,1 个或多个氨基酸被取代、缺失、插入、及/或附加了的氨基酸序列组成的,具有催化脂肪族一元羧酸的碳链延长反应功能的蛋白质。

[0035] 编码上述脂肪酸链延长酶的基因,优选使用以下 (g) 或 (h) 中所述的基因。

[0036] (g) 具有将序列号 4 中所示的碱基序列作为开放阅读框区域的基因。

[0037] (h) 与由序列号 4 中所示的碱基序列组成的基因的互补碱基序列组成的基因在严谨条件下杂交,且编码具有催化脂肪族一元羧酸的碳链延长反应功能的蛋白质的基因。

[0038] 上述 $\Delta 5$ 去饱和酶,优选为以下 (i) 或 (j) 中所述的蛋白质。

[0039] (i) 由序列号 5 中所示的氨基酸序列组成的蛋白质。

[0040] (j) 由序列号 5 中所示的氨基酸序列中,1 个或多个氨基酸被取代、缺失、插入、及/或附加了的氨基酸序列组成的,具有催化在脂肪族一元羧酸的 $\Delta 5$ 位导入不饱和键反应功能的蛋白质。

[0041] 编码上述 $\Delta 5$ 去饱和酶的基因,优选使用以下 (k) 或 (l) 中所述的基因。

[0042] (k) 具有将序列号 6 中所示的碱基序列作为开放阅读框区域的基因。

[0043] (l) 与由序列号 6 中所示的碱基序列组成的基因的互补碱基序列组成的基因在严谨条件下杂交,且编码具有催化在脂肪族一元羧酸的 $\Delta 5$ 位导入不饱和键反应功能的蛋白质的基因。

[0044] 与上述花生四烯酸生物合成有关的脂肪酸合成酶或编码该酶的基因,优选来源于被孢霉属 (*Mortierella*)。特别是与上述花生四烯酸生物合成有关的脂肪酸合成酶或编码该酶的基因,优选来源于高山被孢霉 (*Mortierella alpina*)。

[0045] 上述花生四烯酸生产过程中,优选包含抑制宿主的 $\Delta 15$ 去饱和酶表达的抑制过程。

[0046] 而且,上述表达抑制过程,更优选为通过 RNAi 法抑制 $\Delta 15$ 去饱和酶表达的过程。

[0047] 且含有由上述任一种油脂原料植物体生产的花生四烯酸的植物体,也包含于本发

明。且上述植物体中,优选包含植物细胞、植物组织、愈伤组织、种子、成熟的植物个体、或与该植物个体具有相同性质的植物个体的后代。上述植物体特别优选大豆。

[0048] 由上述含有花生四烯酸的植物体得到的花生四烯酸也包含于本发明。且本发明也包含含有上述花生四烯酸的组合物。本发明还包含含有上述组合物的食品。用于制备上述任一种含有花生四烯酸的植物体的试剂盒,其特征在于,至少包含编码与花生四烯酸生物合成有关的脂肪酸合成酶的基因和启动子的重组表达载体。还优选包含用于将上述重组表达载体导入植物细胞的试剂组。

[0049] 为完成本发明,本发明者等进行反复试验,将实际上属于异种生物的基因导入植物体,成功地生产了含有花生四烯酸的油脂原料植物体、特别是大豆。这不是从以往的论述中容易得到的。

[0050] 如上所述,本发明涉及的含有花生四烯酸的植物体,因具备将与花生四烯酸生物合成有关的脂肪酸合成酶基因导入植物体的结构,所以,可在植物体中生产花生四烯酸。因此,在可容易地获得含有花生四烯酸的植物体上很奏效。即,通过本发明,可用植物体制成花生四烯酸,所以,与从鱼油、微生物中获得花生四烯酸相比,不仅使生产过程的效率大幅度提高和降低了成本,还对可大量生产·获得花生四烯酸上起作用。

[0051] 而且本发明涉及的含有花生四烯酸的植物体,在由子代继承生产多不饱和脂肪酸的性状上,具有非常显著的效果。因此,本发明涉及的含有花生四烯酸的植物体的子代植物体中,也传递了脂肪酸被改变了的性状。因此,通过栽培此含有花生四烯酸的植物体,对可大量获得具有改变了脂肪酸组成的含有花生四烯酸的植物体的种子,并可大量且持续地获得花生四烯酸上很奏效。

[0052] 且植物中被认为转化较困难的豆科植物,例如,在大豆中,也可得到与上述同样的效果。即本发明中包含含有花生四烯酸的大豆,且对于相关的含有花生四烯酸的大豆,也可得到上述效果。

[0053] 花生四烯酸是作为以人类为首的高等动物的必须脂肪酸,在保健食品、医药品上的应用在不断发展,对其需要也在不断增加,而根据本发明,可适应这种对花生四烯酸需求量增加的要求。

附图说明

[0054] 图 1 是表示多不饱和脂肪酸生物合成途径的模式图。

[0055] 图 2 是表示本实施形态涉及的质粒载体 pSPB1877 的制备过程的模式图。

[0056] 图 3 是表示本实施形态涉及的质粒载体 pSPB1877 全体的模式图。

[0057] 具体实施形式

[0058] 本发明涉及用于生产对于高等动物来说含有必须脂肪酸 PUFA 之一花生四烯酸的花生四烯酸植物体及大豆的生产方法,通过此生产方法得到的植物体、大豆及其利用。因此,在进入本发明的详细说明之前,简单说明高等植物中对于脂质生物合成的基本见解。

[0059] 高等植物所具有的主要脂质,主要是 C16 或 C18,在 1~3 处具有不饱和键的结构。这些脂肪酸的大部分,在叶绿体等质体内,以乙酰 CoA 为最初底物合成。最初的反应是由乙酰 CoA 和二氧化碳合成丙二酰 CoA 的反应,通过乙酰 CoA 羧化酶 (ACCCase) 进行。有报道认为,本反应是高等植物中油脂生物合成的限速反应之一,影响油脂生产量,通过 ACCCase 基

因的超表达,使菜籽的总油脂量增加了 5% (Plant Physiol., 113, p75-81(1997))。

[0060] 丙二酰 CoA 的丙二酰基,此后转移到 ACP,生成丙二酰-ACP 后,通过脂肪酸合成酶复合体的酶反复进行缩合、还原、脱水、还原的一系列反应,使碳链每次延长 2 个,最终生成 C16:0-ACP、C18:0-ACP。此 C18:0-ACP 的大部分,通过局部存在于质体的 C18:0-ACP 去饱和酶,在 $\Delta 9$ 位(从羰基末端的碳开始数,第 9 个碳)导入最初的不饱和键。

[0061] 如此生成的 C18:1-ACP 的一部分,在质体内用于甘油脂的生物合成,但剩余的因硫酯酶的作用从 ACP 脱离,从成为 CoA 酯的质体输出后,在内质网内用于甘油脂的生物合成。即甘油脂的生物合成在叶绿体和叶绿体外(主要是内质网)同时进行,在叶绿体内的体系称为原核途径,叶绿体外的途径称为真核途径。

[0062] 此两途径均是通过酰基转移酶,酰基向甘油 3-磷酸(G3P)的 sn-1 位、sn-2 位顺次转移,通过极性头部转换,形成磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰甘油(PG)等种种甘油脂。由真核途径合成的 PC 等的脂质,除成为膜的主要组成成分以外,还在 sn-3 位转移第 3 个酰基,成为贮藏物质的主要成分甘油三酯(TAG)。

[0063] 以大豆为首的植物的生物膜,一般含有高比例的亚油酸、及 α -亚麻酸。高等植物共通地具有 18:0-ACP 去饱和酶、 $\Delta 12$ 去饱和酶、 $\Delta 3$ 去饱和酶。对于在质体内局部存在的 18:0-ACP 去饱和酶, $\Delta 12$ 去饱和酶、 $\Delta 3$ 去饱和酶分别存在质体局部存在型和 ER 局部存在型的至少 2 种同工酶。而且有限种类的植物,还具有特殊的去饱和酶基因。例如,月见草、琉璃苣的 $\Delta 6$ 去饱和酶参与由亚油酸生成 γ -亚麻酸,荷包蛋花(Limnanthes douglasii)的 $\Delta 5$ 去饱和酶参与 C20:1($\Delta 5$)的合成。

[0064] 植物中含有的大部分脂肪酸是 C16 或 C18,但作为植物覆盖体表面的蜡质的主要成分,还有作为细胞膜、液泡膜中大量含有的鞘脂类的成分,需 C20 或大于 C20 的超长链脂肪酸。且一部分植物中,作为贮藏物质,以相当比例含有 C20 及 C22 的超长链脂肪酸。此超长链脂肪酸的合成途径,与通过脂肪酸合成酶复合体合成新型脂肪酸类似,进行由缩合、还原、脱水、还原为 1 个循环的、每次进行 C2 单位的链延长。因此,如上所述,在超长链脂肪酸的合成途径中,已有的酰基与丙二酰 CoA 的缩合反应是链延长的限速反应。

[0065] 且新型脂肪酸合成是对于结合于 ACP 的酰基进行链延长,而超长链脂肪酸合成途径,其链延长不需要 ACP。近年来,由拟南芥、荷荷芭(Simmondsia chinensis)中得到了担负链延长反应最初的缩合反应的酶基因、FAE1(Plant Cell, 7, p309(1995))及 KCS 基因(Plant Cell, 8, p281(1996)),表明其参与了 C20 或大于 C20 的饱和脂肪酸的合成。且用酵母、动物、霉菌等报道的 ELO 家族的脂肪酸链延长酶(J. Biol. Chem., 271, p18413(1996)、J. Biol. Chem., 272, p17376(1997))、与植物的 FAE1/KCS 家族的链延长酶,在一级序列上完全不具相似性。

[0066] 贮藏物质的大部分是 TAG。此 TAG 由细胞质供给的 G3P 顺次酰基化生成。此 TAG 中的 3 个酰基,分别通过各自的酰基转移酶转移到甘油骨架,其中担负向 sn-2 位进行酰基转移的溶血磷脂酸酰基转移酶(LPAAT)具有一般的高度的底物特异性,此现象被认为是决定贮藏物质脂肪酸组成的要因之一。

[0067] 另外,也可通过以前项所述的真核途径合成的主要脂质 PC 为基础的途径生成 TAG。此 TAG 在滑面内质网的膜上合成,在脂双层间积累。积累了 TAG 的膨大的部分,不久从被称为油体的被脂单层包围的球状体内质网上脱离。根据植物的不同,有大量生成比 C16、

C18 短、或长的中链·超长链脂肪酸、经羟化及环氧化后的特殊的脂肪酸的植物,但这些特殊的脂肪酸基本上以 TAG 的形式存在。根据何种机制进行此种控制,目前还不明确,但一般认为存在具有高度底物特异性的磷脂酶及酰基转移酶等。此现象也是高水平生产植物中原本不具备的脂肪酸时,使结果不可预测的要因之一。根据以上见解,说明本发明。

[0068] 本发明涉及含有花生四烯酸的油脂原料植物体及其利用。通过本发明得到的油脂原料植物体,因可生产花生四烯酸,所以可生产含有花生四烯酸的油脂原料植物体。以下的说明,按本发明涉及的含有花生四烯酸的油脂原料植物体(从说明的方便上,有时称为含有花生四烯酸的植物体)的生产方法、由此方法得到的油脂原料植物体及其利用的顺序进行说明。

[0069] (1) 含有花生四烯酸的植物体的生产方法

[0070] 本发明涉及的花生四烯酸植物体及大豆的生产方法,只要是包含通过将与花生四烯酸生物合成有关的脂肪酸合成酶基因导入植物体,从而生产花生四烯酸的花生四烯酸生产过程即可,其它具体的过程、条件、材料等,无特别限定。首先,就“与脂肪酸有关的酶”进行说明。

[0071] (1-1) 与脂肪酸合成有关的酶

[0072] 本发明中使用的脂肪酸合成酶,例如,可为与花生四烯酸的生物合成有关的脂肪酸合成酶中,作为宿主的植物体中不存在的脂肪酸合成酶。高等植物一般具有从硬脂酸生物合成亚油酸或 α -亚麻酸的酶群,所以,更详细地说,有关的脂肪酸合成酶是用于由亚油酸或 α -亚麻酸生物合成花生四烯酸的必需的酶。这些酶具体地说,可为 $\Delta 6$ 去饱和酶、脂肪酸链延长酶(以下,有时单称为链延长酶)、 $\Delta 5$ 去饱和酶的 3 种酶。

