

(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



(10) 国際公開番号

WO 2011/037207 A1

(43) 国際公開日

2011年3月31日(31.03.2011)

PCT

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C12N 9/02 (2006.01)
C11C 3/00 (2006.01) C12P 7/64 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) C12R 1/645 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/066599
- (22) 国際出願日: 2010年9月24日(24.09.2010)
- (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 2009-219820 2009年9月24日(24.09.2009) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人九州大学 (KYUSHU UNIVERSITY, NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION) [JP/JP]; 〒8128581 福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号 Fukuoka (JP). 国立大学法人宮崎大学 (UNIVERSITY OF MIYAZAKI) [JP/JP]; 〒8892192 宮崎県宮崎市学園木花台西1丁目1番地 Miyazaki (JP). 学校法人甲南学園 (KONAN GAKUEN) [JP/JP]; 〒6588501 兵庫県神戸市東灘区岡本八丁目9番1号 Hyogo (JP). 日本水産株式会社 (NIPPON SUISAN KAISHA, LTD.) [JP/JP]; 〒

1008686 東京都千代田区大手町二丁目6番2号 Tokyo (JP).

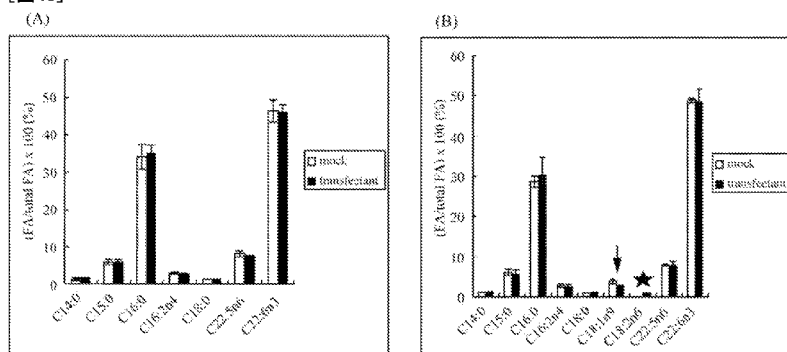
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 坂口 圭史 (SAKAGUCHI, Keishi) [JP/JP]; 〒8128581 福岡県東区箱崎六丁目10番1号 九州大学内 Fukuoka (JP). 松田 高宜 (MATSUDA, Takanobu) [JP/JP]; 〒8128581 福岡県東区箱崎六丁目10番1号 九州大学内 Fukuoka (JP). 小林 巧 (KOBAYASHI, Takumi) [JP/JP]; 〒8128581 福岡県東区箱崎六丁目10番1号 九州大学内 Fukuoka (JP). 伊東 信 (ITO, Makoto) [JP/JP]; 〒8128581 福岡県東区箱崎六丁目10番1号 九州大学内 Fukuoka (JP). 長野 直樹 (NAGANO, Naoki) [JP/JP]; 〒8892192 宮崎県宮崎市学園木花台西1丁目1番地 国立大学法人宮崎大学内 Miyazaki (JP). 林 雅弘 (HAYASHI, Masahiro) [JP/JP]; 〒8892192 宮崎県宮崎市学園木花台西1丁目1番地 国立大学法人宮崎大学内 Miyazaki (JP). 本多 大輔 (HONDA, Daisuke) [JP/JP]; 〒6588501 兵庫県神戸市東灘区岡本八丁目9番1号 甲南大学内 Hyogo (JP). 田岡 洋介 (TAOKA, Yosuke) [JP/JP]; 〒1008686 東京都千代田区大手町2-6-2 日本水産株式会社 バイオ生産研究所内 Tokyo (JP). 沖田 裕司 (OKITA, Yuji) [JP/JP]; 〒1008686 東京都千代

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR TRANSFORMING STRAMENOPILE

(54) 発明の名称: ストラメノパイルの形質転換方法

[図43]



(57) Abstract: Disclosed is a transformation method whereby an ability to produce a useful substance of a stramenopile can be improved. The method for transforming a stramenopile comprises transferring a foreign gene into the stramenopile which is a microorganism belonging to the class *Labyrinthula*, more specifically, to a genus *Labyrinthula*, *Altornia*, *Aplanochytrium*, *Schizochytrium*, *Aurantiochytrium*, *Thraustochytrium*, *Ulkenia*, etc. Said foreign gene, which is a gene relating to tolerance against an antibiotic, a colorimetric protein and/or a fatty acid desaturase ($\Delta 5$ desaturase gene, $\Delta 12$ desaturase gene and/or $\omega 3$ desaturase gene), is transferred by using the electroporation or gene-gun technique.

(57) 要約: 課題: ストラメノパイルの有用物質の産生能力を向上させる形質転換方法を提供する。 解決手段: ストラメノパイルに外来遺伝子を導入するストラメノパイルの形質転換方法であり、ストラメノパイルがラビリンチュラ類、より具体的にはラビリンチュラ属、アルトルニア属、アプラノキトリウム属、シゾキトリウム属、アウランティオキトリウム属、ヤブレッツボカビ属、ウルケニア属などに属する微生物である。外来遺伝子が抗生物質耐性能、発色タンパク質、および/または脂肪酸不飽和化酵素に関連する遺伝子 ($\Delta 5$ デサチユラーゼ遺伝子、 $\Delta 12$ デサチユラーゼ遺伝子、および/または、 $\omega 3$ デサチユラーゼ遺伝子) であり、エレクトロポレーションまたは遺伝子銃法によって外来遺伝子を導入する。



WO 2011/037207 A1



田区大手町 2-6-2 日本水産株式会社バイオ生産研究所内 Tokyo (JP). 泉田 仁 (IZUMI-DA, Hitoshi) [JP/JP]; 〒1008686 東京都千代田区大手町 2-6-2 日本水産株式会社バイオ生産研究所内 Tokyo (JP). 杉本 慎一 (SUGIMOTO, Shinichi) [JP/JP]; 〒1008686 東京都千代田区大手町 2-6-2 日本水産株式会社バイオ生産研究所内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 須藤 阿佐子, 外 (SUDO, Asako et al.); 〒1840002 東京都小金井市梶野町 5-6-2 6 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))
- 規則 13 の 2 に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示 (規則 13 の 2.4(d)(i) 及び 48.2(a)(viii))
- 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))

明 細 書

発明の名称： ストラメノパイルの形質転換方法

技術分野

[0001] 本発明は、ストラメノパイルの形質転換方法に関する。また、脂肪酸不飽和化酵素遺伝子を導入することにより不飽和脂肪酸含量の増加したストラメノパイル、これら不飽和脂肪酸含量増加ストラメノパイルから不飽和脂肪酸を生産する方法等に関する。

背景技術

[0002] 高度不飽和脂肪酸 (poly unsaturated fatty acid, PUFA) は動物およびヒトの栄養において重要な成分である。エイコサペンタエン酸 (EPA) またはドコサヘキサエン酸 (DHA) のような ω 3 高度不飽和脂肪酸 (n-3 高度不飽和脂肪酸ともいう) は、小児の脳の発達、眼の機能、ホルモンおよび他のシグナル物質の合成ならびに心血管障害、癌および糖尿病の予防を含め健康の態様において種々の役割を果たすため (非特許文献 1)、それらはヒトの栄養において重要な成分である。そのような理由で、高度不飽和脂肪酸の製造が必要とされている。

[0003] 一方、ラビリンチュラ綱に分類される微生物は、高度不飽和脂肪酸を製造することが既に知られている。ヤブレッツボカビ科に属する微生物においては、シゾキトリウム属の微生物を用いた高度不飽和脂肪酸含有リン脂質の製造方法 (特許文献 1)、ドコサヘキサエン酸生産能を有するスラウストキトリウム属の微生物 (特許文献 2) 等が既に報告されている。これらの不飽和脂肪酸は、食物および/または飼料の強化を可能にするために、これらの不飽和脂肪酸の、特に真核生物系における、簡便で経済的な製造方法が大いに必要とされている。

[0004] ラビリンチュラ類において、外来遺伝子の導入方法として、Schizochytrium属の特定の株 (現在の分類体系 (非特許文献 2) ではAuranthiochytrium属に属する (非特許文献 3)) に対する方法が既に報告されている (特許文献

3, 4)。また、形質転換により脂肪酸組成に変化を起こさせる方法として、ポリケチドシンターゼ（PKS）系遺伝子を破壊しその結果脂肪酸組成に変化があった例が知られているが（非特許文献4）、エロンガーゼ／デサチュラーゼ経路を構成する酵素を操作して脂肪酸組成を変化させる報告は今までに知られていない。

先行技術文献

特許文献

- [0005] 特許文献1：特開2007-143479号公報
特許文献2：特開2005-102680号公報
特許文献3：特開2006-304685号公報
特許文献4：特開2006-304686号公報
特許文献5：特開2005-287380号公報
特許文献6：PCT/DK96/00051

非特許文献

- [0006] 非特許文献1：Poulos, A Lipids 30:1-14, 1995; Horrocks, LAおよびYeo YK, Pharmacol Res 40:211-225, 1999
非特許文献2：Yokoyama R., Honda D., Mycoscience 48:199-211, 2007
非特許文献3：第60回日本生物工学会大会講演要旨集, p136, 2008
非特許文献4：Lippmeier JC et al., Lipids., Jul;44(7):621-30. (2009), E pub 2009 Jun 3.
非特許文献5：FEBS Lett. 553, 440-444 (2003).
非特許文献6：Nucleic Acids Res. (1994) 22, 4673-4680)
非特許文献7：Prasher, D. C. et al., Gene, 111 (2): 229-233 (1992)
非特許文献8：Chalfie M. et al., Science, 263:802-805, (1994)
非特許文献9：Southern, P. J., and Berg, P., J. Molec. Appl. Gen. 1, 3 27-339. (1982)
非特許文献10：バイオ実験イラストレイテッド 2 遺伝子解析の基礎 p63-68、秀潤社

非特許文献11 : Sanger, F., et al. Proc. Natl. Acad. Sci (1977) 74, 546
3

非特許文献12 : バイオ実験イラストレイテッド 2 遺伝子解析の基礎 p117-12
8、秀潤社

非特許文献13 : Adachi, J. et al. Comput. Sci. Monogr. (1996) 28

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、ストラメノパイルの有用物質の産生能力を向上させるために外来遺伝子を導入して形質転換することを目的とする。ストラメノパイルの有用物質の産生に係わる外来遺伝子を導入して有用物質の産生能力を改変することにより、ストラメノパイルが産生する脂肪酸組成の改変方法、ストラメノパイルに高度に脂肪酸を蓄積させる方法、不飽和脂肪酸の製造方法、不飽和脂肪酸含量の増加したストラメノパイル、これら不飽和脂肪酸含量増加したストラメノパイルから不飽和脂肪酸を生産して提供することを目的とする。本発明により、ストラメノパイルが産生する脂肪酸組成を改変すること、およびストラメノパイルに高度に脂肪酸を蓄積させる方法が提供され、高度不飽和脂肪酸をより効率的に製造することが可能となる。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、上記の従来技術の状況に鑑み鋭意研究の結果、ストラメノパイルの高度に不飽和脂肪酸を産生する能力を向上させるために外来遺伝子を導入して形質転換することに成功し、さらに、ストラメノパイルに脂肪酸不飽和化酵素遺伝子を導入して発現させることによりストラメノパイルが産生する脂肪酸組成の改変を行なう方法、およびこの形質転換ストラメノパイルに高度に不飽和脂肪酸を蓄積させる方法を見出しその実用化のための研究、開発をさらに増進することにより本発明を完成させるに至った。

本発明は、以下の(1)～(22)に記載の技術的事項を要旨とするものである。

(1) ストラメノパイルに外来遺伝子を導入することを特徴とする、ストラ

メノパイルの形質転換方法。

(2) ストラメノパイルがラビリンチュラ類である、(1)に記載のストラメノパイルの形質転換方法。

(3) ラビリンチュラ類がラビリンチュラ属(Labyrinthula)、アルトルニア属(Altornia)、アプラノキトリウム属(Aplanochytrium)、イアポノキトリウム属(Japonochytrium)、ラビリンチュロイデス属(Labyrinthuloides)、シゾキトリウム属(Schizochytrium)、アウランティオキトリウム属(Auranti chytrium)、ヤブレッツボカビ属(Thraustochytrium)、ウルケニア属(Ulkenia)、オブロンギキトリウム属(Oblongichytrium)、ボトリオキトリウム属(Botryochytrium)、パリエティキトリウム属(Parietichytrium)、またはシクヨイドキトリウム属(Sicyoidochytrium)に属する微生物である、(2)に記載のストラメノパイルの形質転換方法。

(4) 微生物がSchizochytrium sp. M-8株(FERM P-19755)、Thraustochytrium aureum ATCC 34304、Thraustochytrium sp. ATCC 26185、Schizochytrium sp. AL1Ac、Schizochytrium aggregatum ATCC 28209、Ulkenia sp. ATCC 28207、Schizochytrium sp. SEK210 (NBRC 102615)、Schizochytrium sp. SEK345 (NBRC 102616)、Botryochytrium radiatum SEK353 (NBRC 104107)、またはParietichytrium sarkarianum SEK364 (FERM ABP-11298)である、(1)ないし(3)のいずれかに記載のストラメノパイルの形質転換方法。

(5) 外来遺伝子が抗生物質耐性能、発色タンパク質、および/または脂肪酸不飽和化酵素に関連する遺伝子である、(1)ないし(4)のいずれかに記載のストラメノパイルの形質転換方法。

(6) 脂肪酸不飽和化酵素に関連する遺伝子が Δ 5デサチュラーゼ遺伝子、 Δ 12デサチュラーゼ遺伝子、および/または ω 3デサチュラーゼ遺伝子である、(1)ないし(5)のいずれかに記載のストラメノパイルの形質転換方法。

(7) エレクトロポレーションまたは遺伝子銃法によって外来遺伝子を導入することを特徴とする、(1)ないし(6)のいずれかに記載のストラメノパイルの形質転換方法。

(8) 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子を導入し、当該脂肪酸不飽和化酵素を発現することを特徴とする、ストラメノパイルの脂肪酸組成の改変方法。

(9) 脂肪酸不飽和化酵素がデサチュラーゼである、(8)に記載の方法。

(10) 脂肪酸不飽和化酵素が $\Delta 5$ デサチュラーゼ、 $\Delta 12$ デサチュラーゼ、または $\omega 3$ デサチュラーゼである、(8)または(9)に記載の方法。

(11) ストラメノパイルがラビリンチュラ類である、(8)ないし(10)のいずれかに記載の方法。

(12) ラビリンチュラ類がラビリンチュラ属(Labyrinthula)、アルトルニア属(Altornia)、アプラノキトリウム属(Aplanochytrium)、イアポノキトリウム属(Japonochytrium)、ラビリンチュロイデス属(Labyrinthuloides)、シゾキトリウム属(Schizochytrium)、アウランティオキトリウム属(Aurantiochytrium)、ヤブレッツボカビ属(Thraustochytrium)、ウルケニア属(Ulkenia)、オブロンギキトリウム属(Oblongichytrium)、ボトリオキトリウム属(Botryochytrium)、パリエティキトリウム属(Parietichytrium)、またはシクヨイドキトリウム属(Sicyoidochytrium)に属する微生物である、(11)に記載の方法。

(13) 微生物がSchizochytrium sp. M-8株(FERM P-19755)、Thraustochytrium aureum ATCC 34304、Thraustochytrium sp. ATCC 26185、Schizochytrium sp. AL1Ac、Schizochytrium aggregatum ATCC 28209、Ulkenia sp. ATCC 28207、Schizochytrium sp. SEK210 (NBRC 102615)、Schizochytrium sp. SEK345 (NBRC 102616)、Botryochytrium radiatum SEK353 (NBRC 104107)、またはParietichytrium sarkarianum SEK364 (FERM ABP-11298)である、(12)に記載の方法。

(14) (8)ないし(13)のいずれかに記載の方法により、ストラメノパイルに高度に脂肪酸を蓄積させる方法。

(15) 脂肪酸が不飽和脂肪酸である、(14)に記載の方法。

(16) 不飽和脂肪酸が炭素数18~22の不飽和脂肪酸である、(15)に記載の方法。

(17) (14) ないし (16) のいずれかに記載の方法により得られた脂肪酸。

(18) 脂肪酸組成の改変を目的として形質転換されたストラメノパイル。

(19) 脂肪酸を高度に蓄積させることを目的として形質転換されたストラメノパイル。

(20) ラビリンチュラ類である、(18) または (19) に記載のストラメノパイル。

(21) ラビリンチュラ類がラビリンチュラ属(Labyrinthula)、アルトルニア属(Altornia)、アプラノキトリウム属(Aplanochytrium)、イアポノキトリウム属(Japonochytrium)、ラビリンチュロイデス属(Labyrinthuloides)、シゾキトリウム属(Schizochytrium)、アウランティオキトリウム属(Aurantiochytrium)、ヤブレツボカビ属(Thraustochytrium)、ウルケニア属(Ulkenia)、オブロンギキトリウム属(Oblongichytrium)、ボトリオキトリウム属(Botryochytrium)、パリエティキトリウム属(Parietichytrium)、またはシクヨイドキトリウム属(Sicyoidochytrium) に属する微生物である、(20) に記載のストラメノパイル。

(22) 微生物が Schizochytrium sp. M-8株 (FERM P-19755)、Thraustochytrium aureum ATCC 34304、Thraustochytrium sp. ATCC 26185、Schizochytrium sp. AL1Ac、Schizochytrium aggregatum ATCC 28209、Ulkenia sp. ATCC 28207、Schizochytrium sp. SEK210 (NBRC 102615)、Schizochytrium sp. SEK345 (NBRC 102616)、Botryochytrium radiatum SEK353 (NBRC 104107)、または Parietichytrium sarkarianum SEK364 (FERM ABP-11298) である、(21) に記載のストラメノパイル。

発明の効果

[0009] 本発明により、ストラメノパイルの有用物質（不飽和脂肪酸）の産生に係わる外来遺伝子を導入して有用物質の産生能力を改変すること、その改変により、ストラメノパイルが産生する脂肪酸組成の改変方法、ストラメノパイルに高度に脂肪酸を蓄積させる方法、不飽和脂肪酸の製造方法、不飽和脂肪酸

含量の増加したストラメノパイルを提供すること、これら不飽和脂肪酸含量増加したストラメノパイルから不飽和脂肪酸を生産して提供することが可能となった。ストラメノパイルが産生する脂肪酸組成を改変すること、およびストラメノパイルに高度に脂肪酸を蓄積させる方法が提供されることにより、高度不飽和脂肪酸をより効率的に製造することが可能となった。

図面の簡単な説明

- [0010] [図1]感受性を示す抗生物質のスクリーニングの結果を表す。なお、X軸の項目名は左から順に、以下の通りである。 control G418(2 mg/ml) Zeocin(1 mg/ml) Puromycin(100 μ g/ml) Blastidicin(100 μ g/ml) Hygromycin(2 mg/ml) Chloramphenicol(30 μ g/ml) Kanamycin(50 μ g/ml) Penicillin(500 μ g/ml) Streptomycin(500 μ g/ml) Tetracyclin(100 μ g/ml)
- [図2] *T. aureum*の液体培養時における最小発育阻止濃度を表す。
- [図3] *Thraustochytrium* sp. の液体培養時における最小発育阻止濃度を表す。
- [図4] mh0186の液体培養時における最小発育阻止濃度を表す。
- [図5] AL1Acの液体培養時における最小発育阻止濃度を表す。
- [図6] *T. aureum*の平板培養時における最小発育阻止濃度を表す。
- [図7] *Thraustochytrium* sp. の平板培養時における最小発育阻止濃度を表す。
- [図8] mh0186の平板培養時における最小発育阻止濃度を表す。
- [図9] AL1Acの平板培養時における最小発育阻止濃度を表す。
- [0011] [図10] 薬剤耐性遺伝子カセットの模式図(EF-1aプロモーター、ターミネーター)を表す。 [符号の説明] 1. 18S2. 1R3. 2F4. neo-pro-3F5. n-G-pro-3F6. n-term-G-4R7. n-term-G-4F8. terminator 5R
- [図11] 薬剤耐性遺伝子カセットの模式図(ユビキチンプロモーター、ターミネーター)を表す。 [符号の説明] 1. NdeI18SF2. 18s-fug-ubq-R3. Ubpro-HindIII-R4. UbproG418fus1R5. ubproG418fus2F 6. G418ubtersus3R7. G418ubterfus4F8. KpnI terR
- [図12] 構築したラビリンチュラ-大腸菌シャトルベクターを表す。
- [図13] G418耐性能を指標とした *A. limacinum* 形質転換体の評価を表す。

[図14] A. *limacinum*形質転換体と野生株の形態の比較を表す。

[図15] ゲノムDNAを鋳型としたPCRによるA. *limacinum*形質転換体の評価を表す。[符号の説明] 1 : Transfectant 12 : Transfectant 23 : Transfectant 34 : Transfectant 45 : Transfectant 56 : Wild type 7 : Positive control (導入DNA断片を鋳型としたもの)

[図16] サザンブロッティングによるA. *limacinum*形質転換体の評価を表す。

[符号の説明] (A) 1. Positive control (476 pg の導入DNA) 2. Transfectant 1, XbaI処理 3. Transfectant 1, PstI処理 4. Transfectant 1, HindIII処理 5. Transfectant 1, EcoRI処理 6. Transfectant 1, BamHI処理 7~11. negative control (wild type) (B) 1. Positive control (30 pg の導入DNA) 2. Wild type, PstI処理 3. Transfectant 5, PstI処理 4. Transfectant 4, PstI処理 5. Transfectant 3, PstI処理 6. Transfectant 2, PstI処理 7. Transfectant 1, PstI処理

[図17] RT-PCRによるA. *limacinum*形質転換体の評価を表す。[符号の説明] 1 : Transfectant 12 : Transfectant 23 : Transfectant 34 : Transfectant 45 : Transfectant 56 : Wild type 7 : Positive control (導入DNA断片を鋳型としたもの) 8~13 : Total RNAを鋳型としたもの

[図18] T. *aureum*形質転換体と野生株の形態の比較を表す。

[図19] ゲノムDNAを鋳型としたPCR、およびサザンブロッティングによるT. *aureum*形質転換体の評価を表す。[符号の説明] (A) M : ϕ X174/HincII, λ HindIII 1 : Templateなし 2 : Positive control (導入DNA断片) 3 : Transfectant 14 : Transfectant 25 : Transfectant 36 : Wild type (B) P : Positive control (導入DNA 2.5 ng) 1 : Wild type, NotI処理 2 : Transfectant 1, NotI処理 3 : Transfectant 2, NotI処理 4 : Transfectant 3, NotI処理

[図20] RT-PCRによるT. *aureum*形質転換体の評価を表す。[符号の説明] M : ϕ X174/HincII, λ HindIII 1 : Transfectant 12 : Transfectant 23 : Transfectant 34 : Wild type 5 : Positive control (導入DNA断片) 6~9 : 1~4において、RNAを鋳型としたPCR (negative control)

[図21]ゲノムDNAを鋳型としたPCR、およびサザンブロットィングによるThraustochytrium sp. ATCC 26185形質転換体の評価を表す。[符号の説明] (A) 1: λ HindIII digest / ϕ x-174 HincII digest 2: wildtype DNA (2F/5R) 3: wildtype DNA (2Fのみ) 4: wildtype DNA (5Rのみ) 5: Transfectant-1 DNA (2F/5R) 6: Transfectant-1 DNA (2Fのみ) 7: Trnsfectant-1 DNA (5Rのみ) 8: Transfectant-2 DNA (2F/5R) 9: Transfectant-2 DNA (2Fのみ) 10: Transfectant-2 DNA (5Rのみ) 11: Transfectant-3 DNA (2F/5R) 12: Transfectant-3 RNA (2Fのみ) 13: Transfectant-3 RNA (5Rのみ) 14: positive control (2F/5R) 15: positive control (2Fのみ) 16: positive control (5Rのみ) (B) 1: λ HindIII digest / ϕ x-174 HincII digest 2: Transfectant-2 DNA (2F/4R) 3: Transfectant-2 DNA (2Fのみ) 4: Transfectant-2 DNA (4Rのみ) 5: Transfectant-2 DNA (3F/4R) 6: Transfectant-2 DNA (3Fのみ) 7: Trnsfectant-2 DNA (3F/5R) 8: Transfectant-2 DNA (5Rのみ) (C) 1: wildtype, Pst I 処理 2: wildtype, HindIII 処理 3: Transfectant-1, Pst I 処理 4: Transfectant-1, HindIII 処理 5: Transfectant-2, Pst I 処理 6: Transfectant-2, HindIII 処理 7: Transfectant-3, Pst I 処理 8: Transfectant-3, HindIII 処理 10: positive control (100 ngの導入DNA)

[図22]RT-PCRによるThraustochytrium sp. ATCC 26185形質転換体の評価を表す。[符号の説明] (A) 1: λ HindIII digest / ϕ x-174 HincII digest 2: wildtype cDNA (3F/4R) 3: wildtype cDNA (3Fのみ) 4: wildtype cDNA (4Rのみ) 5: wildtype RNA (3F/4R) 6: wildtype RNA (3Fのみ) 7: wildtype RNA (4Rのみ) 8: Transfectant-1 cDNA (3F/4R) 9: Transfectant-1 cDNA (3Fのみ) 10: Transfectant-1 cDNA (4Rのみ) 11: Transfectant-1 RNA (3F/4R) 12: Transfectant-1 RNA (3Fのみ) 13: Transfectant-1 RNA (4Rのみ) 14: positive control (3F/4R) 15: positive control (3Fのみ) 16: positive control (4Rのみ) (B) 1: λ HindIII digest / ϕ x-174 HincII digest 2: Transfectant-2 cDNA (3F/4R) 3: Transfectant-2 cDNA (3Fのみ) 4: Transfectant-2 cDNA (4Rのみ) 5: Transfectant-2 RNA (3F/4R) 6: Transfectant-2 RNA (3Fのみ)

amt-2 RNA (3Fのみ) 7: Transfectant-2 RNA (4Rのみ) 8: Transfectant-3 cDNA (3F/4R) 9: Transfectant-3 cDNA (3Fのみ) 10: Transfectant-3 cDNA (4Rのみ) 11: Transfectant-3 RNA (3F/4R) 12: Transfectant-3 RNA (3Fのみ) 13: Transfectant-3 RNA (4Rのみ) 14: positive control (3F/4R) 15: positive control (3Fのみ) 16: positive control (4Rのみ)

[図23]ゲノムDNAを鋳型としたPCRによるSchizochytrium sp. AL1Ac形質転換体の評価を表す。[符号の説明] レーン1~3: 形質転換体 レーン4~6: 野生株 レーン7: 鋳型DNA無し(negative control) レーン8: 導入DNAを鋳型としたもの(positive control)

[図24]作製したGFP (Green Fluorescent Protein) 遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセットの模式図を示す。Ub-pro-F1とUb-term-R2は、配列中にKpn Iサイトをそれぞれ有する。

[図25]コントロール株およびGFP遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセット導入株に由来するゲノムDNAを鋳型としたPCR解析を表す。(A, B)はAurantiochytrium sp. mh0186、(C, D)はT. aureumにおけるPCR結果、また(A, C)はネオマイシン耐性遺伝子、(B, D)はGFP遺伝子を増幅した結果をそれぞれ表す。[符号の説明] M: λ HindIII digest / ϕ x-174 HincII digest N: 野生株 (negative control) C: ネオマイシン耐性遺伝子発現カセット導入株 (A, Cにおいてはpositive control/B, Dにおいてはnegative control) T: GFP遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセット導入株 P: GFP遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセットを鋳型にしたもの (positive control)

[図26]コントロール株およびGFP遺伝子/neomycin耐性遺伝子発現カセット導入株に由来するcDNAを鋳型としたPCR解析を表す。(A, B)はAurantiochytrium sp. mh0186、(C, D)はT. aureumにおけるPCR結果、また、(A, C)はネオマイシン耐性遺伝子、(B, D)はGFP遺伝子を増幅した結果をそれぞれ表す。[符号の説明] M: λ HindIII digest / ϕ x-174 HincII digest N: 野生株 (negative control) C: ネオマイシン耐性遺伝子発現カセット導入株

(A, Cにおいてはpositive control/B, Dにおいてはnegative control) T: GFP遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセット導入株 P: GFP遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセットを鑄型にしたもの (positive control)

[図27] 共焦点レーザー顕微鏡を用いたGFPの蛍光観察の結果を表す。 (A) *T. aureum* wild-typeの微分干渉像 (B) *T. aureum* wild-typeの蛍光画像 (C) GFP発現*T. aureum*の微分干渉像 (D) GFP発現*T. aureum*の蛍光画像 (E) *Aurantiochytrium* sp. mh0186 wild-typeの微分干渉像 (F) *Aurantiochytrium* sp. mh0186 wild-typeの蛍光画像 (G) GFP発現*Aurantiochytrium* sp. mh0186の微分干渉像 (H) GFP発現*Aurantiochytrium* sp. mh0186の蛍光画像

[図28] *Pinguiochrysis pyriiformis*由来 $\Delta 12$ デサチュラーゼの推定アミノ酸配列と真菌および原虫由来 $\Delta 12$ デサチュラーゼのアミノ酸配列の多重アライメント解析を表す。P. *pyriiformis*、真菌および原虫由来 $\Delta 12$ デサチュラーゼのアミノ酸配列を対象として、ClustalW 1.81とESPrpt 2.2による多重アライメント解析を行った。同一のアミノ酸残基は黒塗りの背景に白字、類似のアミノ酸残基は黒枠で囲まれた太字で各々記されている。下線部は、共通して保存されているヒステジンボックスを示している。

[0012] [図29] $\Delta 12$ デサチュラーゼおよび二機能性 $\Delta 12/\Delta 15$ デサチュラーゼの系統解析を表す。

[図30] コントロールベクターpYES2/GTもしくは組換えプラスミドpYpD12Desを導入した*Saccharomyces cerevisiae*由来脂肪酸メチルエステル (FAME) のGC解析を表す。矢印は新規ピークを示しており、そのリテンションタイムは標品のリノール酸メチルエステルのもので一致する。

[図31] pYpD12Des導入*S. cerevisiae*由来FAMEsにおける新規ピークのGC-MS解析を表す。 [符号の説明] (A) リノール酸の標準物質 (B) 新規ピーク

[図32] 作製した $\Delta 12$ デサチュラーゼ遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセットの模式図を表す。Ub-pro-F1とUb-term-R2は、それぞれ配列中にKpn I サ

イトを有する。

[図33]コントロール株および $\Delta 12$ デサチュラーゼ遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセット導入株に由来するゲノムDNAを鋳型としたPCR解析を表す。

(A) はネオマイシン耐性遺伝子を、(B) $\Delta 12$ デサチュラーゼ遺伝子を増幅した結果をそれぞれ表す。[符号の説明] M: λ HindIII digest / ϕ x-174 HincII digest N: 野生株 (negative control) C1: ネオマイシン耐性遺伝子発現カセット導入株1 (Aにおいてはpositive control/Bにおいてはnegative control) C2: ネオマイシン耐性遺伝子発現カセット導入株2

(Aにおいてはpositive control/Bにおいてはnegative control) C3: ネオマイシン耐性遺伝子発現カセット導入株3 (Aにおいてはpositive control/Bにおいてはnegative control) T1: $\Delta 12$ デサチュラーゼ遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセット導入株1 T1: $\Delta 12$ デサチュラーゼ遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセット導入株2 T1: $\Delta 12$ デサチュラーゼ遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセット導入株3 P: GFP遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセットを鋳型にしたもの (positive control)

[図34]コントロール株および $\Delta 12$ デサチュラーゼ遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセット導入株に由来するcDNAを鋳型としたPCR解析を表す。(A)

はネオマイシン耐性遺伝子、(B) は $\Delta 12$ デサチュラーゼ遺伝子を増幅した結果をそれぞれ表す。[符号の説明] M: λ HindIII digest / ϕ x-174 HincII digest N: 野生株 (negative control) C1: ネオマイシン耐性遺伝子発現カセット導入株1 (Aにおいてはpositive control/Bにおいてはnegative control) C2: ネオマイシン耐性遺伝子発現カセット導入株2 (Aにおいてはpositive control/Bにおいてはnegative control) C3: ネオマイシン耐性遺伝子発現カセット導入株3 (Aにおいてはpositive control/Bにおいてはnegative control) T1: $\Delta 12$ デサチュラーゼ遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセット導入株1 T1: $\Delta 12$ デサチュラーゼ遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセット導入株2 T1: $\Delta 12$ デサチュラーゼ遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセット導入株3 P: GFP遺伝子/ネオマイシン耐性遺

伝子発現カセットを鋳型にしたもの (positive control)

[図35] *T. aureum*由来 $\Delta 5$ デサチュラーゼの多重アラインメントを表す。

[図36] デサチュラーゼの系統解析を表す。

[0013] [図37a] 酵母を宿主とした $\Delta 5$ デサチュラーゼの過剰発現実験1の結果を表す。

(E T Aを培地に添加したもののGC分析結果)

[図37b] 酵母を宿主とした $\Delta 5$ デサチュラーゼの過剰発現実験2の結果を表す。

(DGLAを培地に添加したもののGC分析結果)

[図37c] EPAとAAのGC-MSによる構造解析の結果を表す。 (a) Tau $\Delta 5$ des産物

のEPA (b) EPAの標準物質 (c) Tau $\Delta 5$ des産物のAA (d) AAの標準物質

[図38] (a) 作製した $\Delta 5$ デサチュラーゼ遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセットを含むベクターコンストラクトを表す。(b) PCRで増幅した $\Delta 5$ デサチュラーゼ遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセットを示す。

[図39] コントロール株および $\Delta 5$ デサチュラーゼ遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセット導入株に由来するゲノムDNAを鋳型としたPCR解析を表す。

レーン1-6がネオマイシン耐性遺伝子を増幅したものであり、レーン7-12は $\Delta 5$ デサチュラーゼ遺伝子を増幅したものである。[符号の説明] 1: $\Delta 5$ デサチュラーゼ遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセット導入株1 2: $\Delta 5$ デサチュラーゼ遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセット導入株2 3: $\Delta 5$ デサチュラーゼ遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセット導入株3 4: 野生株 (negative control) 5: $\Delta 5$ デサチュラーゼ遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセットを鋳型にしたもの (positive control) 6: 鋳型なし (negative control) 7: $\Delta 5$ デサチュラーゼ遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセット導入株1 8: $\Delta 5$ デサチュラーゼ遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセット導入株2 9: $\Delta 5$ デサチュラーゼ遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセット導入株3 10: 野生株 (negative control) 11: $\Delta 5$ デサチュラーゼ遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセットを鋳型にしたもの (positive control) 12: 鋳型なし (negative control)

[図40] コントロール株および $\Delta 5$ デサチュラーゼ遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセット導入株に由来するcDNAを鋳型としたPCR解析を表す。上段がネオマイシン耐性遺伝子を増幅した結果、下段が $\Delta 5$ デサチュラーゼ遺伝子を増幅した結果を表わす。[符号の説明] mhneor¹: ネオマイシン耐性遺伝子発現カセット導入株1 mhneor²: ネオマイシン耐性遺伝子発現カセット導入株2 mhneor³: ネオマイシン耐性遺伝子発現カセット導入株3 mh[?]5neor¹: $\Delta 5$ デサチュラーゼ遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセット導入株1 mh[?]5neor²: $\Delta 5$ デサチュラーゼ遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセット導入株2 mh[?]5neor³: $\Delta 5$ デサチュラーゼ遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセット導入株3

[図41] コントロール株もしくは $\Delta 12$ デサチュラーゼ遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセットを導入した*Aurantiochytrium* sp. mh0186由来FAMESのGC解析を表す。矢印は新規ピークを示しており、そのリテンションタイムは標品のリノール酸メチルエステルのもので一致する。

[図42] $\Delta 12$ デサチュラーゼ遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセット導入株由来FAMESにおける新規ピークのGC-MS解析を示す。

[図43] コントロール株および $\Delta 12$ デサチュラーゼ遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセット導入株の脂肪酸組成の比較を表す。白棒と黒棒は、それぞれコントロール株と $\Delta 12$ デサチュラーゼ遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセット導入株の脂肪酸組成を表している。矢印は外来脂肪酸であるオレイン酸を示しており、星印は生合成されたリノール酸を示している。値は、平均値±標準偏差の値である。

[図44] mh0186形質転換体のGC分析の結果を表す。

[図45] PCRによるNeor^r (約2300 bp) を検出した結果、ラビリンチュラへの遺伝子導入した形質転換体においては、野生株には見られないNeor^rの特異な増幅が観察されたことを示す。

[図46] サブクローニングしたpcDNA 3.1 Myc-His vector 由来のSV40 terminator配列を含むプラスミドを表す。

[図47] Fusion PCR に使用したプライマーと産物の模式図を表す。最終産物は、*Thraustochytrium aureum* ATCC 34304 由来ubiquitin promoterと pTracer-CMV/Bsd/lacZ由来ブラストサイジン耐性遺伝子の融合した配列になる。

[図48] 作製したpTracer-CMV/Bsd/lacZ由来ブラストサイジン耐性遺伝子BgIIIカセットを表す。

[図49] Fusion PCR に使用したプライマーと産物の模式図を表す。最終産物は、*Thraustochytrium aureum* ATCC 34304 由来ubiquitin promoterと *Saprolegnia diclina*由来 ω 3 デサチュラーゼ遺伝子配列および*Thraustochytrium aureum* ATCC 34304 由来ubiquitin terminatorの融合した配列になる。

[図50] 図48記載ブラストサイジン耐性遺伝子BgIIIカセットにおける一方のBgIIIサイトをKpnIサイトに置換えたプラスミドを表す。

[図51] 作製した*Saprolegnia diclina*由来 ω 3 デサチュラーゼ発現プラスミドを表す。薬剤耐性マーカーとして、ブラストサイジン耐性遺伝子を有する。

[図52] *Saprolegnia diclina*由来 ω 3 デサチュラーゼ遺伝子のゲノム挿入確認PCRに用いたプライマーの位置を示した模式図を表す。

[図53] ゲノムDNAを鋳型にしたPCRによる*Thraustochytrium aureum* ATCC 34304形質転換株の評価を表す。[符号の説明] レーン1~2：形質転換体

[図54] *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304のコントロール株および ω 3 デサチュラーゼ遺伝子導入株の脂肪酸組成の比較を表す。白棒と黒棒は、それぞれコントロール株と ω 3デサチュラーゼ遺伝子導入株の脂肪酸組成を表している。値は、平均値±標準偏差の値である。

