

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4383671号  
(P4383671)

(45) 発行日 平成21年12月16日 (2009.12.16)

(24) 登録日 平成21年10月2日 (2009.10.2)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 9/02 (2006.01)

C 1 2 N 9/02

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C O 7 K 16/40 (2006.01)

C O 7 K 16/40

A O 1 H 5/00 (2006.01)

A O 1 H 5/00 A

A O 1 K 67/027 (2006.01)

A O 1 K 67/027

請求項の数 27 (全 46 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-586873 (P2000-586873)  
 (86) (22) 出願日 平成11年12月6日 (1999.12.6)  
 (65) 公表番号 特表2002-531116 (P2002-531116A)  
 (43) 公表日 平成14年9月24日 (2002.9.24)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US1999/028655  
 (87) 国際公開番号 W02000/034439  
 (87) 国際公開日 平成12年6月15日 (2000.6.15)  
 審査請求日 平成17年6月3日 (2005.6.3)  
 (31) 優先権主張番号 60/111,301  
 (32) 優先日 平成10年12月7日 (1998.12.7)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 500232938  
 ワシントン ステート ユニバーシティ  
 リサーチ ファウンデーション  
 アメリカ合衆国 ワシントン州 9916  
 3 プルマン、イーストゲート プールヴ  
 アード 1610 ノースイースト  
 (74) 代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志  
 (72) 発明者 ブロウズ ジョン エイ.  
 アメリカ合衆国 ワシントン州 パローズ  
 マッケンズィー ロード 41  
 (72) 発明者 ワリス ジェイムズ ジー.  
 アメリカ合衆国 アイダホ州 モスコ  
 サウス ローガン ストリート 1218

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 不飽和化酵素、およびそれらを多価不飽和脂肪酸の合成のために用いる方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

C 2 0 脂肪酸<sup>8</sup> - 不飽和化酵素 (desaturase) 活性を有する精製された蛋白質であつて、以下のアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む蛋白質：

(a) 配列番号：4に示されたアミノ酸配列；

(b) (a) で規定された配列と、少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列。

【請求項 2】

請求項1記載の蛋白質をコードする、単離された核酸分子。

【請求項 3】

配列番号：3に示された配列を含む、請求項2記載の単離された核酸分子。

10

【請求項 4】

請求項2記載の核酸配列と動作可能的に結合した制御配列を含む、組換え核酸分子。

【請求項 5】

請求項4記載の組換え核酸分子により形質転換された細胞。

【請求項 6】

請求項4記載の組換え核酸分子、ならびに、

(a) 配列番号：1に示された核酸分子；および

(b) (a) に示された核酸分子と95%の配列同一性を有する核酸分子；

からなる群より選択される脂肪酸<sup>5</sup> - 不飽和化酵素活性を有するタンパク質をコードする核酸分子により、形質転換された細胞。

20

## 【請求項 7】

植物細胞である、請求項5記載の細胞。

## 【請求項 8】

(a) 配列番号：3に示された配列と、高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズし；且つ

(b) C 2 0 脂肪酸<sup>8</sup> - 不飽和化酵素活性を有する蛋白質をコードする；  
単離された核酸分子。

## 【請求項 9】

請求項8記載の核酸分子によってコードされる単離または組換え C 2 0 脂肪酸<sup>8</sup> - 不飽和化酵素。

10

## 【請求項 1 0】

請求項8記載の核酸分子と動作可能的に結合したプロモーター配列を含む、組換え核酸分子。

## 【請求項 1 1】

請求項10記載の組換え核酸分子により形質転換された細胞。

## 【請求項 1 2】

植物、細菌、昆虫、真菌およびヒトを除く哺乳動物からなる群より選択される、請求項11記載の形質転換細胞を含むトランスジェニック生物。

## 【請求項 1 3】

請求項9記載の C 2 0 脂肪酸<sup>8</sup> - 不飽和化酵素と結合する抗体。

20

## 【請求項 1 4】

(a) 配列番号：3に示された核酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有し；且つ

(b) C 2 0 脂肪酸<sup>8</sup> - 不飽和化酵素活性を有する蛋白質をコードする；  
単離された核酸分子。

## 【請求項 1 5】

核酸配列を同定する方法であって、以下の段階を含む方法：

(a) 核酸配列を、配列番号：3に示された配列の全長に高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズさせる段階；および