[0073] 此处的“ $\Delta 6$ 去饱和酶”,是指具有催化在脂肪族一元羧酸的 $\Delta 6$ 位(从羧酸末端的碳起算第 6 个碳)导入不饱和键反应功能的蛋白质。“脂肪酸链延长酶”,是指具有催化延长脂肪族一元羧酸碳链反应功能的蛋白质。“ $\Delta 5$ 去饱和酶”,是指具有催化在脂肪族一元羧酸的 $\Delta 5$ 位(从羧酸末端的碳起算第 5 个碳)导入不饱和键反应功能的蛋白质。且此处的“不饱和键”是指碳-碳双键(C=C)。例如,高等植物大豆(Glycine max)中,0 为生产花生四烯酸,只要将编码上述 3 种脂肪酸合成酶的基因与组成型或种子特异性启动子连接、导入即可。

[0074] 而且,高等动物中虽存在从硬脂酸到 M 酸(Mead acid)(C20:3)的 n-9 途径,但因不能合成亚油酸及 α -亚麻酸,所以需从植物油中摄取。而被孢霉属(Mortierella)等一部分真菌类及线虫等的低等动物,具有高等植物和高等动物两者的途径,所以可生产花生四烯酸和 EPA。

[0075] 因此,上述 $\Delta 6$ 去饱和酶、脂肪酸链延长酶、 $\Delta 5$ 去饱和酶的 3 种酶,可利用来源于高等动物或被孢霉等微生物的物质。其中,被孢霉属的丝状菌可利用于多不饱和脂肪酸的发酵生产,对其生物合成体系的研究也在不断发展。特别是高山被孢霉(Mortierella alpina),作为主要途径,具有经由亚油酸及 α -亚麻酸等积累花生四烯酸的 n-6 体系的生物合成途径。且高山被孢霉的花生四烯酸生物合成途径中,亚油酸、 α -亚麻酸的生物合成途径与高等植物相同。另外,由亚油酸合成花生四烯酸的途径,首先,是亚油酸通过 $\Delta 6$ 去饱和酶生成 γ -亚麻酸,之后,通过脂肪酸链延长酶(GLELO)生成二高- γ -亚麻酸,然后再通过 $\Delta 5$ 去饱和酶转换为花生四烯酸。

[0076] 从高山被孢霉中,已分离出编码与从硬脂酸到花生四烯酸生物合成途径有关的所有酶的基因。通过 $\Delta 5$ 去饱和酶基因 (J Biol Chem. 273,p19055(1998)) 及 $\Delta 6$ 去饱和酶的生成物 γ -亚麻酸、十八碳四烯酸 (C18:4) 起特异性作用的脂肪酸链延长酶基因 (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97,p8284(2000)),是最先从本菌中分离的。脂肪酸的链延长通过缩合、羟化、脱水、还原 4 个反应,显示底物特异性的是最初的缩合反应。

[0077] 来源于此高山被孢霉的 $\Delta 6$ 去饱和酶,是具有序列号 1 中所示的氨基酸序列的蛋白质,其催化在脂肪族一元羧酸的 $\Delta 6$ 位导入不饱和键的反应。且本发明中使用的 $\Delta 6$ 去饱和酶,不限于具有序列号 1 中所示的氨基酸序列的 $\Delta 6$ 去饱和酶,只要是具有催化在脂肪族一元羧酸的 $\Delta 6$ 位导入不饱和键反应功能的蛋白质均可。具体地说,即使是由序列号 1 中所示的氨基酸序列中,1 个或数个氨基酸被取代、缺失、插入、及 / 或附加了的氨基酸序列组成的蛋白质,只要具有上述功能,均可用于本发明。且本发明中所述的“由序列号 1 中所示的氨基酸序列中,1 个或数个氨基酸被取代、缺失、插入、及 / 或附加了的氨基酸序列”中“1 个或数个”的范围无限定,例如,可为 1 个~ 20 个、优选为 1 个~ 10 个、更优选为 1 个~ 7 个、更特别优选为 1 个~ 5 个、最优选 1 个~ 3 个。

[0078] 上述氨基酸的缺失、取代或附加,是指可将编码上述肽的碱基序列按照该技术领域中公知的方法进行改变。向碱基序列中导入突变时,可通过 Kunkel 法或 Gapped duplex 法等公知的方法或依据此方法的方法进行,例如,使用利用了定点诱变法的诱变试剂盒 [例如 Mutant-K、Mutant-G(均为商品名, TAKARA 公司制)] 等,或使用 LAPCR in vitro Mutagenesis 系列试剂盒 (商品名、TAKARA 公司制) 以导入突变。

[0079] 来源于高山被孢霉的脂肪酸链延长酶,是具有序列号 3 中所示的氨基酸序列的蛋白质,催化延长脂肪族一元羧酸的脂肪酸链的反应。且本发明中使用的脂肪酸链延长酶,不限于具有序列号 3 中所示的氨基酸序列的脂肪酸链延长酶,只要是具有催化延长脂肪族一元羧酸的脂肪酸链反应的功能的蛋白质均可。具体地说,即使是由序列号 3 中所示的氨基酸序列中,1 个或数个氨基酸被取代、缺失、插入、及 / 或附加了的氨基酸序列组成的蛋白质,只要具有上述功能,均可用于本发明。

[0080] 来源于高山被孢霉的 $\Delta 5$ 去饱和酶,是具有序列号 5 中所示的氨基酸序列的蛋白质,催化在脂肪族一元羧酸的 $\Delta 5$ 位导入不饱和键的反应。且本发明中使用的 $\Delta 5$ 去饱和酶,不限于具有序列号 5 中所示的氨基酸序列的 $\Delta 5$ 去饱和酶,只要是具有催化在脂肪族一元羧酸的 $\Delta 5$ 位导入不饱和键反应功能的蛋白质均可。具体地说,即使是由序列号 5 中所示的氨基酸序列中,1 个或数个氨基酸被取代、缺失、插入、及 / 或附加了的氨基酸序列组成的蛋白质,只要具有上述功能,均可用于本发明。

[0081] 本发明涉及的植物体的生产方法,如后所述,可利用公知的基因重组技术,优选使用编码上述 $\Delta 6$ 去饱和酶、脂肪酸链延长酶、 $\Delta 5$ 去饱和酶的基因。编码上述 $\Delta 6$ 去饱和酶的基因 (说明的方便上,称作 $\Delta 6$ 去饱和酶基因),无特别限定,但作为具体举例,例如,使用来源于高山被孢霉的 $\Delta 6$ 去饱和酶时,可例举为编码此 $\Delta 6$ 去饱和酶的基因。作为一 $\Delta 6$ 去饱和酶基因的具体实例,例如,可为将序列号 2 中所示的碱基序列作为开放阅读框 (ORF) 含有的多核苷酸。

[0082] 当然,本发明中使用的 $\Delta 6$ 去饱和酶基因不限于上述实例,只要是与序列号 2 中所示的碱基序列具有同源性的基因均可。具体地说,例如,可为与由序列号 2 中所示的碱基

序列组成的基因的互补碱基序列组成的基因在严谨条件下杂交,且编码具有催化在脂肪族一元羧酸的 $\Delta 6$ 位导入不饱和键反应功能的蛋白质的基因。且本发明所述的“严谨条件”是指,只有在序列间至少存在有 90% 的同一性、优选至少有 95% 的同一性、更优选至少有 97% 的同一性时所引起的杂交。

[0083] 上述杂交可用 J. Sambrook et al. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory (1989) 中所述的方法等、以往公知的方法进行。通常,温度越高,盐浓度越低,严谨程度越高(杂交越难)。

[0084] 且编码上述脂肪酸链延长酶的基因(说明的方便上,称为脂肪酸链延长酶基因)无特别限定,具体举例,例如,可为使用来源于高山被孢霉的脂肪酸链延长酶时,编码此脂肪酸链延长酶的基因。作为一脂肪酸链延长酶基因的具体例,例如,可为将序列号 4 中所示的碱基序列作为开放阅读框(ORF)含有的多核苷酸。本发明中所述的 ORF,是指从起始密码子到终止密码子之前的范围。

[0085] 而且,本发明中使用的脂肪酸链延长酶基因,不限于上述实例,可以是与序列号 4 中所示的碱基序列具有同源性的基因。具体地说,例如,可例举为与由序列号 4 中所示的碱基序列组成的基因的互补碱基序列组成的基因在严谨条件下杂交,且编码具有催化延长脂肪族一元羧酸链反应功能的蛋白质的基因等。

[0086] 另外,编码上述 $\Delta 5$ 去饱和酶的基因(说明的方便上,称为 $\Delta 5$ 去饱和酶基因)无特别限定,但具体举例,例如,可为使用来源于高山被孢霉的 $\Delta 5$ 去饱和酶时,编码此 $\Delta 5$ 去饱和酶的基因。作为一 $\Delta 5$ 去饱和酶基因的具体例,例如,可为将序列号 6 中所示的碱基序列作为开放阅读框(ORF)含有的多核苷酸。

[0087] 当然,本发明中使用的 $\Delta 5$ 去饱和酶基因,不限于上述实例,可以是与序列号 6 中所示的碱基序列具有同源性的基因。具体地说,例如,可为与由序列号 6 中所示的碱基序列组成的基因的互补碱基序列组成的基因在严谨条件下杂交,且编码具有催化在脂肪族一元羧酸的 $\Delta 5$ 位导入不饱和键反应功能的蛋白质的基因等。

[0088] 获得上述基因的方法无特别限制,可通过以往公知的方法,从很多的动物、微生物、或植物中分离。例如,可使用以已知的酶的碱基序列为基础制备的引物对。使用其引物对,可通过以植物的 cDNA 或基因组 DNA 为模板、进行 PCR 等,获得上述基因。上述基因,也可通过以往公知的方法化学合成而得到。

[0089] (1-2) 本发明涉及的花生四烯酸大豆的生产方法例

[0090] 本发明涉及的花生四烯酸大豆的生产方法,只要包含将在上述(1-1)栏中说明的脂肪酸合成酶基因导入植物体、以生产花生四烯酸的过程,均无特别限定,但本发明涉及的植物体的生产方法,用具体过程表示时,例如,可为包含重组表达载体的构建过程、转化过程、筛选过程等过程的生产方法。其中,本发明至少包含转化过程即可。以下,就各过程进行具体说明。

[0091] (1-2-1) 重组表达载体的构建过程

[0092] 本发明中进行的重组表达载体构建过程,只要是构建包含编码上述(1-1)栏中说明的脂肪酸合成酶的基因与启动子(序列)的重组表达载体的过程,无特别限制。

[0093] 成为上述重组表达载体的母体的载体,可使用以往公知的各种载体。例如,质粒、噬菌体、或粘粒等,可根据导入的植物细胞及导入方法适宜选择。具体地说,例如,可为

pBR322、pBR325、pUC19、pUC119、p Bluescript、p Bluescript S K、pBI 系的载体等。特别是,向植物体的载体的导入方法为使用农杆菌的方法时,优选使用 pBI 系的双元载体。pBI 系的双元载体,具体地说,例如可为 pBIG、pBIN19、pBI101、pBI121、pBI221 等。

[0094] 上述启动子,只要是可在植物体内使基因表达的启动子,均无特别限定,可优选使用公知的启动子。有关的启动子,例如,可为花椰菜花叶病毒 35S 启动子 (CaMV35S)、肌动蛋白启动子、胭脂碱合成酶 (nopaline synthase) 的启动子、烟草的 PR1a 基因启动子、番茄的核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶·加氧酶小亚基启动子等。其中,可更优选使用花椰菜花叶病毒 35S 启动子或肌动蛋白启动子。在大豆中起作用的启动子,可优选使用大豆种子的贮藏蛋白质伴大豆球蛋白的启动子。而且,上述启动子可以是组成型启动子,或者也可以是组织特异性启动子。如使用上述各启动子所得到的重组表达载体,在导入到植物细胞内时,均可使任意的基因高表达。其中,优选种子特异性启动子。即,可优选在种子特异性启动子的下游区域,连接编码与花生四烯酸生物合成有关的脂肪酸合成酶的基因。更详细地说,可例举为将 $\Delta 6$ 去饱和酶、脂肪酸链延长酶、 $\Delta 5$ 去饱和酶的 3 种酶分别连接在种子特异性启动子的下游区域。例如,大豆种子特异性启动子,可例举为后述实施例中所示的伴大豆球蛋白启动子等。由此,可使与花生四烯酸生物合成有关的酶高效且稳定地表达,可稳定地生产花生四烯酸。