[図55] *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304野生型株を100%とした時の、コントロール株および ω 3デサチュラーゼ遺伝子導入株の脂肪酸割合を示す。

発明を実施するための形態

[0014] 近年、脂質の生理活性や薬理作用についての研究が進み不飽和脂肪酸の代謝において様々な化学物質への変換とその働きについての解明がなされている。特に飽和脂肪酸、モノエン酸、不飽和脂肪酸の栄養学上の好ましい比率やエイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸等の魚油由来の ω 3系（n-3系と

もいう)の脂肪酸とリノール酸を中心とする植物由来の ω 6系(n-6系ともいう)の脂肪酸の比率が疾病との関連の中で重用視されている。しかしながら、動物は脂肪酸不飽和化酵素(デサチュラーゼ、desaturase)の欠損または低下から一部の不飽和脂肪酸を食物として摂取しなければならない。これらの脂肪酸を必須脂肪酸(またはビタミンF)とよび、リノール酸(LA)、 γ -リノレン酸(GLA)、アラキドン酸(AAまたはARA)等がこれにあたる。

[0015] 不飽和脂肪酸の生成には、脂肪酸不飽和化酵素(デサチュラーゼ)という酵素が関与する。脂肪酸不飽和化酵素(デサチュラーゼ)には(1)脂肪酸のカルボニル基から決まった位置に二重結合(不飽和結合ともいう)を作るタイプ(例: Δ 9デサチュラーゼはカルボニル炭素を1番目の炭素とした場合の、9番目の位置に二重結合を作る。)および(2)脂肪酸のメチル末端から特定の位置に二重結合を作るタイプ(例: ω 3デサチュラーゼはメチル末端を1番目とした場合の、3番目の位置に二重結合を作る)があり、これらデサチュラーゼによる二重結合の生成(不飽和化)と、いくつかの異なるエロンガーゼによる鎖長延長が繰り返されることにより、不飽和脂肪酸が生合成されることが知られている。例えば、 Δ 9デサチュラーゼは、体内でパルミチン酸から合成されたか外部から直接摂取されたステアリン酸を不飽和化することによってオレイン酸(OA)を合成する。また Δ 6、 Δ 5、 Δ 4デサチュラーゼはアラキドン酸(AA)、エイコサペンタエン酸(EPA)、そしてドコサヘキサエン酸(DHA)のような高度不飽和脂肪酸の合成に必要な脂肪酸不飽和化酵素(デサチュラーゼ)である。

[0016] 一方、ストラメノパイルに属するラビリンチュラ類(labyrinthulomycetes)には、ヤブレッツボカビ科(スラウストキトリウム科とも言う)(Thraustocytriaceae)およびラビリンチュラ科(Labyrinthulaceae)の2つの科が存在する。これらはアラキドン酸、EPA、DTA、DPA、DHA等の高度不飽和脂肪酸を蓄積する微生物として知られている。

[0017] 本発明は、ストラメノパイルに外来遺伝子を導入することを特徴とするストラメノパイルの形質転換方法に関するものである。本発明の形質転換方法を

基礎とすることにより、ストラメノパイルが産生する脂肪酸組成の改変方法、ストラメノパイルに高度に脂肪酸を蓄積させる方法および不飽和脂肪酸の製造方法が新たに構築することが可能となり、また、ストラメノパイルに脂肪酸不飽和化酵素遺伝子を導入することにより不飽和脂肪酸含量の増加したストラメノパイルや、これら不飽和脂肪酸含量増加ストラメノパイルから不飽和脂肪酸を生産する方法を開発し提供することが可能となった。

[0018] 次に、本発明について更に詳細に説明する。

[微生物]

本発明の脂肪酸改変方法で用いる微生物としては、脂肪酸不飽和化酵素遺伝子を導入することにより脂肪酸合成を行うであろうと思われるストラメノパイルであれば特に限定されないが、特に好ましくはラビリンチュラ類を対象とする。ラビリンチュラ類としては、ラビリンチュラ属(Labyrinthula)、アルトルニア属(Althornia)、アプラノキトリウム属(Aplanochytrium)、イアポノキトリウム属(Japonochytrium)、ラビリンチュロイデス属(Labyrinthuloides)、シゾキトリウム属(Schizochytrium)、ヤブレッツボカビ属(Thraustochytrium)、またはウルケニア属(Ulkenia)、アウランティオキトリウム属(Aurantiochytrium)、オブロンギキトリウム属(Oblongichytrium)、ボトリオキトリウム属(Botryochytrium)、パリエティキトリウム属(Parietichytrium)、またはシクヨイドキトリウム属(Sicyoidochytrium)に属するものが挙げられる。

[0019] 本発明で用いるストラメノパイルとしては、シゾキトリウム属(Schizochytrium) ヤブレッツボカビ属(Thraustochytrium)、アウランティオキトリウム属(Aurantiochytrium)、パリエティキトリウム属(Parietichytrium)に属する微生物が好ましく、その中でも特に好ましくは、Schizochytrium sp. M-8 株 (FERM P-19755)、Thraustochytrium aureum ATCC34304、Thraustochytrium sp. ATCC26185、Schizochytrium sp. AL1Ac、Schizochytrium aggregatum ATCC28209、Ulkenia sp. ATCC 28207、Schizochytrium sp. SEK210 (NBRC 102615)、Schizochytrium sp. SEK345 (NBRC 102616)、Botryochytrium rad

iatum SEK353 (NBRC 104107)、またはParietichytrium sarkarianum SEK364 (FERM ABP-11298) が挙げられる。Schizochytrium sp. M-8株は、特許文献5に既に報告されており、当該公報に記載の方法（ヤブレッツボカビ科M-8株）で以下のようにして取得した。まず、石垣島のマングローブ林で採取した海水・落葉を300ml三角フラスコに入れ、松花粉（ここでは宮崎市周辺海岸にて採取したものをを用いた）を約0.05g添加した。室温にて1週間放置し、水面の松花粉を含むように海水を採取し、シャーレ中に調製したポテトデキストロース寒天培地上に0.1mlを塗布した。28℃で5日間培養し、クリーム色でつやのないコロニーをピックアップして新しい寒天培地上に塗布した。3日後、増殖した微生物を顕微鏡下で観察し、ラビリンチュラ類であることを細胞のサイズ、形態から判断してスラント培地に保存した。なおこの株は独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（茨城県つくば市東1-1-1 つくばセンター 中央第6）に受託番号（FERM P-19755）として平成16年3月29日に国内寄託されており、そこから入手可能である。また、Parietichytrium sarkarianum SEK364株は、石垣島・吹通川の河口域で採取した表層水 10 mL を試験管に入れ、松花粉を添加して室温で放置した。7日後に松花粉を無菌寒天培地（2 gグルコース, 1 g ペプトン, 0.5 g 酵母エキス, 0.2 g クロラムフェニコール, 15 g 寒天, 蒸留水 100 mL, 海水900mL）に塗布する。5日後に出現したコロニーを分離し培養することを数回繰り返し、菌体を分離した。なおこの株は独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（茨城県つくば市東1-1-1中央第6）に受領番号（FERM ABP-11298）として平成22年9月24日に国際寄託されており、そこから入手可能である。

[0020] また、当該ストラメノパイルは、その後の文献においてSchizochytrium sp. mh0186、Aurantiochytrium sp. mh0186、あるいはAurantiochytrium limacinum mh0186と呼ばれており、本発明中でもこれらの名称を用いることがある。これらのストラメノパイルを、通常用いられる固体培地あるいは液体培地等で、常法により培養する。この時、用いられる培地としては、例えば炭素

源としてグルコース、フルクトース、サッカロース、デンプン、グリセリン等、また窒素源として酵母エキス、コーンステープリカー、ポリペプトン、グルタミン酸ナトリウム、尿素、酢酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸ナトリウム等、また無機塩としてリン酸カリウム等、その他必要な成分を適宜組み合わせた培地であり、ラビリンチュラ類を培養するために通常用いられるものであれば特に限定されない。培地は調製後、pHを3.0~8.0の範囲内に調整した後、オートクレーブ等により殺菌して用いる。さらに、Thraustochytrium aureum ATCC 34304、Thraustochytrium sp. ATCC 26185、Schizochytrium aggregatum ATCC 28209、及びUlkenia sp. ATCC 28207はATCCに、またSchizochytrium sp. SEK210 (NBRC 102615)、Schizochytrium sp. SEK345 (NBRC 102616)、及びBotryochytrium radiatum SEK353 (NBRC 104107) は独立行政法人製品評価技術基盤機構に、それぞれ寄託され一般に入手可能である。

[0021] [脂肪酸不飽和化酵素]

本発明の脂肪酸不飽和化酵素（デサチュラーゼ、desaturase）は脂肪酸不飽和化酵素としての機能を有するものであれば特に限定されない。脂肪酸不飽和化酵素遺伝子としては動物由来、植物由来等その由来は特に制限されないが、 $\Delta 4$ 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子、 $\Delta 5$ 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子、 $\Delta 6$ 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子、 $\Delta 12$ 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子等の脂肪酸不飽和化酵素遺伝子を好適に例示することができ、これらは単独でまたは多重に用いることができる。かかる $\Delta 4$ 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子、 $\Delta 5$ 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子、 $\Delta 6$ 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子、 $\Delta 12$ 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子は、脂肪酸の末端カルボキシル基の炭素（デルタエンド）から数えて、それぞれ4番目、5番目、6番目、12番目の炭素において不飽和結合を形成するものであり、これらの脂肪酸不飽和化酵素遺伝子としては、例えば微細藻類由来の $\Delta 4$ 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子 (Tonon, T., Harvey, D., Larson, T. R., and Graham, I. A. Identification of a very long chain polyunsaturated fatty acid $\Delta 4$ -desaturase from the microalga *Pavlova lutheri*

非特許文献5)を具体的に挙げることができる。さらに具体的には、 $\Delta 5$ デサチュラーゼとしては、*T. aureum*由来 $\Delta 5$ デサチュラーゼ、*Thraustochytrium* sp. ATCC 26185, *Dictyostelium discoideum*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Homo sapiens*, *Caenorhabditis elegans*, *Leishmania major*に由来する $\Delta 5$ デサチュラーゼ等が例示される。また、 $\Delta 12$ デサチュラーゼとしては、ピンギオ藻*Pinguiochrysis pyriformis*由来 $\Delta 12$ デサチュラーゼ、真菌および原虫由来 $\Delta 12$ デサチュラーゼが例示される。

- [0022] デサチュラーゼは多数の重要な機能をもつ高度不飽和脂肪酸の生産に不可欠である。例えば、高度不飽和脂肪酸は細胞膜の主要成分であり、リン脂質形態で存在する。哺乳動物プロスタサイクリン、エイコサノイド、ロイコトリエンおよびプスタグランジンの前駆物質としても機能する。更に、高度不飽和脂肪酸は発育中の乳児脳の適正な発育と組織形成および修復に必要である。高度不飽和脂肪酸の生物学的意義に鑑み、高度不飽和脂肪酸とその中間体を効率的に生産する試みがなされている。
- [0023] $\Delta 5$ デサチュラーゼは、例えば、ジホモ γ -リノレン酸 (DGLA) からアラキドン酸 (AA) への変換およびエイコサテトラエン酸 (ETA) からエイコサペンタエン酸 (EPA) への変換を触媒する。 $\Delta 6$ デサチュラーゼは例えば、リノール酸 (LA) から γ -リノレン酸 (GLA) への変換および α -リノレン酸 (ALA) からステアリドン酸 (STA) への変換を触媒する。高度不飽和脂肪酸生合成には $\Delta 5$ デサチュラーゼと $\Delta 6$ デサチュラーゼ以外に多数の酵素が関与している。例えば、エロンガーゼ (elongase) は γ -リノレン酸 (GLA) からジホモ γ -リノレン酸 (DGLA) への変換およびステアリドン酸 (STA) からエイコサテトラエン酸 (ETA) への変換を触媒する。またリノール酸 (LA) はオレイン酸 (OA) から $\Delta 12$ デサチュラーゼにより生産される。
- [0024] [産生不飽和脂肪酸]
ストラメノパイル内で発現する脂肪酸不飽和化酵素により生成される不飽和脂肪酸は、例えば、炭素数18~22の不飽和脂肪酸である。用いる脂肪酸不飽和化酵素の種類や脂肪酸基質の種類によって異なるが、ドコサヘキサエ

ン酸(DHA)やエイコサペンタエン酸(EPA)を好適に例示することができ、これらの他に α -リノレン酸(ALA)、オクタデカテトラエン酸(OTA、18:4n-3)、エイコサテトラエン酸(ETA、20:4n-3)、n-3ドコサペンタエン酸(DPA、22:5n-3)、テトラコサペンタエン酸(TPA、24:5n-3)、テトラコサヘキサエン酸(THA、24:6n-3)、リノール酸(LA)、 γ -リノレン酸(GLA)、エイコサトリエン酸(20:3n-6)、アラキドン酸(AA)、n-6ドコサペンタエン酸(DPA、22:5n-6)等を挙げるができる。

[0025] [脂肪酸不飽和化酵素遺伝子源]

本発明において脂肪酸不飽和化酵素遺伝子源として利用できる生物は、段落[0021]に記載のように、特に属、種あるいは株などを限定するものではなく、高度不飽和脂肪酸生産能を有する生物であればいずれのものでも用いることができる。これらの生物は、例えば微生物であれば公的微生物寄託機関で容易に入手することができる。このような微生物としては、モリテラ属(*Moritella*)に属する細菌モリテラ・マリナ(*Moritella marina*) MP-1株(ATCC15381)等が例示され、デサチュラーゼおよびエロンガーゼ遺伝子源の例として本株を用いる場合の方法について以下に説明する。しかしながら、ここで示す方法はデサチュラーゼ/エロンガーゼ経路を有する全ての生物種から、その構成遺伝子であるデサチュラーゼおよびエロンガーゼ遺伝子の単離を行う際に適応が可能である。

MP-1株からデサチュラーゼおよび/もしくはエロンガーゼ遺伝子を単離するためには、それぞれの目的酵素遺伝子のアミノ酸配列において、保存された領域を推定することが必要である。例えば、デサチュラーゼにおいては一つのシトクロムb5ドメインと3つのヒスチジンボックス、エロンガーゼにおいては2つのヒスチジンボックスが生物種を通して保存されていることが知られている。より具体的には、様々な生物種由来の既知のデサチュラーゼもしくはエロンガーゼ遺伝子のアミノ酸配列を、clustal wプログラム(Thompson, J. D., et al. 非特許文献6)を使用した多重アライメントによって比較することで、目的酵素の保存領域を推定することが出来る。さらには、既知の他生

物由来デサチュラーゼおよび/もしくはエロンガーゼにおいて、同じ基質特異性を有するデサチュラーゼもしくはエロンガーゼ遺伝子のアミノ酸配列を多重アライメントによって比較することで、同じ基質特異性を有するデサチュラーゼおよび/もしくはエロンガーゼに特異的な保存領域を推定することも可能である。次に、推定した保存領域を元に様々な縮重オリゴヌクレオチドプライマーを作製し、MP-1株由来cDNAライブラリーを鋳型にしたPCR、RACE法などを行うことで、MP-1株由来目的遺伝子の部分配列を増幅する。引き続き、得た増幅産物をプラスミドベクターにクローニング後、常法により塩基配列を決定し、既知の酵素遺伝子と比較することにより、MP-1株より目的酵素遺伝子の一部が単離できたことを確認する。目的酵素遺伝子全長取得には、得た部分配列をプローブとしたハイブリダイゼーション法によるスクリーニング、もしくは目的遺伝子の部分配列から作製したオリゴヌクレオチドプライマーを用いたRACE法を行う。

[その他遺伝子源]

GFP (Green Fluorescent Protein) は 非特許文献 7 あるいは非特許文献 8、EGFP (enhanced GFP) は 特許文献 6、ネオマイシン耐性遺伝子は非特許文献 9 が、それぞれ参考になる。

[0026] [ストラメノパイルへの脂肪酸不飽和化酵素の導入と発現]

脂肪酸不飽和化酵素遺伝子導入方法としては、従来の微生物への遺伝子導入により形質転換方法が適用でき、組換え発現ベクターを細胞に導入して形質転換する方法を挙げることができる。本発明におけるストラメノパイルへのデサチュラーゼ遺伝子の導入の詳細については実施例に具体的に記載した。また、形質転換の対象となるストラメノパイルも特に限定されるものではなく、前述するように、ラビリンチュラ類を好適な例として挙げることができる。

[0027] 発現ベクターとしては、特に限定されるものではなく遺伝子が挿入された組換え発現ベクターが挙げられる。組換え発現ベクターの作製には、プラスミド、ファージ、またはコスミド等を用いることができるが特に限定される

ものではない。また、作製方法も公知の方法を用いて行えばよい。ベクターの具体的な種類は特に限定されるものではなく、宿主細胞中で発現可能なベクターを適宜選択すればよい。すなわち、宿主細胞の種類に応じて、確実に遺伝子を発現させるために適宜プロモータ配列を選択し、これと本発明の遺伝子を各種プラスミド等に組み込んだものを発現ベクターとして用いればよい。発現ベクターには、好ましくは少なくとも1つの選択マーカを含む。このようなマーカーとしては、真核生物細胞培養についてはジヒドロ葉酸レダクターゼまたはネオマイシン耐性遺伝子、GFP等が挙げられる。抗生物質感受性の結果と真核生物形質転換系で用いられる選択マーカー遺伝子に鑑みて、ラビリンチュラ類の形質転換系に使用出来る選択マーカー遺伝子は、以下表1に示すものが有効であると示された。

- [0028] 上記選択マーカーを用いれば、本発明に係るポリヌクレオチドが宿主細胞に導入されたか否か、さらには宿主細胞中で確実に発現しているか否かを確認することができる。あるいは、本発明に係る脂肪酸不飽和化酵素を融合ポリペプチドとして発現させてもよく、例えば、オワンクラゲ由来の緑色蛍光ポリペプチドGFPをマーカーとして用い、本発明に係る脂肪酸不飽和化酵素をGF融合ポリペプチドとして発現させてもよい。
- [0029] エレクトロポレーションまたは遺伝子銃法によって外来遺伝子を導入することが好ましい、具体的な導入条件については表2に示してある。本発明においては、脂肪酸不飽和化酵素遺伝子が導入されることによって、脂肪酸不飽和化酵素遺伝子を導入する前と比較して、細胞の脂肪酸組成が変化する。すなわち、脂肪酸不飽和化酵素遺伝子が発現することにより、脂肪酸組成の改変という効果が得られる。
- [0030] ストラメノパイルの形質転換により、産生する脂肪酸組成が改変されたストラメノパイル（微生物）が得られる。この脂肪酸不飽和化酵素をコードする遺伝子が発現可能に導入されてなるストラメノパイルは、例えば、不飽和脂肪酸の製造に利用することができる。不飽和脂肪酸の製造には、上述の産生脂肪酸組成が改変されたストラメノパイルを使用すればよく、その他の工程

、製造設備・器具等の諸条件については、特に限定されるものではない。不飽和脂肪酸の製造には、上述の改変方法によって産生する脂肪酸組成が改変された微生物を培養する工程を含み、微生物およびその培地を利用して、不飽和脂肪酸を製造する。

[0031] 上記細胞の培養条件（培地、培養温度、通気状態等）は、細胞の種類や、目的とする不飽和脂肪酸の種類、その量等に応じて適宜設定することができる。

なお、本発明での不飽和脂肪酸とは、不飽和脂肪酸を含む物質をも意味し、その含有量、純度、形状、組成、等は特に限定されるものではない。つまり、本発明では、脂肪酸組成が改変された細胞またはその培地自体を、不飽和脂肪酸とみなしてもよい。また、この細胞または培地から不飽和脂肪酸を精製する工程をさらに含んでいてもよい。不飽和脂肪酸を精製する方法としては、不飽和脂肪酸を始めとする脂質（複合脂質を含む）の精製方法として公知である方法を適用することができる。

[0032] [ストラメノパイルに高度に不飽和脂肪酸を蓄積させる方法]

ストラメノパイルに不飽和脂肪酸を蓄積させるには、形質転換した本発明のストラメノパイルを培養することにより達成される。例えば、通常用いられる固体培地あるいは液体培地等で培養する。この時、用いられる培地としては、例えば炭素源としてグルコース、フルクトース、サッカロース、デンプン、グリセリン等、また窒素源として酵母エキス、コーンステーパーリカー、ポリペプトン、グルタミン酸ナトリウム、尿素、酢酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸ナトリウム等、また無機塩としてリン酸カリウム等、その他必要な成分を適宜組み合わせた培地であり、ラビリンチュラ類を培養するために通常用いられるものであれば特に限定されないが、特に好ましくは酵母エキス・グルコース寒天培地（GY培地）が用いられる。培地は調製後、pHを3.0～8.0の範囲内に調整した後、オートクレーブ等により殺菌して用いる。培養は、10～40℃、好ましくは15～35℃にて、1～14日間、通気攪拌培養、振とう培養、あ

るいは静置培養で行えば良い。

[0033] 産生した不飽和脂肪酸を回収するは、ストラメノパイルを培地で生育し、その培地から得た微生物細胞を処理し、細胞内脂質（高度不飽和脂肪酸を含む油脂含有物あるいは高度不飽和脂肪酸）を放出させ、その放出された細胞内脂質を含む培地から脂質を回収する。すなわち、このようにして培養したストラメノパイルを遠心分離等回収し、細胞を破砕し定法に従い適当な有機溶媒を用いて細胞内の脂肪酸を抽出することにより、高度不飽和脂肪酸含有率の増加した油脂を得ることができる。

[0034] 本発明は、脂肪酸不飽和化酵素遺伝子を導入した形質転換ストラメノパイルを培養することにより、ストラメノパイルが産生する脂肪酸の組成が改変されるが、これはストラメノパイルが通常産生する脂肪酸が、導入した脂肪酸不飽和化酵素により不飽和化されることによる。改変前後での脂肪酸組成の変化は、表8から表10に対比して示してある。例えば、ピングオ藻由来 $\Delta 12$ デサチュラーゼの発現により生成する脂肪酸の種類には変化はないが、導入した酵素は生成比に影響を与える。特に、オレイン酸からリノール酸への転換が起こり、その転換効率 $は30 \pm 6.6\%$ となった。

また、ある種のラビリンチュラにおける、異種ラビリンチュラ由来 $\Delta 5$ デサチュラーゼの発現試験によると、EPAの含有率が1.4倍程度上昇した。ETAまたはDGLAを含有する培地で培養すると、ETAとDGLAはそれぞれEPAとAAIに変換され、不飽和脂肪酸が増加した。ラビリンチュラ内での変換効率は、ラビリンチュラ内での前駆物質の変換効率は酵母の場合よりも高く、ETAで75%、DGLAで63%であった。これらの結果はCG-MSの試験データから得られた。

[0035] また、本発明の不飽和脂肪酸は、種々の医薬品、食品、または工業製品も含まれ、その利用分野は特に限定されない。また、本発明の不飽和脂肪酸含有油脂が含まれる食品には、サプリメント等の健康食品や、食品添加物等が含まれる。また、工業製品としては、人以外の生物を対象とした飼料、フィルム、生分解性プラスチック、機能性繊維、潤滑油、洗剤等が挙げられる。

[0036] 次に、本発明を実施例に基づいて具体的に説明するが、本発明は以下の実施例によって何ら限定されるものではない。

実施例 1

[0037] [ラビリンチュラ類とその培養法・保存法]

(1) 本発明で使用する菌株

Thraustochytrium aureum ATCC 34304、およびThraustochytrium sp. ATCC 26185はATCCより分譲を受けた。Aurantiochytrium limacinum mh0186、およびSchizochytrium sp. AL1Acは宮崎大学農学部より分譲を受けた。

また、Schizochytrium aggregatum ATCC 28209、およびUlkenia sp. ATCC 28207はATCCより分譲を受けた。Schizochytrium sp. SEK210 (NBRC 102615)、Schizochytrium sp. SEK345 (NBRC 102616)、Botryochytrium radiatum S EK353 (NBRC 104107)、およびParietichytrium sarkarianum SEK364は甲南大学理工学部より分譲を受けた。

[0038] (2) 培地組成

i. 寒天平板培地組成

PDA寒天平板培地

0.78% (w/v) ポテトデキストロース寒天培地 (日水製薬社製)、1.75% (w/v) シーライフ (マリンテック社製)、1.21% (w/v) 寒天末 (ナカライテスク社製) を混合し、121°Cで20分間オートクレーブ滅菌を行った。十分に冷却後に、バクテリアのコンタミネーションを防ぐために終濃度が100 $\mu\text{g/ml}$ となるようにアンピシリン酸ナトリウム (ナカライテスク社製) を添加し、シャーレに分注して平らな所に静置して固化させた。

[0039] ii. 液体培地組成

GY液体培地

3.18% (w/v) グルコース (ナカライテスク社製)、1.06% (w/v) 乾燥酵母エキス (ナカライテスク社製)、1.75% (w/v) シーライフ (マリンテック社製) を混合し、を混合し、121°Cで20分間オートクレーブ滅菌後に、100 $\mu\text{g/ml}$ のアンピシリン酸ナトリウム (ナカライテスク社製) を添加した。

[0040] PD液体培地

0.48% (w/v) ポテトデキストロース (Difco社製)、1.75% (w/v) シーライフ (マリンテック社製) を混合し、121°Cで20分間オートクレーブ滅菌後に、100 μ g/mlのアンピシリン酸ナトリウム (ナカライテスク社製) を添加した。

[0041] H液体培地

0.2% (w/v) グルコース (ナカライテスク社製)、0.02% (w/v) 乾燥酵母エキス (ナカライテスク社製)、0.05%グルタミン酸ナトリウム (ナカライテスク社製)、1.75% (w/v) シーライフ (マリンテック社製) を混合し、121°Cで20分間オートクレーブ滅菌後に、100 μ g/mlのアンピシリン酸ナトリウム (ナカライテスク社製) を添加した。

[0042] (3) 培養方法

i. 寒天平板培養

ラビリンチュラ菌体を白金耳、もしくはスプレッダーを用いて接種し、25°Cで静置培養することでコロニーを出現させた。その継代培養に関しては、コロニーを白金耳で釣菌して滅菌生理食塩水に懸濁後、その懸濁液を白金耳、もしくはスプレッダーを用いて塗布することで行った。尚、必要に応じて平板上の菌体を液体培地に接種することで、液体培養への転換を行った。

[0043] ii. 液体培養

ラビリンチュラ菌体を接種し、三角フラスコ、もしくは試験管を用いて、25°C、150 rpmの回転数で攪拌しながら懸濁培養を行った。その継代培養に関しては、増殖が確認された対数増殖期～定常期までの培養液を、新しいGYもしくはPD液体培地に対して1/200～1/10容添加することで行った。尚、必要に応じて細胞培養液をPDA寒天平板培地に塗布することで、寒天平板培養への転換を行った。

[0044] (4) ラビリンチュラ類の保持・保存法

継代培養に加えて、グリセロールストック作製による凍結保存を行った。すなわち、GY液体培地を用いた対数増殖期～定常期の細胞懸濁液に対して、

終濃度が15% (v/v) のグリセロール（ナカライテスク社製）を添加し、-80℃のディープフリーザー中にて保存した。

実施例 2

[0045] [ラビリンチュラ類の抗生物質感受性試験と形質転換系に用いる選択マーカーの選定]

(1) 液体培養による感受性を示す抗生物質のスクリーニング

ラビリンチュラ類4株の前培養液を、様々な抗生物質を含有したGY液体培地添加し、150 rpm、25℃で5日間培養後に600nmにおける濁度 (OD600) を測定した。使用した抗生物質と濃度、およびその結果を図1に示す。

[0046] (2) 液体培養における最小発育阻止濃度 (MIC) の決定

感受性を示した抗生物質に関して、液体培養におけるMICの決定を行った。ラビリンチュラ類4株の前培養液を、様々な濃度の各種抗生物質を含有するGY液体培地に添加し、150 rpm、25℃で5日間培養後に600nmにおける濁度 (OD600) を測定した。T. aureumの結果を図2に、Thraustochytrium sp. ATCC 26185の結果を図3に、A. limacinum mh0186の結果を図4に、Schizochytrium sp. AL1Acの結果を図5にそれぞれ示す。

[0047] (3) 寒天平板培養におけるMICの決定

ラビリンチュラ類4株の前培養液5 μ lを様々な濃度の各種抗生物質を含有するPDA寒天平板培地に滴下し、25℃で7日間培養後にコロニー形成を観察した。T. aureumの結果を図6に、Thraustochytrium sp. ATCC 26185の結果を図7に、A. limacinum mh0186の結果を図8に、Schizochytrium sp. AL1Acの結果を図9にそれぞれ示す。

[0048] これらの結果、抗生物質感受性の結果と真核生物形質転換系で用いられる選択マーカー遺伝子に鑑みて、ラビリンチュラ類の形質転換系に使用出来る選択マーカー遺伝子は、以下表1に示すものが有効であると示された。

[0049]

[表1]

供試菌株	使用可能な選択マーカー遺伝子
<i>T. aureum</i>	Neo ^r 、Hyg ^r 、Bla ^r
<i>Thraustochytrium</i> sp.	Neo ^r 、Hyg ^r 、Bla ^r 、Ble ^r
<i>A. limacinum</i> mh0186	Neo ^r 、Hyg ^r 、Bla ^r 、Ble ^r
<i>Schizochytrium</i> sp. AL1Ae	Neo ^r 、Hyg ^r

Neo^r・・・ネオマイシン耐性遺伝子 Hyg^r・・・ハイグロマイシン耐性遺伝子
 Bla^r・・・プラスタサイゾン耐性遺伝子 Ble^r・・・ブレオマイシン耐性遺伝子

実施例 3

[0050] [T. aureum由来EF-1 α およびユビキチン遺伝子の単離と、それらの遺伝子発現調節領域の単離]

(1) T. aureum由来EF-1 α 遺伝子と遺伝子発現領域の単離

i. T. aureum由来EF-1 α 遺伝子cDNA配列の単離

GY液体培地で培養したT. aureumの対数増殖期～定常期の菌体を4°C、3,500 x g、10 min遠心することによって集菌した。得た菌体を滅菌生理食塩水に懸濁後に再遠心操作を行うことで菌体を洗浄し、液体窒素によって急速凍結後に乳鉢中で粉末状になるまで搗り潰した。次に、細胞破碎液中からセパゾールRNA I Super (ナカライテスク社製) を使用して全RNAを抽出した。引き続き、Oligotex™-dT30<Super> mRNA Purification Kit (タカラバイオ社製) を使用し、全 RNAからmRNAの精製を行った。

次に、SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (clontech社製) を使用し、5' および3' 末端に合成アダプターを付加したcDNAライブラリーを作製した。また既知のEF-1 α の保存配列を元にして、DNA合成機 (Applied Biosystems社製) を使用して1つの正方向縮重オリゴヌクレオチドプライマーEF-F1 (配列表配列番号1) を作製した。これらを用いて3' RACEを行ったところ、特異的な増幅産物が確認された。そこで1%アガロースゲルによる電気泳動で分離

した該DNA断片を清浄なカッター等で切り出し、非特許文献10に記載の方法に従ってアガロースゲルからDNAを抽出した。次に、pGEMR-T easy Vector System I (Promega社製) を使用して該DNA断片のTAクローニングを行い、Sangerらの方法(非特許文献11)によってそれらの塩基配列を決定した。具体的には、BigDyeR Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kitおよび3130ジェネティックアナライザ(Applied Biosystems社製)を使用したダイターミネーター法による塩基配列決定を行った。その結果、得た980 bpの3' RACE産物(配列表配列番号2)は他生物由来EF-1 α 遺伝子と高い相同性を示すことから、*T. aureum*由来EF-1 α 遺伝子の部分配列であることが強く示唆された。

[0051] そこで、得られた配列を元にして2つの逆方向オリゴヌクレオチドプライマー EF-1r(配列表配列番号3)、およびEF-2r(配列表配列番号4)を作製し、それらを用いた5' RACEを行った。その結果、両者においてそれぞれ特異的な5' RACE産物が確認された。塩基配列解析の結果、前者は496 bp(配列表配列番号5)、後者が436 bp(配列表配列番号6)から成る*T. aureum*由来推定EF-1 α 遺伝子の部分配列であり、いずれも重複部分に関しては3' RACE産物と完全に一致することが分かった。

以上の結果から、今回得た*T. aureum*由来推定EF-1 α 遺伝子のcDNA配列は1,396 bp(配列表配列番号7)であり、うちORF領域に関しては、341アミノ酸残基(配列表配列番号8)をコードする1,023 bp(配列表配列番号9)であることが示された。

[0052] i i . *T. aureum*由来EF-1 α 遺伝子の遺伝子調節領域の単離

GY培地で培養した*T. aureum*菌体を遠心によって集菌した。得た菌体を滅菌生理食塩水に懸濁後に再遠心操作を行うことで菌体を洗浄し、液体窒素で急速凍結後に乳鉢中で粉末状になるまで搗り潰した。その後、非特許文献12に記載の方法に従ってゲノムDNAを抽出し、A260/280を測定することで、抽出したゲノムDNAの純度と濃度の測定を行った。

次に、LA PCR in vitro Cloning Kitを用いて、PCRゲノムウォーキング法によるEF-1 α 遺伝子ORF上流配列(プロモーター)、もしくはORF下流配列(タ

ーミネーター)の単離を試みた。尚、ORF上流配列の増幅に用いた逆方向オリゴヌクレオチドプライマーはr3(配列表配列番号10)、ORF下流配列の増幅に用いた正方向オリゴヌクレオチドプライマーはEF-t-F1(配列表配列番号11)およびEF-t-F2(配列表配列番号12)である。得られた特異的増幅産物の塩基配列を解析したところ、615 bpの*T. aureum*由来EF-1 α 遺伝子ORF上流配列(配列表配列番号13)、および1,414 bpのORF下流配列(配列表配列番号14)の単離に成功したことが分かった。以降、前者をEF-1 α プロモーター、後者をEF-1 α ターミネーターと表記する。

[0053] (2) *T. aureum*由来ユビキチン遺伝子と遺伝子発現領域の単離

i. *T. aureum*由来ユビキチン遺伝子cDNA配列の単離

SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (clontech社製)を用いて作製したcDNAライブラリーを鋳型として、既知のユビキチン遺伝子の保存配列を元に作製した正方向縮重オリゴヌクレオチドプライマー2F(配列表配列番号15)を使用した3' RACEを行った。得た増幅産物の塩基配列を解析したところ、278bp(配列表配列番号16)の*T. aureum*由来推定ユビキチン遺伝子の部分配列であることが分かった。5' RACEに関しては、種々のオリゴヌクレオチドプライマーの使用、およびPCR条件を試みたにも関わらず、特異的増幅産物を得ることが出来なかった。このことから、高GC含量に由来した目的mRNAの高次構造が、cDNAライブラリー作製時の逆転写反応を阻害している可能性が疑われた。

そこで、熱安定性の高い逆転写酵素を用いる5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (Invitrogen社製)を使用した5' RACEを行った。尚、逆転写反応に用いた逆方向オリゴヌクレオチドプライマー、およびcDNA合成後のPCR反応に用いた逆方向ヌクレオチドプライマーは、それぞれ1R(配列表配列番号17)、および2R(配列表配列番号18)である。得た増幅産物の塩基配列を解析したところ、260bp(配列表配列番号19)の*T. aureum*由来推定ユビキチン遺伝子の部分配列であり、3' RACE産物との重複部分は完全に一致した。以上の結果から、*T. aureum*由来推定ユビキチ

ン遺伝子cDNA配列の単離に成功したことが分かった。

[0054] しかし、ユビキチン遺伝子は一般的に同一配列の繰り返し構造を有することが知られている。すなわち今回の結果は、該遺伝子の全長構造を示すものではなく、5'、3'末端の非コード領域、およびORF領域中の繰り返し構造を構成する単一配列を明らかにしたものと推測された。尚、今回解明された*T. aureum*由来推定ユビキチン遺伝子ORF領域中の単一配列は、76アミノ酸残基（配列表配列番号20）をコードする228 bp（配列表配列番号21）であることが示された。

[0055] i i . *T. aureum*由来ユビキチン遺伝子の遺伝子調節領域の単離

LA PCR in vitro Cloning Kitを用いて、PCRゲノムウォーキング法によるユビキチン遺伝子ORF上流配列（プロモーター）、もしくはORF下流配列（ターミネーター）の単離を試みた。尚、ORF上流配列の増幅に用いた逆方向オリゴヌクレオチドプライマーはREVERS-U PR-1（配列表配列番号22）およびREVERS-U PR-2（配列表配列番号23）、ORF下流配列の増幅に用いた正方向オリゴヌクレオチドプライマーはsubqterminalf1（配列表配列番号24）およびter2F（配列表配列番号25）である。得た特異的な増幅産物の塩基配列を解析したところ、801 bpの*T. aureum*由来ユビキチン遺伝子ORF上流配列（配列表配列番号26）、および584 bpのORF下流配列（配列表配列番号27）の単離に成功したことが分かった。以降、前者をユビキチンプロモーター、後者をユビキチンターミネーターと表記する。

[0056] この結果、ラビリンチュラ類で恒常的に機能する遺伝子発現調節領域として、*T. aureum*由来のhouse keeping遺伝子であるEF-1 α およびユビキチン遺伝子のプロモーター・ターミネーターの単離に成功した。

実施例 4

[0057] [薬剤耐性遺伝子発現カセットの作製]

(1) ネオマイシン耐性遺伝子 (Neor) の人工合成

メディック社に依頼し、codon usage database (www.kazusa.or.jp/codon/) に記載の*T. aureum*のコドン使用頻度に準じた人工合成Neorを合成した。

その塩基配列を配列表配列番号 28 に示し、コードするアミノ酸配列を配列表配列番号 29 に示す。

[0058] (2) *Neor* 発現カセットの構築

i. EF-1 α プロモーター・ターミネーターを用いた *Neor* 発現カセットの構築

「日本農芸化学会誌 第77巻第2号 (2003年2月) p150-153」記載の方法に従って、fusion PCRによってEF-1 α プロモーター/人工合成 *Neor*/ EF-1 α ターミネーターから成る薬剤耐性遺伝子 (*Neor*) 発現カセットの上流に、*T. aureum* 由来18S rDNAを連結したDNA断片を、配列表配列番号 30~38 記載のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて作製した。尚、PCR反応条件は変性温度を98°C10秒とし、アニーリングおよび伸長反応はプライマーのT_mおよび増幅産物の長さによって適宜調節して行った。