(b) 核酸配列を、C 2 0 脂肪酸<sup>8</sup> - 不飽和化酵素をコードするものとして同定する段階。

30

## 【請求項 1 6】

請求項15記載の方法によって同定される C 2 0 脂肪酸<sup>8</sup> - 不飽和化酵素をコードする核酸分子。

## 【請求項 1 7】

請求項16記載の核酸分子によってコードされる不飽和化酵素。

## 【請求項 1 8】

請求項17記載の不飽和化酵素と結合する抗体。

## 【請求項 1 9】

段階(a)がPCR反応において行われる、請求項15記載の方法。

## 【請求項 2 0】

段階(a)がライブラリーのスクリーニングの際に行われる、請求項15記載の方法。

40

## 【請求項 2 1】

脂肪酸において2つの炭素間に二重結合を形成する方法であって、以下の段階を含む方法；

脂肪酸を、少なくとも1つの精製された請求項17記載の不飽和化酵素と接触させる段階であって、少なくとも1つの精製された不飽和化酵素が配列番号：3と95%の配列同一性を有する核酸配列と高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする核酸によってコードされる段階；および

不飽和化酵素に2つの炭素間の二重結合を形成させる段階。

## 【請求項 2 2】

50

不飽和化酵素がヒトを除くトランスジェニック生物において発現し、二重結合の形成がインピボで起こる、請求項21記載の方法。

【請求項 2 3】

不飽和化酵素が真核生物および原核生物からなる群より選択される生物において発現する、請求項22記載の方法。

【請求項 2 4】

二重結合の形成がインピトロで起こる、請求項21記載の方法。

【請求項 2 5】

さらに以下のアミノ酸配列からなる群より選択される第2の不飽和化酵素の発現を含む、請求項21記載の方法：

(a) 配列番号：2に示されたアミノ酸配列；および

(b) (a)に規定された配列と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列。

【請求項 2 6】

C 2 0 脂肪酸<sup>8</sup> - 不飽和化酵素活性を有し、かつ配列番号：4と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むが、配列番号：4に示されるアミノ酸配列は含まない、精製されたタンパク質。

【請求項 2 7】

脂肪酸において2つの炭素間に二重結合を形成する方法であって、以下の段階を含む方法；

脂肪酸を、少なくとも1つの精製された不飽和化酵素と接触させる段階であって、少なくとも1つの精製された不飽和化酵素がC 2 0 脂肪酸<sup>8</sup> - 不飽和化酵素活性を有し、配列番号：4と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むが、配列番号：4に示されるアミノ酸配列は含まない段階、；および

不飽和化酵素に2つの炭素間の二重結合を形成させる段階。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

発明の分野

本発明は、食品面で重要な用途をもつ多価不飽和脂肪酸の作製のために用いられうる不飽和化酵素に関する。

【0 0 0 2】

背景

脂肪酸は生体システムの基本的な構成要素である。植物、動物および原生生物にも同様に共通して、それらは細胞膜の主要な構成要素である。

【0 0 0 3】

炭素20個を有し、炭化水素鎖の方向に沿って複数の炭素-炭素不飽和結合がある脂肪酸は特に重要であることが知られている。アラキドン酸(20:4)(Heinz、「植物における脂質代謝(Lipid Metabolism in Plants)」、pp.33~89、1993；Yamazakiら、Biochim Biophys. Acta 1123:18~26、1992；Ulsamerら、J. Cell Biol. 43:105~114、1969；およびAlbertら、Lipids 14:498~500、1979)、および一般にEPAと呼ばれているエイコサペンタエン酸(20:5)(Heinz、「植物における脂質代謝(Lipid Metabolism in Plants)」、pp.33~89、1993；Yamazakiら、Biochim. Biophys. Acta 1123:18~26、1992；Ulsamerら、J. Cell Biol. 43:105~114、1969；Albertら、Lipids 14:498~500、1979；およびCookら、J. Lipid Res. 32:1265~1273、1991)は哺乳動物細胞膜の重要な構成要素であり、またプロスタグランジンを含むシグナル分子の前駆体でもある。脳(Naughton、J. Biochem. 13:21~32、1981)、精巣(WilderおよびConiglio、Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 177:399~405、1984)および網膜(Aveldano de Caldironiら、Prog. Lipid Res. 20:49~57、1981)などのある種の特殊化した哺乳動物の組織では、不飽和脂肪酸が特に豊富である。