[0095] 上述启动子,只要是连接、导入载体内时使编码上述 (1-1) 栏中说明的脂肪酸合成酶的基因可表达即可,对重组表达载体的具体结构无特别限定。

[0096] 且脂肪酸合成酶,例如,使 $\Delta 6$ 去饱和酶、脂肪酸链延长酶、 $\Delta 5$ 去饱和酶的 3 种酶在宿主植物中表达时,为使各自的酶表达,可使用将此 3 种酶构建在同一载体上的重组表达载体进行转化,或可使用在 3 个载体上,分别插入 $\Delta 6$ 去饱和酶、脂肪酸链延长酶、 $\Delta 5$ 去饱和酶的 3 种酶,再将此 3 个载体同时转化,并使 3 种酶在宿主植物细胞中分别表达的方法,特别是,更优选使用将 3 种酶构建在同一载体上的重组表达载体。使用将 $\Delta 6$ 去饱和酶、脂肪酸链延长酶、 $\Delta 5$ 去饱和酶的 3 种酶构建在同一载体上的重组表达载体时,优选使此 3 种基因正向转录地构建,但并不限于此,比如反向转录时,只要上述 3 种酶能在宿主植物中表达,均可用于本过程。

[0097] 上述重组表达载体,不仅含有上述启动子及上述脂肪酸合成酶基因,还可含有其他的 DNA 片段。该其他的 DNA 片段无特别限定,可例举为终止子、选择性标记、增强子、为提高翻译效率的碱基序列等。上述重组表达载体,还可具有 T-DNA 区域。T-DNA 区域,特别是在使用农杆菌将上述重组表达载体导入植物体时,可提高转基因的效率。

[0098] 终止子只要具有作为转录终止位点的功能,无特别限定,可使用公知的终止子。例如,具体地说,可优选使用胭脂碱合成酶基因的转录终止区 (Nos 终止子)、花椰菜花叶病毒 35S 的转录终止区域 (CaMV35S 终止子)、甘露碱合成酶基因的转录终止区域 (Mas 终止子) 等。其中可更优选使用 Nos 终止子或 Mas 终止子。

[0099] 上述重组表达载体中,通过将终止子构建在适当的位置,再导入到植物细胞后,可防止合成不必要的长转录物、或防止强启动子使质粒的拷贝数减少的现象的发生。

[0100] 上述选择性标记,例如可使用抗药性基因。有关的抗药性基因的具体举例,例如,可例举为对于潮霉素、博莱霉素、卡那霉素、庆大霉素、氯霉素等的抗药性基因。由此,通过筛选在含有上述抗生素的培养基中生长发育的植物体,可容易地识别转化了的植物体。

[0101] 用于提高上述翻译效率的碱基序列,例如可为来源于烟草花叶病毒的 omega 序列。通过将此 omega 序列构建于启动子的非翻译区域 (5' UTR),可提高上述嵌合基因的翻译效率。因此,上述重组表达载体中,可根据目的,含有各种各样的 DNA 片段。

[0102] 对上述重组表达载体的构建方法无特别限定,可在适宜选择的成为母体的载体上,将上述启动子、编码脂肪酸合成酶的基因、及必要时将上述其他的 DNA 片段按所定顺序导入即可。例如,为使编码 $\Delta 6$ 去饱和酶的基因、编码脂肪酸链延长酶的基因、编码 $\Delta 5$ 去饱和酶的基因表达,将此 3 种酶基因连接,之后,将这些脂肪酸合成酶基因和启动子(根据需要可为终止子等)连接以构建表达盒,再将此导入载体即可。且如上所述,无需将 3 种基因构建于同一载体上,例如,可在 3 个载体上分别插入 3 种基因,在此不需赘述。

[0103] 3 种脂肪酸合成酶基因的构建及表达盒的构建,例如,使各 DNA 片段的切断位点为相互互补的突出末端,通过连接酶反应,可规定该 DNA 片的顺序。且当表达盒中含有终止子时,从上游开始,可为启动子、上述脂肪酸合成酶基因、终止子的顺序。另外,用于构建重组表达载体的试剂类,即对于限制性内切酶、连接酶等的种类,无特别限定,可适宜选择使用市场销售的试剂。

[0104] 对上述重组表达载体的增殖方法(生产方法)也无特别限定,可使用以往的公知的方法。一般可将大肠杆菌作为宿主,使其在大肠杆菌内增殖即可。此时,可根据载体的种类,选择最适的大肠杆菌的种类。

[0105] (1-2-2) 转化过程

[0106] 本发明中进行的转化过程,只要将上述(1-2-1)栏中说明的重组表达载体导入植物细胞中,使其生产上述(1-1)栏中说明的脂肪酸合成酶即可。

[0107] 将上述重组表达载体导入植物细胞的方法(转化方法)无特别限定,可根据植物细胞,使用适合的以往公知的方法。具体地说,例如,可使用农杆菌的方法、及使用直接导入植物细胞的方法。使用农杆菌的方法,例如,可使用 Transformation of Arabidopsis thaliana by vacuum infiltration (<http://www.bch.msu.edu/pamgreen/protocol.htm>)。

[0108] 将重组表达载体直接导入植物细胞的方法,例如,可使用显微注射法、电击法(电穿孔法)、聚乙二醇法、基因枪法、原生质体融合法、磷酸钙法等。

[0109] 导入上述重组表达载体的植物细胞,例如,可例举为花、叶、根等的植物器官中的各组织的细胞、愈伤组织、悬浮培养细胞等。

[0110] 此处,本发明涉及的植物体的生产方法中,上述重组表达载体可适宜构建适合欲生产种类植物体的适当的载体,但也可预先构建通用的重组表达载体,再将其导入植物细胞。即,本发明涉及的植物体的生产方法,可包含上述(1-2-1)中说明的重组表达载体构建过程,也可不包括。

[0111] 另外,在宿主植物中含有 $\Delta 15$ 去饱和酶时,最好抑制此 $\Delta 15$ 去饱和酶的表达。这是因为,如图 1 所示,在大豆中生产的亚油酸会通过 $\Delta 15$ 去饱和酶转化为 α -亚麻酸。因此,为使在大豆中生产的全部亚油酸都转化为花生四烯酸的前体物质 γ -亚麻酸,应最好抑制此 $\Delta 15$ 去饱和酶的表达。抑制此 $\Delta 15$ 去饱和酶的表达的方法,可利用以往公知的基因工程学的方法,反义法、正义(共抑制)法、使双链 RNA 转录的 RNAi 法,无特别限定,例如,可优选使用如后述实施例中所示的 RNAi 法。根据此方法,可简便且确实地抑制 $\Delta 15$ 去饱和酶基因的表达。即本发明的花生四烯酸生产过程中,优选包含抑制宿主的 $\Delta 15$ 去饱和酶

表达的抑制过程,而且上述表达抑制过程,更优选通过 RNAi 法,抑制 $\Delta 15$ 去饱和酶表达的过程。

[0112] (1-2-3) 其他过程、其他方法

[0113] 本发明涉及的植物体的生产方法中,只要包含上述转化过程即可,而且可包含上述重组表达载体的构建过程,还可包含其他过程。具体地说,可例举为从转化后的植物体中筛选适当的转化体的筛选过程等。

[0114] 筛选的方法无特别限定,例如可将潮霉素抗性等的抗药性作为基准筛选,也可在育成转化体后,从植物体本身、或其任意的器官、组织中含有的花生四烯酸含量进行筛选。例如,可同时转导 GFP 等的荧光蛋白质,从视觉上筛选。

[0115] 本发明涉及的植物体的生产方法,因是将上述脂肪酸合成酶基因导入植物体,所以,从该植物体中,可通过有性繁殖或无性繁殖,获得只含有花生四烯酸的后代。从该植物体及其后代中可获得植物细胞、种子、果实、植株、愈伤组织、块茎、切穗、块根等的繁殖材料,并可以此为基础,大量生产该植物体。因此,本发明涉及的植物体的生产方法,还包含繁殖筛选后植物体的繁殖过程(量产过程)。

[0116] 本发明中的植物体,是指至少包含成熟了的植物个体、植物细胞、植物组织、愈伤组织、种子的任一个。且在此繁殖过程中繁殖的植物体的后代也包含于本发明。即本发明中,只要是最最终能成长发育成植物个体的状态,均认为是植物体。上述植物细胞中包含各种形态的植物细胞。有关的植物细胞,例如,包含悬浮培养细胞、原生质体、叶的切片等。并通过将这些植物细胞增殖·分化,可得到植物体。从植物细胞进行的植物体的再生,可根据植物细胞的种类,使用以往公知的方法进行。因此,本发明涉及的植物体的生产方法,还包含从植物细胞中再生植物体的再生过程。

[0117] 本发明涉及的植物体的生产方法,不限于用重组表达载体转化的方法,还可使用其他的方法。具体地说,例如,可将上述脂肪酸合成酶直接投给植物体。此时,为使最终利用的植物体的部位中能含有花生四烯酸,只要将脂肪酸合成酶投与幼年期的植物体即可。脂肪酸合成酶的投给方法无特别限定,可使用公知的各种方法。

[0118] (2) 通过本发明得到的花生四烯酸植物体、大豆及其有效性以及其利用

[0119] 本发明涉及的花生四烯酸植物体及大豆的生产方法,是与花生四烯酸生物合成有关的脂肪酸合成酶基因导入植物体及大豆。由此,与花生四烯酸合成体系有关的脂肪酸合成酶进行表达,该脂肪酸合成酶通过原本高等植物中不存在的花生四烯酸的生物合成途径,生产花生四烯酸。其结果,所得到的植物体会含有花生四烯酸。因此,本发明中包含由上述植物体的生产方法得到的、含有花生四烯酸的植物体及大豆。

[0120] (2-1) 本发明的有效性

[0121] 本发明可在植物体中生产花生四烯酸,但本发明的有效性无特别限定,可将含有花生四烯酸的植物体直接作为农作物、食品等进行流通,还可从该植物体中提取花生四烯酸,以利用此花生四烯酸。即本发明中也包含从根据上述植物体的生产方法生产的植物体中获得的花生四烯酸。

[0122] 在此,从含有上述花生四烯酸的油脂原料植物体中获得花生四烯酸的方法无特别限定,可利用以往公知的提取·纯化的方法。例如,可为按照从转基因大豆中获得豆油的要领榨油,并从其中分离·纯化花生四烯酸的方法。

[0123] 如后述的实施例所示,由实验证实了本发明涉及的转基因大豆,其性状的改变被子代继承了。这意味着通过栽培本发明涉及的转基因大豆,可大量生产含有花生四烯酸的大豆。因此,可以说在工业上是非常有用的发明。

[0124] 且如上所述,花生四烯酸除在动物的体内显示出种种功能外,还作为前列腺素的直接前体发挥重要的作用。而且花生四烯酸对老年痴呆症也具有改善作用。因此,含有花生四烯酸的植物体或从该植物体中得到的花生四烯酸,可应用于对老年痴呆症有改善作用的组合物(例如油脂组合物)、食品(保健食品等)及医药品等。此处的“组合物”,可含有花生四烯酸以外的任何成分,无特别限定。例如,作为花生四烯酸以外的油脂成分,还可含有 PC、DHA、EPA 等的 PUFA 等。且此处所述的“食品”,只要是通过经口摄取可摄入体内的均可,不限于片剂、液体、粉末等的剂型等。例如,可为包含在体内可溶的胶囊中含有花生四烯酸的油脂组合物的保健食品。

[0125] (2-2) 一本发明的利用例

[0126] 对本发明的利用领域、利用方法无特别限定,但举例来说,可为用于进行本发明涉及的植物体生产方法的试剂盒,即含有花生四烯酸的植物体制备试剂盒。

[0127] 此含有花生四烯酸的植物体制备试剂盒的具体实例,至少包含含有编码上述脂肪酸合成酶的基因的重组表达载体即可,更优选含有用于将上述重组表达载体导入植物细胞的试剂组。上述试剂组,可列举为对应于转化的种类的酶及缓冲液等。其他,可根据需要,添加微型离心管等的实验用材料。

[0128] 根据本发明涉及的含有花生四烯酸的植物体制备试剂盒,可容易地进行上述植物体的生产方法,确实且简便地生产含有花生四烯酸的植物体。

[0129] 以下用实施例,进一步详细说明本发明的实施形态。当然,本发明不限于以下实施例,关于更细致部分还可有各种形态,不需一一赘述。而且,本发明不限于上述实施形态,可在权利要求表示的范围内进行种种变更,对于适当组合各个公开的技术手段后所得到的实施形态,也包含于本发明的技术范围内。