その結果、4,454 bpの *T. aureum* 18S rDNA/EF-1 α プロモーター/人工合成 *Neor*/EF-1 α ターミネーターの連結に成功した (配列表配列番号 39、図10)。

[0059] 次に、pGEM-T easy (Invitrogen社製) を用いたTAクローニングを行い、ラビリンチュラ用の選択マーカーとしてEF-1 α プロモーター・ターミネーターを用いた *Neor* 発現カセット、および相同組換え部位として *T. aureum* 由来18S rDNA配列を有するラビリンチュラ-大腸菌シャトルベクターを構築した。以降、これをpEFNeomycin^rと表記する (図12)。

[0060] i i. ユビキチンプロモーター・ターミネーターを用いた *Neor* 発現カセットの構築

EF-1 α プロモーター・ターミネーターを用いた *Neor* 発現カセットの場合と同様の手法により、配列表配列番号 40~47 記載のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、*T. aureum* 18S rDNA/ユビキチンプロモーター/人工合成 *Neor*/ユビキチンターミネーターを連結した (図11)。構築した *Neor* 発現カセットをpUC18ベクターのNdeI/KpnIサイトを利用して組み込み、ラビリンチュラ用の選択マーカーとしてユビキチンプロモーター・ターミネーターを用いた *Neor* 発現カセット、および相同組換え部位として *T. aureum* 由来18S rDNA配列を有

するラビリンチュラ-大腸菌シャトルベクターを構築した。以降、これをpUBNeomycin^rと表記する（図12）。

- [0061] これらの結果、ラビリンチュラ用の選択マーカーとして、EF-1 α 遺伝子のプロモーター/ターミネーターを利用したNeor^r発現カセットを有するラビリンチュラ-大腸菌シャトルベクター-pEFNeomycin^r、およびユビキチン遺伝子のプロモーター/ターミネーターを利用したNeor^r発現カセットを有するpUBNeomycin^rを構築した。両ベクターは、Neor^rのラビリンチュラでの発現を容易にするために、*T. aureum*のcodon使用頻度を参考にcodonを最適化したNeor^rを人工合成使用している。また、相同組み換えを利用した染色体DNAへの組み込みを考慮し、*T. aureum*由来18S rDNA配列を有している（図10および11）。

実施例 5

- [0062] [ラビリンチュラへの遺伝子導入実験]

(1) 遺伝子導入実験に用いたDNA

以降に示す4種のDNAを用いた遺伝子導入実験を行った。

- (1) 環状ベクター-pUBNeomycin^r
- (2) 同 pUBNeomycin^r
- (3) ユビキチンプロモーター・ターミネーターによる直鎖状Neor^r発現カセット (ub-Neor^r)
- (4) EF-1 α プロモーター・ターミネーターによる直鎖状Neor^r発現カセット (EF-Neor^r)

(3) に関しては、pUBNeomycin^rを鋳型とし、LA taq Hot Start Version (タカラバイオ社製) を使用して1対のオリゴヌクレオチドプライマー-Ubpro-fug-18s-F (配列表配列番号42) /KpnterR (配列表配列番号47) を用いたPCRを行い、得られた増幅産物をゲル精製したもの、(4) に関してはpEFNeomycin^rを鋳型とし、LA taq Hot Start Version (タカラバイオ社製) を使用して1対のオリゴヌクレオチドプライマー-2F (配列表配列番号32) /terminator 5R (配列表配列番号33) を用いたPCRを行い、得られた増幅産物をゲル精製したものである。

[0063] (2) 遺伝子導入実験に用いた遺伝子導入法

i. エレクトロポレーション法

GY液体培地を用いて、ラビリンチュラ類を25°C、150 rpmで対数増殖期中期～後期まで培養後に、3,500 x g, 4°C, 10 min遠心し上清を除いた。得られた菌体を滅菌1.75% シーライフ (マリンテック社製) に懸濁後に、再遠心操作を行うことで菌体を洗浄した。次に、5 x 10⁶個の細胞を50 mMスクロース、もしくは使用機器に付属した遺伝子導入試薬に懸濁し、様々な条件の電気パルスを印加した。電気パルスの印加後はただちに1 mlのGY液体培地を加え、25°Cで12時間培養を行った。その後、培養液を2 mg/ml (*T. aureum*, *Thraustochytrium* sp. ATCC 26185, *Schizochytrium* sp. AL1Ac) もしくは0.5 mg/ml (*A. limacinum* mh0186) のG418を含有するPDA寒天平板培地に塗布して25°Cで静置培養を行い、G418耐性能が付与された形質転換体のコロニー形成を観察した。

[0064] i i. 遺伝子銃法

GY液体培地を用いて、ラビリンチュラ類を25°C、150 rpmで対数増殖期中期～後期まで培養後に、3,500 x g, 4°C, 10 min遠心し上清を除いた。次に、得られた菌体を元の培養液の100倍濃縮となるようにGY液体培地に再懸濁し、うち20 μ l分の細胞液を、G418を含有する/もしくは含有しない直径5 cmのPDA寒天平板培地上に、直径3 cm程度に薄く均一に塗布して乾燥させた。次に、PDS-1000 /Heシステム (バイオ・ラッド ラボラトリーズ社製) を使用した遺伝子銃法によるDNAの打ち込み操作を行った。打ち込み条件においては、以下に示すように打ち込み圧を変化させた条件を検討した。

- ・ target distance - 6 cm (固定)
- ・ vacuum - 26 inches Hg (固定)
- ・ micro carrier size - 0.6 μ m (固定)
- ・ Rupture disk (打ち込み圧) - 450, 900, 1100, 1350, および1,550

G418を含有するPDA寒天平板培地上で打ち込み操作を行った場合は、導入後12時間程度静置培養後、PDA寒天平板に100 μ lのPDA液体培地を滴下して菌体

を拡げ直して静置培養を続けた。一方、G418を含有しないPDA寒天平板培地上で打ち込み操作を行った場合は、導入後12時間程度静置培養後に菌体を回収し、2 mg/mlもしくは0.5 mg/mlのG418を含有するPDA寒天平板培地に再び塗布して25°Cで静置培養を行い、G418耐性能が付与された形質転換体のコロニー形成を観察した。

[0065] (3) 形質転換体の取得とその評価

i. A. limacinum形質転換体

まず、エレクトロポレーション法において以下に示す条件での遺伝子導入を試みた。

- ・ 導入DNA・・・pUBNeomycin^r およびub-Neor
- ・ 遺伝子導入法・・・エレクトロポレーション法
- ・ 細胞を懸濁するバッファー・・・50 mMスクロース
- ・ 遺伝子導入機器・・・Gene Pulser (バイオ・ラッド ラボラトリーズ社製) 。1 mmギャップキュベットを使用
- ・ パルス条件・・・50 μ F/50 Ω / 0.75 kV、印加回数1回。

この結果、直鎖状DNAであるub-Neorを用いた場合において、 $\sim 2.4 \times 10^0$ cfu/ μ g DNAの効率でG418耐性能を示すコロニーの出現が見られた。一方、環状DNAであるpUBNeomycin^rを用いた場合は、導入操作を複数回行ったのにも関わらず、コロニーの形成は全く見られないことが分かった。

次に、遺伝子導入機器による導入効率の比較検討を行った。Microporator MP-100 (エア・ブラウン社製) もしくはNucleofector™ (amaxa社製) を使用し、添付の条件検索キットを用いて導入試験を行った。その結果、Microporator MP-100では1個もコロニーが形成されなかった。一方、Nucleofectorを添付の細胞懸濁バッファーNucleofectorR solution Lと共に用いた場合において、 $\sim 9.5 \times 10^0$ cfu/ μ g DNAの効率で再現性よく形質転換体を得られることが分かった。

そこで次に、NucleofectorR solution Lを用いたパルス条件の検討を、Gene Pulser (バイオ・ラッド ラボラトリーズ社製) を使用して行った。その

結果、キャパシタンス50 μ F/電気抵抗50 Ω /電場強度0.75 kV、印加回数2回の場合において、 $\sim 1.2 \times 10^1$ cfu/ μ g DNAの効率で再現よく形質転換体が得られることが分かった。以上の結果をまとめ、以下表2に示す。

[0066] [表2]

遺伝子導入機器	導入試薬 (細胞懸濁バッファー)	パルス条件	遺伝子導入効率
Gene Pulser	50 mMスクロース	50 μ F/50 Ω /0.75 kV, 印加回数1回	$\sim 2.4 \times 10^6$ cfu/ μ g DNA
Microporter MP-100	添付のバッファー	マニュアル記載の条件	---
Nucleofector TM	添付のバッファー (Nucleofector TM solution L)	マニュアル記載の条件	$\sim 9.5 \times 10^6$ cfu/ μ g DNA
Gene pulser	Nucleofector TM solution L	50 μ F/50 Ω /0.75 kV, 印加回数2回	$\sim 1.2 \times 10^1$ cfu/ μ g DNA

[0067] i i i . G418耐性能を指標としたA. limacinum形質転換体の評価

得られた形質転換体は0.5 mg/ml G418含有GY液体培地で培養し、野生株はG418を含有しないGY液体培地で培養した。両株の培養液を、G418を含む (0, 0.2, 0.5, 1, 2, 4mg/ml) PDA寒天平板培地上に10 μ lずつスポットし、25°Cで2日間培養を行い、寒天平板培地上での生育を観察した。その結果、野生株は0.2 mg/mlのG418で増殖が阻害されるのに対し、形質転換体は4 mg/mlのG418存在下においても増殖することが分かった (図13A)。また、G418を含有しないGY液体培地で形質転換体を5回継代培養し、G418を含む (0, 2, 4, 8, 16, 32 mg/ml) PDA寒天平板培地を用いて同様の実験を行った場合においてもG418耐性能に変化が見られず、G418濃度が32 mg/mlの場合においても増殖が見られる (図13B) ことが分かった。このことから、G418耐性能を指標とした場合、付与された形質は安定していることが確認された。

[0068] i i i . A. limacinum形質転換体と野生株の形態の比較

顕微鏡観察 (図14A) 、およびnile redで細胞内の油球を染色した後の共焦点レーザー顕微鏡観察 (図14B) によって、野生株と今回得た形質転換体との間には、形態的な変化が見られないことが確認された。また、18S rDN A解析によって、形質転換体がA. limacinumであることも確認された。

[0069] i v . ゲノムDNAを鋳型としたPCRによるA. limacinum形質転換体の評価

得られた形質転換体は0.5 mg/ml G418含有GY液体培地で培養し、野生株はG

418を含有しないGY液体培地で培養した。ISOPLANT（ナカライテスク社製）を使用して、両株の菌体からゲノムDNAの抽出を行った。引き続いて、得られたゲノムDNAを鋳型として、LA taq Hot Start Version（タカラバイオ社製）を使用したPCRによるNeor^rの増幅をおこなった。用いたオリゴヌクレオチドプライマーはubproG418fus2F（配列表配列番号45）/G418ubtersus3R（配列表配列番号46）である（PCR cycles：94°C 2 min/98°C 10sec, 68°C 1 min, 72°C, 30 cycles/4°C）。

この結果、形質転換体においては、野生株に見られないNeor^rの特異的な増幅が観察された（図15）。このことから、導入したub-Neor^rは、染色体DNA上に組み込まれていることが示唆された。

[0070] v. サザンブロッティングによるA. limacinum形質転換体の評価

定法通り抽出したA. limacinum形質転換体と野生株の2 μgのゲノムDNAを種々の制限酵素で37°C、16時間消化した後に、「DIG説明書集 8th、Roche」に従いDIGラベルNeor^rをプローブとしたサザンブロッティングを行った。

この結果、図16Aで示すように、Neor^rのバンドが検出された。このことから、導入したユビキチンプロモーター・ターミネーターによるub-Neor^rは、染色体DNAに組み込まれていることが示された。また、同一酵素（PstI）で消化した5つの形質転換体のバンドの分子量が異なることから、導入DNA断片は、染色体DNA上にランダムに組み込まれていることが示された（図16B）。

[0071] v i. RT-PCRによるA. limacinum形質転換体の評価

セパゾールRNA l super（ナカライテスク社製）を用いて、A. limacinum形質転換体と野生株の菌体から全RNAの抽出を行った。続いて、RNeasy plus mini kit（QIAGEN社製）を使用し全RNAのクリーンアップを行った後に、Cloned DNase l（タカラバイオ社製）を使用して、添付のマニュアルに準じて37°Cで1時間反応させることで、コンタミしたゲノムDNAの分解を行った。次に、PrimeScript Reverse Transcriptase（タカラバイオ社製）を使用した逆転写反応を行い、逆転写反応によるcDNAの合成を行った。引き続いて、得られたcDNAを鋳型として、LA taq Hot Start Version（タカラバイオ社製）を使用

したPCRによるNeor^rの増幅をおこなった。用いたオリゴヌクレオチドプライマーはubproG418fus2F(配列表配列番号45)/G418ubtersus3R(配列表配列番号46)である(PCR cycles: 94°C 2 min/98°C 10sec, 68°C 1 min, 72°C, 30 cycles/4°C)。

その結果、形質転換体においてNeor^rの増幅産物が確認された(図17、レーン1~5)。全RNAを鋳型としたPCRを行った場合(図17、レーン8~13)には増幅産物が見られないことから、レーン1-5で観察された産物はゲノムDNAのコンタミではなく、Neor^r mRNAの逆転写産物(Neor^r cDNA)由来であることが示された。このことから、染色体DNA上に組み込まれたub-Neor^rは、mRNAへの転写を受けていることが明らかとなった。

[0072] v i i . T. aureum形質転換体の取得

導入DNAとして、pUBNeomycin^r、もしくはub-Neor^rの2種のDNAを使用した。様々な条件を検討した結果、エレクトロポレーション法では全く形質転換体が得られないことが判明した。そこで遺伝子銃法を検討したところ、G418耐性能が付与された形質転換体の取得に成功した。その遺伝子導入効率は1,100 psiの打ち込み圧の場合が最も高く、ub-Neor^rを導入した場合、 $\sim 1.9 \times 10^2$ cfu/ μ g DNAであることが分かった。またpUBNeomycin^rの導入効率は、 $\sim 1.4 \times 10^1$ cfu/ μ g DNAであり、18S rDNA配列を相同組み換え部位とした環状DNAを導入するよりも、直鎖状DNAを導入したランダムインテグレーションの方が、導入効率が約14倍程度高いことが分かった。また形質転換体は、G418を含有しないGY液体培地で5回継代培養したあとにおいても、そのG418耐性能を維持していることが分かった。

[0073] v i i i . T. aureum形質転換体と野生株の形態の比較

nile redで細胞内の油球を染色した後の共焦点レーザー顕微鏡観察(図18)によって、野生株と今回得た形質転換体との間には、形態的な変化が見られないことが確認された。また18S rDNA解析によって、形質転換体がT. aureumであることが確認された。

[0074] i x . ゲノムDNAを鋳型としたPCRおよびサザンブロッティングによるT. aure

um形質転換体の評価

A. Limacinum形質転換体の場合と同様に、ゲノムDNAを鋳型としたPCR（図19A）、およびサザンブロットィングによるNeor^rの検出（図19B）によって、ub-Neor^rが染色体DNAにランダムに組み込まれていることが確認された。

[0075] x. RT-PCRによるT. aureum形質転換体の評価

A. Limacinum形質転換体の場合と同様に、染色体DNA上に組み込まれたub-Neor^rは、mRNAへの転写を受けていることが明らかとなった（図20）。

[0076] x i. Thraustochytrium sp. ATCC 26185形質転換体の取得

導入DNAとして、EF-1 α プロモーター・ターミネーターによる直鎖状Neor^r発現カセット（EF-Neor^r）を使用した。条件検討の結果、エレクトロポレーション法において、ごく低い遺伝子導入効率（10⁻¹ cfu/ μ g DNA以下）で形質転換体を得た。また形質転換体は、G418を含有しないGY液体培地で5回継代培養したあとにおいても、G418耐性能を維持していることが分かった。

[0077] x i i. ゲノムDNAを鋳型としたPCRおよびサザンブロットィングによるThraustochytrium sp. ATCC 26185形質転換体の評価

A. Limacinum形質転換体の場合と同様に、ゲノムDNAを鋳型としたPCR（図21A、B）、およびサザンブロットィングによるNeor^rの検出（図21C）によってEF-Neor^rが染色体DNAにランダムに組み込まれていることが確認された。しかし解析した3つの形質転換体のうちの1つ（Transfectant 2）に関しては、ターミネーター領域の一部欠損が示唆された（図21B、レーン7）。

[0078] x i i i. RT-PCRによるThraustochytrium sp. ATCC 26185形質転換体の評価

ターミネーター領域の一部欠損が示唆されたTransfectant 2を含めて（図22、レーン14）、染色体DNA上に組み込まれたEF-Neor^rは、mRNAへの転写を受けていることが明らかとなった（図22A、B）。

[0079] x i v. Schizochytrium sp. AL1Ac形質転換体の取得

導入DNAとして、ub-Neor^rを使用した。様々な条件検討にも関わらず、エレクトロポレーション法では形質転換体を得ることが出来なかった。そこで遺伝

子銃法の条件検討を行ったところ、1,100 psiの打ち込み圧において、ごく低い遺伝子導入効率 (10^{-1} cfu/ μ g DNA以下) で形質転換体を得た。また形質転換体は、G418を含有しないGY液体培地で5回継代培養したあとにおいても、G418耐性能を維持していることが分かった。

[0080] x v. ゲノムDNAを鋳型としたPCRによる Schizochytrium sp. AL1Ac形質転換体の評価

A. limacinum形質転換体の場合と同様に、ゲノムDNAを鋳型としたPCR (図23) によって、導入DNA断片が染色体DNAに組み込まれていることが強く示唆された。

[0081] これらの遺伝子導入実験の結果、直鎖状DNAを用いたランダムインテグレーションを利用し、エレクトロポレーション法もしくは遺伝子銃法を使い分けることで、ラビリンチュラ4株全ての形質転換体を得ることが可能になった (表3)。

[0082] [表3]

供試菌株	遺伝子導入法	遺伝子導入効率
<i>A. limacinum</i> mh0186	エレクトロポレーション法	$\sim 1.2 \times 10^1$ cfu/ μ g DNA
<i>T. aureum</i>	遺伝子銃法	$\sim 1.9 \times 10^2$ cfu/ μ g DNA
<i>Thraustochytrium</i> sp.	エレクトロポレーション法	$\sim 10^0$ cfu/ μ g DNA
<i>Schizochytrium</i> sp. AL1Ac	遺伝子銃法	$\sim 10^0$ cfu/ μ g DNA

[0083] また、得られた形質転換体のG418耐性能は安定しており、ゲノムDNAを鋳型としたPCRとサザンブロットィング解析において、導入DNAが染色体DNAにランダムに組み込まれていることが示された。

実施例 6

[0084] 形質転換による Aurantiochytrium limacinum mh0186および Thraustochytrium aureum ATCC 34304での異種タンパク質の発現

(1) オワンクラゲ緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein ; GFP) の発現

i. GFP遺伝子のmh0186ゲノムDNAへの組み込み

Thraustochytrium aureum ATCC 34304 (American type culture collectionより分譲) 由来ユビキチン遺伝子由来プロモーター領域とターミネーター領域、およびEnhanced GFP遺伝子 (Clontech社製) をPrimeSTAR GC polymerase kit (タカラバイオ社製) を用いたPCRにより増幅した (PCRサイクル: 94°C 2 min/94°C 1 min, 62°C 30 sec, 72°C 1 min, 30 cycles/4°C)。次に、プロモーター領域とGFP遺伝子をPrimeSTAR GC polymerase kit (タカラバイオ社製) を用いたFusion PCRによって連結した (PCRサイクル: 94°C 2 min/94°C 1 min, 62°C 30 sec, 72°C 2 min, 30 cycles/4°C)。その後、これを鋳型としてPrimeSTAR GC polymerase kit (タカラバイオ社製) を用いたFusion PCRを行い、プロモーター領域・GFP遺伝子・ターミネーター領域を連結した (PCRサイクル: 94°C 2 min/94°C 1 min, 62°C 30 sec, 72°C 3 min, 30 cycles/4°C)。連結したDNA断片は、pGEM-T Easyベクター (Promega社製) に組み込んだ。このプラスミドを鋳型として、プライマーUb-pro-F1 (配列表配列番号48) とUb-term-R2 (配列表配列番号49)、PrimeSTAR GC polymerase kit (タカラバイオ社製) を用いたPCRを行うことによって、作製したGFP遺伝子カセットの両端にKpn I siteを付加した。その後、人工合成ネオマイシン耐性遺伝子カセット (ユビキチン遺伝子由来プロモーター領域とターミネーター領域) を含むpUC18ベクターのKpn I site (ターミネーター領域の直後) に組み込むことによって、GFP遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセットを作製した。GFP遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセットを含むベクターはpNeoGFPと名づけた。

作製したGFP遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセットを、プライマーUb18Spro-F2 (配列表配列番号50) とpUC18-R (配列表配列番号51)、PrimeSTAR GC polymerase kit (タカラバイオ社製) を用いて増幅し、精製した。精製したDNA断片5 μ gをmh0186株に導入した。導入は、200 mlのGY液体培地で

3日間培養した細胞を使用して、最終細胞懸濁液として0.3 Mソルビトール（和光純薬工業社製）、またはNucleofector Solution L（lonza社製）に懸濁し、0.75 kV、50Ω、50 μFの条件でGENE PULSER（登録商標）II（バイオ・ラッド ラボラトリーズ社製）を用いた電圧ポレーション法による遺伝子導入操作を行った。また、同様に精製したDNA断片0.625 μgを、200 mlのGY液体培地で5日間培養した*T. aureum*に、Standard Pressure Kit（バイオ・ラッド ラボラトリーズ社製）とPDS-1000/Heシステム（バイオ・ラッド ラボラトリーズ社製）を用いた遺伝子銃法によって導入した。導入条件としては、0.6 Micronの金粒子、Target distance 6 cm、Vacuum 26 mmHg、Rupture disk 1, 100 PSIで行い、PDA寒天平板培地（2 mg/ml G418含有）に塗布した菌体に打ち込んだ。

mh0186株に関しては3日間100 mlのGY液体培地（0.5 mg/ml G418含有）で培養した菌体、*T. aureum*に関しては7日間100 mlからのGY液体培地（2 mg/ml G418含有）で培養した菌体からゲノムDNAを抽出し、Ultrospec 3000（Amersham Pharmacia Biotech社製）を用いてA260/280を測定することで、抽出したゲノムDNAの純度と濃度の測定を行った。抽出したゲノムDNAを鋳型として、プライマー3F（配列表配列番号52）、4R（配列表配列番号53）、Ub-GFP-F（配列表配列番号54）、UB-GFP-R（配列表配列番号55）、およびLA Taq HS polymerase Kit（タカラバイオ社製）を用いたPCRを行った（PCRサイクル：98°C 2 min/98°C 20 sec, 60°C 30 sec, 72°C 1 min, 30 cycles/4°C）。

[0085] 表4に示すキメラプライマーを用いたFusion PCRの結果、GFP遺伝子・ユビキチン遺伝子プロモーター領域・ユビキチン遺伝子ターミネーター領域全ての連結することができた。さらに、この連結断片を人工合成ネオマイシン耐性遺伝子カセット（ユビキチン遺伝子由来プロモーター領域とターミネーター領域）を含むpUC18ベクター（タカラバイオ社製）のKpnI site（ターミネーター領域の直後）に組み込むことによって、GFP遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセットを作製した（図24）。作製したGFP遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセットを*A. limacinum* mh0186株および*T. aureum*に導入

した結果、形質転換体を取得することができた。得られた形質転換体に対してゲノムDNAを鋳型としたPCRを行ったところ、GFP遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセット形質転換体のゲノムDNA中には、確かにGFP遺伝子およびネオマイシン耐性遺伝子が組み込まれていることが確認された（図25）。

[0086] [表4]

Name	Sequence	Direction
Ub18Spro-F2	5'-AGAGGAAGGTGAAGTCGTAACAAGCGCTTAGA-3'	Forward
Ub-pro-F1	5'-TCGGTACCCGTTAGAACGCGTAATACGAC-3'	Forward
Ub-pro-R1	5'-TCCTCGCCCTTCTCACCATGTTGGCTAGTGTTCCTTAGGT-3'	Reverse
Ub-GFP-F	5'-ACCTAAGCAACACTAGCCAACATGGTGAGCAAGGGCGAGGA-3'	Forward
Ub-GFP-R	5'-AGCACATACTACAGATAGCTTAGTTTACTTGTACAGCTCGTCCA-3'	Reverse
Ub-term-F1	5'-TGGACGAGCTGTACAAGTAAACTAAGCTATCTGTAGTATGTGCT-3'	Forward
Ub-term-R1	5'-ATCTAGAACC GCGTAATACGACTCACTATAGGGAGAC-3'	Reverse
Ub-term-R2	5'-TCGGTACCACCGCGTAATACGACTCACTATAGGGAGACTGCAGTT-3'	Reverse
pUC18-R	5'-AACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGG-3'	Reverse

Ub-pro-F1とUb-term-R2はともに、配列中にKpn Iサイトを有している（下線部）。

[0087] i i . GFP mRNAの発現

mh0186株に関しては3日間100 mlのGY液体培地（0.5 mg/ml G418含有）で本培養した菌体、T. aureumに関しては7日間100 mlからのGY液体培地（2 mg/ml G418含有）で培養した菌体から、セパゾールRNA I Super（ナカライテスク社製）を用いてTotal RNAを抽出した。次に、RNeasy Mini Kit（QIAGEN社製）を用いてTotal RNAのクリーンアップを行った。さらに、Cloned DNase I（タカラバイオ社製）を用いたDNase処理を行うことによって、純度の高いTotal RNAを精製し、Ultrospec 3000（Amersham Pharmacia Biotech社製）を用いてA260/280を測定することで、精製したTotal RNAの純度と濃度の測定を行った。その後、精製したTotal RNAから、PrimeScript™ Reverse Transcriptase（タカラバイオ社製）を用いてcDNAを作製した。作製したcDNAを鋳型として、プライマー3F（配列表配列番号52）、4R（配列表配列番号53）、Ub-GFP-F（配列表配列番号54）、UB-GFP-R（配列表配列番号55）、LA Taq HS polymerase kit（タカラバイオ社製）を用いてPCRを行った（PCRサイクル：98℃ 2 min/98℃ 20 sec, 60℃ 30 sec, 72℃ 1 min, 30 cycles/4℃）。この結果、組み込まれたGFP遺伝子およびネオマイシン耐性遺伝子は、mRNAへと転写されていることが示された（図26）。

[0088] i i i . GFPの発現

mh0186株に関しては3日間3 mlのGY液体培地 (0.5 mg/ml G418含有) で培養した菌体、*T. aureum*に関しては7日間100 mlからのGY液体培地 (2 mg/ml G418含有) で培養した菌体1 mlを室温、3,500 x g、10 min遠心して集菌した。集菌した菌体を500 μ lの滅菌SEA LIFEで2回洗浄し、共焦点レーザー顕微鏡 (ECLIPSE TE2000-U; ニコン社製) 下 (40 \times 60倍、油浸レンズ、励起光Arレーザー 488 nm) で観察し、EZ-G1ソフトウェア (ニコン社製) を用いて画像を取得した。

共焦点レーザー顕微鏡観察の結果、得られたGFP遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセット形質転換体では、wild-typeにはみられないGFPの蛍光が観察された (図27)。

[0089] (2) ピンギオ藻の Δ 12デサチュラーゼの発現i . Δ 12デサチュラーゼのクローニング

Pinguiochrysis pyriformis MBIC 10872 (Marine Biotechnology Institute Culture collectionより分譲) をESM培地 (NIESコレクションの培地リストに記載の方法で作製) で培養した後、体数増殖期後期の菌体を4 $^{\circ}$ C、6,000 x g、15 min遠心することによって集菌した。集菌した菌体を液体窒素により凍結し、フェノール/SDS/LiCl法 (1) によってTotal RNAを抽出した。得られたTotal RNAから、mRNA Purification Kit (GE healthcare Bio-sciences社製) を用いてpoly (A)+RNAを精製した。精製したpoly (A)+RNAから、Ready-To-Go T-Primed First-Strand Kit (GE healthcare Bio-sciences社製) を用いて一本鎖cDNAを作製した。作製したcDNAを鋳型として、既知の Δ 12デサチュラーゼの保存配列を元に作製したプライマーF1 (配列表配列番号56)、R1 (配列表配列番号57)、およびAdvantageTM 2 PCR Kit (Clontech社製) を用いたPCRを行った (PCRサイクル: 95 $^{\circ}$ C 30 sec, 50 $^{\circ}$ C 30 sec, 68 $^{\circ}$ C 2 min, 40 cycles/4 $^{\circ}$ C)。増幅したPCR産物は、pGEM-T easy vector (Promega社製) に組み込んだ後に、エレクトロポレーション法によりコンピタントセル DH5 α (東洋紡績社製) に導入した。抽出した形質転換体プラスミドを鋳型とし、D

ye Terminator Cycle Sequencing Kit (BECKMAN COULTER社製) を用いたシーケンスにより塩基配列を解析した。P. pyriformisのcDNAライブラリーを、Lambda cDNA Library Construction Kits(Stratagene社製) を用いて構築した。ECL Direct Nucleic Acid Labeling and Detection System(GE healthcare Bio-sciences社製) を用いたブランクハイブリダイゼーションにより、ポジティブクローンのスクリーニングを行った。プローブとのインキュベーション条件は、8 ng/mlの濃度で添加した標識プローブと42°Cで3時間、洗浄条件は、primary wash (ウレア無し) は55°Cで10分間を2回、secondary wash (ウレア無し) は室温で5分間を2回、とした。プローブには、取得した部分配列を含むプラスミドを鋳型とし、プライマーSP1/F (配列表配列番号58)、SP1/R (配列表配列番号59)、およびAdvantage™ 2 PCR Kit (Clontech社製) を用いたPCRにより増幅した314 bpのcDNA断片を用いた (PCRサイクル: 94°C 3 min/94°C 30 sec, 56°C 30 sec, 68°C 1 min, 35 cycles/4°C)。数回のスクリーニング後、得られたポジティブクローンはExAssistヘルパーファージ(Stratagene社製) を用いてλファージからpBluescript(Stratagene社製) に移し変えた。

この結果、515 bpの推定Δ12デサチュラーゼ遺伝子部分配列の増幅に成功した。取得したDNA断片をプローブとしたブランクハイブリダイゼーションによる、目的遺伝子全長を含むポジティブクローンのスクリーニングを行った結果、 5.5×10^6 個のクローンから7つの陽性クローンの単離に成功した。これらの配列を解析した結果、取得した遺伝子は、437アミノ酸をコードする1,314 bpのORFを含む遺伝子であることが示唆された。

[0090] i i . 他生物由来のΔ12デサチュラーゼとのアライメント

P. pyriformis、真菌および原虫由来Δ12デサチュラーゼのアミノ酸配列を対象として、ClustalW 1.81とESPrpt 2.2 (<http://esprpt.ibcp.fr/ESPrpt/cgi-bin/ESPrpt.cgi>) による多重アライメント解析を行った。

この結果、取得した遺伝子のアミノ酸配列は、他生物由来のΔ12デサチュラーゼ遺伝子のアミノ酸配列と高い同一性を示すことが明らかとなった (図

28)。また、取得した遺伝子の推定アミノ酸配列中には、デサチュラーゼ全般において保存されている、3つのヒスチジンボックスが保存されていた（図28）。

[0091] iii. 系統解析

P. pyriformis由来 $\Delta 12$ デサチュラーゼを含む、 $\Delta 12$ デサチュラーゼおよび $\Delta 12/\Delta 15$ デサチュラーゼの分子系統樹を、MOLPHY version 2.3 computer program package（非特許文献13）を用いた最尤法によって作成した。まず、全てのアミノ酸配列を用いて、ClustalW 1.81による多重アライメントを行った。次に、不確定部分を除去した後に、近隣結合法（2）による系統樹を初期系統樹とした最尤系統樹の探索を行った。

この結果、取得した推定 $\Delta 12$ デサチュラーゼ、他生物由来の $\Delta 12$ デサチュラーゼおよび $\Delta 12/\Delta 15$ デサチュラーゼは、fungal & nematode $\Delta 12$ デサチュラーゼ群、plant $\Delta 12$ デサチュラーゼ群、cyanobacterial and chloroplast-localized plant $\Delta 12$ デサチュラーゼ群の3つの系統群に分類された。そして、取得した推定 $\Delta 12$ デサチュラーゼは、fungal & nematode $\Delta 12$ デサチュラーゼ群に分類され、Saprolegnia diclina由来 $\Delta 12$ デサチュラーゼと最も近縁であることが明らかとなった（図29）。

[0092] iv. $\Delta 12$ デサチュラーゼの酵母での発現

P. pyriformis由来 $\Delta 12$ デサチュラーゼ遺伝子全長を含むプラスミドを鋳型として、プライマーPyr-F（配列表配列番号60）、Pyr-R（配列表配列番号61）、およびPrimeSTAR GC polymerase kit（タカラバイオ社製）を用いたPCRを行い、両端にHindIII制限酵素サイトとXba I 制限酵素サイトを付加した。増幅断片をpGEM-T-Easyベクター（Promega社製）に組み込んで配列解析を行い、増幅ミスが無かったプラスミドからHindIII/Xba I 処理によって $\Delta 12$ デサチュラーゼ遺伝子を切り出し、同様に制限酵素処理した酵母用ベクターpYES2/CT（Invitrogen社製）に組み込み、 $\Delta 12$ デサチュラーゼ遺伝子発現ベクターpYp $\Delta 12$ Desを構築した。構築した $\Delta 12$ デサチュラーゼ遺伝子発現ベクターpYp $\Delta 12$ DesおよびpYES2/CTを「Current Protocols in Molecular Biology, Un

it 13 (Ausubel et al., 1994)」および「Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology (Gutherie and Fink, 1991)」記載の方法に従い、酢酸リチウム法によって出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*に導入し形質転換体の選別を行った。次に、得た形質転換体 (pYp Δ 12Des導入株およびmock導入株) をQiuらの方法 (Qiu, X., et al. J. Biol. Chem. (2001) 276, 31561-6) に準じて培養し、菌体由来脂肪酸の抽出とメチルエステル化を行った。GC解析にはガスクロマトグラフGC-2014 (島津製作所社製) を使用し、カラム: HR-S S-10 (30 m x 0.25 mm; 信和化工社製)、カラム温度: 150°C \rightarrow (5°C/min) \rightarrow 220°C (10 min)、キャリアガス: He (1.3 mL/min) の条件で行った。また、GC-MS解析には、GC-17A 及びGCMS-QP-5000 (島津製作所社製) を使用し、DB-1キャピラリーカラム (0.25 mm i.d. x 30 m, film thickness 0.25 μ m; アジレント社製) を用い、カラム温度160°C \rightarrow (4°C/min) \rightarrow 260°C、インジェクターポート温度250°Cの条件で行った。また、さらに解析が困難であったピークに関しては、ピコリニルエステル化した脂肪酸を前記と同じ装置及びカラムを用い、240°C \rightarrow (2.5°C/min) \rightarrow 260°C (15min \rightarrow (2.5°C/min) \rightarrow 280°Cの温度条件で解析を行った。

[0093] 取得した遺伝子が確かに Δ 12デサチュラーゼをコードしているのかを検証するために、発現ベクターを構築し、出芽酵母*S. cerevisiae* (Invitrogen社製) を宿主とした発現実験を行った。まず、pYp Δ 12Des導入株およびpYES2/CT導入株の脂肪酸組成のGC解析を行った結果、リノール酸のリテンションタイムに相当する位置に、mockコントロールにはみられない新規ピークが、pYp Δ 12Des導入株において確認された (図30)。次に、この新規ピークのGC-MS解析を行った結果、その分子量およびフラグメントパターンは、標品のリノール酸メチルエステルのもので一致することが明らかとなった (図31)。転換効率 (%) = $\text{product} (\%) / (\text{product} (\%) + \text{substrate} (\%)) \times 100$ 、という計算式に基づいて算出した場合、オレイン酸からリノール酸への転換効率は 23.5 ± 1.23 % であり、その他の脂肪酸に対する活性は見られなかった (表5)。

[0094] [表5]

外来基質は全て、終濃度40 μMとなるように添加した。基質 (%) と産物 (%) はともに、総脂肪酸に対する割合 (GCのピーク面積) を表している。

転換効率% Conversion = 100 × (産物) / (産物 + 基質)。値は全て平均±標準偏差であり、n=3である。

基質	基質 (%)	産物	産物 (%)	転換効率 (%)
Mock				
18:1 ^{Δ9a}	29.6 ± 1.15	18:2 ^{Δ9, 12}	ND ^c	0
16:1 ^{Δ9a}	47.04 ± 0.62	16:2 ^{Δ9, 12}	ND ^c	0
pYpd12des				
14:1 ^{Δ9b}	3.99 ± 0.38	14:2 ^{Δ9, 12}	ND ^c	
16:1 ^{Δ9a}	45.8 ± 0.80	16:2 ^{Δ9, 12}	ND ^c	
18:1 ^{Δ9a}	21.3 ± 0.27	18:2 ^{Δ9, 12}	6.56 ± 0.49	23.5 ± 1.23
18:1 ^{transΔ9b}	7.60 ± 2.23	18:2 ^{transΔ9, 12}	ND ^c	
18:2 ^{Δ9, 12b}	18.5 ± 0.30	18:3 ^{Δ9, 12, 15}	ND ^c	
18:3 ^{Δ6, 9, 12b}	16.3 ± 1.32	18:4 ^{Δ9, 9, 12, 15}	ND ^c	
20:3 ^{Δ8, 11, 14b}	18.8 ± 0.31	20:4 ^{Δ9, 11, 14, 17}	ND ^c	
20:4 ^{Δ5, 8, 11, 14b}	26.8 ± 0.75	20:5 ^{Δ5, 8, 11, 14, 17}	ND ^c	
22:4 ^{Δ7, 10, 13, 16b}	4.21 ± 0.16	22:5 ^{Δ7, 10, 13, 16, 19}	ND ^c	