【0 0 0 4】

アラキドン酸およびエイコサペンタエン酸はいずれも、C 2 2 (22-carbon) 多価不飽和脂

10

20

30

40

50

脂肪酸の合成のための前駆体として、およびジホモ- $\gamma$ -リノール酸(20:3)(Yamazakiら、Biochim. Biophys. Acta 1123:18~26、1992; Ulsamerら、J. Cell Biol. 43:105~114、1969; およびAlbertら、Lipids 14:498~500、1979)とともに、エイコサノイド代謝調節因子の合成のための前駆体としての役割を果たす(Hwang、「食物中の脂肪酸およびその健康への影響(Fatty Acids in Foods and Their Health Implications)」、545~557、1992)。C20脂肪酸の合成において重要な酵素は不飽和化酵素であり、これは脂肪酸炭化水素鎖の方向に沿った特定の位置で2つの水素原子を除去することによって、シス二重結合を導入する。不飽和化酵素は、標的脂肪酸にすでに存在する二重結合の位置、数および立体化学に特異的である(Heinz、「植物における脂質代謝(Lipid Metabolism in Plants)」、33~89、1993)。

10

#### 【0005】

C20多価不飽和脂肪酸を合成するために、哺乳動物は、必須脂肪酸18:2(Brenner、「ヒトの栄養における脂肪の役割(The Role of Fats in Human Nutrition)」、pp.45~79、1989)および18:3(Nelson、「食物中の脂肪酸およびその健康への影響(Fatty Acids in Foods and Their Health Implications)」、pp.437~471、1992; Brenner、「ヒトの栄養における脂肪の役割(The Role of Fats in Human Nutrition)」、pp.45~79、1989; およびHulanickaら、J. Biol. Chem. 239:2778~2787、1964)を食物から得なければならない(Nelson、「食物中の脂肪酸およびその健康への影響(Fatty Acids in Foods and Their Health Implications)」、437~471、1992)。これらの食物性多価不飽和脂肪酸は、小胞体内で、交互の位置特異的不飽和化およびマロニル-CoA依存性連鎖伸長段階の連続(図1A)によって代謝され、その結果、特徴的なメチレン断続性二重結合パターンが生じる。ヒト脂質代謝の主要臓器である肝臓において、C20脂肪酸生合成における第一段階は必須脂肪酸の<sup>6</sup>位での不飽和化である。不飽和化産物は伸長され20:3および20:4となる(Cookら、J. Lipid Res. 32:1265~1273、1991)。次に、これらのC20産物は<sup>5</sup>-不飽和化酵素によって不飽和化され、アラキドン酸およびエイコサペンタエン酸を産生する。<sup>6</sup>-不飽和化段階は該代謝経路における律速段階であり(BernetおよびSprecher、Biochim. Biophys. Acta 398:354~363、1975; ならびにYamazakiら、Biochim. Biophys. Acta 1123:18~26、1992)、また、驚くまでもなく、食事およびホルモンの変化による調節を受ける(Brenner、「ヒトの栄養における脂肪の役割(The Role of Fats in Human Nutrition)」、pp.45~79、1989)。

20

30

#### 【0006】

肝臓とは異なり、少数の生物および組織においてC20多価不飽和脂肪酸の生合成のための代替経路が示されている(図1B)。代替経路における第一段階は不飽和化ではなく、必須C18脂肪酸のC20鎖長への伸長であり、これにより20:2(Ulsamerら、J. Cell Biol. 43:105~114、1969; およびAlbertら、Lipids 14:498~500、1979)および20:3が生じる。続いて、<sup>8</sup>-不飽和化酵素を介した不飽和化が起こる(図1)。この伸長-不飽和化の産物である20:3および20:4は、より一般的な不飽和化-伸長経路のものと同一である。

<sup>8</sup>経路は土壌アメーバのアカントアメーバ属(Acanthamoeba sp.)(Ulsamerら、J. Cell Biol. 43:105~114、1969)およびユーグレナ属(Euglenoid sp.)に存在しており、C20多価不飽和脂肪酸の形成のための主要経路となっている(Hulanickaら、Journal of Biological Chemistry 239:2778~2787、1964)。