[0130] 实施例

[0131] (I) 脂肪酸的分析

[0132] 脂质的提取·分析,遵照公知的方法[藤野安彦编(1978)生物化学实验法 9 学会出版中心、山田晃弘编(1989)生物化学实验法 24 学会出版中心)。首先,从基部切取 1 片在封闭式温室中栽培的转基因烟草的叶片。切取的叶片称量后水洗,用剪子剪成 5mm 见方。将切断的叶子约 1g 放入不锈钢制的 50ml 的容器中,加入氯仿/甲醇(1:2)溶液 35ml,放入玻璃珠(直径 0.4mm)7.5ml,并用均质机(CELL MASTERCM-100、井内制作所),以 10,000 转数 × 10 分钟进行处理。

[0133] 容器中的内容物用滤纸过滤,用氯仿/甲醇(1:2)溶液反复冲洗·过滤残渣,直到滤液为 90ml。滤液每 22.5ml 分注于容量为 50ml 的玻璃离心管中,并在各离心管中,添加氯仿 7.5ml、1% KCl 水溶液 13.5ml。离心管剧烈搅拌 10 分钟后,用 3,000rpm、离心 20 分钟。溶液分为 2 层,回收其下层的氯仿层。氯仿层移入预先称量的螺口试管(Φ 16mm × 125mm)中,在 Speed Vac(SAVANT 公司 SC210)中蒸发除去溶剂。称量螺口试管的重量,通过与试管的重量差求出回收的脂质的量。

[0134] 在螺口试管中的约 4mg 的油脂中,添加 10% 盐酸甲醇 2ml、二氯甲烷 1ml,加盖后,

进行 50℃、3 小时的加热处理,将脂质作为脂肪酸甲酯。此反应后,添加蒸馏水 1ml、正己烷 4ml,剧烈搅拌 5 分钟后,进行 3,000 转数 ×5 分钟的离心处理。将上层的正己烷层回收到其他的试管中,用 Speed Vac 蒸发除去正己烷。反复 2 次此操作,回收脂肪酸甲酯。脂肪酸甲酯溶解于 50 μ l 的乙腈中,用气相色谱法 (HewlettPackard 公司 HP-6800) 分析。分析条件如下表 1 所示。

[0135] 【表 1】

[0136] 气相色谱法分析条件

[0137]

色谱柱	Supelco SP-2330、Fused Silica Capillary Column、 30m×0.32mm ID,0.2 μ m
温度	Inj :240℃、Det :250℃、Oven :180℃ 3 分钟、 180℃→220℃ (2℃ /min)
柱流量	30cm/sec、压力 200 kPa、检测器 FID

[0138] 色谱图中的各峰值通过标准脂肪酸甲酯的保留时间和 GC-MASS (Hewlett Packard 公司 HP-5973) 分析测定,且由峰值面积测定各脂肪酸的比例。

[0139] (II) 烟草中来源于高山被孢霉 (*M. alpina*) 的基因的表达

[0140] (II-1) $\Delta 6$ 去饱和酶基因的表达

[0141] pE2113 (Plant Cell Physiol. 37, p45 (1996)), 是具有重复了增强子序列的花椰菜花叶病毒 35S (E1235S) 启动子和胭脂碱合酶 (nos) 终止子的质粒载体。将此 pE2113 用 SnaBI 酶切,再将通过插入 XhoI 接头 (TAKARA) 后得到的质粒进一步用 SacI 酶切·补平末端后,插入 BamHI 接头 (TAKARA),得到 pUE7。

[0142] 在将 pUE7 用 HindIII 和 EcoRI 酶切后所得到的 DNA 片段中,通过将具有 E1235S 启动子的片段、与用 HindIII 和 EcoRI 酶切后的植物转化用双元载体 pBINPLUS (Transgenicresearch 4, p288, (1995)) 连接,得到了 pSPB505。同时,将含有来源于被孢霉属的 $\Delta 6$ 去饱和酶基因的质粒 PMLD101 用 XhoI 酶切后,再用 BamHI 部分酶切,回收所得到的约 1.6kb 的 DNA 片段。此 DNA 片段、与将 pSPB505 用 XhoI 和 BamHI 酶切后所得到的双元载体部分 DNA 片段连接,得到了 pSPB559。此质粒中的被孢霉属 $\Delta 6$ 去饱和酶基因在 E1235S 启动子和 nos 终止子的控制下。

[0143] 根据公知的方法 (Plant J. 5, 81, (1994)), 将 pSPB559 导入农杆菌,再使用此重组农杆菌导入烟草。根据公知的方法 (Plant J. 5, 81, (1994)), 从所得到的重组烟草的叶片中提取 RNA,通过 Northern 杂交,选择表达来源于被孢霉属的 $\Delta 6$ 去饱和酶基因的系统。由上述 (I) 栏中所述方法分析这些烟草叶片的脂肪酸时,重组烟草的叶片中含有了宿主烟草中没有的 γ -亚麻酸 1.8%~7.3%。由此结果可知,来源于被孢霉属的 $\Delta 6$ 去饱和酶基因在植物中已起作用。

[0144] (II-2) $\Delta 6$ 去饱和酶基因及脂肪酸链延长酶基因的共表达

[0145] 通过将 pUCAP (Transgenic research 4, p288, (1995)) 用 AscI 酶切, 补平末端, 插入 PacI 接头, 制成 pUCAPP。再通过将 pE2113 用 SnaBI 酶切, 插入 BamHI 接头 (TAKARA), 得到 pUE6。将此 pUE6 用 SacI 酶切, 补平末端, 插入 SalI 接头 (TAKARA), 得到 pUE8。

[0146] 将用 HindIII 和 EcoRI 酶切此质粒 pUE8 后所得到的 DNA 片段中、具有 E1235S 启动子的片段、插入到 pUCAPP 的 Hind III-EcoRI 位点。将用 BamHI 及 SalI 酶切此质粒后的 DNA 片段、与用 BamHI 及 XhoI 酶切脂肪酸链延长酶的 cDNA 后所得到的 DNA 片段连接, 得到 pSPB1130。将用 PacI 酶切此质粒 pSPB1130 后所得到的约 2.3kb 的 DNA 片段、插入到 pBinPLUS 的 PacI 位点。选择脂肪酸链延长酶基因与 pBinPLUS 上的 nptII 基因转录方向相同的质粒, 作为 pSPB1157P。

[0147] 且用 PacI 酶切 pSPB599 后补平末端, 插入 AscI 接头, 作为 pSPB599A。将含有用 AscI 酶切此 pSPB599A 后所得到的 $\Delta 6$ 去饱和酶基因的 DNA 片段、插入到 pSPB1157P 的 AscI 位点, 得到 pSPB1157。

[0148] 将此二元质粒 pSPB1157 如上所述导入烟草中, 获得转基因烟草。其结果, 在脂肪酸链延长酶与 $\Delta 6$ 去饱和酶基因表达了烟草的叶片中, 确认生产出占全脂肪酸量 0.1%~5% 比例的二高- γ -亚麻酸。同时, 未进行转化的宿主烟草的叶片中, 未发现二高- γ -亚麻酸。由上述结果可知, 使用将来源于被孢霉属的 $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶及脂肪酸链延长酶基因构建于同一载体上的二元质粒转化的烟草中, $\Delta 6$ 脂肪酸去饱和酶与脂肪酸链延长酶进行共表达, 同时发挥了作用。

[0149] (II-3) $\Delta 6$ 去饱和酶基因与脂肪酸链延长酶基因和 $\Delta 5$ 去饱和酶基因的共表达

[0150] 通过将用 HindIII 和 SacII 酶切 pCGP1364 (PlantCell Physiol. 36, p1023, (1995)) 后所得到的约 1.3kb 的 DNA 片段, 与用 Pst I 酶切 pCGP1364, 补平末端后, 再用 SacII 酶切后得到的约 2.9kb 的 DNA 片段, 和用 SacI 酶切 pUCAPA, 补平末端后, 再用 HindIII 酶切后得到的约 2.7kb 的 DNA 片段连接, 得到 pSPB184。用 XbaI 和 KpnI 酶切此质粒, 将在 pCR2 亚克隆的 $\Delta 5$ 去饱和酶基因片段用 XbaI 和 KpnI 酶切回收, 再将 DNA 片段连接, 得到 pSPB1519A。

[0151] 用 AscI 酶切此 pSPB1519A 后, 插入到 pSPB1157 的 AscI 位点, 得到 pSPB1519。在此质粒 pSPB1519 上, ptII、 $\Delta 5$ 去饱和酶基因、链延长酶基因、 $\Delta 6$ 去饱和酶基因同向转录, $\Delta 5$ 去饱和酶基因、链延长酶基因、 $\Delta 6$ 去饱和酶基因在组成型启动子的控制下。

[0152] 用与上述相同的方法, 使用 pSPB1519, 获得了转化后的烟草, 并鉴定了 $\Delta 5$ 去饱和酶基因、链延长酶基因、 $\Delta 6$ 去饱和酶基因进行表达的转基因烟草。分析此转基因烟草叶片中的脂肪酸时, 未发现花生四烯酸的生产。此结果显示, 尽管 $\Delta 5$ 去饱和酶基因、链延长酶基因、 $\Delta 6$ 去饱和酶基因进行了转录, 但未能合成花生四烯酸, 说明在此转基因烟草中, 为进行花生四烯酸的生产, 只有 $\Delta 5$ 去饱和酶基因、链延长酶基因、 $\Delta 6$ 去饱和酶基因的转录是不充分的。

[0153] (II-4) $\Delta 5$ 去饱和酶的功能鉴定

[0154] 如前所述, 尽管转基因烟草的叶片中 $\Delta 5$ 去饱和酶基因已被转录, 但未能生产出花生四烯酸。其原因可能是作为 $\Delta 5$ 去饱和酶底物的二高- γ -亚麻酸的量不足, 也可能是 $\Delta 5$ 去饱和酶未起作用。

[0155] 因此, 对于 pSPB1519 转基因烟草, 通过从外界提供二高- γ -亚麻酸, 分析了是否

能生产花生四烯酸。分析方法根据 Qiu 等 (J. Biol. Chem. 276, p31561 (2001)) 的方法。即将鲜重 1g 的烟草叶片用剃刀切刻成小片,置于培养皿中,与 10ml、0.05% 二高- γ -亚麻酸钠水溶液在 24°C、缓慢振荡培养 4 小时。培养后,用水清洗 3 次,进行脂肪酸分析。

[0156] 其结果,从使用转化体 2 系统的分析中,鉴定出与二高- γ -亚麻酸共培养时花生四烯酸的合成,说明 $\Delta 5$ 去饱和酶在烟草的叶片中发挥了作用。由此可以认为,pSPB1519 转基因烟草中未能生成花生四烯酸的原因是,作为 $\Delta 5$ 去饱和酶底物的二高- γ -亚麻酸的量不充分。

[0157] (III) 大豆的转化

[0158] 大豆 (*Glycine max*) 的培养,原则上根据 Finer 等的方法 (*In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 35 :451 (1999)),将品种 Jack 的未成熟子叶 (3 ~ 5mm) 置于诱导培养基 (30g/l sucrose、40mg/l 2,4-D、B5vitamins 添加的 MS 培养基、pH 值为 7.0) 中,诱导体细胞胚。

[0159] 将诱导后的体细胞胚置于液体增殖培养基 [10g/l 蔗糖 (sucrose)、1g/l 天冬酰胺 (asparagine)、5mg/l 2,4-D、FNLite 培养基、pH 值为 5.8] 中增殖后,用基因枪法 (直径为 1.0 μ m 的金属颗粒和 1350dpi 的 Rupture Disk) 导入基因。将导入了此基因的体细胞胚置于增殖培养基中培养 1 星期后,又在添加了 15mg/l、30mg/l、45mg/l 的潮霉素 (hygromycin) 的增殖培养基中分别筛选了 1 个月,再移植到液体分化·成熟培养基 [30g/l sucrose、30g/l D-山梨糖醇 (Glucitol)、298.4mg/l L-蛋氨酸 (methionine)、4.38g/l L-谷氨酰胺 (glutamin)、FNLite 培养基、pH 值为 5.8] 中再分化。筛选后的体细胞胚移入分化·成熟培养基中后,随着逐渐增大 (此阶段还相当于未成熟胚)、发达,分化成鲜明的子叶和胚轴,直至成熟 (此阶段相当于成熟胚)。使成熟的体细胞胚干燥后在发芽培养基中发芽,以获得完整的植物体。液体振荡培养使用回转式振荡器进行,振荡速度为 100rpm。