^a 内因性の脂肪酸

^b 外因性の脂肪酸

^c ND, 検出限界以下。

[0095] v. Δ12デサチュラーゼ遺伝子のmh0186ゲノムDNAへの組み込み

まず、ユビキチン遺伝子由来プロモーター領域とターミネーター領域、およびΔ12デサチュラーゼ遺伝子をPrimeSTAR GC polymerase kit (タカラバイオ社製) を用いたPCRにより増幅した (PCRサイクル: 94°C 2 min/94°C 1 min, 62°C 30 sec, 72°C 1.5 min, 30 cycles/4°C)。次に、プロモーター領域とΔ12デサチュラーゼ遺伝子をPrimeSTAR GC polymerase kit (タカラバイオ社製) を用いたFusion PCRによって連結した (PCRサイクル: 94°C 2 min/94°C 1 min, 62°C 30 sec, 72°C 2.5 min, 30 cycles/4°C)。その後、これを鋳型としてPrimeSTAR GC polymerase kit (タカラバイオ社製) を用いたFusion PCRを行い、プロモーター領域・GFP遺伝子・ターミネーター領域を連結した (PCRサイクル: 94°C 2 min/94°C 1 min, 62°C 30 sec, 72°C 3 min, 30 cycles/4°C)。連結したDNA断片は、pGEM-T Easyベクター (Promega社製) に組み込んだ。このプラスミドを鋳型とし、PrimeSTAR MAX DNA polymerase (タカラバイオ社製) を用いて、Δ12デサチュラーゼ遺伝子の配列中にあるKpn I siteに一

塩基変異を導入した。続いて、Kpn I 処理によって連結断片を切り出し、人工合成ネオマイシン耐性遺伝子カセット（両端にEF1- α 遺伝子由来プロモーター領域およびターミネーター領域を連結）を含むpUC18ベクター（タカラバイオ社製）のKpn I siteに組み込んだ。 $\Delta 12$ デサチュラーゼ遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセットを含むベクターは、pNeoDes12と名づけた。作製に要したPCRプライマーの配列は、表6に示した。作製した $\Delta 12$ デサチュラーゼ遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセットを、プライマー2F（配列表配列番号62）とpUC18-R（配列表配列番号51）、PrimeSTAR GC polymerase kitを用いて増幅し、精製した。精製したDNA断片5 μ gを、(1)-1. 同様に、mh0186株に導入した。最終細胞懸濁液としては、Nucleofector Solution L（lonza社製）を用いた。3日間、100 mlのGY液体培地（0.5 or 2 mg/ml G418含有）で本培養した菌体からゲノムDNAを抽出し、Ultrospec 3000（Amersham Pharmacia Biotech社製）を用いてA260/280を測定することで、抽出したゲノムDNAの純度と濃度の測定を行った。抽出したゲノムDNAを鋳型として、プライマー3F（配列表配列番号52）、4R（配列表配列番号53）、ub pro-D12d-F（配列表配列番号63）、ub term- $\Delta 12$ d-R（配列表配列番号64）、およびLA Taq HS polymerase Kit（タカラバイオ社製）を用いたPCRを行った（PCRサイクル：98°C 2 min/98°C 20 sec, 60°C 30 sec, 72°C 1.5 min, 30 cycles/4°C）。

[0096] 表6に示すキメラプライマーを用いたFusion PCRの結果、 $\Delta 12$ デサチュラーゼ遺伝子・ユビキチン遺伝子プロモーター領域・ユビキチン遺伝子ターミネーター領域全ての連結に成功した。さらに、この連結断片を人工合成ネオマイシン耐性遺伝子カセット（EF1- α 遺伝子由来プロモーター領域とターミネーター領域）を含むpUC18ベクターのKpn I siteに組み込むことによって、 $\Delta 12$ デサチュラーゼ遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセットを作製した（図32）。作製した $\Delta 12$ デサチュラーゼ遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセットをmh0186株に導入した結果、形質転換体を取得することに成功した。得られた形質転換体に対してゲノムDNAを鋳型としたPCRを行ったところ

、Δ12デサチュラーゼ遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセット形質転換体のゲノムDNA中には、確かにΔ12デサチュラーゼ遺伝子およびネオマイシン耐性遺伝子が組み込まれていることが確認された（図33）。

[0097] [表6]

Name	Sequence	Direction
18S	5'-CGAATATTCTCTGGTTGATCTGCCAGTAGT-3'	Forward
1R	5'-GTAAAGGGCTTTTTTGAATTGCAGGTTCACTACGGAAAACCTTGTTA-3'	Reverse
2F	5'-GGTTTCGGTAGTGAACCTGCAATTCAAAAAAAGCCGTTACTCACAT-3'	Forward
3R	5'-AAGGCCGGTCTCTGTTCAATCATCTAGCCTTCCTTTGCCGCTGCTTGCT-3'	Reverse
3F	5'-CAGCGCCAAAAGGAAGGCTAGATGATTGAACAGGACGGCCCTTCACGC-3'	Forward
4R	5'-GCGCATAGCCGGCCGGGATCTCAAAAGAACTCGTCCAGGAGGGCGT-3'	Reverse
4F	5'-TCCTGGACGAGTTCCTTTGAGATCCGCGCCGGCTATGCGCCCGTGC-3'	Forward
5R	5'-CACTGCAGCGAAAAGACGGGCCCTAAGGACG-3'	Reverse
Ub-pro-F1	5'-TCGGTACCCGTTAGAACGGCTAATACGAC-3'	Forward
ub-pro-D12d-R	5'-AGGTTTCCTCCACGACCCATGTTGGCTAGTGTTCCTTAGGTGCT-3'	Reverse
ub-pro-D12d-F	5'-CCTAAGCAACACTAGCCAACATGGGTCGTGGAGGAAAACCTCTCCA-3'	Forward
ub-term-D12d-R	5'-ATACTACAGATAGCCTTAGTTTTAGTCTGCGCCTTGTAGAACACA-3'	Reverse
ub-D12d-term-F	5'-TCTACAAGCGCCACGACTAAAACIAAGCTATCTGTAGTATGTGCT-3'	Forward
Ub-term-R2	5'-TCGGTACCCACCGCGTAATACGACTCACTATAGGGAGACTGCAGTT-3'	Reverse
pUC18-R	5'-AACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGG-3'	Reverse
D12d-F2	5'-CGCGGTGGGCACCGGTGTCTGGGTCACTCGC-3'	Forward
D12d-R2	5'-ACACCGGTGCCACCGCGCCCTGCCAGAA-3'	Reverse

18Sと5Rはそれぞれ、配列中にSsp I サイトもしくはPst I サイトを有する（下線部）。
 Ub-pro-F1とUb-term-R2はともに、配列中にKpn I サイトを有する（下線部）。
 D12d-F2とD12d-R2の配列中の太字でイタリック体の文字は、変異を導入した塩基を示している。

[0098] v i . Δ12デサチュラーゼ遺伝子のT. aureumゲノムDNAへの組み込み

作製したΔ12デサチュラーゼ遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセットを、プライマー2F（配列表配列番号62）とpUC18-R（配列表配列番号51）、PrimeSTAR GC polymerase kitを用いて増幅し、精製した。精製したDNA断片0.625 μgを、200 mlのGY液体培地で5日間培養した菌体に、Standard Pressure Kit（バイオ・ラッド ラボラトリーズ社製）とPDS-1000/Heシステム（バイオ・ラッド ラボラトリーズ社製）を用いた遺伝子銃法によって導入した。導入条件としては、0.6 Micronの金粒子、Target distance 6 cm、Vacuum 26 mmHg、Rupture disk 1,100 PSIで行い、PDA寒天平板培地（2 mg/ml G418含有）に塗布した菌体に打ち込んだ。7日間、100 mlのGY液体培地（2 mg/ml G418含有）で培養した菌体からゲノムDNAを抽出し、Ultrospec 3000（Amersham Pharmacia Biotech社製）を用いてA260/280を測定することで、抽出したゲノムDNAの純度と濃度の測定を行った。抽出したゲノムDNAを鋳型として、

プライマー3F（配列表配列番号52）、4R（配列表配列番号53）、ub pro-D12d-F（配列表配列番号63）、ub term-D12d-R（配列表配列番号64）、およびLA Taq HS polymerase Kit（タカラバイオ社製）を用いたPCRを行った（PCRサイクル：98°C 2 min/98°C 20 sec, 60°C 30 sec, 72°C 1.5 min, 30 cycles/4°C）。

[0099] 作製した Δ 12デサチュラーゼ遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセットを*T. aureum*に導入した結果、形質転換体を取得することに成功した。得られた形質転換体に対してゲノムDNAを鋳型としたPCRを行ったところ、 Δ 12デサチュラーゼ遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセット形質転換体のゲノムDNA中には、確かに Δ 12デサチュラーゼ遺伝子およびネオマイシン耐性遺伝子が組み込まれていることが確認された（図34）。

[0100] v i i . Δ 12デサチュラーゼ mRNAのmh0186株における発現

3日間、100 mlのGY液体培地（0.5 mg/ml G418含有）で本培養した菌体から、セパゾールRNA I Super（ナカライテスク社製）を用いてTotal RNAを抽出した。実施例1(1)-2.と同様に、純度の高いTotal RNAを精製し、cDNAを作製した。作製したcDNAを鋳型として、プライマープライマー3F（配列表配列番号52）、4R（配列表配列番号53）、ub pro-D12d-F（配列表配列番号63）、ub term-D12d-R（配列表配列番号64）、およびLA Taq HS polymerase kit（タカラバイオ社製）を用いてPCRを行った（PCRサイクル：98°C 2 min/98°C 20 sec, 60°C 30 sec, 72°C 1.5 min, 30 cycles/4°C）。

この結果、cDNAを鋳型としたPCRの結果から、組み込まれた Δ 12デサチュラーゼ遺伝子およびネオマイシン耐性遺伝子は、mRNAへと転写されていることが示された（図35）。

[0101] v i i i . Δ 12デサチュラーゼ mRNAの*T. aureum*における発現

7日間、100 mlのGY液体培地（2 mg/ml G418含有）で本培養した菌体から、セパゾールRNA I Super（ナカライテスク社製）を用いてTotal RNAを抽出した。実施例1(1)-2.と同様に、純度の高いTotal RNAを精製し、cDNAを作製した。作製したcDNAを鋳型として、プライマープライマー3F（配列表配列番号5

2)、4R(配列表配列番号53)、ub pro-D12d-F(配列表配列番号63)、ub term-D12d-R(配列表配列番号64)、およびLA Taq HS polymerase kit(タカラバイオ社製)を用いてPCRを行った(PCRサイクル:98°C 2 min/98°C 20 sec,60°C 30 sec,72°C 1.5 min,30 cycles/4°C)。

この結果、cDNAを鋳型としたPCRの結果から、組み込まれた Δ 12デサチュラーゼ遺伝子およびネオマイシン耐性遺伝子は、mRNAへと転写されていることが示された(図34)。

[0102] (3) Thraustochytrium aureum由来 Δ 5デサチュラーゼの発現

i. Δ 5デサチュラーゼのクローニング

Thraustochytrium aureum ATCC 34304に近種のThraustochytrium sp. ATCC 26185が持つ Δ 5デサチュラーゼの配列中に存在する保存領域において、プライマー3F(配列表配列番号65)および1R(配列表配列番号66)を作製した。次にAdvantage 2 PCR Kit (Clontech社製)を用いて、T. aureum由来のRACE cDNAライブラリを鋳型としnested-PCR(PCRサイクル:94°C 30 sec, 50°C 30 sec, 72°C 2 min, 30 cycle)を行った結果、挟み込みのプライマーセット(1R NES:配列表配列番号67)により目的サイズの増幅断片が得られた。

この挟み込みのプライマーにより得た予想サイズのDNA断片(550bp)を解析したところ、T. aureumのもつ Δ 5デサチュラーゼであったため、この増幅断片から100%マッチのプライマー(RACEd5F:配列表配列番号68、およびRACEd5FNES:配列表配列番号69)を作製し、Advantage 2 PCR Kitを用いてRACE PCR(PCRサイクル:94°C 30 sec, 50°C 30 sec, 72°C 2 min, 30 cycle)を行ったところ、700bpの Δ 5デサチュラーゼの3'末端が得られた。

次にこの既知配列からReverseプライマーGSP1(配列表配列番号70)を作製し5' RACE PCRを行ったが、得られた5' RACE産物は予想サイズより短いものであった(PCRサイクル:94°C 30 sec/72°C 3 min, 5cycle、94°C 30 sec/70°C 30 sec/72°C 3 min, 5cycle、94°C 30 sec/68°C 30 sec/72°C 3 min, 20cycle)。そのためcDNAを鋳型としたPCRをやめ、ゲノムカセットラ

イブラリー (TaKaRa LA PCR in vitro Cloning Kit) を鋳型としたPCR (プライマーGSP2 (配列表配列番号71)) を前述同様に行った。その結果、BglIIカセットライブラリーを鋳型としたPCRを行ったところプライマー作製部位よりおよそ2.5kbp上流のゲノム配列を取得することが出来た。

ゲノムウォーキング法を用いて得た上流配列は $\Delta 5$ デサチュラーゼの開始コドンを含んでおり、解析したゲノム途中にイントロンの存在は認められなかった。また3'-RACEおよび5'-RACEより得た配列により $\Delta 5$ デサチュラーゼの全長配列情報を取得できた。その結果得た全長配列は1320 bpのORFを有する439アミノ酸からなり、 $\Delta 5$ デサチュラーゼに高度に保存される一つのcytochrome b5 ドメイン (HPGGS1) と、三つのヒスチジンボックス (HECGH, HSKHH and QIEHH) を有していた。この情報をもとに、ORF末端で以下のプライマーを作成しcDNAを鋳型としたPCR (プライマーd5fulllengthF (配列表配列番号72) およびd5fulllengthR (配列表配列番号73)、PCRサイクル: 94° C for 30 s, 60° C for 30 s, and 72° C for 2 min, 30cycle) を行うことで、完全長の*T. aureum*由来 $\Delta 5$ デサチュラーゼを単離した。

[0103] i i . 他生物由来の $\Delta 5$ デサチュラーゼとのアライメント

*T. aureum*由来 $\Delta 5$ デサチュラーゼおよび*Thraustochytrium* sp. ATCC 26185, *Dictyostelium discoideum*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Homo sapiens*, *Caenorhabditis elegans*, *Leishmania major*由来 $\Delta 5$ デサチュラーゼのアミノ酸配列を用いて、ClustalX-1.83.1による多重アラインメントを行った (図35)。

この結果、*T. aureum*由来 $\Delta 5$ デサチュラーゼは他生物由来の $\Delta 5$ デサチュラーゼ遺伝子とアミノ酸レベルで有意な相同性を示した (*D. discoideum*: 34%, *R. norvegicus*: 28%, *M. musculus*: 28%, *H. sapiens*: 26%)。特に、同属の*Thraustochytrium* sp. とは、57%と高い同一性を示した。

[0104] i i i . 系統解析

*T. aureum*由来 $\Delta 5$ デサチュラーゼを含む全てのデサチュラーゼ遺伝子の分子系統樹を、molphyを用いた最尤法によって作成した。まず、全ての配列をF

asta形式にし、clustalWを用いた多重アラインメントを行った。次に、不確定部分を除去した後に、近隣結合法による系統樹を初期系統樹とした最尤系統樹の探索を行った。

この結果、取得した遺伝子は原生動物由来のデサチュラーゼ群と近縁であり、*Thraustochytrium* sp. ATCC 26185および*L. major*由来 $\Delta 5$ デサチュラーゼと、同一の系統群に分類されることが明らかになった（図36）。

[0105] i v. $\Delta 5$ デサチュラーゼの酵母での発現

取得遺伝子が確かに $\Delta 5$ デサチュラーゼであるかを検証するために、出芽酵母*S. cerevisiae*を宿主とした過剰発現実験を行った。まず最初に、取得した遺伝子を酵母用ベクターであるpYES2/GT（Invitrogen社製）のEcoRI/XhoIサイトに組み込み、発現ベクターpY $\Delta 5$ desを構築した。次に、構築した発現ベクターpY $\Delta 5$ desを*S. cerevisiae*に導入し、酢酸リチウム法によって得た形質転換体の脂肪酸を抽出後にメチル化しGC解析を行った。GC解析にはガスクロマトグラフGC-2014（島津製作所社製）を使用し、カラム：HR-SS-10（30 m x 0.25 mm；信和化工社製）、カラム温度：150°C →（5°C/min）→ 220°C（10 min）、キャリアガス：He（1.3 mL/min）の条件で行った。また、GC-MS解析には、GC-17A 及びGCMS-QP-5000（島津製作所社製）を使用し、DB-1キャピラリーカラム（0.25 mm i.d. x 30 m, film thickness 0.25 μ m; アジレント社製）を用い、カラム温度160°C →（4°C/min）→ 260°C、インジェクターポート温度250°Cの条件で行った。また、さらに解析が困難であったピークに関しては、ピコリニルエステル化した脂肪酸を前記と同じ装置及びカラムを用い、240°C →（2.5°C/min）→ 260°C（15min →（2.5°C/min））→ 280°Cの温度条件で解析を行った。

この結果、 $\Delta 5$ デサチュラーゼの前駆物質として知られるエイコサテトラエン酸（Eicosatetraenoic acid (ETA), C20:4 $\Delta 8, 11, 14, 17$ ）およびジホモ γ -リノレン酸（dihomo- γ -linoleic acid (DGLA), C20:3 $\Delta 8, 11, 14$ ）が、それぞれEPAとアラキドン酸（Arachidonic acid (AA); C20:4 n-6）に変換された。変換効率はそれぞれ32%および27%であった。また、他の基質に対する

特異性は見られなかった。変換により生じたEPAとAAIに関してはGC-MSによる構造の確認も行い、確かに構造も一致していた（図37a～c、表7）

[0106] [表7]

Fatty acid substrates	Percentage of substrate converted (%)
C18:3n-3 (-Linolenic acid (ALA))	0.0
C18:2n-6 Linoleic acid (LA)	0.0
C20:4n-3 Eicosatetraenoic acid (ETA)	32.0
C20:3n-6 Dihomo-g-linolenic acid (DGLA)	27.0
C20:3n-3 Eicosatrienoic acid	0.0
C20:2n-6 Eicosadienoic acid	0.0
C22:5n-3 Docosapentaenoic acid (DPA)	0.0
C22:4n-6 Docosatetraenoic acid (DTA)	0.0

$$\text{Conversion rate} = (\text{product} \times 100) / (\text{substrate} + \text{product})$$

[0107] v. Δ5デサチュラーゼ遺伝子のmh0186ゲノムDNAへの組み込み

発現ベクターの構築のためのT. aureum ATCC 34304 由来ユビキチン遺伝子プロモーター/ターミネーターの単離を行った。それにはまず、以下の様なRACE法を用いたユビキチン遺伝子の単離を行った。始めに縮重プライマー2F（配列表配列番号74）を用い、cDNAを鋳型としたPCRによってユビキチン遺伝子の3'側の断片を増幅した。

次に、5'-RACE産物を得る為に、5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, version 2.0 (invitrogen社製)を用い、逆転写用プライマー1R（配列表配列番号17）と5'-RACE用プライマー（配列表配列番号75）を作成しキットの操作を行った。

得られたユビキチン遺伝子ORFの配列をもとに、プライマーREVERS-U PR-1（配列表配列番号22）およびREVERS-U PR-2（配列表配列番号23）を作成し、ゲノムウォーキング法によりPCR（PCRサイクル：98°C 30 sec/60°C 30 sec/72°C 2 min, 30cycle）を行った。この結果、SalIカセットライブラリーを鋳型としたPCRにより812 bpのプロモーター領域を単離した。

次に、同様の方法でターミネーターの単離を行い、その結果612 bpのDNA断

片を得た。

尚、プライマーとして1st PCRではubqterminalf1（配列表配列番号24）を、2nd PCRではter2F（配列表配列番号25）を用い、PCRサイクルは94°C 30 sec/60°C 30 sec/72°C 3 min, 30 cycleで行った。得られた増幅断片をフュージョンPCRにより連結しpUC18に組み込み図38aに示す様な環状ベクターを作成後、PCRによって図38bに示す導入遺伝子断片を調整した。

[0108] 次にAurantiochytrium sp. mh0186に対して遺伝子導入実験を行った。まず、Aurantiochytrium sp. mh0186株のシングルコロニーをGY培地にて25°Cで対数増殖期にさしかかるまで培養後、3,500 x g, 4°C, 15分遠心し上清を除いた。5 x 10⁶の細胞をNucleofector kit L（amaxa社製）に懸濁しBio Rad Gene Pulser II（バイオ・ラッド ラボラトリーズ社製）を用いて0.75 kV, 50 Ω, 50 μF の条件で導入DNAと共に二回パルスを行った。素早く1 mlのPD液体培地を加え25°Cで一晩震盪培養を行った。次に0.5 mg/mlのG418を含むPDA寒天平板培地に植菌して3~4日間培養する事で形質転換体を得た。

続いて得た形質転換体がゲノムDNAに組み込まれている事を確認するために、Δ5デサチュラーゼ増幅プライマーとしてd5fulllengthF（配列表配列番号72）およびd5fulllengthR（配列表配列番号73）、ネオマイシン耐性遺伝子増幅プライマーとしてFU2FA（配列表配列番号76）およびFU2RA（配列表配列番号77）を用い、98°C 10 sec/98°C 10 sec/60°C 30 sec/72°C 1.5 min, 30cycleのPCRプログラムでゲノムDNAを鋳型としたPCRを行った。

この結果、導入した遺伝子の増幅が確認され、確かにゲノム中に取り込まれている事が確認された（図39）。

[0109] v i . Δ5デサチュラーゼ mRNAの発現

Aurantiochytrium sp. mh0186形質転換体を培養後、RNA抽出（セパゾールRNA l super; ナカライテスク社製）を、キットの操作方法を参照して行った。まず各クローンから得たtotalRNAをPrimeScript Reverse Transcriptase（タカラバイオ社製）を用いて逆転写しcDNAの合成を行った。得たcDNAを鋳型として次に示す様な条件でPCRを行った。（PCRサイクル：98°C 10 sec/55°C 3

0 sec/72°C 1.5 min, 30cycle)

この結果、各目的遺伝子の増幅が確認できた（図40）。このことから、得た形質転換体は導入遺伝子がmRNAへと転写され発現している事が確認された。

実施例 7

[0110] 形質転換による Aurantiochytrium limacinum mh0186の脂肪酸組成の改変

(1) ピンギオ藻由来 $\Delta 12$ デサチュラーゼの発現による脂肪酸組成の改変

実施例6(2) v. で得られた形質転換体クローンを10 mlのGY液体培地（0.5 mg/ml G418含有）で2日間培養した後、オレイン酸を終濃度が50 μ Mとなるように添加して、さらに1日培養した。培養後は、実施例6(2) i v. 同様にGCおよびGC-MSを用いて脂肪酸組成を解析した。GC解析にはガスクロマトグラフGC-2014（島津製作所社製）を使用し、カラム：HR-SS-10（30 m x 0.25 mm；信和化工社製）、カラム温度：150°C \rightarrow （5°C/min） \rightarrow 220°C（10 min）、キャリアガス：He（1.3 mL/min）の条件で行った。また、GC-MS解析には、GC-17A 及びGCMS-QP-5000（島津製作所社製）を使用し、DB-1キャピラリーカラム（0.25 mm i.d. x 30 m, film thickness 0.25 μ m; アジレント社製）を用い、カラム温度160°C \rightarrow （4°C/min） \rightarrow 260°C、インジェクターポート温度250°Cの条件で行った。また、さらに解析が困難であったピークに関しては、ピコリニルエステル化した脂肪酸を前記と同じ装置及びカラムを用い、240°C \rightarrow （2.5°C/min） \rightarrow 260°C（15min \rightarrow （2.5°C/min） \rightarrow 280°Cの温度条件で解析を行った。コントロールとしては、ネオマイシン耐性遺伝子カセットのみを導入した形質転換体を用いた。

得られた形質転換体の脂肪酸組成のGC解析を行った結果、 $\Delta 12$ デサチュラーゼ遺伝子/ネオマイシン耐性遺伝子発現カセット導入株において、リノール酸のリテンションタイムに相当する位置に、コントロール株にはみられない新規ピークが確認された（図41）。この新規ピークのGC-MS解析を行った結果、その分子量およびフラグメントパターンは、標品のリノール酸メチルエステルのもので一致することが明らかとなった（図42）。オレイン酸から

リノール酸への転換効率は 30.1 ± 6.64 %であり、他の脂肪酸組成への影響は確認されなかった（図43）。

[0111] (2) Thraustochytrium aureum由来 $\Delta 5$ デサチュラーゼの発現による脂肪酸の変化

実施例6(3)v. で得られた形質転換体クローンを3日間培養後、脂肪酸メチルエステルの抽出を行いGCを用いてmhneorおよびmh $\Delta 5$ neorを解析した。また外因性の $\Delta 5$ デサチュラーゼが基質とする脂肪酸であるETAまたはDGLAを0.1 mMだけ培地に添加し、ラビリンチュラに取り込ませ、酵母における過剰発現実験と同様にして脂肪酸を抽出後、GC解析を行った。GC解析にはガスクロマトグラフGC-2014（島津製作所社製）を使用し、カラム：HR-SS-10（30 m x 0.25 mm；信和化工社製）、カラム温度：150°C →（5°C/min）→ 220°C（10 min）、キャリアガス：He（1.3 mL/min）の条件で行った。

Aurantiochytrium sp. mh0186株に内在性のETAが、導入した $\Delta 5$ デサチュラーゼの働きにより変換され、EPAの含有率がmhneorと比較して1.4倍程度高くなっている事が分かった（図44、表8）。また $\Delta 5$ デサチュラーゼが基質とするETAまたはDGLAを0.1 mMだけ培地に添加し、ラビリンチュラに取り込ませたところ、酵母における $\Delta 5$ デサチュラーゼ発現実験で観察された様に前駆物質がラビリンチュラ内でEPAとAAに変換されその含有率が増大した（表9、10）。またラビリンチュラ内での前駆物質の変換効率は前述の酵母の場合よりも高く、それぞれETAが75.2 %、DGLAが62.9 %であった。また、本実験は3回以上の再現性確認実験を行っており、いずれの場合も結果は一致していた。

[0112]

[表8]

	mhneur (%)	mh Δ 5neur (%)
C14:0	2.23±0.05	2.32±0.03
C15:0	2.43±0.62	2.97±0.96
C16:0	55.2±1.83	52.1±3.15
C17:0	0.97±0.22	1.19±0.42
C18:0	1.54±0.03	1.39±0.13
DGLA	ND	ND
AA	0.18±0.04	0.21±0.02
ETA	0.32±0.02	0.04±0.04
EPA	0.65±0.04	0.94±0.13
DPA	5.17±0.05	5.61±1
DHA	31.3±0.93	33.2±2.44

[0113] [表9]

	mhneur +DGLA (%)	mh Δ 5neur +DGLA (%)
C14:0	2.22±0.06	2.28±0.16
C15:0	2.53±0.63	2.96±0.79
C16:0	53.5±2.36	52±3.41
C17:0	0.99±0.21	1.19±0.41
C18:0	1.56±0.03	1.42±0.13
DGLA*	3.92±0.21	1.09±0.7
AA	0.14±0.01	1.85±0.24
ETA	0.39±0.04	0.08±0.05
EPA	0.6±0.04	1.15±0.29
DPA	4.92±0.11	5.44±0.89
DHA	29.3±1.32	30.5±1.94

[0114] [表10]

	mhneur +ETA (%)	mh Δ 5neur +ETA (%)
C14:0	2.26±0.1	2.43±0.07
C15:0	2.48±0.64	3.04±0.91
C16:0	54.6±1.56	51.8±3.56
C17:0	0.96±0.23	1.17±0.41
C18:0	1.56±0.02	1.4±0.13
DGLA	ND	ND
AA	0.15±0.02	0.22±0.02
ETA*	3.27±0.44	0.94±0.5
EPA	0.62±0.03	2.85±0.35
DPA	4.92±0.06	5.35±0.97
DHA	29.2±0.53	30.8±2.52

実施例 8

[0115] [ラビリンチュラへの遺伝子導入実験・2]

Schizochytrium aggregatum ATCC 28209、Ulkenia sp. ATCC 28207、Schizochytrium sp. SEK210 (NBRC 102615)、Schizochytrium sp. SEK345 (NBRC 102616)、Botryochytrium radiatum SEK353 (NBRC 104107)、及びParietichytrium sarkarianum SEK364に対し、遺伝子導入実験を行った。

[0116] (1) 寒天平板培養におけるMICの決定

前記ラビリンチュラ類6株の前培養液5 μ lを様々な濃度のG418を含有するPDA寒天平板培地に滴下し、28°Cで7日間培養後にコロニー形成を観察した。これらの結果、抗生物質感受性の結果と真核生物形質転換系で用いられる選択マーカー遺伝子に鑑みて、ラビリンチュラ類の形質転換系に使用出来る選択マーカー遺伝子は、G418が有効であると示された。

[0117] (2) T. aureum由来ユビキチン遺伝子、及びその遺伝子発現調節領域の単離
T. aureum由来ユビキチン遺伝子及びその遺伝子発現調節領域の単離は、実施例3と同様に行った。

[0118] (3) 薬剤耐性遺伝子発現カセットの作製

薬剤耐性遺伝子発現カセットの作製は、実施例4と同様に行った。

[0119] (4) 遺伝子導入実験

ユビキチンプロモーター・ターミネーターによる直鎖状Neo^r発現カセット (ub-Neo^r)を用いた遺伝子導入実験を行った。このカセットは、実施例4-ii)で得られたpUBNeomycin^rを鋳型とし、LA taq Hot Start Version (タカラバイオ社製)を使用して1対のオリゴヌクレオチドプライマーNeoF (配列表配列番号78)/NeoR (配列表配列番号79)を用いたPCRを行い、得られた増幅産物をゲル精製したものである。

[0120] 遺伝子導入実験は、エレクトロポレーション法で行った。即ち、GY液体培地またはH液体培地を用いて、ラビリンチュラ類を28°C、150 rpmで対数増殖期前期～後期まで培養後に、3,500 x g, 4°C, 10 min遠心し上清を除いた。得られた菌体を滅菌1.75%シーライフ (マリンテック社製)に懸濁後に、再遠心

操作を行うことで菌体を洗浄した。次に、 5×10^6 個の細胞と導入DNAであるub-Neor^rを遺伝子導入試薬NucleofectorR solution L (amaxa社製)に懸濁し、Gene Pulser (バイオ・ラッドラボラトリーズ社製; 1 mmギャップキュベットを使用)にて電気パルスを印加した(パルス条件: 50 μ F/50 Ω / 0.75 kV、印加回数2回)。電気パルスの印加後はただちに1 mlのGY液体培地を加え、28°Cで12時間培養を行った。その後、培養液を2.0mg/ml (Ulkenia sp. ATCC 28207、Schizochytrium sp. SEK210、およびParietichytrium sarkarianum SEK364)、もしくは1.0 mg/ml (Botryochytrium radiatum SEK353、Schizochytrium aggregatum ATCC 28209およびSchizochytrium sp. SEK345)のG418を含有するPDA寒天平板培地に塗布して28°Cで静置培養を行い、G418耐性能が付与された形質転換体のコロニー形成を観察した。

この結果、直鎖状DNAであるub-Neor^rを用いた場合において、 $\sim 1.6 \times 10^0$ cfu/ μ g DNAの効率でG418耐性能を示すコロニーの出現が見られた。また、得られた形質転換体は、G418を含有しないGY液体培地で5回継代培養したあとにおいても、そのG418耐性能を維持していることが分かり、G418耐性能を指標とした場合、付与された形質は安定していることが確認された。

[0121] (5) ゲノムDNAを鋳型としたPCRによる形質転換体の評価

得られた形質転換体は1.0および2.0mg/ml G418含有GY液体培地で培養し、野生株はG418を含有しないGY液体培地で培養した。ISOPLANT (ナカライテスク社製)を使用して、両株の菌体からゲノムDNAの抽出を行った。引き続き、得られたゲノムDNAを鋳型として、KOD FX (東洋紡ライフサイエンス社製)を使用したPCRによるNeor^rの増幅をおこなった。用いたオリゴヌクレオチドプライマーはNeoF (配列表配列番号78) /NeoR (配列表配列番号79) である (PCR cycles : 94°C 2 min/98°C 10sec, 68°C 30 sec, 72°C 2 min, 30 cycles/4°C)。

この結果、形質転換体においては、野生株に見られないNeor^rの特異的な増幅が観察された(図45)。このことから、導入したub-Neor^rは、染色体DNA上に組み込まれていることが示唆された。

実施例 9

[0122] [*Thraustochytrium aureum* における ω 3デサチュラーゼ遺伝子の発現]

[実施例 9-1] SV40 terminator配列のサブクローニング

pcDNA 3.1 Myc-His vectorを鋳型に、PrimeSTAR polymerase (タカラバイオ社製) によりSV40 terminator配列を増幅した。用いたPCR primer は下記の通りで、RH058はSV40 terminator配列上に設定し、BglIIおよびBamHIリンカー配列を含む。RH052はSV40 terminator配列上に設定し、BglII配列を含む。 [RH058: 34mer: 5' - CAG ATC TGG ATC CGC GAA ATG ACC GAC CAA GCG A-3' (配列番号: 80)、 RH052: 24mer: 5' - ACG CAA TTA ATG TGA GAT CTA G CT -3' (配列番号: 81)]。下記の条件で増幅後、pGEM-T easy vector (プロメガ社製) にクローニングした。 [PCR cycles: 98°C 2 min/ 98°C 30 sec, 60°C 30 sec, 72°C 1 min, 30 cycles/ 72°C 1min]。大腸菌にて増幅後、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit を用いて配列を確認した。これをpRH27と名付けた。

サブクローニングしたSV40 terminator配列 (342 bp、配列番号: 82) を含むプラスミド (pRH27) を図46に示す。

[0123] [実施例 9-2] ブラストサイジン耐性遺伝子カセットの作製

Thraustochytrium aureum ATCC 34304よりゲノムDNAを鋳型に、PrimeSTAR GC polymeraseによりubiquitin promoter 配列 (618 bp、配列番号83) を増幅した。用いたPCR primer は下記の通りで、RH053はubiquitin promoter 配列上に設定、BglIIリンカー配列を含む。RH048はubiquitin promoter 配列とブラストサイジン耐性遺伝子配列を含む。 [RH053: 36mer: 5' - CCC AGA TC I_GCC GCA GCG CCT GGT GCA CCC GCC GGG -3' (配列番号: 84)、 RH048: 58mer: 5' - CTT CTT GAG ACA AAG GCT TGG CCA TGT TGG CTA GTG TTG CTT AGG TCG CTT GCT GCT G -3' (配列番号: 85)]。 [PCR cycles: 98°C 2min/ 98°C 10 sec, 68°C 1 min, 30 cycles/ 68°C 1min]。

pTracer-CMV/Bsd/lacZ を鋳型に、PrimeSTAR GC polymeraseによりブラストサイジン耐性遺伝子 (432 bp、配列番号: 86) を増幅した。用いたPCR prim

er は下記の通りで、RH047はubiquitin promoter 配列とブラストサイジン耐性遺伝子配列を含む。RH049はブラストサイジン耐性遺伝子配列を含み、BglII リンカー配列を有する。[RH047: 54mer: 5' - AGC GAC CTA AGC AAC ACT AGC CAA CAT GGC CAA GCC TTT GTC TCA AGA AGA ATC -3' (配列番号: 87)、RH049: 38mer: 5' - CCC AGA TCT TAG CCC TCC CAC ACA TAA CCA GAG GGC AG -3' (配列番号: 88)]。[PCR cycles: 98°C 2min/ 98°C 10 sec, 68°C 1 min, 30 cycles/ 68°C 1min]。

[0124] 配列番号83および86を鋳型にRH053 (配列番号: 85) およびRH049 (配列番号: 88) を用いてFusion PCRを行った。酵素はLA taq Hot start versionを使用し、下記の条件で増幅後、BglIIIにて消化した。[PCR cycles: 94°C 2min/ 94°C 20 sec, 55°C 30 sec, 68°C 1 min, 30 cycles/ 68°C 1min。ただし55°Cから68°Cへは1°C/ 10sec とした] (図47)。

上記のようにしてFusionしたThraustochytrium aureum ATCC 34304 由来ubiquitin promoter-pTracer-CMV/Bsd/lacZ由来ブラストサイジン耐性遺伝子(1000 bp、配列番号: 89) を、BglIIIにて消化し、これを実施例9-1記載pRH27 (図46) のBamHIサイトに繋いだ。出来たプラスミドを大腸菌にて増幅後、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit を用いて配列を確認した。これをpRH38と名付けた。

作製したブラストサイジン耐性遺伝子カセット (pRH38) を図48に示す。

[0125] [実施例9-3] ミズカビSaprolegnia diclina由来 ω3デサチュラーゼ遺伝子のクローニングと遺伝子発現プラスミドの作製

Thraustochytrium aureum ATCC 34304よりゲノムDNAを鋳型に、LA taq GC I polymeraseによりubiquitin promoter 配列 (longer) (812 bp、配列番号: 90) を増幅した。用いたPCR primer は下記の通りで、TM042はubiquitin promoter 配列上、RH053 (実施例9-2、配列番号: 84) よりも上流に設定、KpnIリンカー配列を含む。TM043はubiquitin promoter 配列とSaprolegnia diclina由来ω3 デサチュラーゼ遺伝子配列を含む。[TM042: 29mer: 5' - TC G GTA CCC GTT AGA ACG CGT AAT ACG AC -3' (配列番号: 91)、TM043: 45me

r: 5' - TTC GTC TTA TCC TCA GTC ATG TTG GCT AGT GTT GCT TAG GTC GCT -
3' (配列番号: 92)]。 [PCR cycles: 96°C 2min/ 98°C 20 sec, 60°C 30 sec,
72°C 1 min, 30 cycles/ 72°C 1min]。