[0160] (IV) 多基因表达用载体的改良

[0161] 已有的载体中的限制性内切酶识别位点基本上为 6 个碱基,将目的基因与启动子、终止子组合后的复数的表达盒插入到同一载体时,因目的基因中存在识别位点,所以很多时候不能利用限制性内切酶识别位点。此时,通过使用 8 个碱基的限制性内切酶识别位点可解决此问题,所以制备追加了 4 处 8 个碱基的限制性内切酶识别位点的载体。具体如下进行。

[0162] 首先,将具有 2 处 8 个碱基识别位点的 pUCAP 用 AscI 酶切后,插入 SgfI 接头,再用 PacI 酶切,插入 FseI 接头,制备具有 4 处 8 个碱基识别的限制性内切酶识别位点的质粒 pUCSAPF。其他,将用于亚克隆的 pUC19 用 HindIII 酶切后插入 SgfI 接头,再将用 EcoRI 酶切后插入 AscI 接头的质粒 pUCSA、pUC19 用 HindIII 酶切后插入 PacI 接头,再将用 EcoRI 酶切后插入 FseI 接头的质粒 pUCPF、pUC19 用 HindIII 酶切,插入 SgfI 接头,再进一步将用 EcoRI 酶切后插入 SgfI 接头的质粒 pUCSS、pUC19 用 HindIII 酶切后插入 FseI 接头,再用 EcoRI 酶切、插入 FseI 接头,从而制备了质粒 pUCFF。

[0163] (V) 用于脂肪酸合成酶基因植物表达的载体的构建

[0164] 用于生产花生四烯酸的载体,将来源于被孢霉属的 $\Delta 6$ 去饱和酶、脂肪酸链延长酶 (GLELO)、 $\Delta 5$ 去饱和酶的表达盒、及来源于大豆的 $\Delta 15$ 去饱和酶的 RNAi 表达盒与种子特异性启动子组合,制备了用于脂肪酸合成酶基因植物表达的载体。种子特异性启动子中使用了来源于大豆的伴大豆球蛋白 α' 亚基启动子 (Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 83

p8560(1986))。具体如下进行。

[0165] 首先,在 pUC19 多克隆位点的 HindIII 和 XbaI 之间,插入通过 PCR 扩增、限制性内切酶处理、且纯化后的伴大豆球蛋白启动子,在 SacI 和 EcoRI 之间,插入通过 PCR 扩增、限制性内切酶处理、且纯化后的甘露碱合成酶基因终止子 (pSPB1904)。PCR 反应是将亚克隆后目的序列的质粒作为模板进行。且用于 PCR 反应的引物,对于伴大豆球蛋白启动子,使用了引物 HinCprof (5'-AGTCAAGCTTAATTCAAACAAAAACG-3') (序列号 7)、和 XbaCpror (5'-CAGTTCTAGAAAATTCTTTAATACGG-3') (序列号 8)。甘露碱合成酶基因终止子,使用了引物 Sacmasf (5'-AGTCGAGCTCCAGCTTCCCTGAAACC-3') (序列号 9) 和、Ecomasr (5'-CATCATCTCGAGGGTGGTGACCATGGTGATCGC-3') (序列号 10)。

[0166] 用亚克隆中使用的 PCR 扩增的 DNA 片段,使用可全部、高精度扩增 DNA 的 KOD+ 聚合酶 (东洋纺株式会社),通过 94℃、预变性 2 分钟后,25 个 94℃·15 秒、68℃·1~3 分钟的循环的 PCR 反应进行了制备。在 pSPB1904 的 XbaI 和 SacI 间,将用 PCR 制备的 Δ5 去饱和酶、Δ6 去饱和酶、脂肪酸链延长酶的各 DNA 片段进行亚克隆,分别命名为 pSPB1909、pSPB1910、pSPB1911。

[0167] 将用 HindIII、EcoRI 酶切 pSPB1909 后得到的 Δ5 去饱和酶表达盒插入 pUCSA,再将用 HindIII、EcoRI 酶切 pSPB1911 后得到的链延长酶表达盒插入 pUCPF。并将其分别称为 pSPB1919、pSPB1920。再将用 PacI、FseI 酶切 pSPB1919 后得到的 Δ5 去饱和酶表达盒、和用 SgfI、AscI 酶切 pSPB1920 后得到的脂肪酸链延长酶表达盒,与用 HindIII、EcoRI 酶切 pSPB1910 后得到的 Δ6 去饱和酶表达盒整合进 pUCSAPF,制备了连接 3 个表达盒的质粒 pSPB1944。

[0168] 且由 35S 启动子-潮霉素抗性基因-nos 终止子组成的 HPT 表达盒在 pUCFF 的 HindIII 位点,由 35S 启动子-绿色荧光蛋白质基因-nos 终止子组成的 GFP 表达盒在 pUCSS 的 SphI 和 EcoRI 之间分别进行亚克隆,制备了 pSPB1918、pSPB1935。在 pSPB1944 的 FseI 位点,插入从 pSPB1918 切下的 HPT 表达盒,在 SgfI 位点插入从 pSPB1935 切下的 GFP 表达盒,从而制备了 pSPB1852。

[0169] 为将 Δ15 去饱和酶基因 (Accession No. P48625) 进行亚克隆,使用从大豆未成熟种子中提取的全 RNA 进行 RT-PCR。具体如下进行。

[0170] 逆转录反应使用用于 RT-PCR 的第一链合成试剂盒 (SuperScriptFirst-Strand Synthesis System for RT-PCR) (invitrogen 株式会社),用 Oligo (dT) 12~18 引物进行。以逆转录产物为模板,使用引物 det15-2-F 1 (5'-ATGGTTAAAGACACAAAGCCTTTAGCC-3') (序列号 11)、和 det15-2-R1 (5'-TCAGTCTCGTTGCGAGTGGAGG-3') (序列号 12) 进行了 PCR 反应。

[0171] PCR 反应是在 94℃、预变性 2 分钟后,进行 30 个 94℃·30 秒、55℃·30 秒、72℃·30 秒~1 分钟的循环,再进行 72℃、1 分钟的延伸。将被扩增的 DNA 片段用 TOPO 克隆试剂盒 (invitrogen 株式会社) 在 pCRII 载体进行亚克隆,以测定序列。将对于从亚克隆后的 Δ15 去饱和酶基因的起始密码子开始 5 碱基下游~591bp 的 DNA 片段附加了 BamHI、XhoI 识别序列的片段,与对 5 碱基下游~791bp 的 DNA 片段附加了 SacI、XhoI 识别序列的片段,通过 PCR 进行扩增、纯化。

[0172] 此时使用的引物,对于上述的约 591bp 片段,使用了引物 SOYF1-B (5'-TGGCCTGGGATCCTTAAAGACACAAAGCCTTTA-3') (序列号 13)、和 SOYR1-X (5'-GCACATCTCGAGGGATTGAAGTGAG

AGCCTTC-3') (序列号 14)。且对于上述约 791bp 片段,使用了引物 SOYF2-S(5'-GTCTGCGAGCTCTTAAAGACACAAAGCCTTTA-3') (序列号 15)、和 SOUR2-X(5'-CATCATCTCGAGGGTGGTGACCATG GTGATGC-3') (序列号 16)。

[0173] 此 2 种 DNA 片段为制造发夹结构,在 BamHI-XhoISacI 反向连接,以制备在伴大豆球蛋白启动子和 nos 终止子之间、BamHI、SacI 位点插入的 RNAi 表达盒 (pSPB1876)。从此 pSPB1876 切下 $\Delta 15$ RNAi 表达盒,插入到 pSPB1852 的 AscI 位点,制备了 pSPB1877。

[0174] pSPB1877 可用图 2 所示顺序制备。具体地说,首先,在 pUCSAPF2.7kbp 的 SgfI-AscI 位点导入 GLELO 基因片段 (在图中用 Con 表示的伴大豆球蛋白启动子、和图中用 mas 表示的甘露碱合成酶基因终止子之间,连接了 GLELOcDNA 的片段),且在 AscI-PacI 位点导入 $\Delta 6$ 去饱和酶基因片段 (Con 与 mas 之间连接了 $\Delta 6$ 去饱和酶 cDNA 的片段),在 PacI-FseI 位点导入 $\Delta 5$ 去饱和酶 (Con 与 mas 之间,连接了 $\Delta 5$ 去饱和酶 cDNA 的片段),以制备 pSPB1944。之后,将 pSPB1944 用 SgfI 和 FseI 处理后,在 SgfI 位点导入由 35S 启动子-绿色荧光蛋白质基因-nos 终止子组成的 GFP 表达盒,在 FseI 位点导入由 35S 启动子-潮霉素抗性基因-nos 终止子组成的 HPT 表达盒,以制备 pSB1852。最后将 $\Delta 15$ RNAi 表达盒插入到 pSPB1852 的 AscI 位点,以制备 pSPB1877。

[0175] 如此制备的 pSB1877 的全图如图 3 所示。在 pSB1877 中,连接 GFP 表达盒、GLELO、 $\Delta 15$ RNAi 表达盒、 $\Delta 6$ 去饱和酶、 $\Delta 5$ 去饱和酶、HPT 表达盒,成为表达多基因的载体。

[0176] (VI) 大豆的转化及表达分析

[0177] 将导入了 pSPB1877 的大豆不定胚分未成熟和成熟 2 阶段取样,进行了多基因的导入·表达分析。具体如下进行。

[0178] 将基因组 DNA 及 RNA 分别使用 DNeasy Plant Mini Kit 和 RNeasyPlant Mini Kit (QIAGEN 株式会社) 进行了制备。以提取的 DNA 200ng 为模板,进行 PCR 反应。此时使用的引物,使用了 det6f3(5'-TGGTGAAGGACAAGCACAA-3') (序列号 17) 和 det6r2(5'-ACAGACCAGGGTGAACATCA-3') (序列号 18)、引物 det5f4 (5'-CTTTGGATCCTTGATCGCCT-3') (序列号 19) 和 det5r3(5'-AGAACATGACGGTGTGCCAA-3') (序列号 20)、引物 XbaGLf(5'-CAGTTC TAGAGCCTTCTCACATTCCC-3') (序列号 21) 和 SacGLr(5'-AGTCGAGCTCTTACTGCAACTTCCTT-3') (序列号 22)、引物 HPTf1(5'-CCTGCGGGTAAATAGCTGCG-3') (序列号 23) 和 HPTr1(5'-CGTCAACCAAGCTCTGATAG-3') (序列号 24)、引物 E GFP-F1(5'-ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA-3') (序列号 25) 和 EGFP-R1(5'-AATGAACATGTCGAGCAGGTA-3') (序列号 26)。

[0179] PCR 反应,使用酶 ExTaq(TAKARA BIO 株式会社),用 94°C、预变性 2 分钟后,进行 30 个 94°C·30 秒、55°C·30 秒、72°C·30 秒~1 分钟的循环,再进行 72°C、1 分钟的延伸。由此结果可知,导入了 pSPB1877 的大豆中, $\Delta 6$ 去饱和酶、 $\Delta 5$ 去饱和酶、脂肪酸链延长酶、HPT 基因虽被导入,但 GFP 基因未被导入。使用提取的全 RNA 进行如上所述的 RT-PCR。RT-PCR 以逆转录产物为模板,使用了引物 det6f3(序列号 17) 和 det6r2(序列号 18)、引物 det5f4 和 det5r3、引物 GLEf(5'-GTGCTCGCTTATTTGGTCAC-3') (序列号 27) 和 GLER(5'-CGACATCATGCAGAACTGTG-3') (序列号 28)。与基因组 DNA 相同循环进行 PCR,分析了基因表达。其结果,在 pSPB1877 转基因大豆中,鉴定了 $\Delta 6$ 去饱和酶、 $\Delta 5$ 去饱和酶、脂肪酸链延长酶的表达。

[0180] (VII) 转基因大豆的脂质分析

[0181] 从 pSPB1877 转基因大豆的成熟胚 1g 中,按照上述 (I) 栏中的方法提取脂质,并通过气相色谱法及质谱分析装置,进行了脂肪酸的分析。其结果如下表 2 所示。

[0182] 【表 2】

[0183]

	Control (%)	pSPB1877 (%)
亚油酸	56.28	43.96
α 亚麻酸	7.6	6.52
γ 亚麻酸	0	2.77
二高 γ 亚麻酸	0	1.73
花生四烯酸	0	2.1

[0184] 如表 2 所示,在 pSPB1877 转基因大豆的成熟胚中,原本在大豆中不能生物合成的 γ -亚麻酸、二高- γ -亚麻酸、花生四烯酸,对于全脂肪酸,分别以 2.77%、1.73%、2.10% 的比例合成了。且野生型大豆的脂质中,不含有 γ -亚麻酸、二高- γ -亚麻酸、花生四烯酸。

[0185] 由上述结果可知,根据本发明涉及的植物体的生产方法,可在大豆中生产出花生四烯酸。

[0186] (VIII)

[0187] 从 pSPB1877 转基因大豆的 1 粒种子中,按照上述 (I) 栏中所述的方法提取脂质,通过气相色谱法及质谱分析装置,进行了转基因大豆的种子中含有的脂肪酸的分析。其结果如下表 3 所示

[0188] 【表 3】

[0189]

	Control 种子 (%)	pSPB1877 种子 (%)
亚油酸	57.86	51.19
α 亚麻酸	9.27	1.92
γ 亚麻酸	0	2.49
二高 γ 亚麻酸	0	1.05
花生四烯酸	0	0.83

[0190] 如表 3 所示,在 pSPB1877 转基因大豆的种子中,原本在野生型大豆中不能生物合成的 γ -亚麻酸、二高- γ -亚麻酸、花生四烯酸,对于全脂肪酸量,分别以 2.49%、1.05%、0.83% 的比例合成了。且由于转化体的 α -亚麻酸量减少到了野生型大豆表达量的约

20%，所以，可认为通过 RNAi，产生了 $\Delta 15$ 去饱和酶的表达抑制。

[0191] 由上所述，从转化体种子的脂肪酸组成发生了变化上，可说明改变了的脂肪酸的性状向转基因大豆的子代大豆中传递了。因此，通过栽培此重组大豆，可大量获得具有改变了脂肪酸组成的大豆种子。

[0192] (IX)

[0193] 播种积累了花生四烯酸的 pSPB1877 转基因大豆的 T1 种子，采收其子代的 T2 种子。以从 T1 植物的叶片中提取的 DNA 为模板，将 $\Delta 6$ 去饱和酶、链延长酶、 $\Delta 5$ 去饱和酶的基因组 PCR 按上述 (VI) 栏的方法进行，鉴定出 T1 植物中遗传了此 3 个基因。且将 T1 植物的叶片中的 DNA 通过 Nucleon Phytopure (Amersham) 制备，使用 DIG DNALabeling kit (Roche •Diagnostics) 和上述 (VI) 栏中所述的引物，制备 $\Delta 6$ 去饱和酶、链延长酶、 $\Delta 5$ 去饱和酶的探针，并进行 Southern blot 分析。可鉴定出 T1 植物中导入了至少 2 拷贝的结构。进行 T2 种子脂质分析的结果，如表 4 所示，原本在野生型大豆中不能生物合成的 γ -亚麻酸、二高- γ -亚麻酸、花生四烯酸，对于全脂肪酸量，分别以 1.71%、0.55%、0.53% 的比例合成了。且通过种子的 RT-PCR，鉴定了 $\Delta 6$ 去饱和酶、链延长酶、 $\Delta 5$ 去饱和酶的表达。因此，可证明子代中稳定继承了导入基因，脂肪酸组成改变的性状也被继承了。

[0194] 通过 RT-PCR，检测内源性 $\Delta 15$ 去饱和酶 (Accession No. L22964) 的转录物的量时，未能检测出转录物。由此可知，通过 RNAi，可有效地抑制 $\Delta 15$ 去饱和酶的转录，并因此降低了 α -亚麻酸的含量。

[0195] 【表 4】

[0196]

	Control 种子 (%)	pSPB1877-1 T2 种子 (%)
亚油酸	57.86	53.27
α 亚麻酸	9.27	3.07
γ 亚麻酸	0	1.71
二高 γ 亚麻酸	0	0.55
花生四烯酸	0	0.53

[0197] 综上所述，根据本发明涉及的油脂原料植物的生产方法，可获得原本在高等植物中不能生产的、含有花生四烯酸的植物体。因从此植物体中可大量且简便地获得花生四烯酸，所以，使用此花生四烯酸，可进行保健食品、医药品的制造•贩卖。即本发明可用于食品行业、制药行业及其相关行业。并且，由于本发明可赋予植物体以新的附加价值，所以，还可用于农业领域。

序列表 (SEQUENCE LISTING)

- [0198] <110> 三得利株式会社 (SUNTORY LIMITED)
- [0199] <120> 含有花生四烯酸的植物体及其植物体的利用 (Arachidonic acid-containing plants and use of the plants)
- [0200] and use of the plants)
- [0201] <130>SU0423
- [0202] <140>
- [0203] <141>
- [0204] <150>JP 2003-419124
- [0205] <151>2003-12-17
- [0206] <150>JP 2004-097089
- [0207] <151>2004-03-29
- [0208] <160>28
- [0209] <170>PatentIn Ver. 2.1
- [0210] <210>1
- [0211] <211>457
- [0212] <212>PRT
- [0213] <213> 高山被孢霉 (*Mortierella alpina*)
- [0214] <400>1
- [0215] Met Ala Ala Ala Pro Ser Val Arg Thr Phe Thr Arg Ala Glu Ile Leu
- [0216] 1 5 10 15
- [0217] Asn Ala Glu Ala Leu Asn Glu Gly Lys Lys Asp Ala Glu Ala Pro Phe
- [0218] 20 25 30
- [0219] Leu Met Ile Ile Asp Asn Lys Val Tyr Asp Val Arg Glu Phe Val Pro
- [0220] 35 40 45
- [0221] Asp His Pro Gly Gly Ser Val Ile Leu Thr His Val Gly Lys Asp Gly
- [0222] 50 55 60
- [0223] Thr Asp Val Phe Asp Thr Phe His Pro Glu Ala Ala Trp Glu Thr Leu
- [0224] 65 70 75 80
- [0225] Ala Asn Phe Tyr Val Gly Asp Ile Asp Glu Ser Asp Arg Ala Ile Lys
- [0226] 85 90 95
- [0227] Asn Asp Asp Phe Ala Ala Glu Val Arg Lys Leu Arg Thr Leu Phe Gln
- [0228] 100 105 110
- [0229] Ser Leu Gly Tyr Tyr Asp Ser Ser Lys Ala Tyr Tyr Ala Phe Lys Val
- [0230] 115 120 125
- [0231] Ser Phe Asn Leu Cys Ile Trp Gly Leu Ser Thr Phe Ile Val Ala Lys
- [0232] 130 135 140

[0233]	Trp Gly Gln Thr Ser Thr Leu Ala Asn Val Leu Ser Ala Ala Leu Leu
[0234]	145 150 155 160
[0235]	Gly Leu Phe Trp Gln Gln Cys Gly Trp Leu Ala His Asp Phe Leu His
[0236]	165 170 175
[0237]	His Gln Val Phe Gln Asp Arg Phe Trp Gly Asp Leu Phe Gly Ala Phe
[0238]	180 185 190
[0239]	Leu Gly Gly Val Cys Gln Gly Phe Ser Ser Ser Trp Trp Lys Asp Lys
[0240]	195 200 205
[0241]	His Asn Thr His His Ala Ala Pro Asn Val His Gly Glu Asp Pro Asp
[0242]	210 215 220
[0243]	Ile Asp Thr His Pro Leu Leu Thr Trp Ser Glu His Ala Leu Glu Met
[0244]	225 230 235 240
[0245]	Phe Ser Asp Val Pro Asp Glu Glu Leu Thr Arg Met Trp Ser Arg Phe
[0246]	245 250 255
[0247]	Met Val Leu Asn Gln Thr Trp Phe Tyr Phe Pro Ile Leu Ser Phe Ala
[0248]	260 265 270
[0249]	Arg Leu Ser Trp Cys Leu Gln Ser Ile Met Phe Val Leu Pro Asn Gly
[0250]	275 280 285
[0251]	Gln Ala His Lys Pro Ser Gly Ala Arg Val Pro Ile Ser Leu Val Glu
[0252]	290 295 300
[0253]	Gln Leu Ser Leu Ala Met His Trp Thr Trp Tyr Leu Ala Thr Met Phe
[0254]	305 310 315 320
[0255]	Leu Phe Ile Lys Asp Pro Val Asn Met Ile Val Tyr Phe Leu Val Ser
[0256]	325 330 335
[0257]	Gln Ala Val Cys Gly Asn Leu Leu Ala Ile Val Phe Ser Leu Asn His
[0258]	340 345 350
[0259]	Asn Gly Met Pro Val Ile Ser Lys Glu Glu Ala Val Asp Met Asp Phe
[0260]	355 360 365
[0261]	Phe Thr Lys Gln Ile Ile Thr Gly Arg Asp Val His Pro Gly Leu Phe
[0262]	370 375 380
[0263]	Ala Asn Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asn Tyr Gln Ile Glu His His Leu
[0264]	385 390 395 400
[0265]	Phe Pro Ser Met Pro Arg His Asn Phe Ser Lys Ile Gln Pro Ala Val
[0266]	405 410 415
[0267]	Glu Thr Leu Cys Lys Lys Tyr Gly Val Arg Tyr His Thr Thr Gly Met
[0268]	420 425 430
[0269]	Ile Glu Gly Thr Ala Glu Val Phe Ser Arg Leu Asn Glu Val Ser Lys
[0270]	435 440 445
[0271]	Ala Ala Ser Lys Met Gly Lys Ala Gln

[0272] 4504 55

[0273] <210>2

[0274] <211>1371

[0275] <212>DNA

[0276] <213> 高山被孢霉 (*Mortierella alpina*)

[0277] <400>2

[0278] atggctgctg ctcccagtgt gaggacgttt actcgggccc agattttgaa tgccgaggcc 60

[0279] ctgaatgagg gcaagaagga tgccgaggca ccctttctga tgatcattga caacaaggtg 120

[0280] tacgatgtcc gcgagtttgt cctgatcat cccggtggaa gtgtgattct cacgcacgtt 180

[0281] ggcaaggacg gcactgacgt ctttgacact ttccacccc aggctgcttg ggagactctt 240

[0282] gccaaactttt acgttggtga tattgatgag agcgatcgtg ccatcaagaa tgatgacttt 300

[0283] gcggccgagg ttcgcaagct gcgcaccttg ttccagtcce ttggctacta cgactcgtcc 360

[0284] aaggcatact atgccttcaa ggtctcgttc aacctctgca tctggggctt gtcgactttc 420

[0285] attgttgcca agtggggcca gacctcgacc ctgccaacg tgctctcggc tgcgctcttg 480

[0286] ggtctcttct ggcagcagtg cggatggttg gcgcacgact ttttgacca ccaggcttcc 540

[0287] caggaccgtt tctggggtga tcttttcggc gccttcttgg gaggtgtctg ccagggttcc 600

[0288] tcgtctcct ggtggaagga caagcacaac actcaccacg ctgctcccaa cgtccacggc 660

[0289] gaggatcccg acattgacac tcacctctg ttgacctgga gtgagcatgc tctggagatg 720

[0290] ttctcggatg ttctgacga ggagctgacc cgtatgtggt cgcgcttcat ggtcctcaac 780

[0291] cagacctggt tctacttccc cattctctcg tttgcccgtc tgtcctggtg cctccagtcc 840

[0292] attatgtttg ttctgccc aa cggtcaggcc cacaagccct ctggagcgcg tgtgcccatt 900

[0293] tcgttggtcg agcagctgtc tctggctatg cactggacct ggtacctcgc caccatgttc 960

[0294] ctgttcatta aggatcccg caacatgatt gtgtactttt tgggtgctgca ggctgtttgc 1020

[0295] ggcaacttgt tggcgattgt gttctcgtc aaccacaacg gcatgcctgt gatctccaag 1080

[0296] gaggaagcgg tcgatatgga cttcttcacc aagcagatca tcacgggtcg tgatgttcac 1140

[0297] cctggtctgt ttgccaaactg gttcacgggt ggattgaact accagattga gcaccacttg 1200

[0298] ttcccttga tgecccgcc caacttttca aagatccagc ctgctgtcga gactttgtgc 1260

[0299] aaaaagtacg gtgtccgata ccataccact ggtatgatcg agggaactgc agaggtcttt 1320

[0300] agccgtttga acgaggtctc caaggcggcc tccaagatgg gcaaggcaca g 1371

[0301] <210>3

[0302] <211>318

[0303] <212>PRT

[0304] <213> 高山被孢霉 (*Mortierella alpina*)