次に、Saprolegnia diclinaを、1LあたりD-Glucose 31.8g、Yesat Extract
10.6g、を含有する培地（脱イオン水で調整）で培養した。対数増殖期後期
の細胞を4°C、3,500×g、5 min 遠心してペレットにし、液体窒素にて凍結破
砕した。細胞破碎液をフェノール抽出後、エタノール沈殿させ、沈殿を TE
溶液に溶解した。TE 溶液に溶解した核酸を37°C、30 min RNase 処理して RN
A を分解し、再度フェノール抽出後、エタノール沈殿させ、沈殿を TE 溶液
に溶解した。A260/280 を測定し、DNA 純度、および濃度を算出した。このよ
うにして得られたSaprolegnia diclinaのゲノムDNAを鋳型に、LA taq GC II
polymeraseによりSaprolegnia diclina由来ω3 デサチュラーゼ遺伝子配列（
1116 bp、配列番号: 93）を増幅した。用いたPCR primer は下記の通りで、T
M044はubiquitin promoter 配列とSaprolegnia diclina由来ω3 デサチュラ
ーゼ遺伝子配列を含む。TM045はSaprolegnia diclina由来ω3 デサチュラ
ーゼ遺伝子配列およびubiquitin terminatorを含む。 [TM044: 43mer: 5' - CC
T AAG CAA CAC TAG CCA ACA TGA CTG AGG ATA AGA CGA AGG T -3' (配列番
号: 94)、TM045: 40mer: 5' - ATA CTA CAG ATA GCT TAG TTT TAG TCC GAC T
TG GCC TTG G -3' (配列番号: 95)]。 [PCR cycles: 96°C 2min/ 98°C 20 s
ec, 60°C 30 sec, 72°C 1 min 30 sec, 30 cycles/ 72°C 1min 30 sec]。

[0126] Thraustochytrium aureum ATCC 34304ゲノムDNAを鋳型に、LA taq GC II p
olymeraseによりubiquitin terminator 配列（614 bp、配列番号: 96）を増
幅した。用いたPCR primer は下記の通りで、TM046はSaprolegnia diclina由
来ω3 デサチュラーゼ遺伝子配列およびubiquitin terminatorを含む。TM047
はubiquitin terminator配列上に設計し、KpnI リンカー配列を含む。 [TM046:
44mer: 5' - CCA AGG CCA AGT CGG ACT AAA ACT AAG CTA TCT GTA GTA TGT
GC -3' (配列番号: 97)、TM047: 45mer: 5' - TCG GTA CCA CCG CGT AAT AC
G ACT CAC TAT AGG GAG ACT GCA GTT -3' (配列番号: 98)]。 [PCR cycles:

96°C 2min/ 98°C 20 sec, 60°C 30 sec, 72°C 1 min, 30 cycles/ 72°C 1min]。

配列番号90、93、96を鋳型にTM042（配列番号：91）およびTM047（配列番号：98）を用いてFusion PCRを行った。酵素はLA taq GC II polymeraseを使用し、下記の条件で増幅した。[PCR cycles: 96°C 2min/ 98°C 20 sec, 55°C 30 sec, 68°C 3 min, 30 cycles/ 68°C 3min。ただし55°Cから68°Cへは1°C/ 10sec とした]（図49、2463 bp、配列番号：99）。

[0127] 実施例9-2記載pRH38（図48）を鋳型にRH084（配列番号：100、配列後述）およびRH052（実施例9-1、配列番号：101）を用いてPCRを行った。RH084はubiquitin promoter上に設定、KpnIリンカー配列を有する。RH052はSV40 terminator配列上に設定、BglIIリンカーを有する。酵素はLA taq Hot start versionを使用し、下記の条件で増幅後、pGEM-T easy vector にクローニングした。[RH084: 36mer: 5' - CCC GGT ACC GCC GCA GCG CCT GGT GCA CCC GCC GGG -3'（配列番号：100）]。[PCR cycles: 98°C 2min/ 98°C 10 sec, 68°C 1 min 30 sec, 30 cycles/ 68°C 3min]。大腸菌にて増幅後、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit を用いて配列を確認した。これをpRH45と名付けた（図50）。

図49でFusionしたThraustochytrium aureum ATCC 34304 由来ubiquitin promoter-Saprolegnia diclina由来 ω 3 デサチュラーゼ遺伝子-Thraustochytrium aureum ATCC 34304 由来ubiquitin terminator（配列番号：99）を、KpnIにて消化し、これをpRH45（図50）のKpnIサイトに繋いだ。出来たプラスミドを大腸菌にて増幅後、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit を用いて配列を確認した。これをpRH48と名付けた。

作製したSaprolegnia diclina由来 ω 3 デサチュラーゼ遺伝子発現プラスミド（pRH48）を図51に示す。

[0128] [実施例9-4]Thraustochytrium aureumへのミズカビ由来 ω 3デサチュラーゼ発現プラスミド導入

実施例9-3で作製したターゲティングベクターを鋳型に、TM042（実施例

9-3、配列番号：91) およびRH052 (実施例9-1、配列番号：81) をprimerとして用いて、Prime STAR Max polymeraseによりDNAを増幅した。[PCR cycles: 94°C 30 sec, 72°C 1 min, 5 cycles/ 94°C 30 sec, 70°C 30 sec, 72°C 1 min, 5 cycles/ 94°C 30 sec, 68°C 30 sec, 72°C 1 min, 25 cycles / 72°C 2 min]。1.0% アガロースゲルより増幅産物を回収し、エタノール沈殿させ、沈殿を0.1×TEに溶解した。A260/280を測定しDNA濃度を算出した。PCRによって得られる導入断片は 3777 bpで、ubiquitin promoter- ω 3デサチュラーゼ遺伝子-ubiquitin terminator-ubiquitin promoter-ブラストサイジン耐性遺伝子配列-SV40 terminator 配列という並びになる (配列番号：101)。

Thraustochytrium aureum をGY培地中で4日間培養し、対数増殖期にある細胞を遺伝子導入に使用した。OD₆₀₀ = 1~1.5相当分の細胞に対し、0.625gのDNA断片を遺伝子銃法 (マイクロキャリア：0.6 micronの金粒子、target distance：6 cm、chamber vacuum：26 mmHg、Rupture disk：1,100 PSI) により導入した。遺伝子導入した細胞は4~6時間のリカバリータイムの後、0.2 mg/ml ブラストサイジン含有PDA寒天平板培地に塗布した。

1撃ちこみあたり、20から30個の薬剤耐性株を得た。

[0129] [実施例9-5] ミズカビ由来 ω 3デサチュラーゼ遺伝子発現株の取得

実施例9-4で得られた ω 3デサチュラーゼ遺伝子発現株からゲノムDNAを抽出後、A260/280を測定しDNA濃度を算出した。これを鋳型にし、LA taq Hot start version を用いてゲノム構造確認のPCRを行った。用いたprimerの位置、増幅に用いる組み合わせ、増幅産物の予想サイズを図52に示す。TM042 (実施例9-3、配列番号：91) はubiquitin promoter上、RH049 (実施例9-2、配列番号：88) はブラストサイジン耐性遺伝子上に設定した。[PCR cycles: 98°C 2min/ 98°C 10 sec, 68°C 4 min, 30 cycles/ 68°C 7min]。

予想されるサイズに増幅するバンドが確認できた (図53)。導入した発現断片がゲノムに安定に導入された株が単離できた。

[0130] [実施例9-6] Thraustochytrium aureumにおける ω 3 デサチュラーゼ発現

による脂肪酸組成の変化

Thraustochytrium aureumおよび実施例 9-5 で得られた ω 3 デサチュラーゼ発現株を培養、凍結乾燥後、脂肪酸をメチルエステル化し、GCを用いて解析した。GC解析にはガスクロマトグラフGC-2014（島津製作所社製）を使用し、カラム：HR-SS-10（30 m x 0.25 mm；信和化工社製）、カラム温度：150°C →（5°C/min）→ 220°C（10 min）、キャリアガス：He（1.3mL/min）の条件で行った。

ω 3 デサチュラーゼ発現株ではn-6系列の脂肪酸が減少し、n-3系列の脂肪酸に増加傾向が見られた（図54）。また、図55に野生型株を100%とした時の割合を示す。

これらの結果、アラキドン酸が約1/10、DPAが約1/7に減少し、またEPAが約1.8倍、DHAが約1.2倍に増加した。

産業上の利用可能性

[0131] 本発明により、ストラメノパイルが産生する脂肪酸組成を改変すること、およびストラメノパイルに高度に脂肪酸を蓄積させる方法が提供され、高度不飽和脂肪酸をより効率的に製造することが可能となる。

請求の範囲

- [請求項1] ストラメノパイルに外来遺伝子を導入することを特徴とする、ストラメノパイルの形質転換方法。
- [請求項2] ストラメノパイルがラビリンチュラ類である、請求項1に記載のストラメノパイルの形質転換方法。
- [請求項3] ラビリンチュラ類がラビリンチュラ属(Labyrinthula)、アルトルニア属(Altornia)、アプラノキトリウム属(Aplanochytrium)、イアポノキトリウム属(Japonochytrium)、ラビリンチュロイデス属(Labyrinthuloides)、シゾキトリウム属(Schizochytrium)、アウランティオキトリウム属(Aurantiochytrium)、ヤブレッツボカビ属(Thraustochytrium)、ウルケニア属(Ulkenia)、オブロンギキトリウム属(Oblongichytrium)、ボトリオキトリウム属(Botryochytrium)、パリエティキトリウム属(Parietichytrium)、またはシクヨイドキトリウム属(Sicyoidochytrium)に属する微生物である、請求項2に記載のストラメノパイルの形質転換方法。
- [請求項4] 微生物がSchizochytrium sp. M-8株(FERM P-19755)、Thraustochytrium aureum ATCC 34304、Thraustochytrium sp. ATCC 26185、Schizochytrium sp. AL1Ac、Schizochytrium aggregatum ATCC 28209、Ulkenia sp. ATCC 28207、Schizochytrium sp. SEK210 (NBRC 102615)、Schizochytrium sp. SEK345 (NBRC 102616)、Botryochytrium radiatum SEK353 (NBRC 104107)、またはParietichytrium sarkarianum SEK364 (FERM ABP-11298)である、請求項1ないし3のいずれかに記載のストラメノパイルの形質転換方法。
- [請求項5] 外来遺伝子が抗生物質耐性能、発色タンパク質、および/または脂肪酸不飽和化酵素に関連する遺伝子である、請求項1ないし4のいずれかに記載のストラメノパイルの形質転換方法。
- [請求項6] 脂肪酸不飽和化酵素に関連する遺伝子が $\Delta 5$ デサチュラーゼ遺伝子、 $\Delta 12$ デサチュラーゼ遺伝子、および/または $\omega 3$ デサチュラーゼ遺

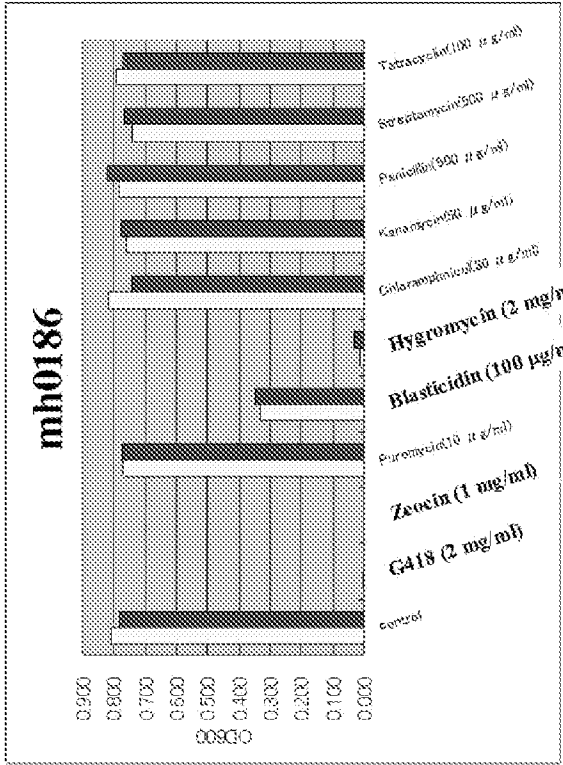
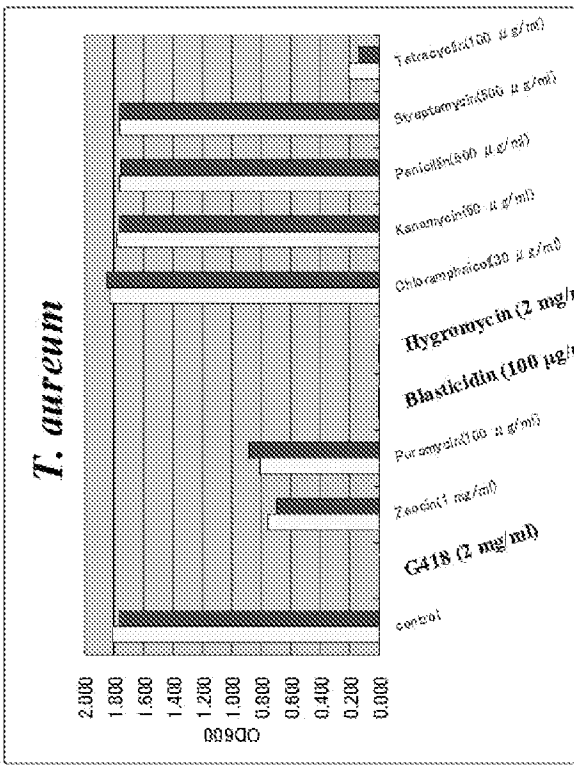
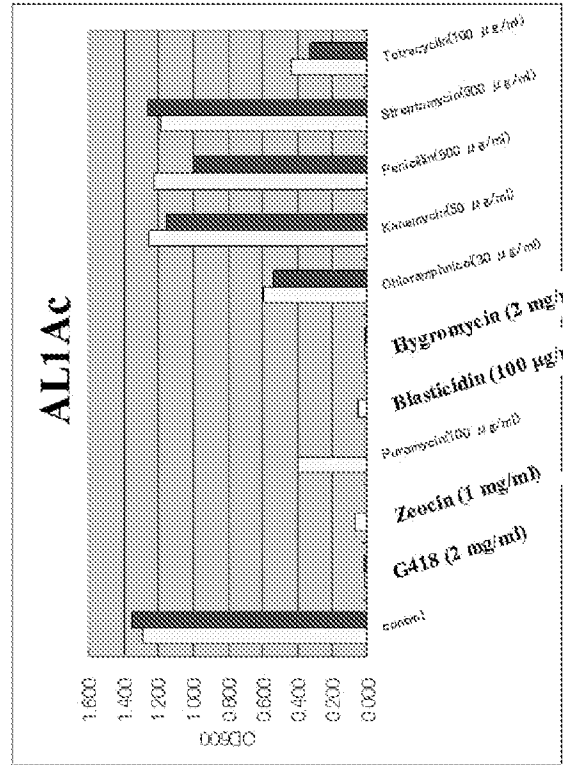
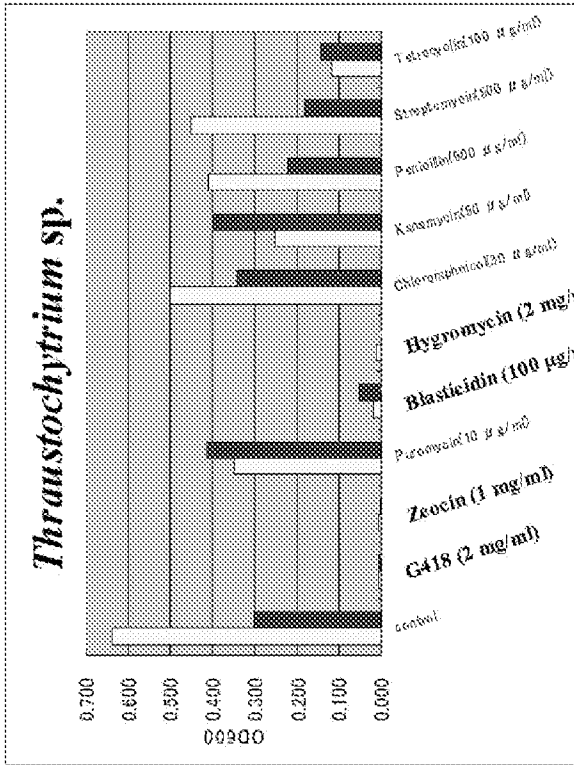
伝子である、請求項 1 ないし 5 のいずれかに記載のストラメノパイルの形質転換方法。

- [請求項7] エレクトロポレーションまたは遺伝子銃法によって外来遺伝子を導入することを特徴とする、請求項 1 ないし 6 のいずれかに記載のストラメノパイルの形質転換方法。
- [請求項8] 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子を導入し、当該脂肪酸不飽和化酵素を発現することを特徴とする、ストラメノパイルの脂肪酸組成の改変方法。
- [請求項9] 脂肪酸不飽和化酵素がデサチュラーゼである、請求項 8 に記載の方法。
- [請求項10] 脂肪酸不飽和化酵素が $\Delta 5$ デサチュラーゼ、 $\Delta 12$ デサチュラーゼ、または $\omega 3$ デサチュラーゼである、請求項 8 または 9 に記載の方法。
- [請求項11] ストラメノパイルがラビリンチュラ類である、請求項 8 ないし 10 のいずれかに記載の方法。
- [請求項12] ラビリンチュラ類がラビリンチュラ属(Labyrinthula)、アルトルニア属(Altornia)、アプラノキトリウム属(Aplanochytrium)、イアポノキトリウム属(Japonochytrium)、ラビリンチュロイデス属(Labyrinthuloides)、シゾキトリウム属(Schizochytrium)、アウランティオキトリウム属(Aurantiochytrium)、ヤブレッツボカビ属(Thraustochytrium)、ウルケニア属(Ulkenia)、オブロンギキトリウム属(Oblongichytrium)、ボトリオキトリウム属(Botryochytrium)、パリエティキトリウム属(Parietichytrium)、またはシクヨイドキトリウム属(Sicyoidochytrium)に属する微生物である、請求項 11 に記載の方法。
- [請求項13] 微生物がSchizochytrium sp. M-8株 (FERM P-19755)、Thraustochytrium aureum ATCC 34304、Thraustochytrium sp. ATCC 26185、Schizochytrium sp. AL1Ac、Schizochytrium aggregatum ATCC 28209、Ulkenia sp. ATCC 28207、Schizochytrium sp. SEK210 (NBRC 102615)、Schizochytrium sp. SEK345 (NBRC 102616)、Botryochytrium rad

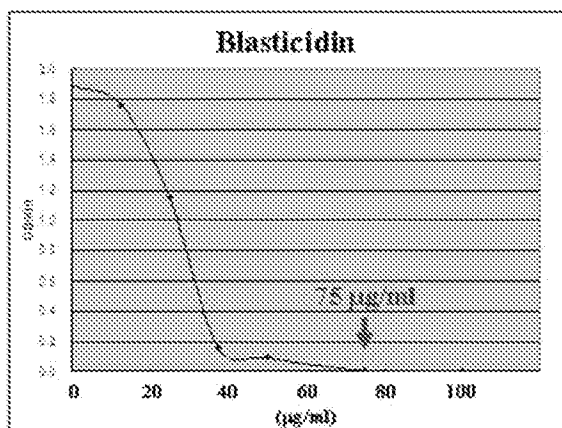
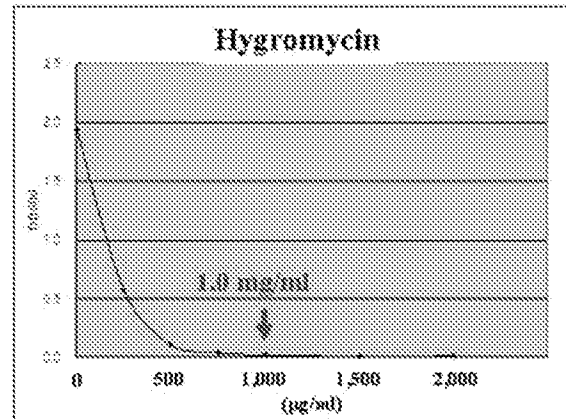
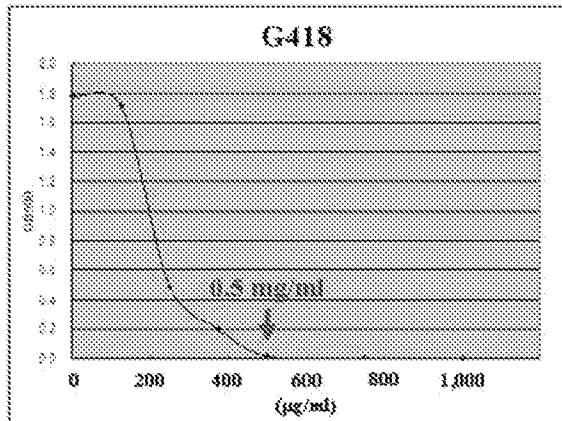
iatum SEK353 (NBRC 104107)、またはParietichytrium sarkarianum SEK364 (FERM ABP-11298) である、請求項 12 に記載の方法。

- [請求項14] 請求項 8 ないし 13 のいずれかに記載の方法により、ストラメノパイルに高度に脂肪酸を蓄積させる方法。
- [請求項15] 脂肪酸が不飽和脂肪酸である、請求項 14 に記載の方法。
- [請求項16] 不飽和脂肪酸が炭素数 18 ~ 22 の不飽和脂肪酸である、請求項 15 に記載の方法。
- [請求項17] 請求項 14 ないし 16 のいずれかに記載の方法により得られた脂肪酸。
- [請求項18] 脂肪酸組成の改変を目的として形質転換されたストラメノパイル。
- [請求項19] 脂肪酸を高度に蓄積させることを目的として形質転換されたストラメノパイル。
- [請求項20] ラビリンチュラ類である、請求項 18 または 19 に記載のストラメノパイル。
- [請求項21] ラビリンチュラ類がラビリンチュラ属 (Labyrinthula)、アルトルニア属 (Altornia)、アプラノキトリウム属 (Aplanochytrium)、イアポノキトリウム属 (Japonochytrium)、ラビリンチュロイデス属 (Labyrinthuloides)、シゾキトリウム属 (Schizochytrium)、アウランティオキトリウム属 (Aurantiochytrium)、ヤブレッツボカビ属 (Thraustochytrium)、ウルケニア属 (Ulkenia)、オブロンギキトリウム属 (Oblongichytrium)、ボトリオキトリウム属 (Botryochytrium)、パリエティキトリウム属 (Parietichytrium)、またはシクヨイドキトリウム属 (Sicyoidochytrium) に属する微生物である、請求項 20 に記載のストラメノパイル。
- [請求項22] 微生物がSchizochytrium sp. M-8株 (FERM P-19755)、Thraustochytrium aureum ATCC 34304、Thraustochytrium sp. ATCC 26185、Schizochytrium sp. AL1Ac、Schizochytrium aggregatum ATCC 28209、Ulkenia sp. ATCC 28207、Schizochytrium sp. SEK210 (NBRC 102615)

、Schizochytrium sp. SEK345 (NBRC 102616) 、Botryochytrium radiatum SEK353 (NBRC 104107) 、またはParietichytrium sarkarianum SEK364 (FERM ABP-11298) である、請求項 21 に記載のストラメノパイル。



[圖2]

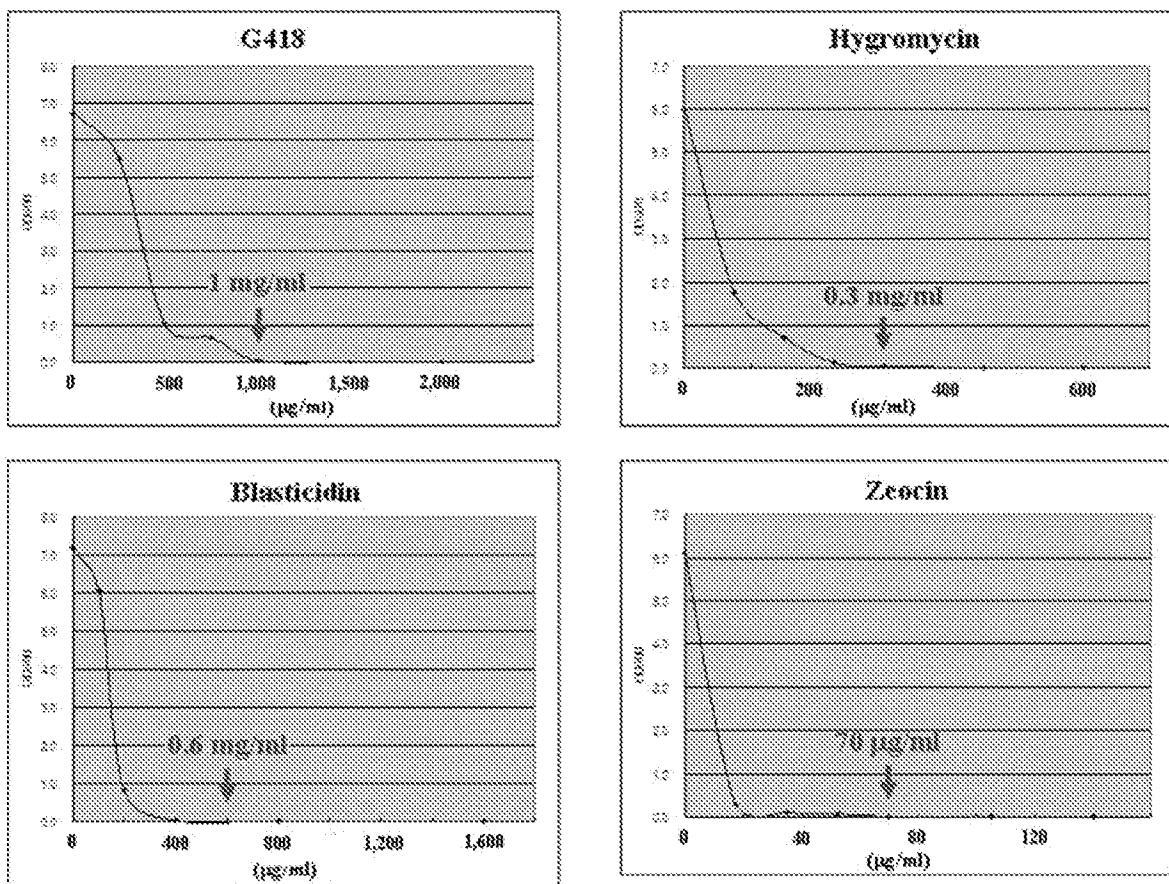


G418 – 0.5 mg/ml~

Hygromycin – 1.0 mg/ml~

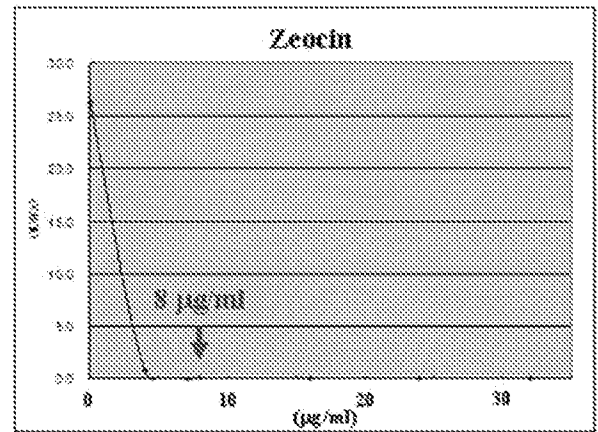
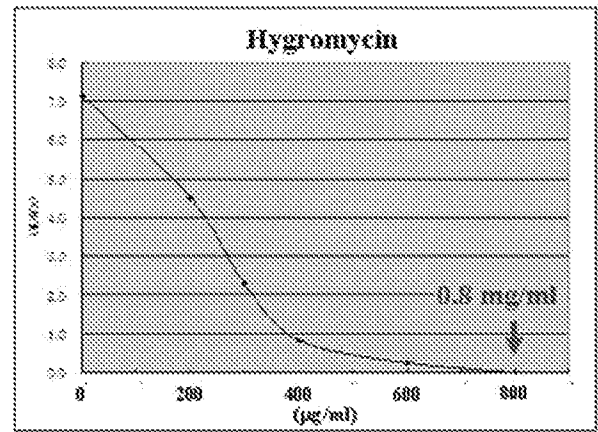
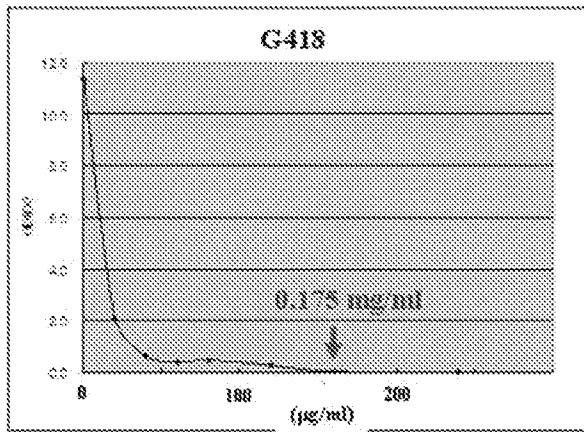
Blasticidin – 75 µg/ml~

[図3]



**G418 – 1 mg/ml~ / Hygromycin – 0.3 mg/ml~ / Blastidicin – 0.6 mg/ml~
Zeocin – 70 µg/ml~**

[図4]

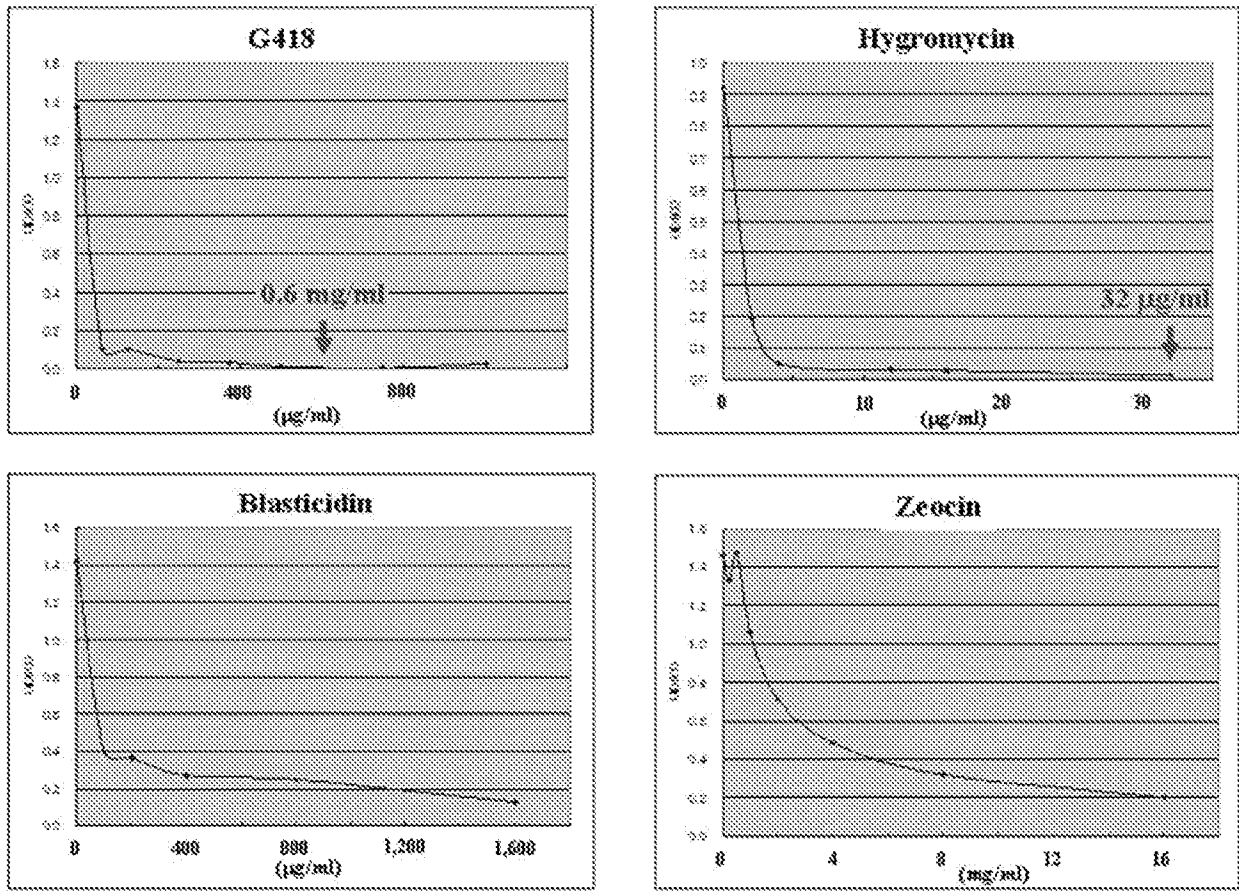


G418 – 0.175 mg/ml~

Hygromycin – 0.8 mg/ml~

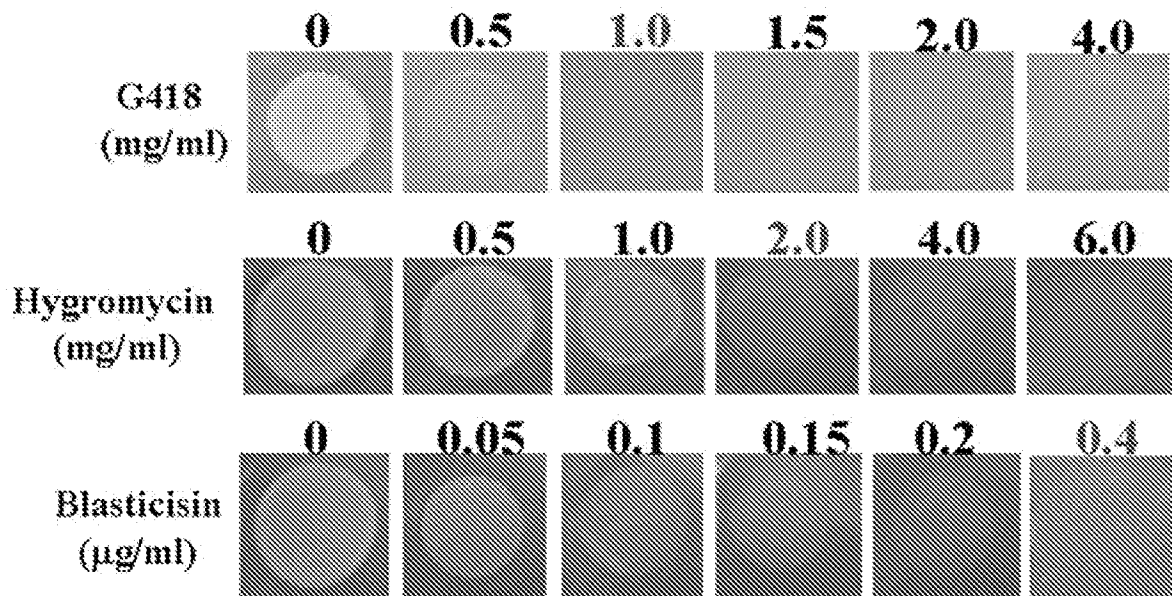
Zeocin – 8 $\mu\text{g/ml}$ ~

[図5]



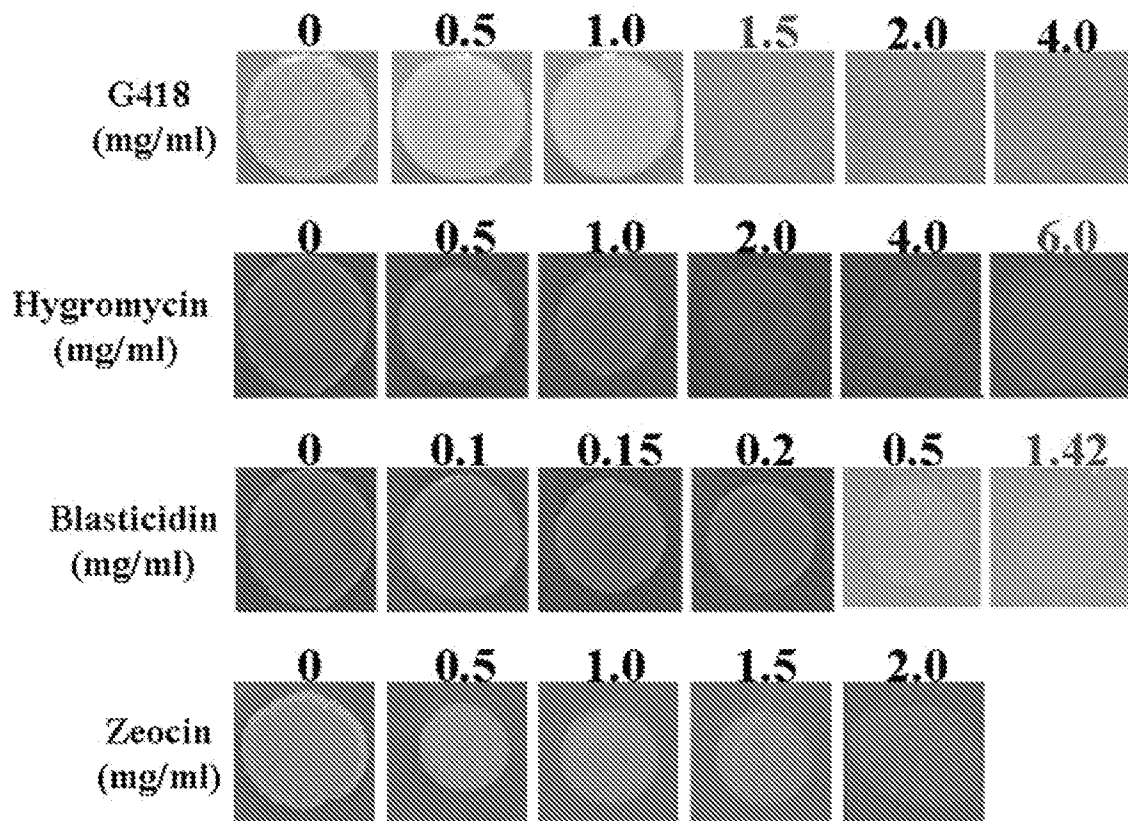
**G418 – 0.6 mg/ml~ / Hygromycin – 32 µg/ml~
BlasticidinおよびZeocinは、より高濃度が必要**

[図6]