[0305] <400>3

[0306] Met Glu Ser Ile Ala Gln Phe Leu Pro Ser Lys Met Pro Gln Asp Leu

[0307] 1 5 10 15

[0308] Phe Ile Asp Leu Ala Arg Ala Ile Gly Val Gln Ala Ala Pro Tyr Val

[0309] 20 25 30

[0310] Asp Pro Leu Glu Ala Ala Leu Val Ala Gln Ala Glu Lys Phe Phe Pro

[0311]	35	40	45
[0312]	Thr Val Val His His Thr Arg Gly Phe Leu Val Ala Val Glu Ser Pro		
[0313]	50	55	60
[0314]	Leu Ala Arg Glu Leu Pro Leu Met Asn Pro Phe His Val Leu Leu Ile		
[0315]	65	70	75
[0316]	Ala Leu Ala Tyr Leu Val Thr Val Phe Val Gly Met Gln Ile Met Lys		
[0317]	85	90	95
[0318]	Asn Phe Glu Arg Phe Glu Val Lys Thr Phe Ser Leu Phe His Asn Phe		
[0319]	100	105	110
[0320]	Cys Leu Val Ser Ile Ser Ala Tyr Met Cys Gly Gly Ile Leu Tyr Glu		
[0321]	115	120	125
[0322]	Ala Tyr Gln Ala Asn Tyr Gly Leu Phe Glu Asn Ala Ala Asp His Thr		
[0323]	130	135	140
[0324]	Val Gln Gly Leu Pro Met Ala Lys Met Ile Trp Leu Phe Tyr Phe Ser		
[0325]	145	150	155
[0326]	Lys Ile Met Glu Phe Val Asp Thr Met Ile Met Val Leu Lys Lys Asn		
[0327]	165	170	175
[0328]	Asn Arg Gln Ile Ser Phe Leu His Val Tyr His His Ser Ser Ile Phe		
[0329]	180	185	190
[0330]	Thr Ile Trp Trp Leu Val Thr Phe Val Ala Pro Asn Gly Glu Ala Tyr		
[0331]	195	200	205
[0332]	Phe Ser Ala Ala Leu Asn Ser Phe Ile His Val Ile Met Tyr Gly Tyr		
[0333]	210	215	220
[0334]	Tyr Phe Leu Ser Ala Leu Gly Phe Lys Gln Val Ser Phe Ile Lys Phe		
[0335]	225	230	235
[0336]	Tyr Ile Thr Arg Ser Gln Met Thr Gln Phe Cys Met Met Ser Ile Gln		
[0337]	245	250	255
[0338]	Ser Ser Trp Asp Met Tyr Ala Met Lys Val Leu Gly Arg Pro Gly Tyr		
[0339]	260	265	270
[0340]	Pro Phe Phe Ile Thr Ala Leu Leu Trp Phe Tyr Met Trp Thr Met Leu		
[0341]	275	280	285
[0342]	Gly Leu Phe Tyr Asn Phe Tyr Arg Lys Asn Ala Lys Leu Ala Lys Gln		
[0343]	290	295	300
[0344]	Ala Lys Ile Asp Ala Ala Lys Glu Lys Ala Arg Lys Leu Gln		
[0345]	305	310	315
[0346]	<210>4		
[0347]	<211>954		
[0348]	<212>DNA		
[0349]	<213>高山被孢霉 (Mortierella alpina)		

[0350] <400>4
 [0351] atggagtcga ttgcgcaatt cctcccctca aagatgccgc aagatctggt tattgacctt 60
 [0352] gcaagggccca tcggtgtcca ggccgcaccc tatgtcgacc ctctcgaggc agcgcttgtg 120
 [0353] gcccaggccg agaagttctt ccccacggtc gttcatcaca cgcgcggtt tttggtcgcg 180
 [0354] gtcgagtcac ccttgccccg tgagctgccc ttgatgaacc cttccacgt gctgttgatc 240
 [0355] gcgctcgctt acttggtcac ggtctttgtg ggcatgcaga tcatgaagaa ctttgaacgg 300
 [0356] ttcgaggtea agacgttctc gctcttccac aacttttgtc tggctctgat cagtgcctac 360
 [0357] atgtgcggcg ggatcttgta cgaggcttac caggccaact atggactggt tgagaacgcg 420
 [0358] gccgatcata ccgtccaggg tcttctatg gccaatga tctggctctt ctacttctcc 480
 [0359] aagatcatgg agtttgtcga cccatgatc atggctctta agaagaacaa ccgccagatc 540
 [0360] tcgttcttgc acgtctacca ccacagctcc atcttccacca tctgggtggtt ggtcaccttt 600
 [0361] gttgcacca atggtgaagc ctacttctcg gctgcgttga actcgttcat ccacgtgatc 660
 [0362] atgtacggct actacttctt gtcgccttg ggcttcaagc aggtgtcggt catcaagttc 720
 [0363] tacatcacgc gttcgcagat gacgcagttc tgcattgatg cgatccagtc ctctggggac 780
 [0364] atgtatgcca tgaaggtgct tggccgcccc ggataccctt tcttcatcac cgccctgctt 840
 [0365] tggttctaca tgtggacat gctcggactc ttctacaact tctacagaaa gaacgccaag 900
 [0366] ttggccaagc aggccaagat cgatgctgcc aaggagaagg caaggaagtt gcag 954
 [0367] <210>5
 [0368] <211>446
 [0369] <212>PRT
 [0370] <213> 高山被孢霉 (*Mortierella alpina*)
 [0371] <400>5
 [0372] Met Gly Thr Asp Gln Gly Lys Thr Phe Thr Trp Gln Glu Leu Ala Ala
 [0373] 1 5 10 15
 [0374] Hi s Asn Thr Glu Asp Ser Leu Leu Leu Ala Ile Arg Gly Asn Val Tyr
 [0375] 20 25 30
 [0376] Asp Val Thr Lys Phe Leu Ser Arg His Pro Gly Gly Thr Asp Thr Leu
 [0377] 35 40 45
 [0378] Leu Leu Gly Ala Gly Arg Asp Val Thr Pro Val Phe Glu Met Tyr His
 [0379] 50 55 60
 [0380] Glu Phe Gly Ala Ala Glu Ala Ile Met Lys Lys Tyr Tyr Val Gly Thr
 [0381] 65 70 75 80
 [0382] Leu Val Ser Asn Glu Leu Pro Ile Phe Pro Glu Pro Thr Val Phe His
 [0383] 85 90 95
 [0384] Lys Thr Ile Lys Gly Arg Val Glu Ala Tyr Phe Lys Asp Arg Asn Met
 [0385] 100 105 110
 [0386] Asp Ser Lys Asn Arg Pro Glu Ile Trp Gly Arg Tyr Ala Leu Ile Phe
 [0387] 115 120 125
 [0388] Gly Ser Leu Ile Ala Ser Tyr Tyr Ala Gln Leu Phe Val Pro Phe Val

[0389]	130	135	140
[0390]	Val Glu Arg Thr Trp Leu Gln Val Val Phe Ala Ile Ile Met Gly Phe		
[0391]	145	150	155
[0392]	Ala Cys Ala Gln Val Gly Leu Asn Pro Leu His Asp Ala Ser His Phe		
[0393]		165	170
[0394]	Ser Val Thr His Asn Pro Thr Val Trp Lys Ile Leu Gly Ala Thr His		
[0395]		180	185
[0396]	Asp Phe Phe Asn Gly Ala Ser Tyr Leu Val Trp Met Tyr Gln His Met		
[0397]		195	200
[0398]	Leu Gly His His Pro Tyr Thr Asn Ile Ala Gly Ala Asp Pro Asp Val		
[0399]	210	215	220
[0400]	Ser Thr Ser Glu Pro Asp Val Arg Arg Ile Lys Pro Asn Gln Lys Trp		
[0401]	225	230	235
[0402]	Phe Val Asn His Ile Asn Gln His Met Phe Val Pro Phe Leu Tyr Gly		
[0403]		245	250
[0404]	Leu Leu Ala Phe Lys Val Arg Ile Gln Asp Ile Asn Ile Leu Tyr Phe		
[0405]		260	265
[0406]	Val Lys Thr Asn Asp Ala Ile Arg Val Asn Pro Ile Ser Thr Trp His		
[0407]		275	280
[0408]	Thr Val Met Phe Trp Gly Gly Lys Ala Phe Phe Val Trp Tyr Arg Leu		
[0409]	290	295	300
[0410]	Ile Val Pro Met Gln Tyr Leu Pro Leu Ser Lys Val Leu Leu Leu Phe		
[0411]	305	310	315
[0412]	Thr Val Ala Asp Met Val Ser Ser Tyr Trp Leu Ala Leu Thr Phe Gln		
[0413]		325	330
[0414]	Ala Asn His Val Val Glu Glu Val Gln Trp Pro Leu Pro Asp Glu Asn		
[0415]		340	345
[0416]	Gly Ile Ile Gln Lys Asp Trp Ala Ala Met Gln Val Glu Thr Thr Gln		
[0417]		355	360
[0418]	Asp Tyr Ala His Asp Ser His Leu Trp Thr Ser Ile Thr Gly Ser Leu		
[0419]	370	375	380
[0420]	Asn Tyr Gln Ala Val His His Leu Phe Pro Asn Val Ser Gln His His		
[0421]	385	390	395
[0422]	Tyr Pro Asp Ile Leu Ala Ile Ile Lys Asp Thr Cys Ser Glu Tyr Lys		
[0423]		405	410
[0424]	Val Pro Tyr Leu Val Lys Asp Thr Phe Trp Gln Ala Phe Ala Ser His		
[0425]		420	425
[0426]	Leu Glu His Leu Arg Val Leu Gly Leu Arg Pro Lys Glu Glu		
[0427]		435	440

- [0428] <210>6
- [0429] <211>1338
- [0430] <212>DNA
- [0431] <213> 高山被孢霉 (*Mortierella alpina*)
- [0432] <400>6
- [0433] atgggtacgg accaaggaaa aaccttcacc tggcaagaac tcgcgggcgca taacaccgag 60
- [0434] gacagcctcc ttttggetat cegtggcaat gtatacgatg tcacaaagtt cttgagccgt 120
- [0435] catcctggtg gaacggatac tctcttgctc ggagctggcc gagatgtcac tccggttttt 180
- [0436] gagatgtacc acgagtttgg agctgcagag gctatcatga agaagtacta tgttggcaca 240
- [0437] ctggtctcaa atgagttgcc catcttccca gagccaacgg tgttccataa gaccatcaag 300
- [0438] ggcagagttg aggcatactt taaggaccgg aacatggatt ccaagaacag accagagatc 360
- [0439] tggggacgat atgctctcat ctttggatec ttgategcct cttactacgc gcagctcttt 420
- [0440] gtaccgttcg tggtcgaacg tacatggctc cagggtggtg ttgctatcat catgggattt 480
- [0441] gcgtgcgcgc aagtcggatt gaacctctt cacgatgcct cccacttttc agtgaccac 540
- [0442] aaccccaccg tttggaagat tctcggagcc acgcacgact ttttcaacgg agcatcgtat 600
- [0443] ctcgtgtgga tgtaccaaca tatgctcgge catcatccct ataccaacat tgctggagct 660
- [0444] gatcccgatg tgtecgacct tgagcccgat gttcgtcgta tcaagcccaa ccaaaagtgg 720
- [0445] ttcgtcaacc acatcaacca gcacatgttt gttcctttcc tgtacggact gctggcgttc 780
- [0446] aaggtgcgca tccaggacat caacatcttg tactttgtca agaccaatga cgccattcgt 840
- [0447] gtcaacccca tctcgacttg gcacaccgtc atgttctggg gcggaaaggc cttctttgtc 900
- [0448] tgggtaccgct tgatcgttcc tatgcagtat ctgcccctga gcaaggtggt gctcttgttt 960
- [0449] accgtcgcag acatggtctc ttcttactgg ctggcgctga cttccagge gaaccagtt 1020
- [0450] gttgaggagg ttcagtggcc attgcctgat gagaatggaa tcatcaaaa ggattgggca 1080
- [0451] gccatgcagg tcgagactac tcaggattac gcccacgatt cgcacctctg gaccagcatc 1140
- [0452] acgggcagct tgaactacca agccgttcat catctgttcc cgaacgtttc ccagcatcac 1200
- [0453] taccctgata tcttggetat catcaaggac acctgcagcg agtacaaggt gccatacctc 1260
- [0454] gtcaaggata ctttttggea agcgtttgct tcacatttgg agcacttgcg tgtgcttgg 1320
- [0455] ctctgtccca aggaagag 1338
- [0456] <210>7
- [0457] <211>26
- [0458] <212>DNA
- [0459] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- [0460] <220>
- [0461] <223> 人工序列的记录 :引物 HinCprof (Description of Artificial Sequence :
Primer
- [0462] HinCprof)
- [0463] <400>7
- [0464] agtcaagctt aattcaaca aaaacg 26
- [0465] <210>8