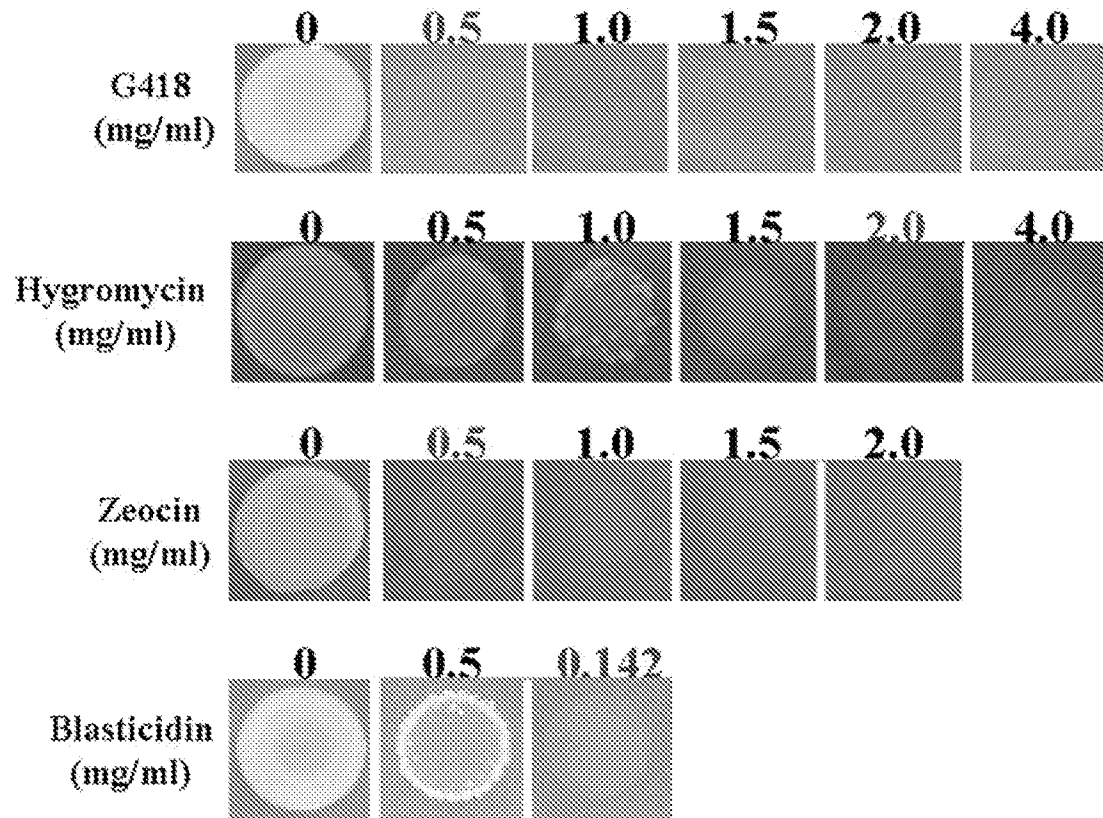
G418 – 1 mg/ml~, Hygromycin – 2 mg/ml~, Blastisidin – 0.4 mg/ml~

[図7]



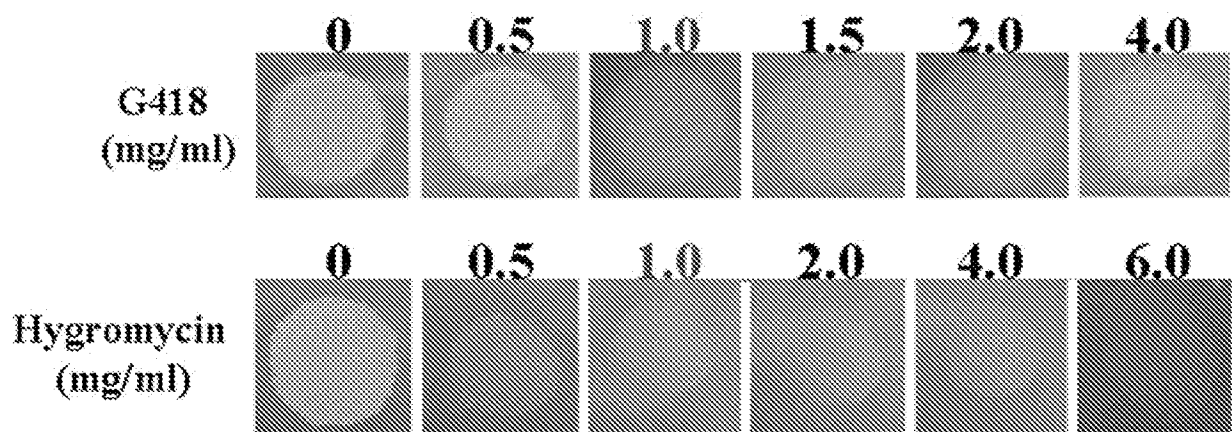
G418 – 1.5 mg/ml~, Hygromycin – 6 mg/ml~, Blastcidin – 1.4 mg/ml~
Zeocinは、より高濃度が必要

[図8]



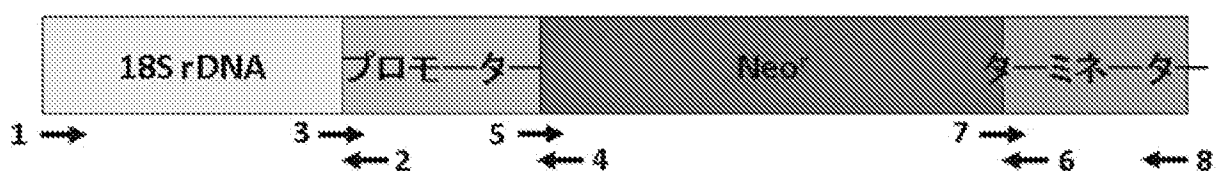
G418 – 0.5 mg/ml~, Hygromycin – 2.0 mg/ml~, Blasticidin – 0.5 mg/ml~
 Blasticidinにおいても、1.42 mg/ml~で増殖を抑制した

[図9]

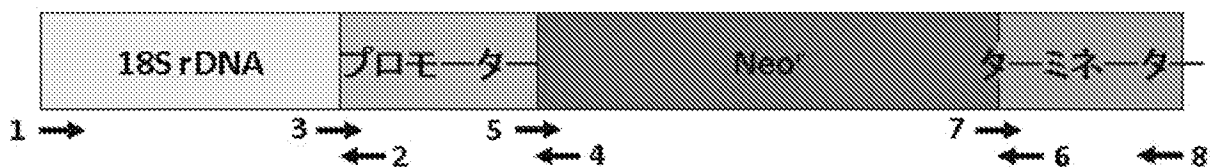


G418 – 1.0 mg/ml~, Hygromycin – 1.0 mg/ml~

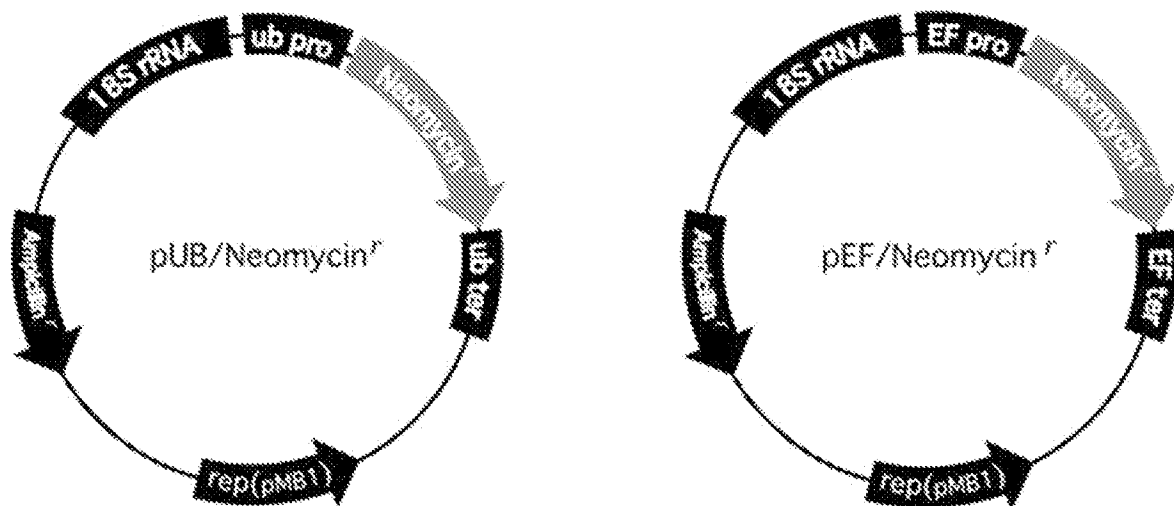
[図10]



[図11]

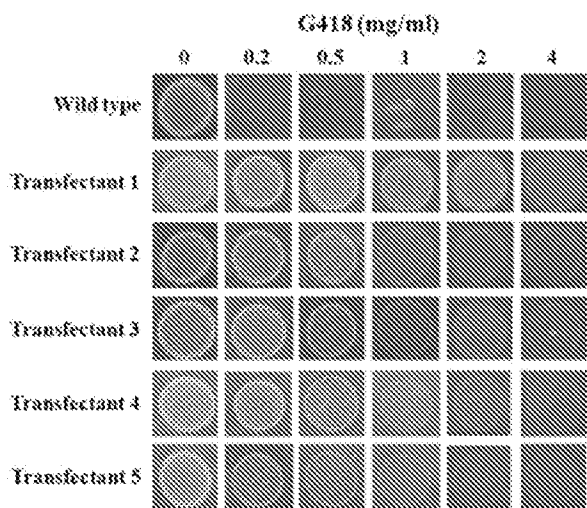


[図12]

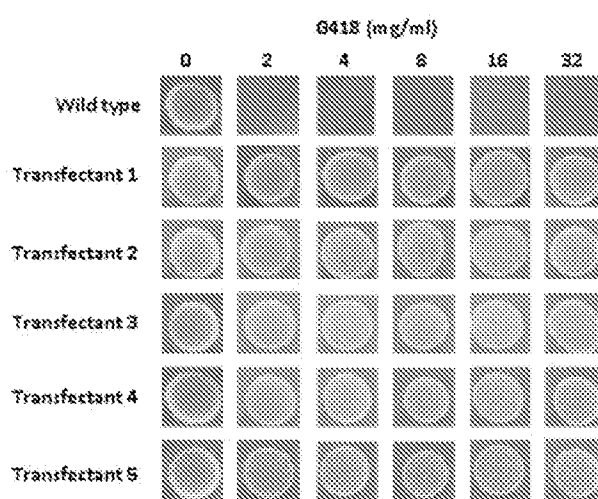


[図13]

(A)

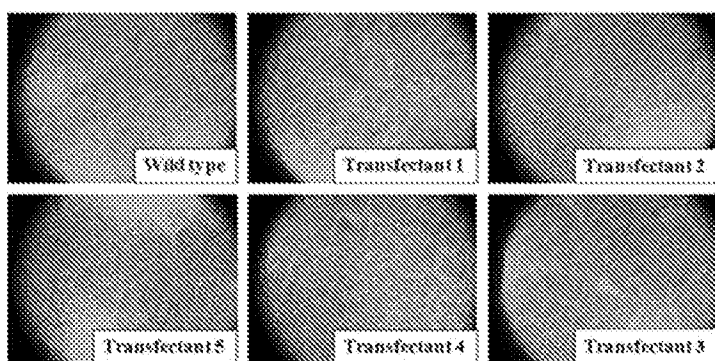


(B)

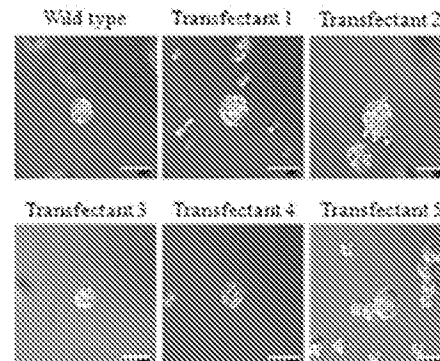


[図14]

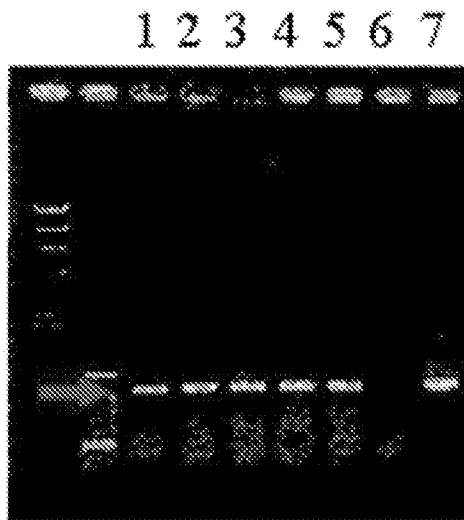
(A)



(B)



[図15]

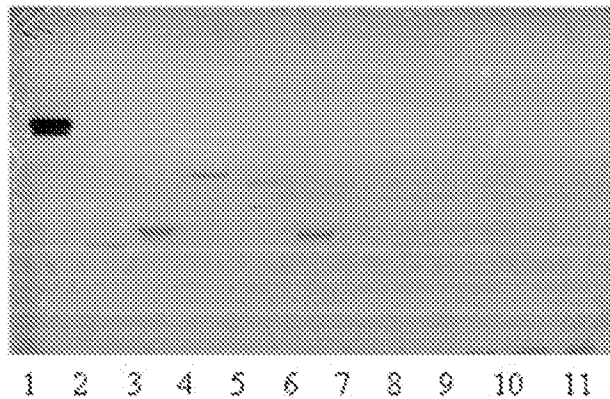


1. Transfectant 1
2. Transfectant 2
3. Transfectant 3
4. Transfectant 4
5. Transfectant 5
6. Wild type
7. Positive control

(導入DNA断片を鋳型としたもの)

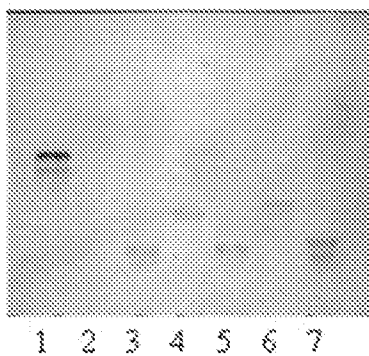
[図16]

(A)



1. Positive control (476 pg の導入DNA)
2. Transfectant 1, XbaI処理
3. Transfectant 1, PstI処理
4. Transfectant 1, HindIII処理
5. Transfectant 1, EcoRI処理
6. Transfectant 1, BamHI処理
- 7-11. negative control (wild type)

(B)



1. Positive control (30 pg の導入DNA)
2. Wild type, PstI処理
3. Transfectant 5, PstI処理
4. Transfectant 4, PstI処理
5. Transfectant 3, PstI処理
6. Transfectant 2, PstI処理
7. Transfectant 1, PstI処理

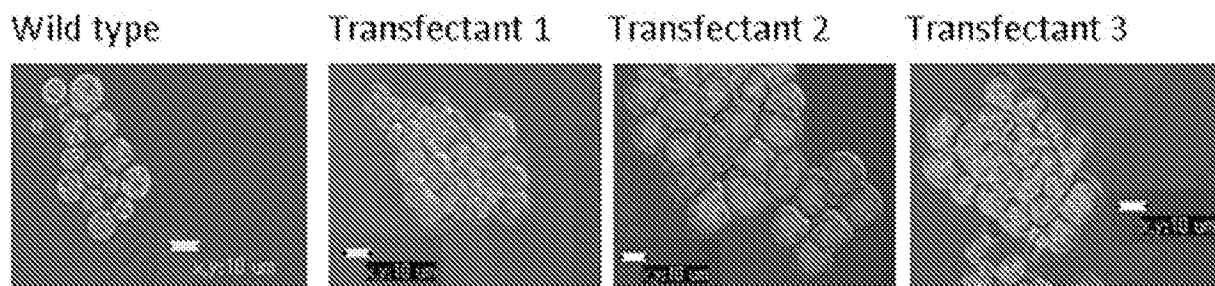
[図17]



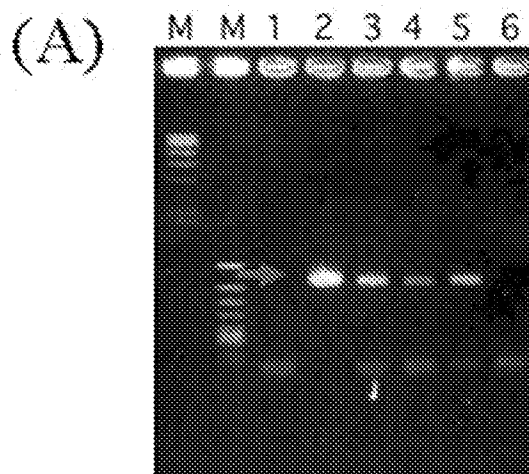
1. Transfectant 1
2. Transfectant 2
3. Transfectant 3
4. Transfectant 4
5. Transfectant 5
6. Wild type
7. Positive control

(導入DNA断片を鋳型としたもの)
8-13. total RNAを鋳型としたもの

[図18]



[図19]



M : ϕ X174/*Hind*III, λ /*Hind*III

1 : Templateなし

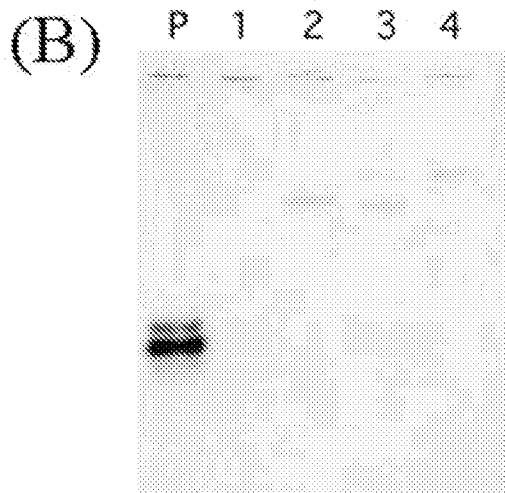
2 : Positive control (導入DNA断片)

3 : Transfectant 1

4 : Transfectant 2

5 : Transfectant 3

6 : Wild type



P : Positive control (導入DNA 2.5 ng)

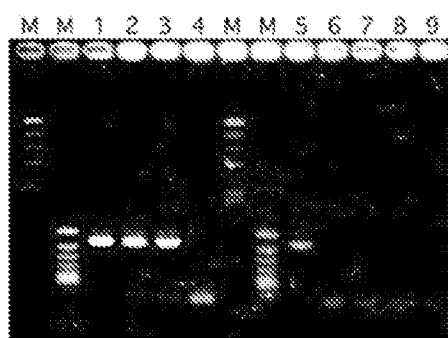
1 : Wild type, *Not*I処理

2 : Transfectant 1, *Not*I処理

3 : Transfectant 2, *Not*I処理

4 : Transfectant 3, *Not*I処理

[図20]



M : ϕ X174/*Hind*III, λ /*Hind*III

1 : Transfectant 1

2 : Transfectant 2

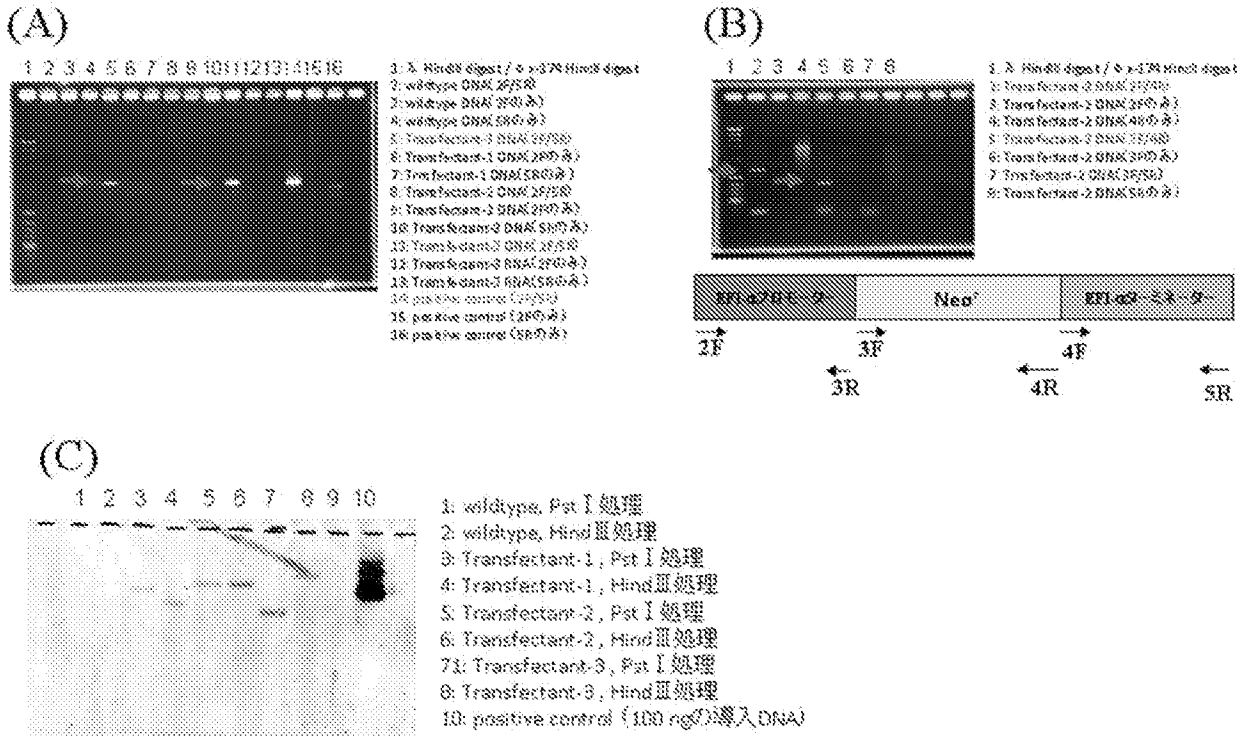
3 : Transfectant 3

4 : Wild type

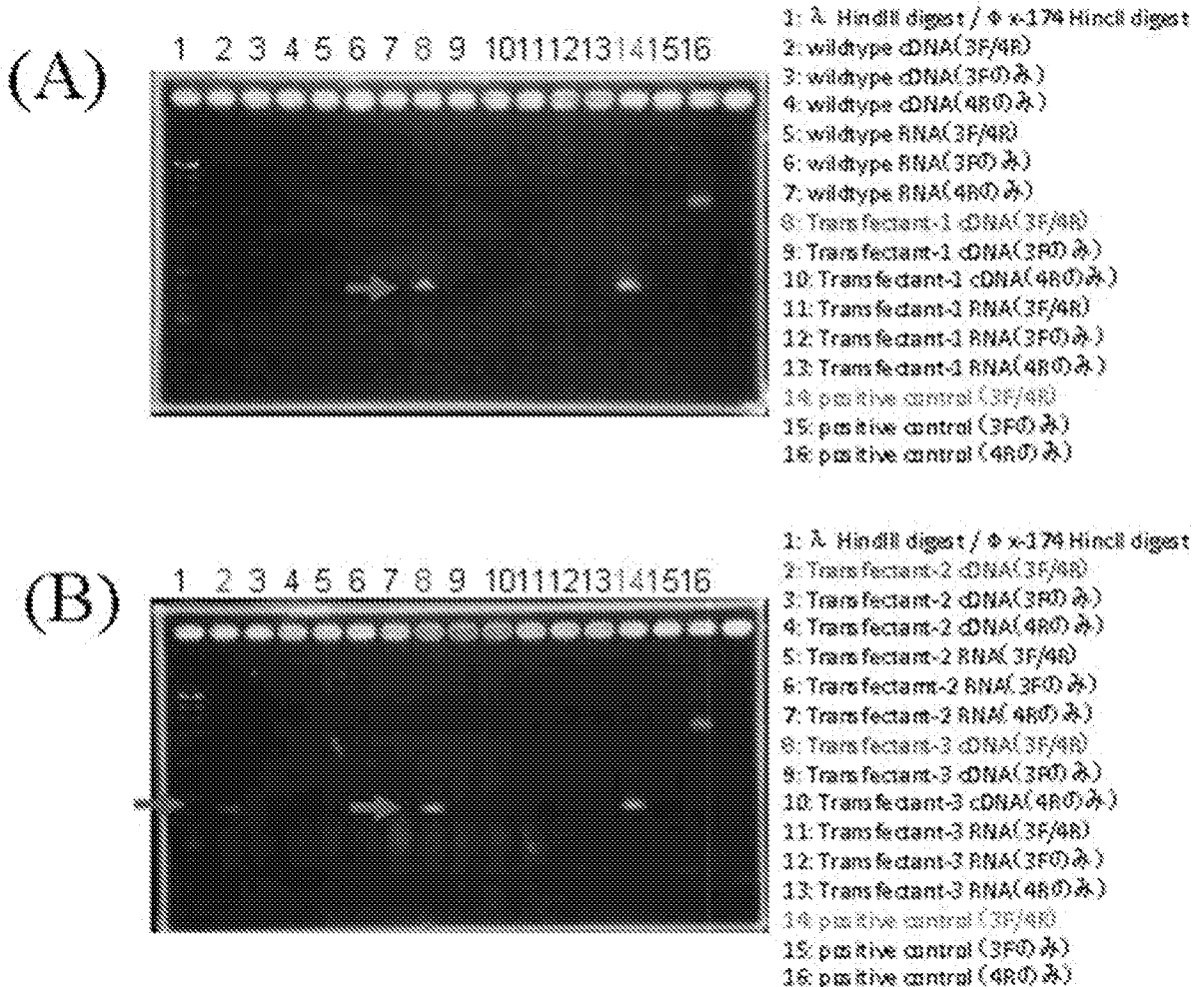
5 : Positive control (導入DNA断片)

6~9 : 1~4において、RNAを鋳型としたPCR (negative control)

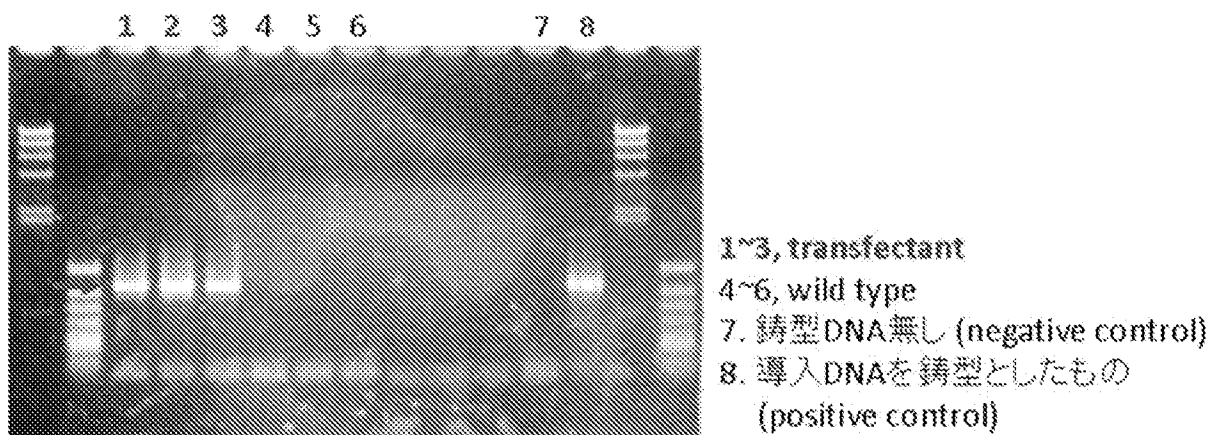
[図21]



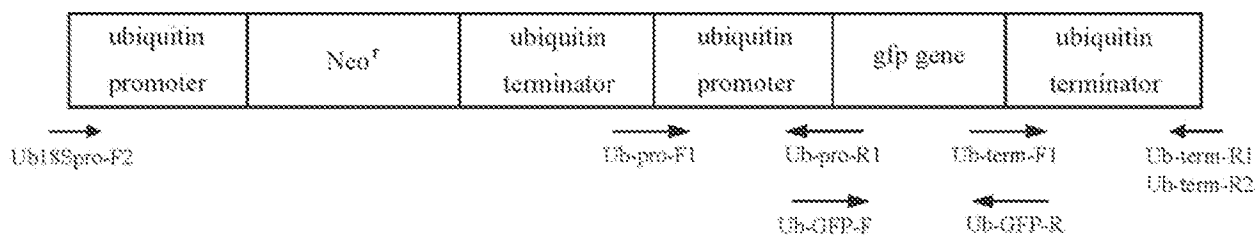
[図22]



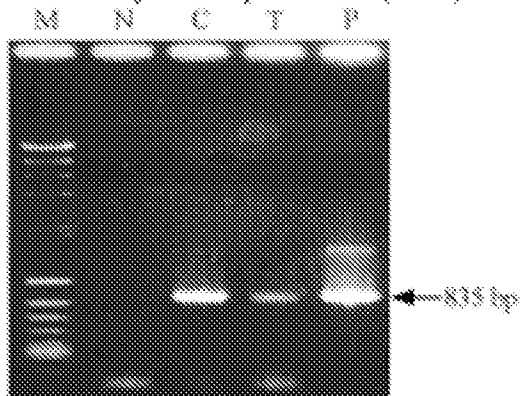
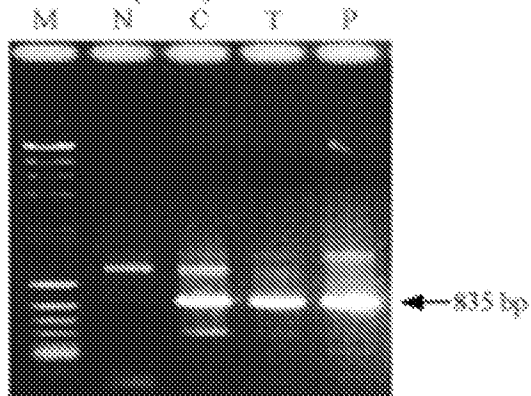
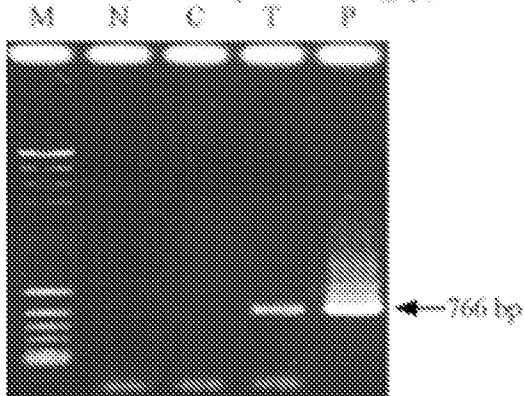
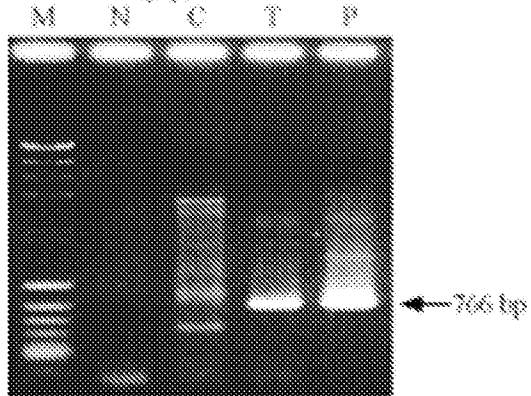
[図23]



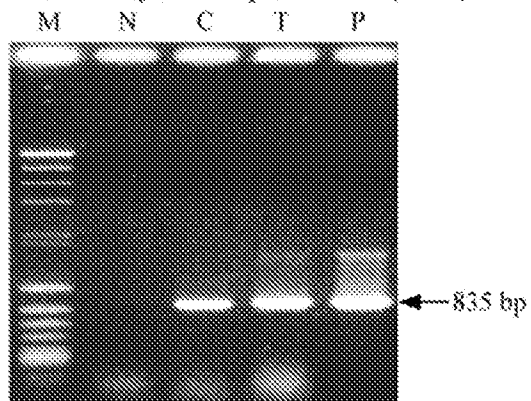
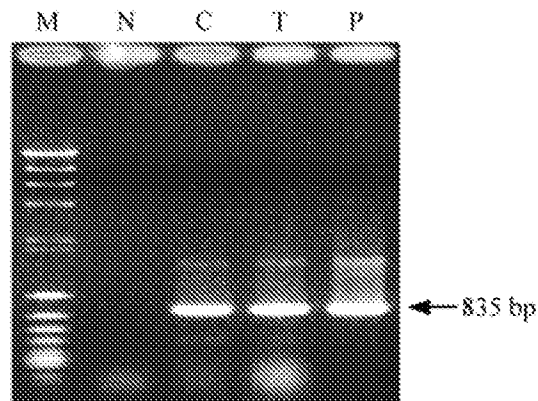
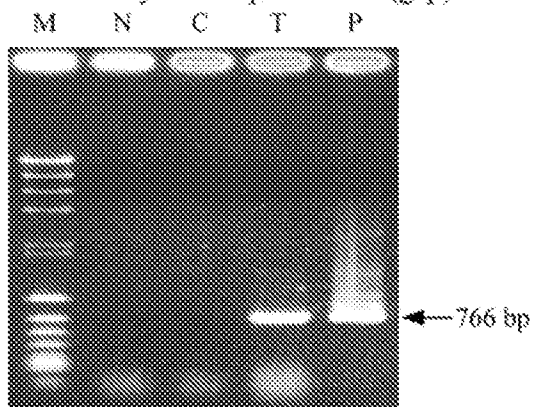
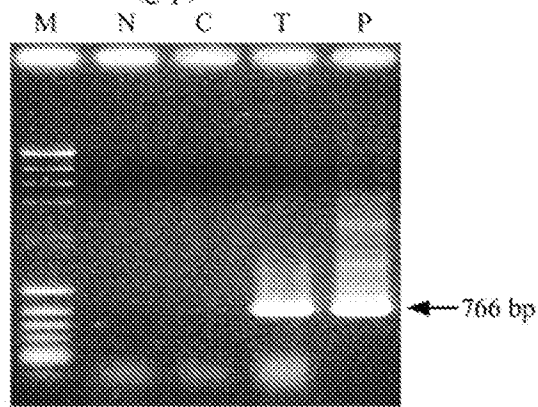
[図24]



[図25]

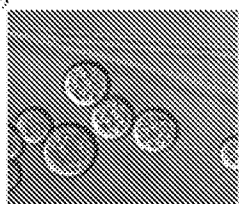
(A) *Aurantiochytrium* sp. mh0186 (*Neo^r*)(C) *T. auricum* (*Neo^r*)(B) *Aurantiochytrium* sp. mh0186 (*gfp*)(D) *T. auricum* (*gfp*)

[図26]

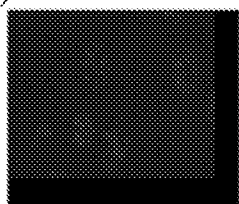
(A) *Aurantiochytrium* sp.mh0186 (Neo^r)(C) *T. aureum* (Neo^r)(B) *Aurantiochytrium* sp.mh0186 (gfp)(D) *T. aureum* (gfp)

[図27]

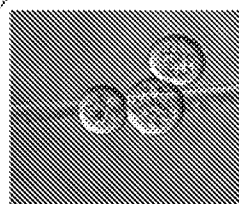
(A)



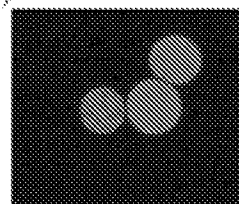
(B)



(C)



(D)



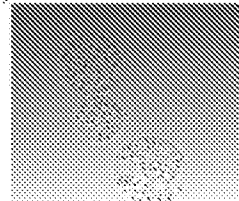
(E)



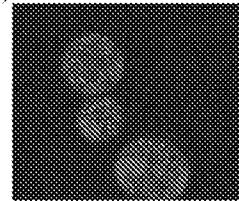
(F)



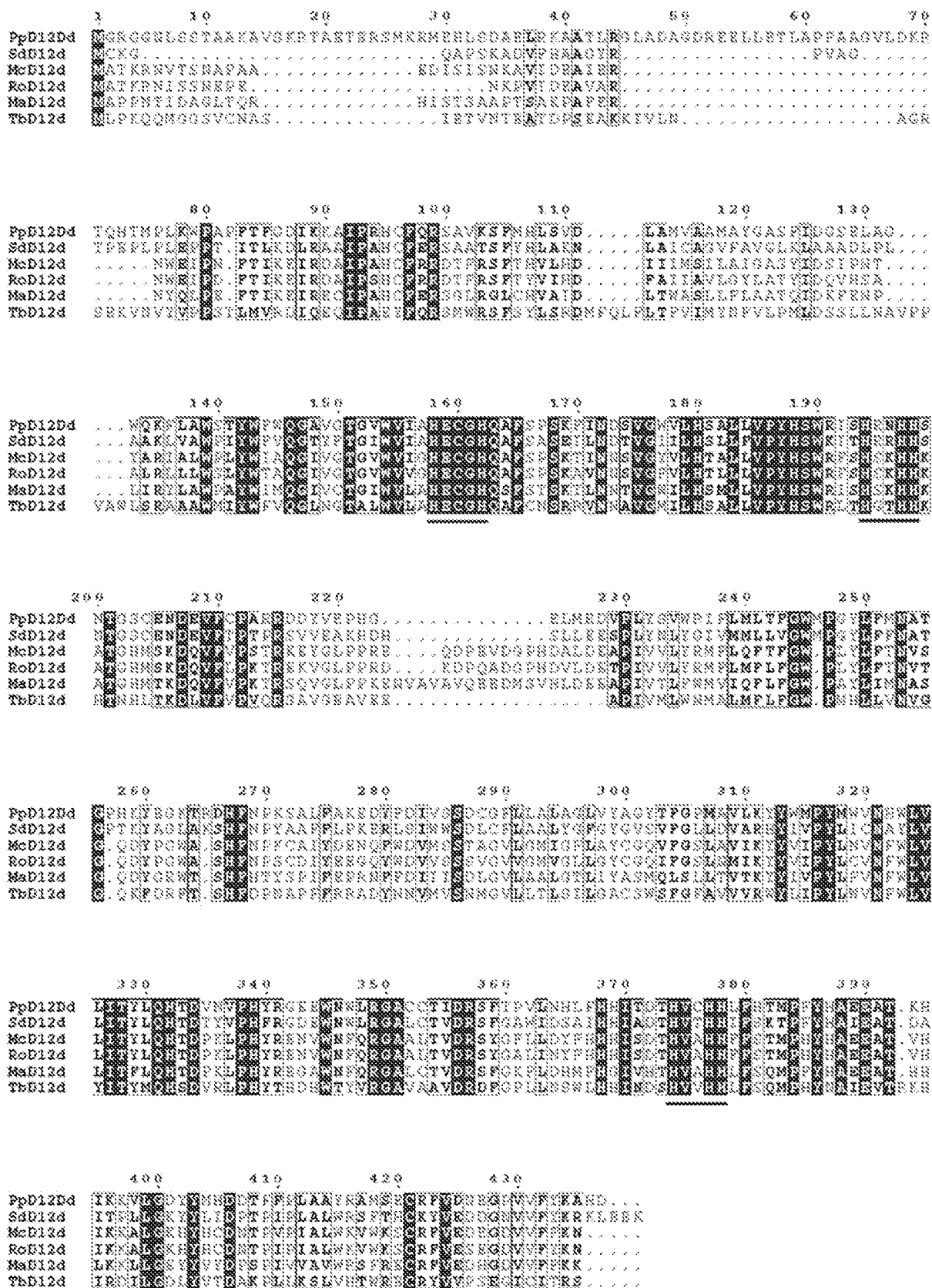
(G)



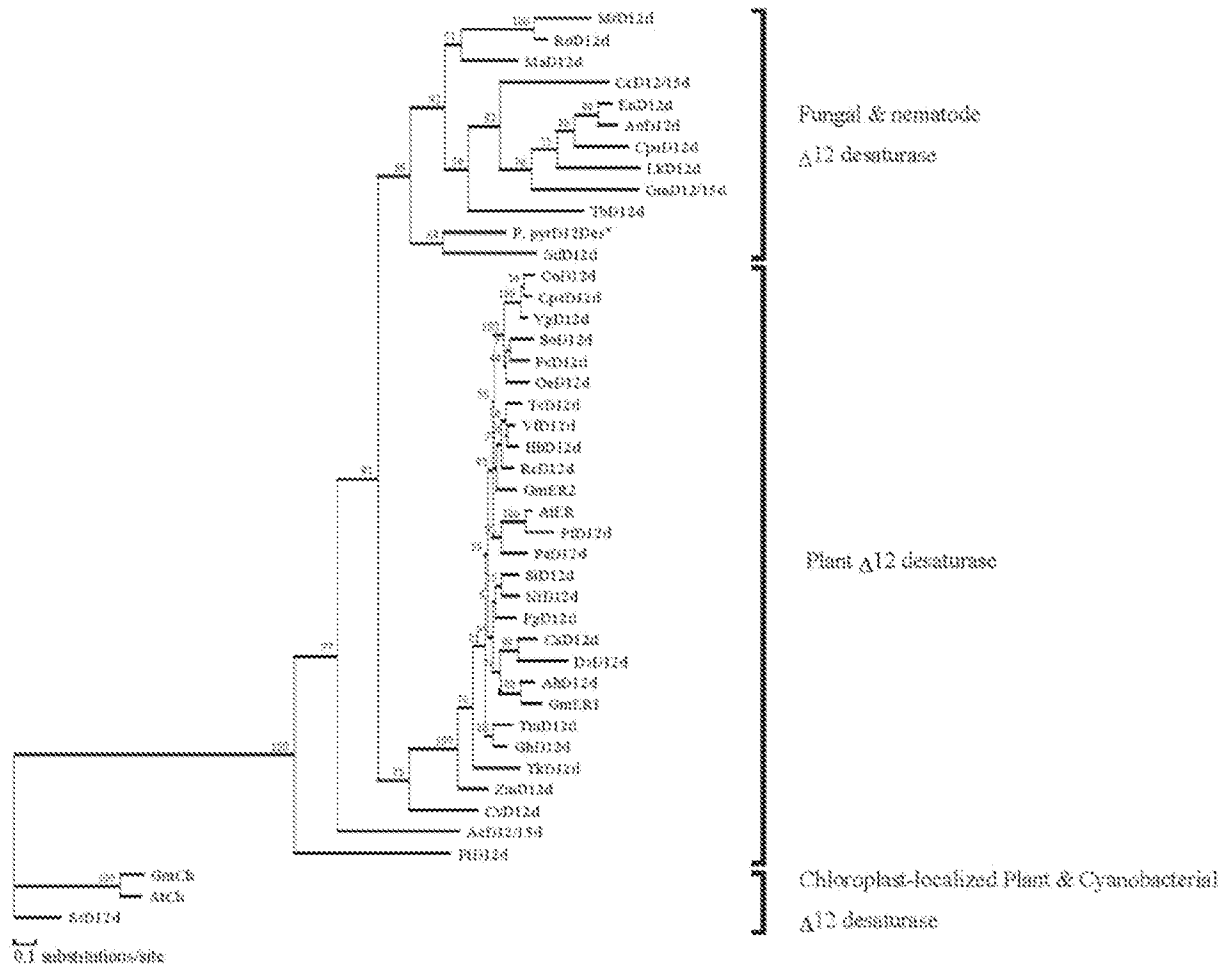
(H)



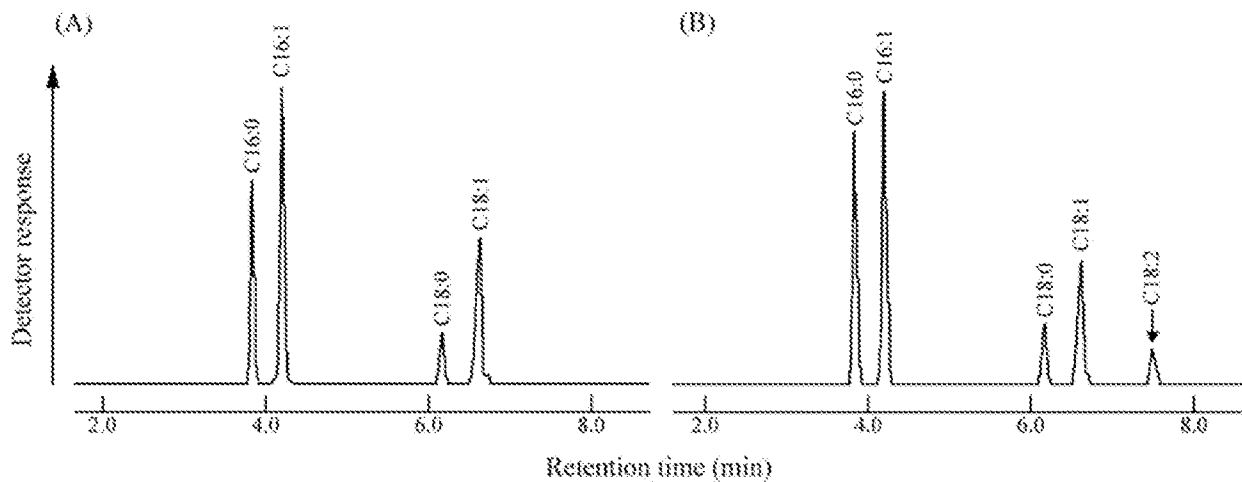
[図28]



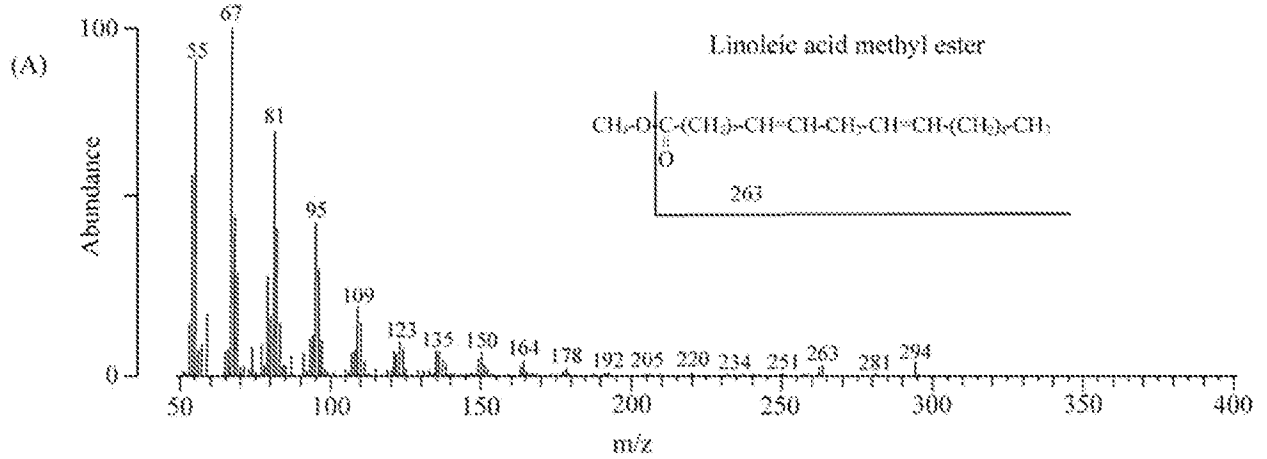
[**29**]



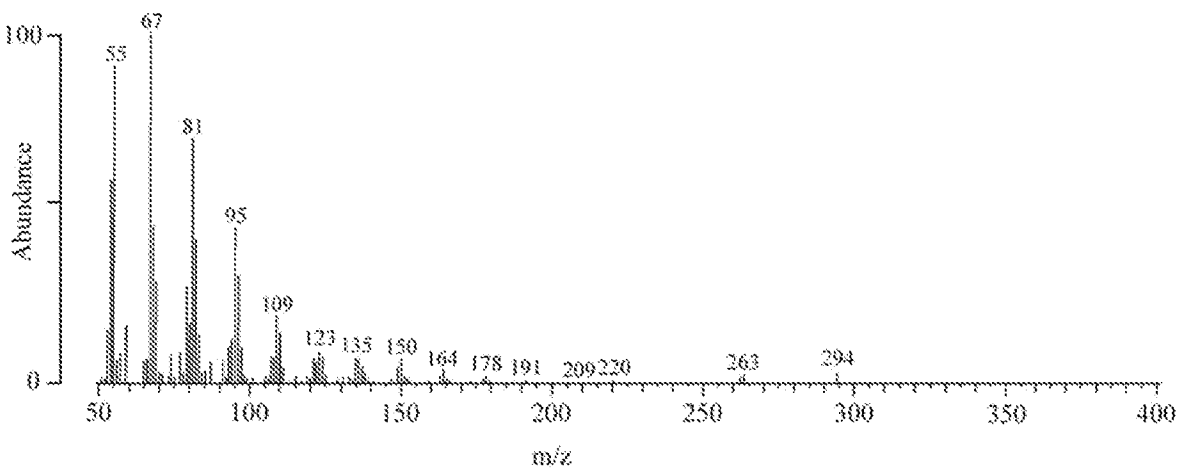
[**30**]



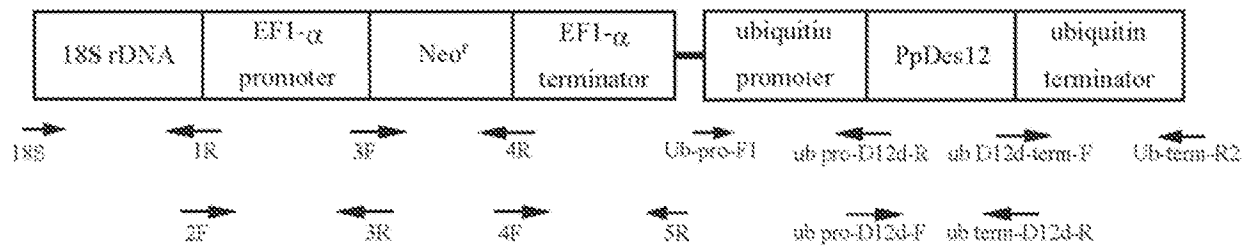
[圖31]



(B)

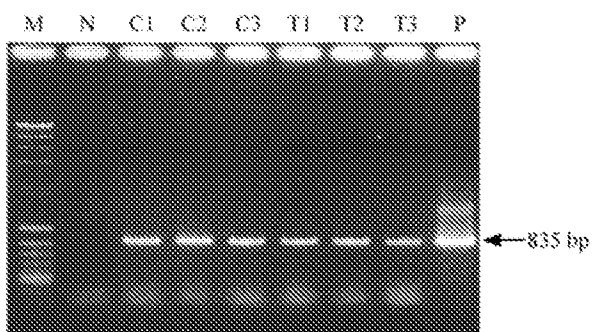


[圖32]

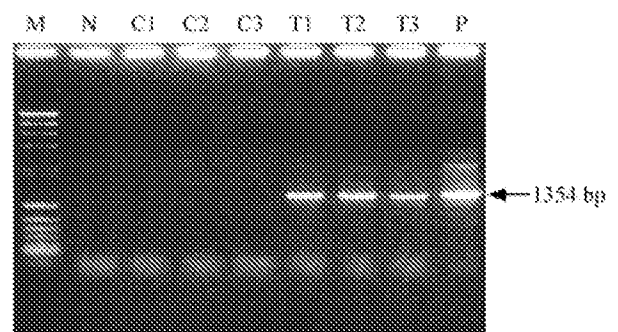


[圖33]

(A) neomycin 耐性遺伝子

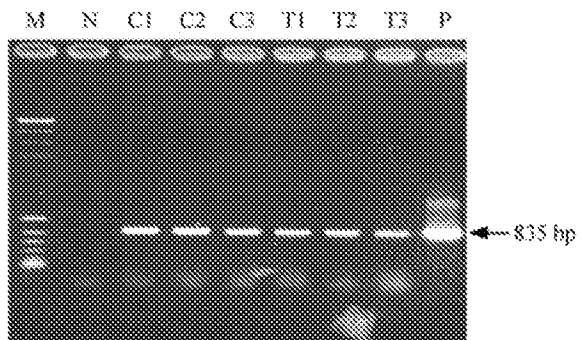
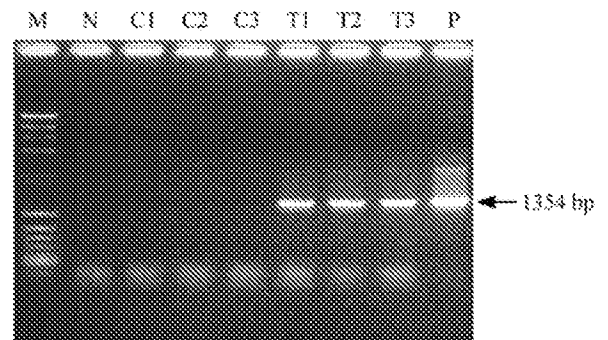


(B) $\Delta 12$ desaturase 遺伝子



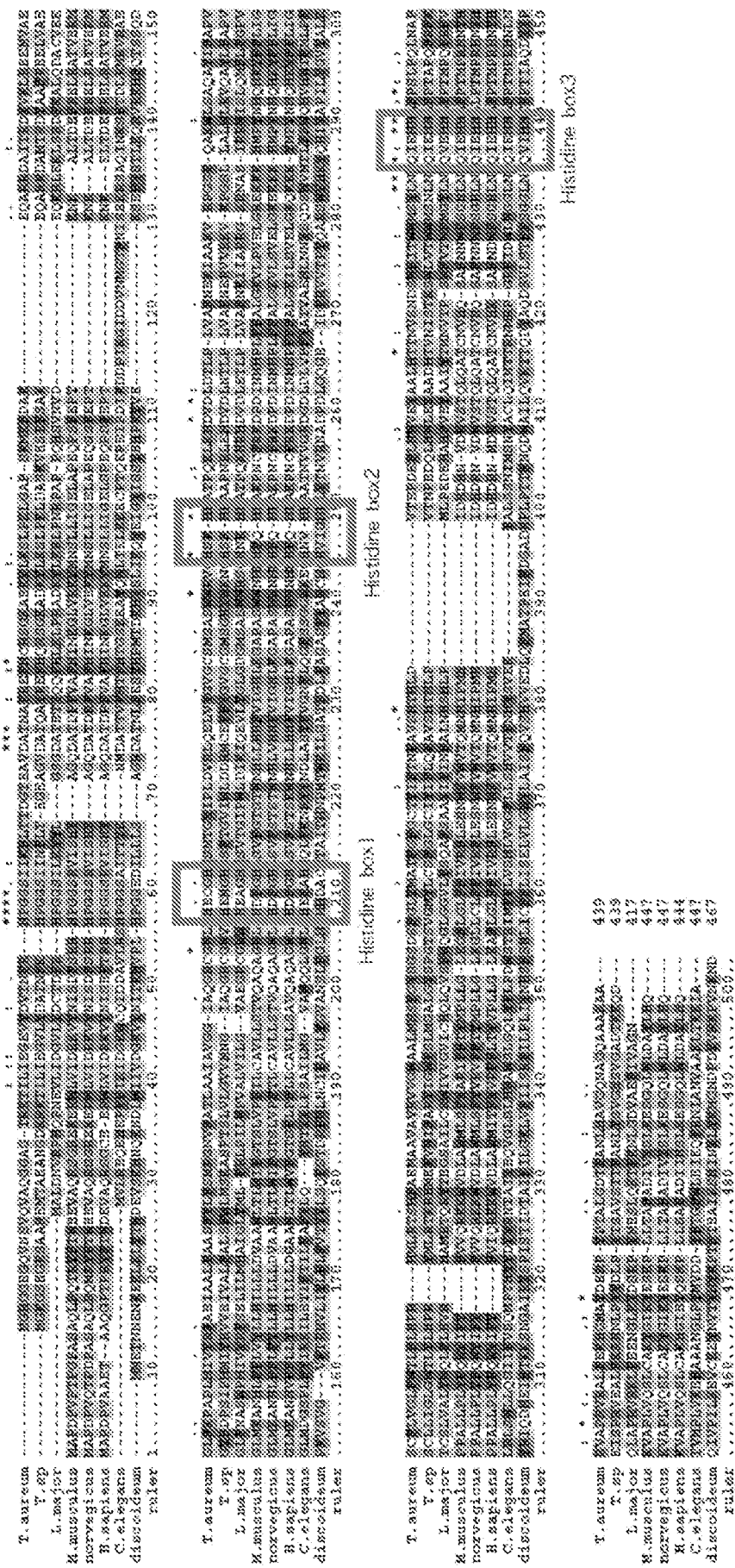
[図34]


(A) neomycin 耐性遺伝子

(B) $\Delta 12$ desaturase 遺伝子

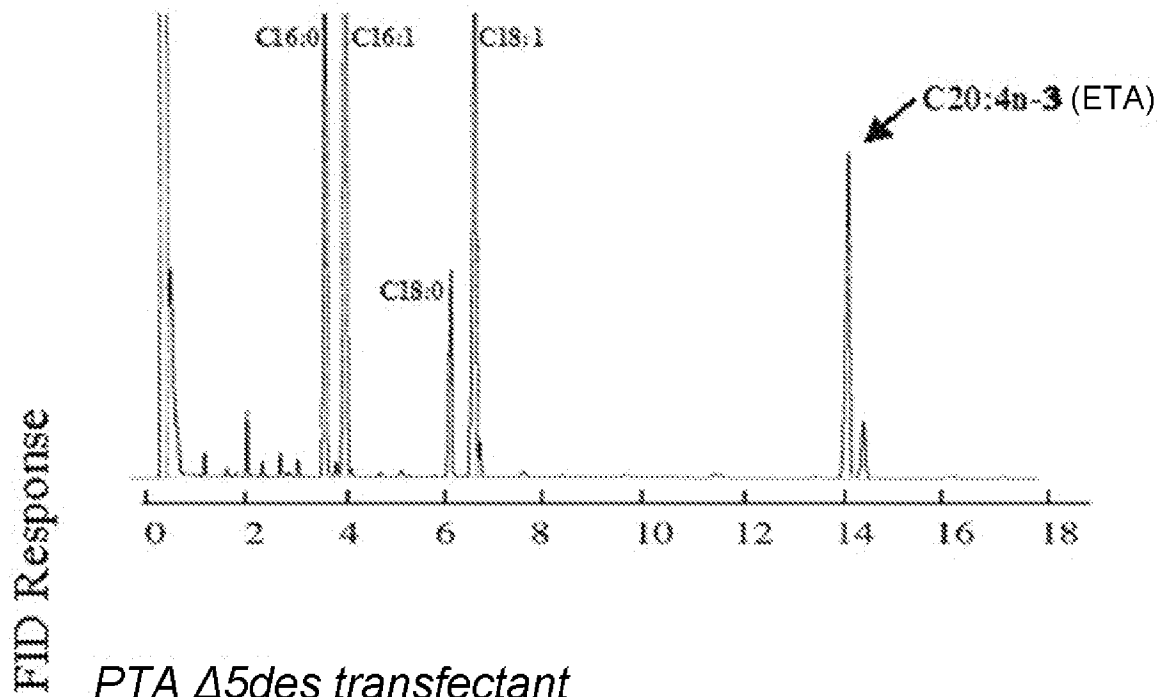
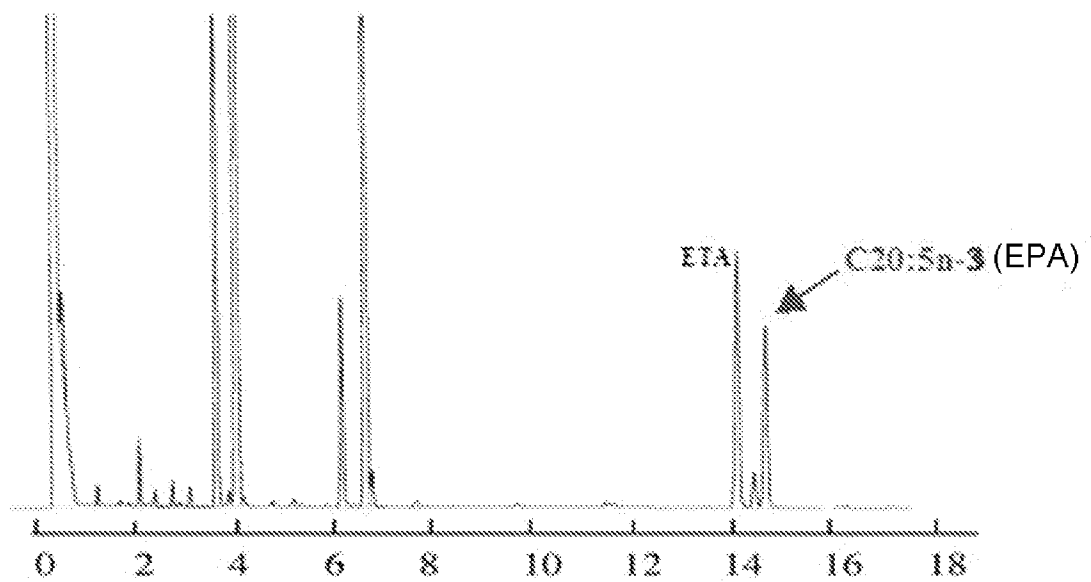
[図35]


cytochrome b5



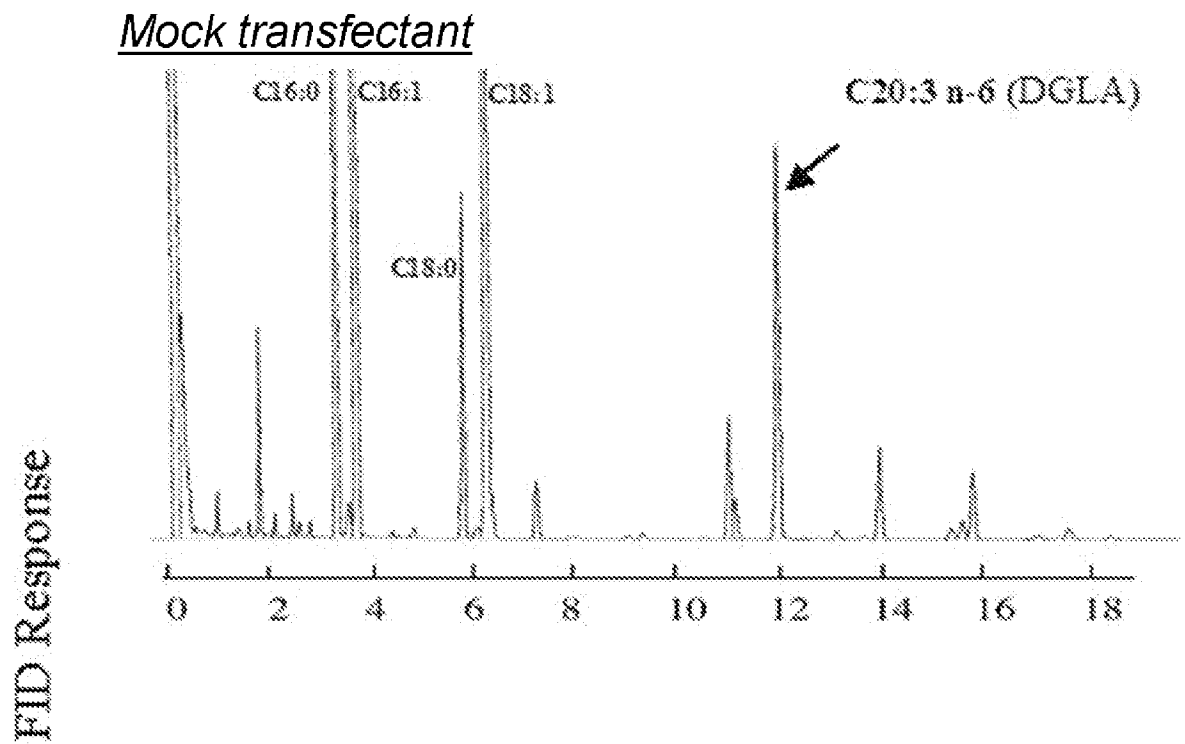
[37a]

(a)

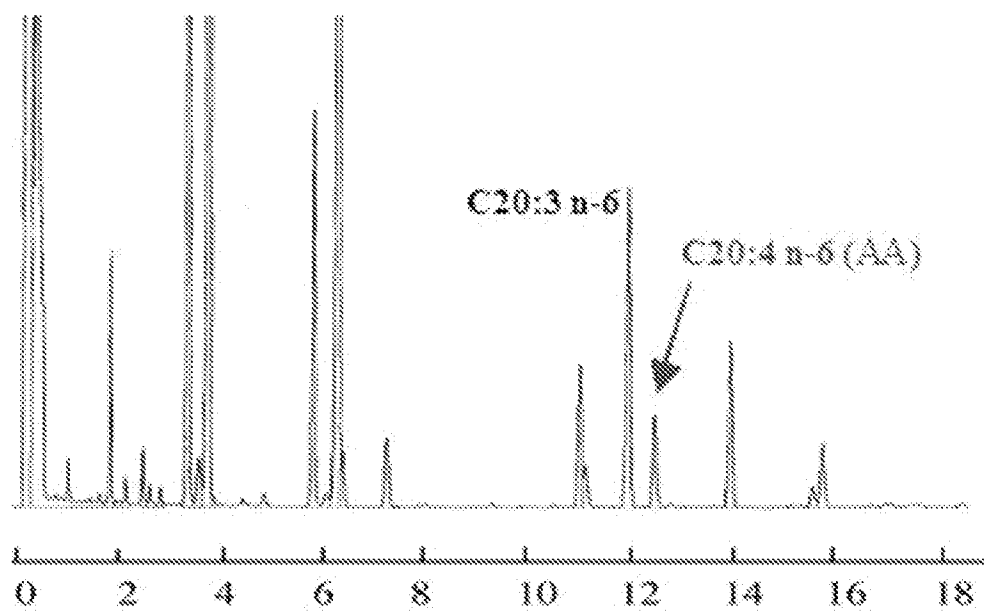
Mock transfectantPTA $\Delta 5des$ transfectant

[37b]

(b)

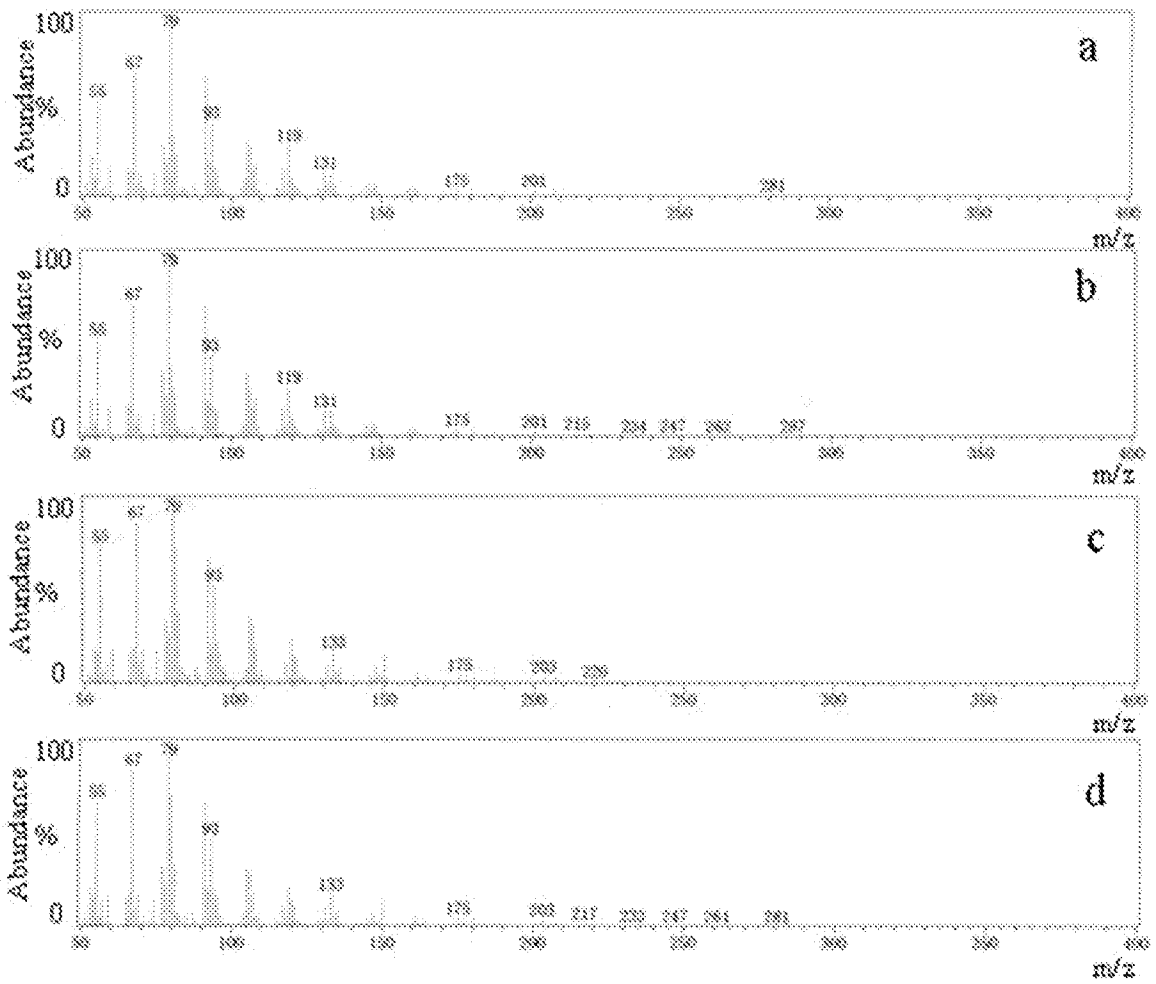


PTA $\Delta 5des$ transfectant



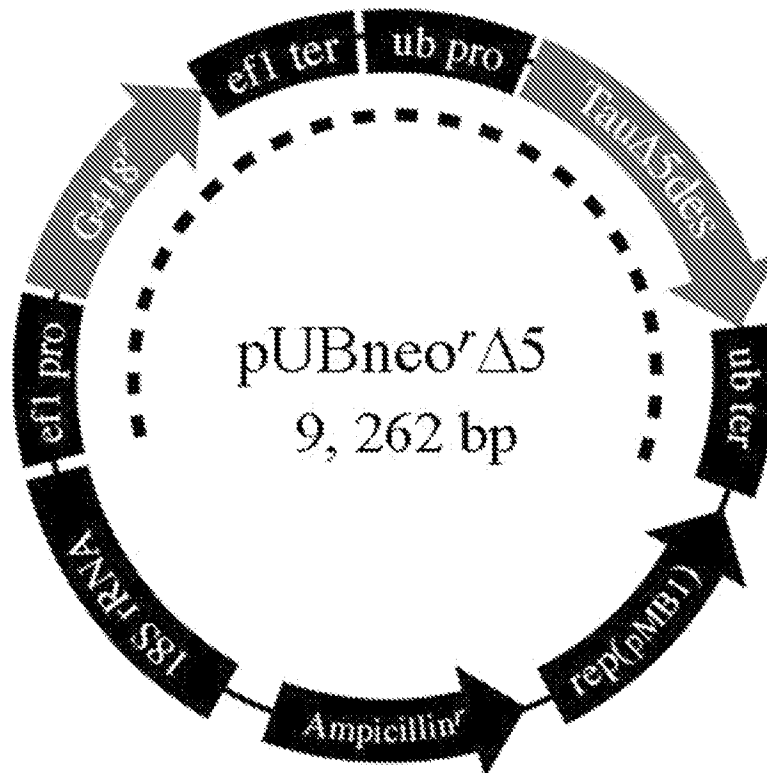
[Fig. 37c]

(c)



[図38]

a

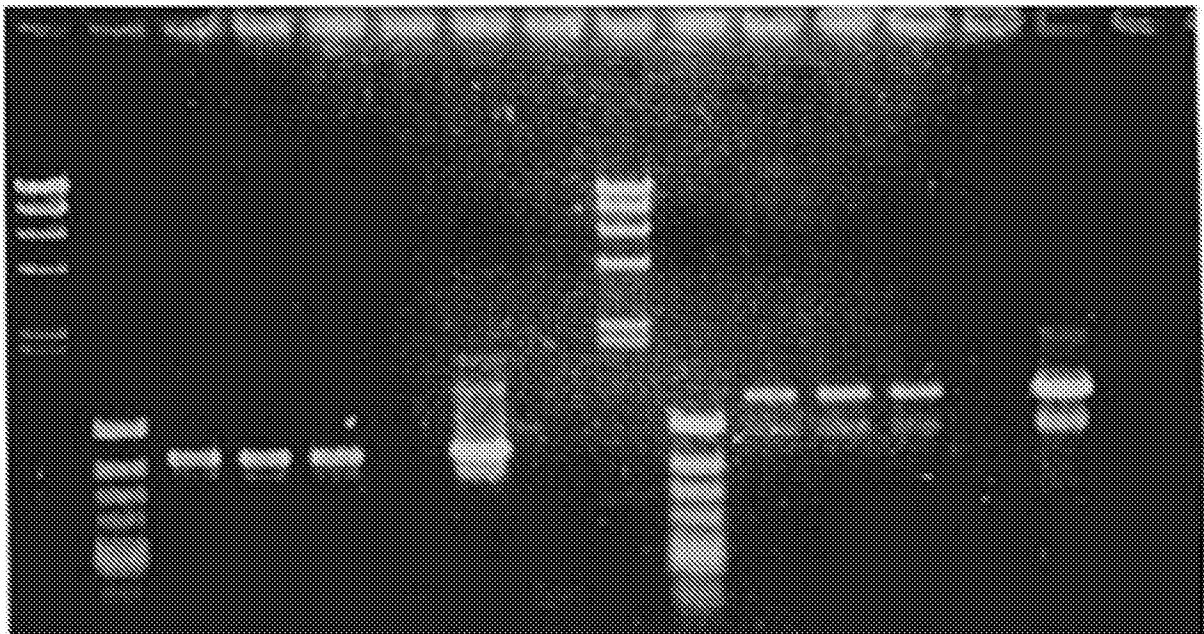


b

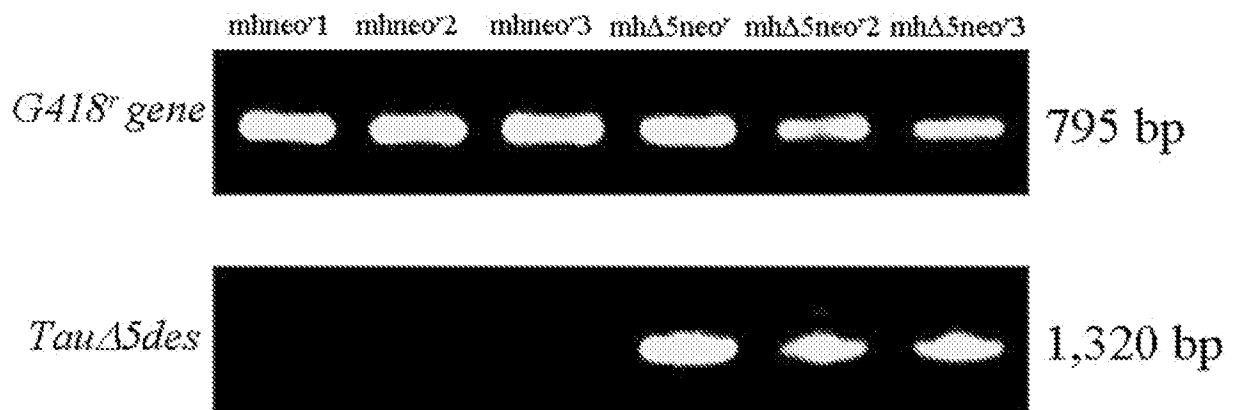


[図39]

M M 1 2 3 4 5 6 M M 7 8 9 10 11 12

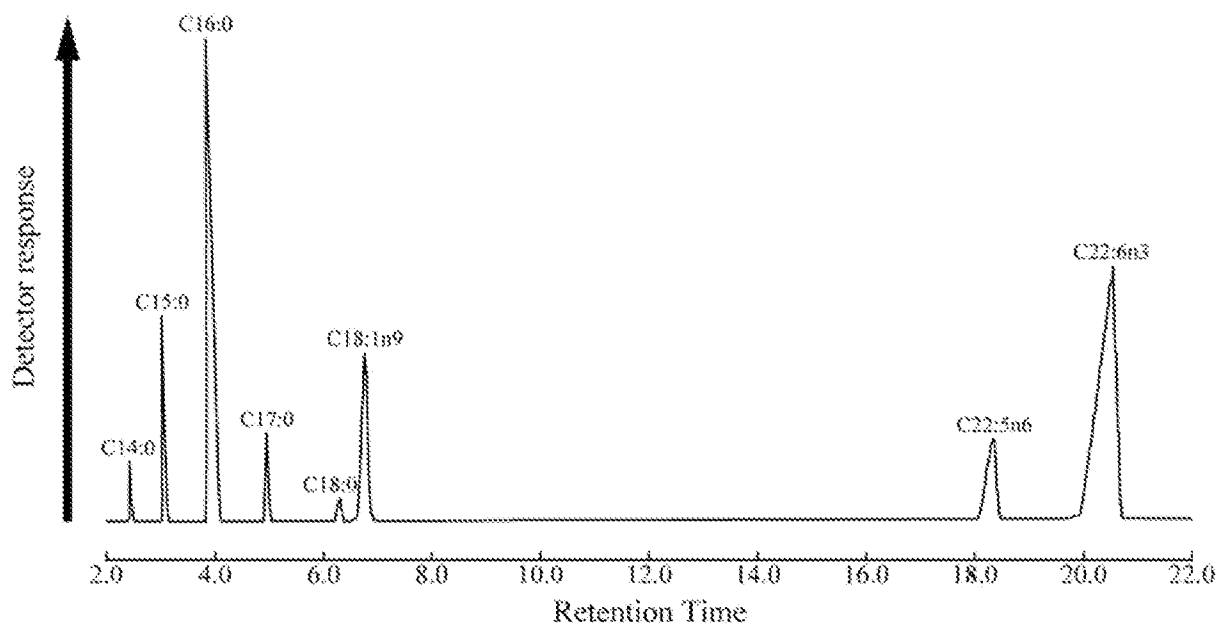


[圖40]