[0466]	<211>26	
[0467]	<212>DNA	
[0468]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
[0469]	<220>	
[0470]	<223> 人工序列的记录:引物 XbaCpror(Description of Artificial Sequence : Primer	
[0471]	XbaCpror)	
[0472]	<400>8	
[0473]	cagttctaga aaattcttta atacgg	26
[0474]	<210>9	
[0475]	<211>26	
[0476]	<212>DNA	
[0477]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
[0478]	<220>	
[0479]	<223> 人工序列的记录:引物 Sacmasf(Description of Artificial Sequence : Primer	
[0480]	Sacmasf)	
[0481]	<400>9	
[0482]	agtcgagctc cagcttcctt gaaacc	26
[0483]	<210>10	
[0484]	<211>33	
[0485]	<212>DNA	
[0486]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
[0487]	<220>	
[0488]	<223> 人工序列的记录:引物 Ecomasr(Description of Artificial Sequence : Primer	
[0489]	Ecomasr)	
[0490]	<400>10	
[0491]	catcatctcg aggggtggtga ccatggtgat cgc	33
[0492]	<210>11	
[0493]	<211>27	
[0494]	<212>DNA	
[0495]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
[0496]	<220>	
[0497]	<223> 人工序列的记录:引物 det15-2-f1(Description of Artificial Sequence :Primer	
[0498]	det15-2-f1)	
[0499]	<400>11	
[0500]	atggttaaag acacaaagcc tttagcc	27

- [0501] <210>12
- [0502] <211>22
- [0503] <212>DNA
- [0504] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- [0505] <220>
- [0506] <223> 人工序列的记录: 引物 det15-2-r1(Description of Artificial Sequence :Primer
- [0507] det15-2-r1)
- [0508] <400>12
- [0509] tcagtctcgt tgcgagtgga gg 22
- [0510] <210>13
- [0511] <211>33
- [0512] <212>DNA
- [0513] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- [0514] <220>
- [0515] <223> 人工序列的记录: 引物 SOYF1-B(Description of Artificial Sequence : Primer
- [0516] SOYF1-B)
- [0517] <400>13
- [0518] tggcctggga tccttaaaga cacaagcct tta 33
- [0519] <210>14
- [0520] <211>32
- [0521] <212>DNA
- [0522] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- [0523] <220>
- [0524] <223> 人工序列的记录: 引物 SOYR1-X(Description of Artificial Sequence : Primer
- [0525] SOYR1-X)
- [0526] <400>14
- [0527] gcacatctcg agggattgaa gtgagagcct tc 32
- [0528] <210>15
- [0529] <211>32
- [0530] <212>DNA
- [0531] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- [0532] <220>
- [0533] <223> 人工序列的记录: 引物 SOYF2-S(Description of Artificial Sequence : Primer
- [0534] SOYF2-S)
- [0535] <400>15

[0536]	gtctgcgagc tcttaaagac acaaagcctt ta	32
[0537]	<210>16	
[0538]	<211>32	
[0539]	<212>DNA	
[0540]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
[0541]	<220>	
[0542]	<223> 人工序列的记录 :引物 SOUR2-X(Description of Artificial Sequence : Primer	
[0543]	SOUR2-X)	
[0544]	<400>16	
[0545]	catcatctcg aggggtggtga ccatggtgat gc	32
[0546]	<210>17	
[0547]	<211>20	
[0548]	<212>DNA	
[0549]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
[0550]	<220>	
[0551]	<223> 人工序列的记录 :引物 det6f3(Description of Artificial Sequence : Primer det6f3)	
[0552]	<400>17	
[0553]	tggtggaagg acaagcacao	20
[0554]	<210>18	
[0555]	<211>20	
[0556]	<212>DNA	
[0557]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
[0558]	<220>	
[0559]	<223> 人工序列的记录 :引物 det6r2(Description of Artificial Sequence : Primer det6r2)	
[0560]	<400>18	
[0561]	acagaccagg gtgaacatca	20
[0562]	<210>19	
[0563]	<211>20	
[0564]	<212>DNA	
[0565]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
[0566]	<220>	
[0567]	<223> 人工序列的记录 :引物 det5f4(Description of Artificial Sequence : Primer det5f4)	
[0568]	<400>19	
[0569]	ctttgatcc ttgatgcct	20
[0570]	<210>20	

- [0571] <211>20
- [0572] <212>DNA
- [0573] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- [0574] <220>
- [0575] <223> 人工序列的记录:引物 det5r3(Description of Artificial Sequence :
Primer det5r3)
- [0576] <400>20
- [0577] agaacatgac ggtgtgccaa 20
- [0578] <210>21
- [0579] <211>26
- [0580] <212>DNA
- [0581] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- [0582] <220>
- [0583] <223> 人工序列的记录:引物 XbaGLf(Description of Artificial Sequence :
Primer XbaGLf)
- [0584] <400>21
- [0585] cagttctaga gccttctcac attccc 26
- [0586] <210>22
- [0587] <211>26
- [0588] <212>DNA
- [0589] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- [0590] <220>
- [0591] <223> 人工序列的记录:引物 SacGLr(Description of Artificial Sequence :
Primer SacGLr)
- [0592] <400>22
- [0593] agtcgagctc ttactgcaac ttcctt 26
- [0594] <210>23
- [0595] <211>20
- [0596] <212>DNA
- [0597] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- [0598] <220>
- [0599] <223> 人工序列的记录:引物 HPTf1(Description of Artificial Sequence :
Primer HPTf1)
- [0600] <400>23
- [0601] cctgcgggta aatagctgcg 20
- [0602] <210>24
- [0603] <211>20
- [0604] <212>DNA
- [0605] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

- [0606] <220>
- [0607] <223> 人工序列的记录:引物 HPTr1(Description of Artificial Sequence :
Primer HPTr1)
- [0608] <400>24
- [0609] cgtcaaccaa gctctgatag 20
- [0610] <210>25
- [0611] <211>20
- [0612] <212>DNA
- [0613] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- [0614] <220>
- [0615] <223> 人工序列的记录:引物 EGFP-f1(Description of Artificial Sequence :
Primer
- [0616] EGFP-f1)
- [0617] <400>25
- [0618] atggtgagca agggcgagga 20
- [0619] <210>26
- [0620] <211>21
- [0621] <212>DNA
- [0622] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- [0623] <220>
- [0624] <223> 人工序列的记录:引物 EGFP-R1(Description of Artificial Sequence :
Primer
- [0625] EGFP-R1)
- [0626] <400>26
- [0627] aatgaacatg tcgagcaggt a 21
- [0628] <210>27
- [0629] <211>20
- [0630] <212>DNA
- [0631] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- [0632] <220>
- [0633] <223> 人工序列的记录:引物 GLEf(Description of Artificial Sequence :
Primer GLEf)
- [0634] <400>27
- [0635] gtgctcgctt atttggcac 20
- [0636] <210>28
- [0637] <211>20
- [0638] <212>DNA
- [0639] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- [0640] <220>

[0641] <223> 人工序列的记录: 引物 GLer (Description of Artificial Sequence: Primer GLer)

[0642] <400>28

[0643] cgacatcatg cagaactgtg

20

图 1

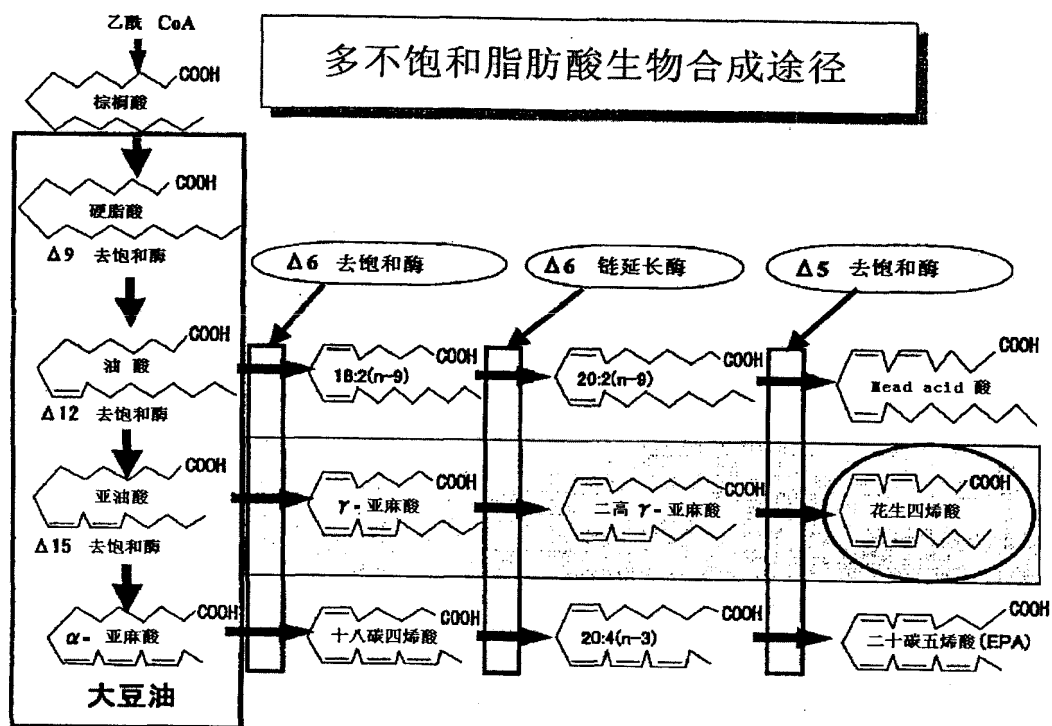


图 2

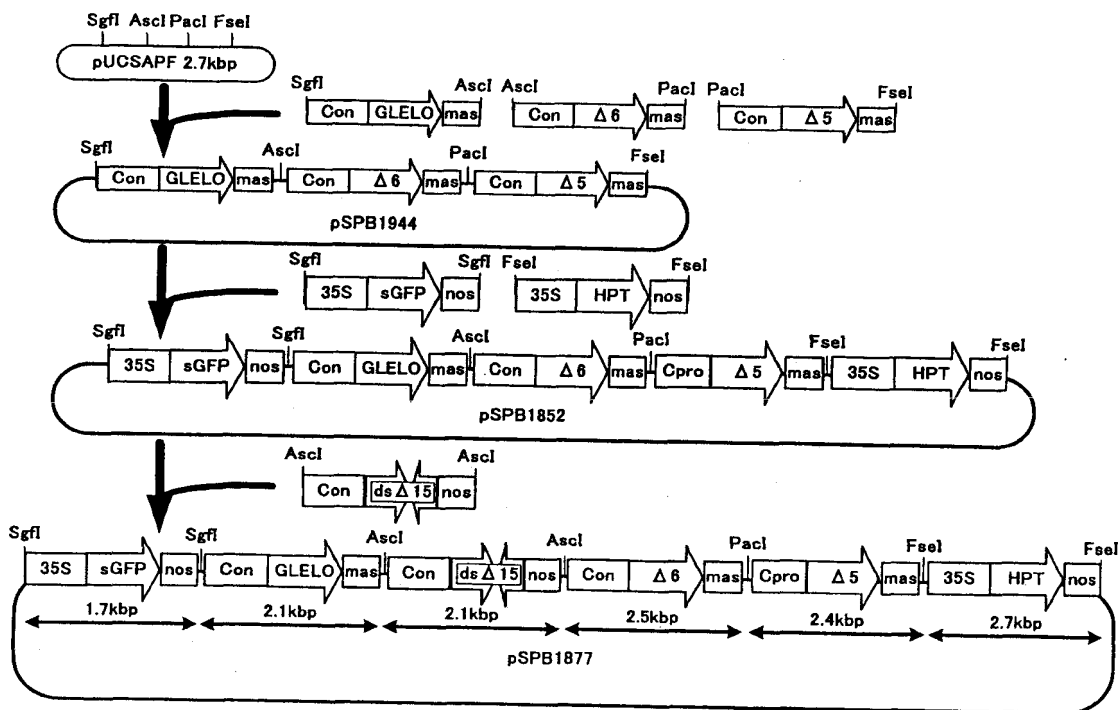


图 3