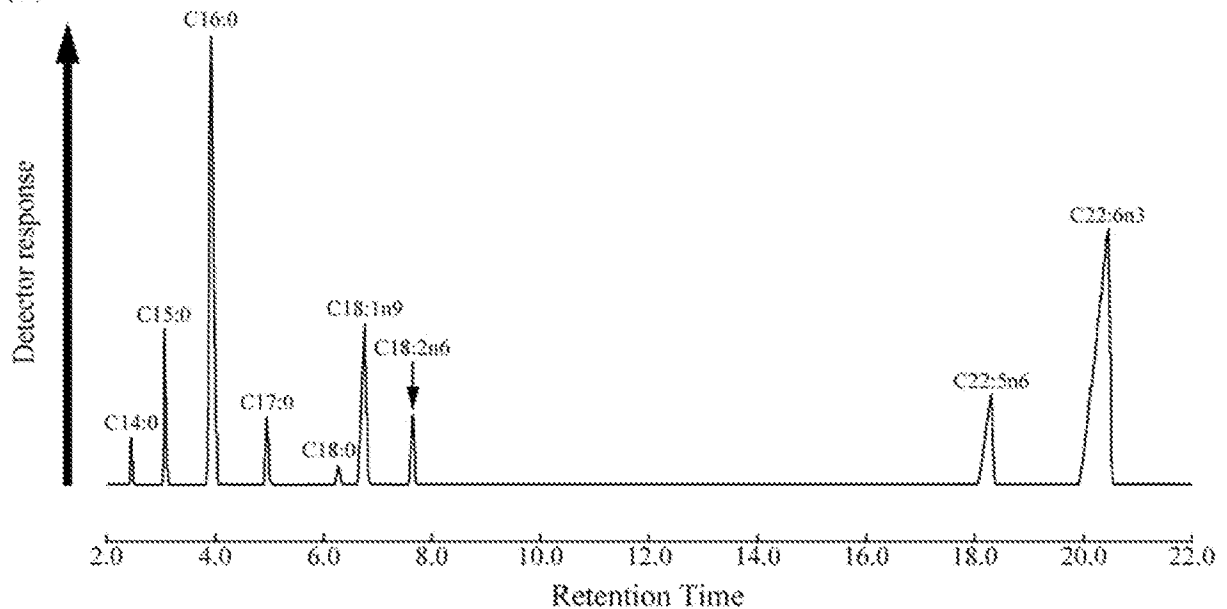


[圖41]

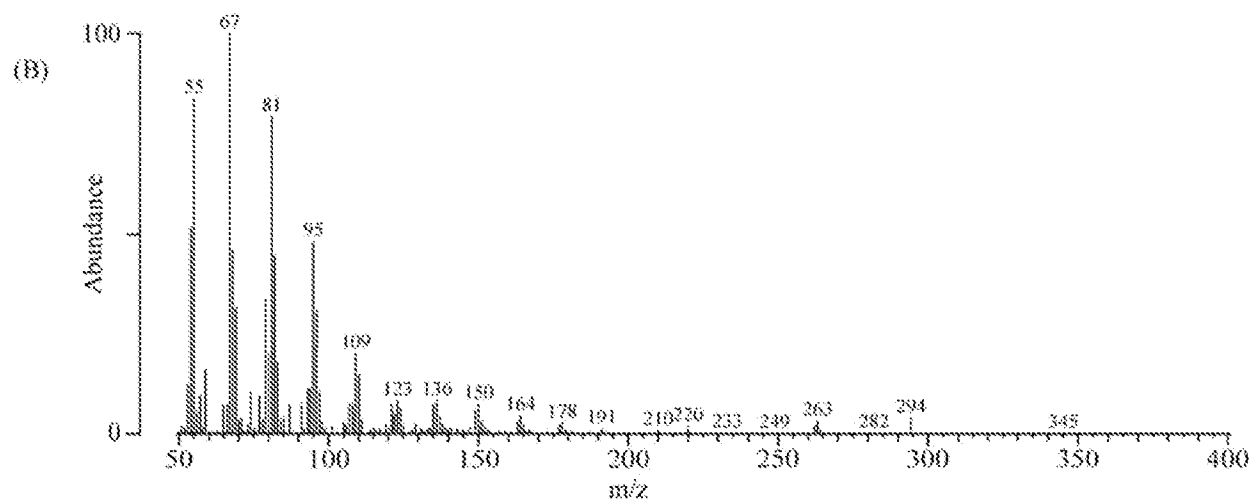
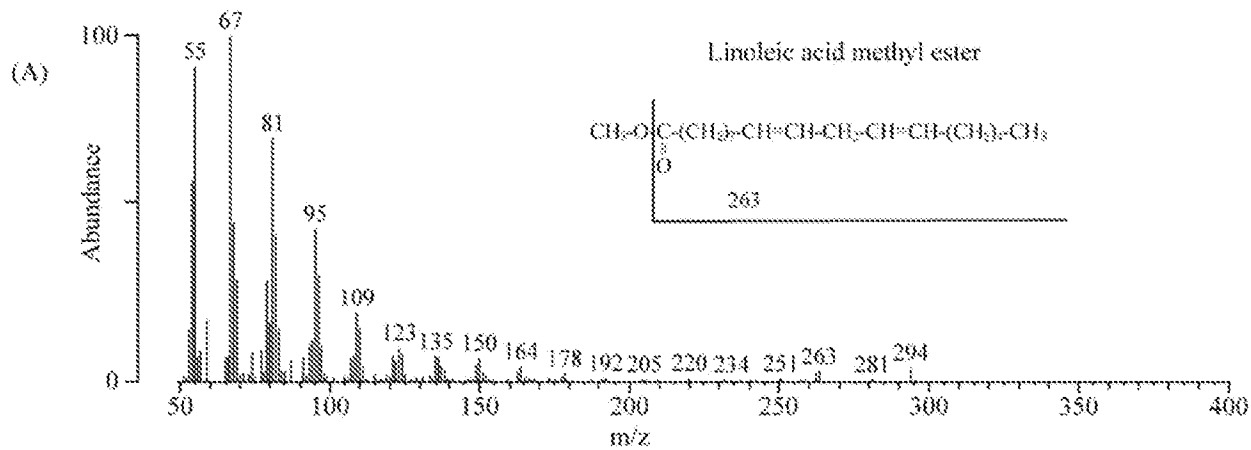
(A)



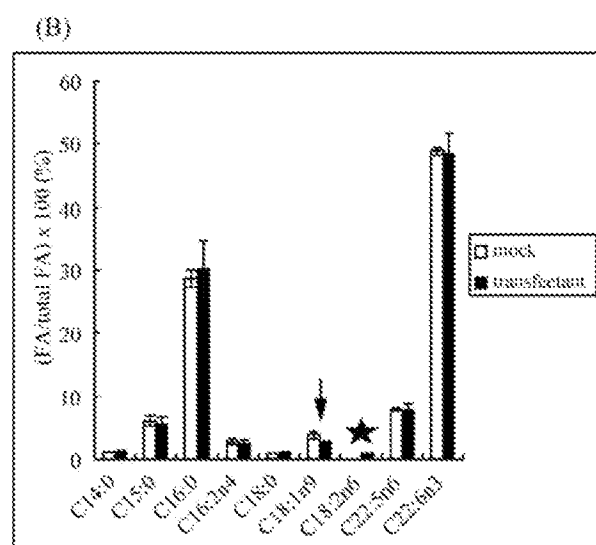
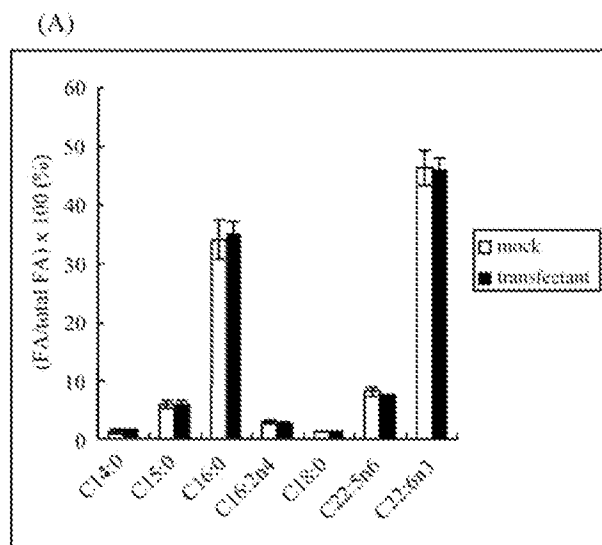
(B)



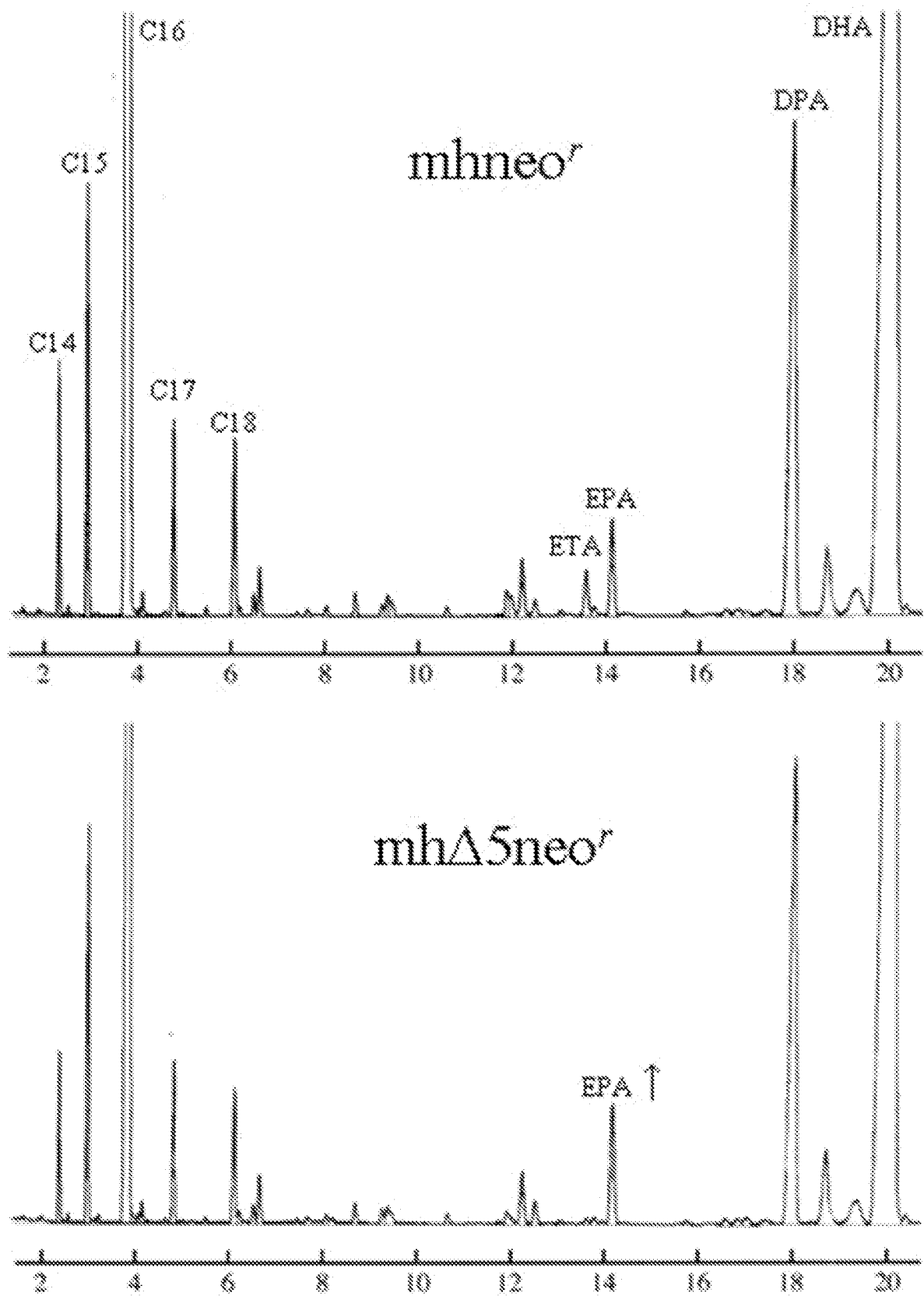
[42]



[43]

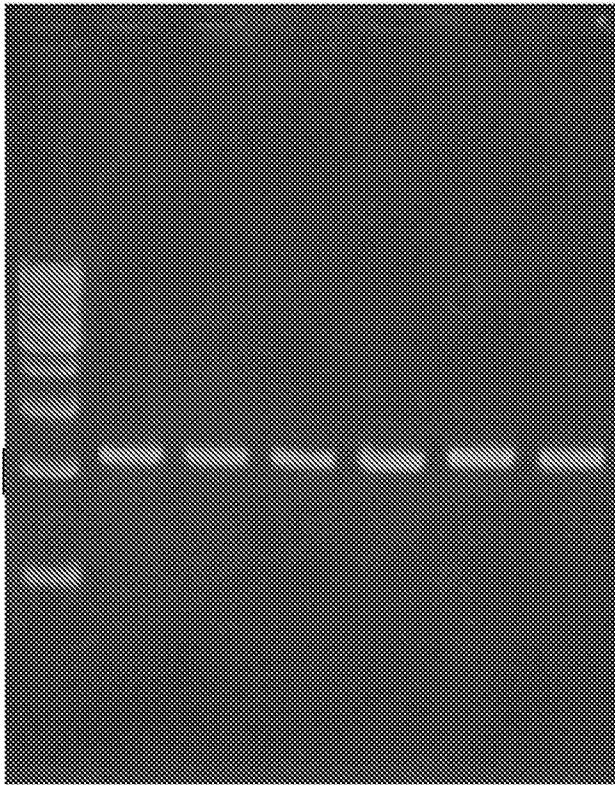


[圖44]



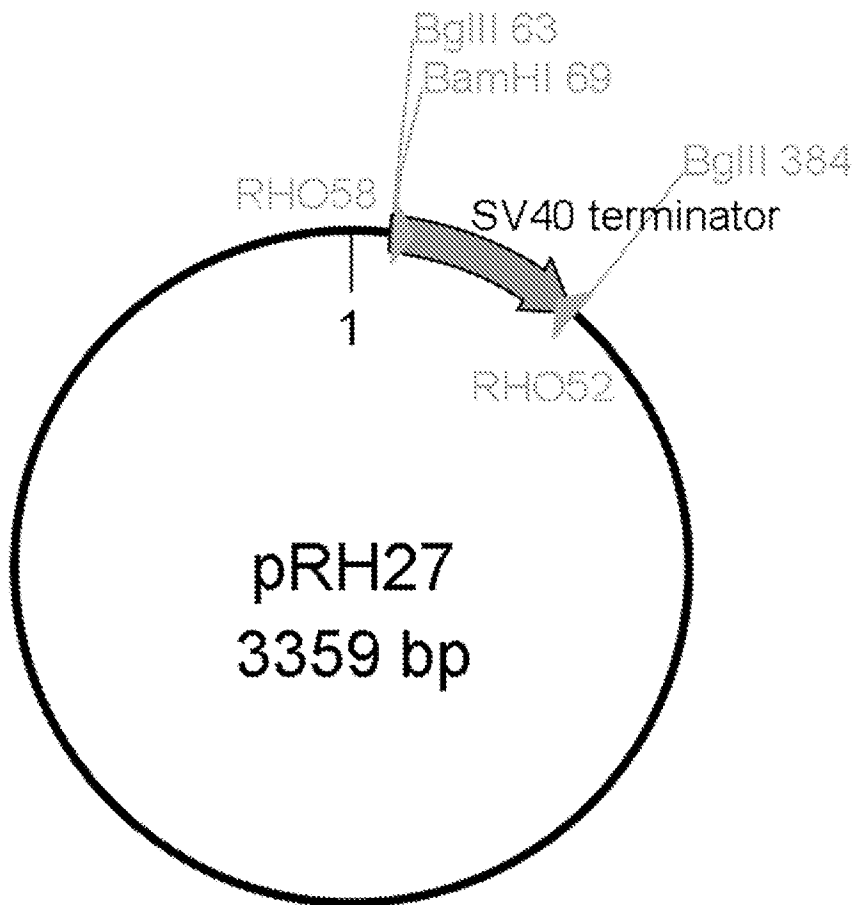
[図45]

M 1 2 3 4 5 6

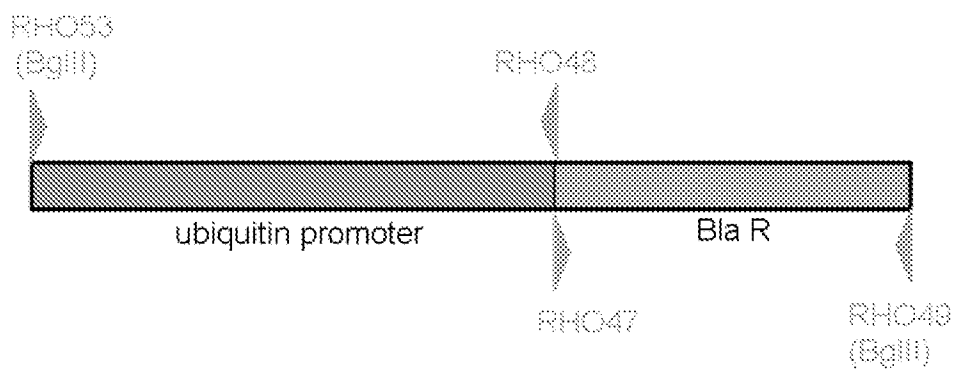


- M. OneSTEP Ladder 1kb.
1. *Schizochytrium aggregatum* ATCC28209
2. *Schizochytrium* sp. SEK210
3. *Schizochytrium* sp. SEK345
4. *Ulkenia* sp. ATCC 28207
5. *Botryochytrium radiatum* SEK353
6. *Parietichytrium sarkarianum* SEK364

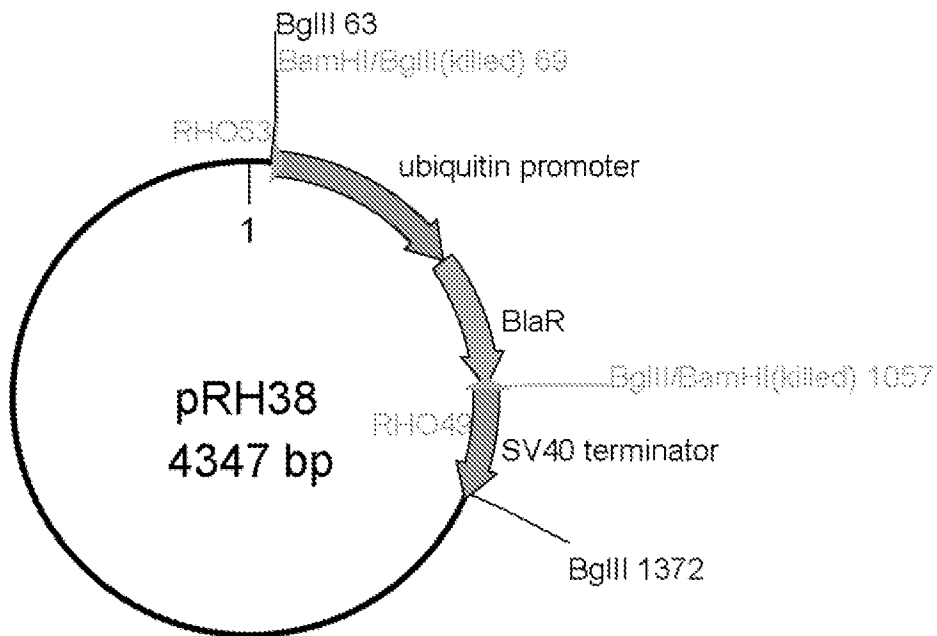
[圖46]



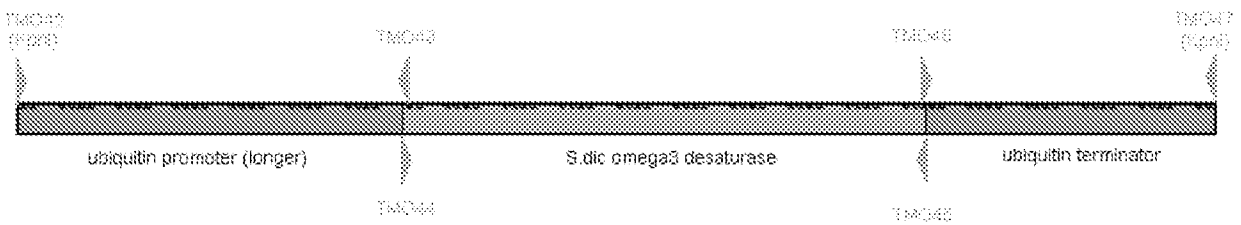
[圖47]



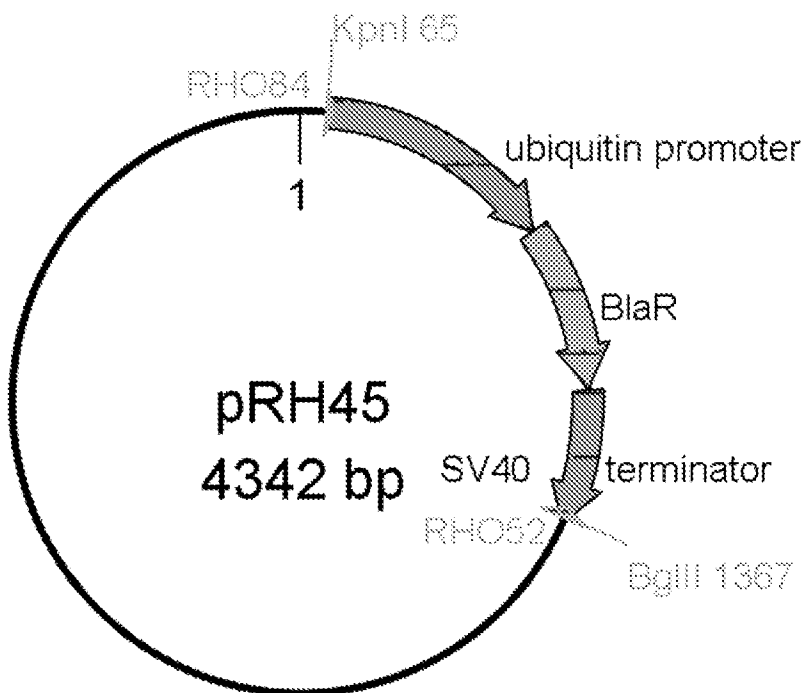
[圖48]



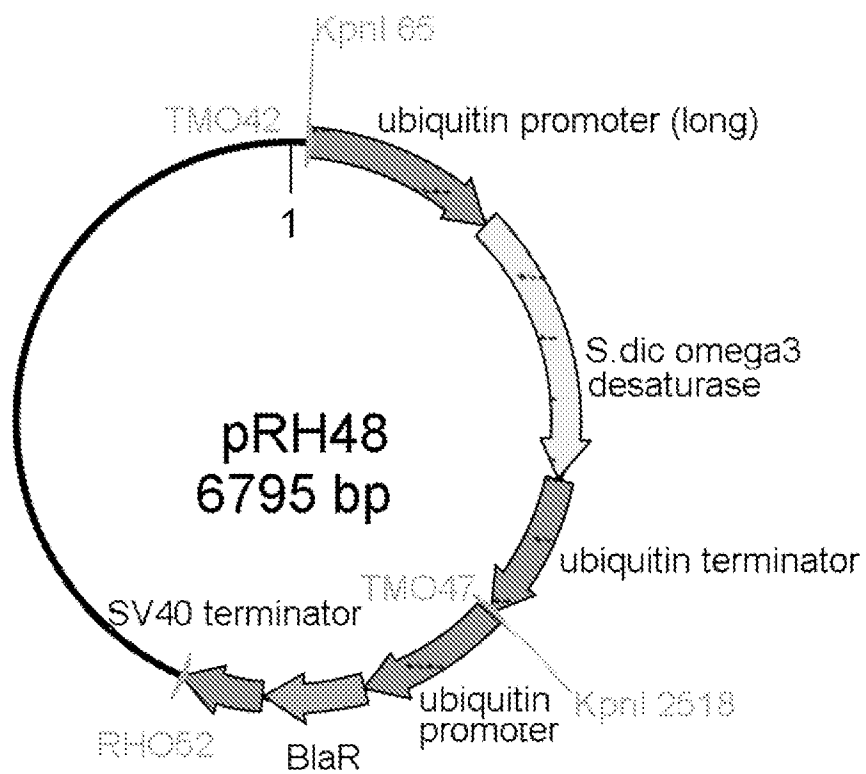
[圖49]



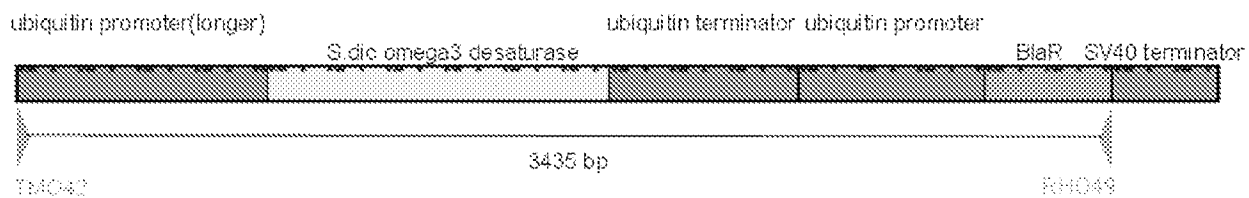
[圖50]



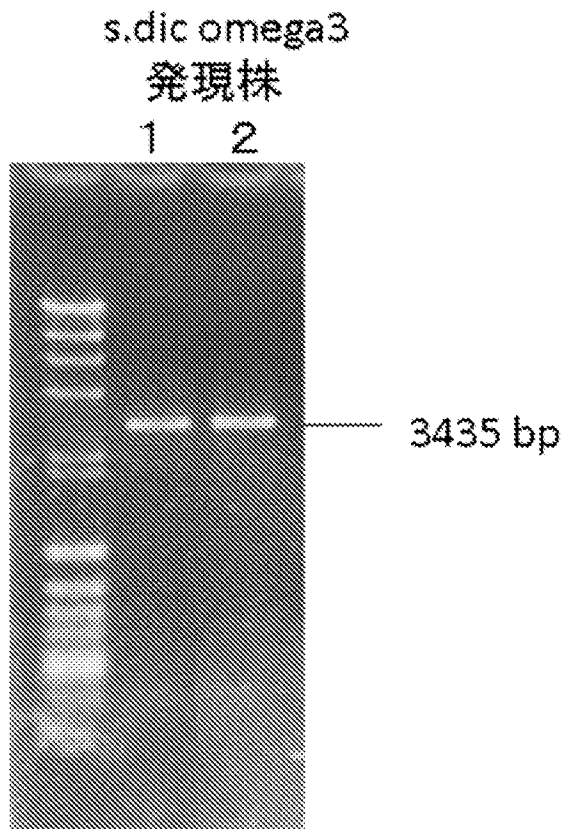
[図51]



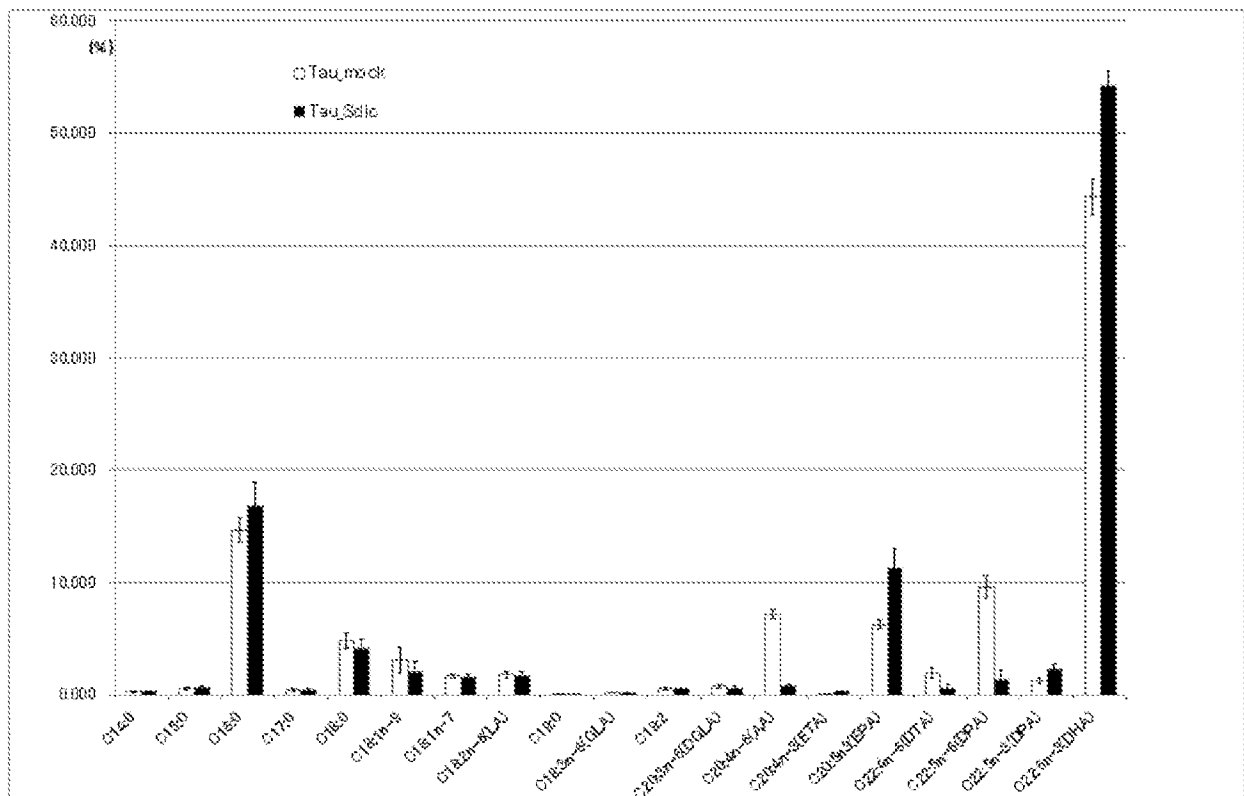
[図52]



[図53]



[図54]



[図55]

野生型株との比較		T.aureum Sdic w3	T.aureum mock	FA
1.25	124.8%	0.30	0.24	C14:0
1.16	115.5%	0.59	0.51	C15:0
1.15	114.7%	16.83	14.67	C16:0
0.94	93.9%	0.40	0.42	C17:0
0.84	84.3%	4.07	4.83	C18:0
0.68	67.9%	2.07	3.05	C18:1n-9
0.96	96.0%	1.60	1.67	C18:1n-7
0.93	92.7%	1.63	1.76	C18:2n-6(LA)
0.94	93.8%	0.02	0.03	C19:0
1.01	100.6%	0.17	0.17	C18:3n-6(GLA)
0.95	94.7%	0.50	0.53	C19:2
0.74	74.2%	0.54	0.73	C20:3n-6(DGLA)
0.10	9.8%	0.71	7.16	C20:4n-6(AA)
8.30	829.6%	0.28	0.03	C20:4n-3(ETA)
1.81	180.8%	11.32	6.26	C20:5n3(EPA)
0.26	26.4%	0.52	1.96	C22:4n-6(DTA)
0.14	14.2%	1.36	9.57	C22:5n-6(DPA)
1.79	178.6%	2.23	1.25	C22:5n-3(DPA)
1.22	122.5%	54.28	44.32	C22:6n-3(DHA)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/066599

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C11C3/00(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N9/02(2006.01)n, C12P7/64(2006.01)n, C12R1/645(2006.01)n

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)

C12N15/09, C11C3/00, C12N1/15, C12N9/02, C12P7/64, C12R1/645

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)

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), WPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> Y	JP 2006-304686 A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 09 November 2006 (09.11.2006), & US 2006/0275904 A1	<u>1-5, 7, 17-22</u> 6, 8-16
<u>X</u> Y	JP 2006-304685 A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 09 November 2006 (09.11.2006), & US 2006/0286650 A1	<u>1-5, 7, 17-22</u> 6, 8-16
<u>X</u> Y	JP 2005-503125 A (Martek Biosciences Corp.), 03 February 2005 (03.02.2005), & US 2003/0166207 A1 & EP 1414941 A2 & WO 2002/083869 A2	<u>1-3, 5-12,</u> <u>14-21</u> 4, 13, 22

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
15 October, 2010 (15.10.10)

Date of mailing of the international search report
26 October, 2010 (26.10.10)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/066599

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Tsunehiro AKI et al., "Development of transformation system of oleaginous microorganism, Labyrinthulida", Abstracts of the Annual Meeting of the Society for Biotechnology, Japan, 2005, vol.2005, page 199	<u>1-2, 5, 7,</u> <u>18-20</u>
Y		3-4, <u>6, 8-17,</u> 21-22
Y	Hiroaki IWASAKA et al., "Modification of lipid composition by genetic engineering in oleaginous microorganism, Labyrinthulida", Abstracts of the Annual Meeting of the Society for Biotechnology, Japan, 2008, vol.60, page 136	1-22
A	Takumi KOBAYASHI et al., "Labyrinthulea no Kodo Fuhowa Shibosan Gosei ni Kansuru Idenshi no Shutoku to Kino Kaiseki", Nippon Nogei Kagakukai Taikai Koen Yoshishu, 2008, vol.2008, page 22	1-22
A	WO 2008/144473 A2 (MARTEK BIOSCIENCES CORP.), 27 November 2008 (27.11.2008), & JP 2010-527244 A & US 2008/0022422 A1	1-22
A	WO 2008/006202 A1 (BIORIGINAL FOOD & SCIENCE CORP.), 17 January 2008 (17.01.2008), & JP 2009-542231 A & US 2008/0072351 A1 & EP 2046957 A1	1-22
A	JP 2007-527716 A (BASF Plant Science GmbH), 04 October 2007 (04.10.2007), & US 2008/0155705 A1 & EP 1654344 A2 & WO 2005/012316 A2	1-22
A	Naoki NAGANO et al., "Labyrinthulea no Kodo Fuhowa Shibosan Seigosei Keiro no Hanbetsuho no Kaihatsu", Nippon Nogei Kagakukai Taikai Koen Yoshishu, 2009.03, vol.2009, page 35	1-22
P,X	Takumi KOBAYASHI et al., "Δ5desaturase Idenshi no Hatsugen ni yoru Labyrinthulea no Shibosan Sosei no Kaihen", Dai 82 Kai The Japanese Biochemical Society Taikai Program Koen Yoshishu, 25 September 2009 (25.09.2009), page 2P-200	1-22

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C11C3/00(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N9/02(2006.01)n, C12P7/64(2006.01)n, C12R1/645(2006.01)n

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 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09, C11C3/00, C12N1/15, C12N9/02, C12P7/64, C12R1/645

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	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2010年
日本国実用新案登録公報	1996-2010年
日本国登録実用新案公報	1994-2010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)

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), WPI

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 Y	JP 2006-304686 A (富士写真フイルム株式会社) 2006. 11. 09 & US 2006/0275904 A1	1-5, 7, 17-22 6, 8-16
X Y	JP 2006-304685 A (富士写真フイルム株式会社) 2006. 11. 09 & US 2006/0286650 A1	1-5, 7, 17-22 6, 8-16

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、一般的な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

15. 10. 2010

国際調査報告の発送日

26. 10. 2010

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
 郵便番号100-8915
 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)

鳥居 敬司

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B

4045

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
X Y	JP 2005-503125 A (マーテック・バイオサイエンスイズ・コーポレーション) 2005.02.03 & US 2003/0166207 A1 & EP 1414941 A2 & WO 2002/083869 A2	1-3, 5-12, 14-21 4, 13, 22
X Y	秋庸裕 他, "油糧微生物ラビリンチュラ類の形質転換系の開発", 日本生物工学会大会講演要旨集, 2005, Vol.2005, p.199	1-2, 5, 7, 18-20 3-4, 6, 8-17, 21-22
Y	岩坂宏明 他, "油糧微生物ラビリンチュラ類の分子育種による脂質組成改変", 日本生物工学会大会講演要旨集, 2008, Vol.60, p.136	1-22
A	小林巧 他, "ラビリンチュラ類の高度不飽和脂肪酸合成に関する遺伝子の取得と機能解析", 日本農芸化学会大会講演要旨集, 2008, Vol.2008, p.22	1-22
A	WO 2008/144473 A2 (MARTEK BIOSCIENCES CORPORATION) 2008.11.27 & JP 2010-527244 A & US 2008/0022422 A1	1-22
A	WO 2008/006202 A1 (BIORIGINAL FOOD & SCIENCE CORPORATION) 2008.01.17 & JP 2009-542231 A & US 2008/0072351 A1 & EP 2046957 A1	1-22
A	JP 2007-527716 A (ビーエーエスエフ プラント サイエンス ゲーエムベアーハ ー) 2007.10.04 & US 2008/0155705 A1 & EP 1654344 A2 & WO 2005/012316 A2	1-22
A	長野直樹 他, "ラビリンチュラ類の高度不飽和脂肪酸生合成経路の判別法の 開発", 日本農芸化学会大会講演要旨集, 2009.03, Vol.2009, p.35	1-22
P, X	小林巧 他, "Δ5desaturase 遺伝子の発現によるラビリンチュラ類の脂肪酸組 成の改変", 第82回日本生化学会大会プログラム・講演要旨集, 2009.09.25, p.2P-200	1-22

第 I 欄 ニュクレオチド又はアミノ酸配列 (第 1 ページの 1. c の続き)

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、提出された以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a. 提出手段
- 紙形式
- 電子形式
- b. 提出時期
- 出願時の国際出願に含まれていたもの
- この国際出願と共に電子形式により提出されたもの
- 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出されたもの
2. さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しを提出した場合、出願後に提出した配列の写し若しくは追加して提出した配列の写しが、出願時に提出した配列と同一である旨又は出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見：