40

#### 【0007】

この<sup>8</sup>-不飽和化経路は哺乳類に存在し、ラット精巣(AlbertおよびConiglio、Biochim. Biophys. Acta 489:390~396、1977)およびヒト精巣(Albertら、Lipids 14:498~500、1979)の両方に存在する。<sup>8</sup>活性は、乳癌細胞株(Grammatikosら、Br. J. Cancer 70:219~227、1994; およびBardonら、Cancer Lett. 99:51~58、1996)およびグリオーマ(Cookら、J. Lipid Res. 32:1265~1273、1991)においてみられるが、対応する非癌性の乳腺細胞株(Grammatikosら、Br. J. Cancer 70:219~227、1994)または脳(DhopeswarkarおよびSubramanian、J. Neurochem. 36:1175~1179、1976)においては

<sup>8</sup>活性は検出されない。組織内の脂肪酸基質の競合性<sup>6</sup>反応および連鎖短縮性逆転換

50

(retroconversion)の存在により、哺乳動物の器官系における不飽和化酵素活性の分析がしばしば複雑化されるため(SprecherおよびLee、Biochim. Biophys. Acta 388:113~125、1975; Geigerら、Biochim. Biophys. Acta 1170:137~142、1993)に、正常細胞または癌細胞の代謝に対する<sup>8</sup>-不飽和化の意義は明確でない。

【0008】

上記に概述した理由のために、多価不飽和C20脂肪酸はヒトの食事において重要であり、このような脂肪酸を、乳児食、乳児用調整乳(baby formula)、栄養補助食品および機能性栄養補助製剤(nutriceutical formulation)に取り入れることに対する近年の関心は相当なものである。

【0009】

このため、多価不飽和C20脂肪酸の産生能力が増強された新規のトランスジェニック植物およびトランスジェニック動物を産生することは望ましいと考えられる。

【0010】

#### 開示の概要

本発明は、C20多価不飽和脂肪酸を産生するために、クローニングされることができ、植物を含む種々の生物の細胞内で発現させることができる、新規の<sup>5</sup>-不飽和化酵素(図6A)および<sup>8</sup>-不飽和化酵素(図7A)を提供する。このような脂肪酸の発現は、このような生物の栄養品質を向上させる。例えば、脂肪種子植物は、本発明の<sup>5</sup>-不飽和化酵素および<sup>8</sup>-不飽和化酵素を組み入れるように操作されうる。このような脂肪種子植物は、20:3、20:4、20:5、22:4および22:5多価不飽和脂肪酸に富む種子油を生じると考えられた。このような脂肪酸は、乳児用調整乳、全ての種類の食品、栄養補助食品、機能性栄養補助製剤および薬学的製剤に、有用に組み入れられることが可能であった。

【0011】

本発明はまた、1つまたは複数の保存的アミノ酸置換がある点で、図6Aおよび図7Aの蛋白質とは異なる蛋白質も提供する。図6Aおよび図7Aの蛋白質と「実質的な類似性(substantial similarity)」(「定義」の項で定義される)を示す蛋白質もまた提供される。

【0012】

本発明は、上述の蛋白質をコードする、単離された新規核酸、該核酸および細胞を含む組換え核酸、ならびに該組換え核酸を含む植物および生物を提供する。

【0013】

20:3、20:4、20:5、22:4および22:5脂肪酸などの多価不飽和脂肪酸を産生するために、例えば代謝経路において、新規<sup>5</sup>-不飽和化酵素および<sup>8</sup>-不飽和化酵素を個別に用いることもでき、または互いに組み合わせ用いることもできる。

【0014】

本発明の範囲にはまた、新規<sup>5</sup>-不飽和化酵素および<sup>8</sup>-不飽和化酵素をコードする核酸の部分、該新規酵素と実質的に類似したポリペプチドをコードする核酸の部分、ならびに、図6Aおよび図7Aの蛋白質とは1つまたは複数の保存的アミノ酸置換という点で異なるポリペプチドをコードする、核酸の部分も含まれる。核酸のこのような部分は、例えば、研究および診断目的のためのプライマーおよびプローブとして用いられうる。このようなプローブおよびプライマーの研究的使用には、ヒトを含む他の生物における、関連した<sup>5</sup>-不飽和化酵素および<sup>8</sup>-不飽和化酵素の同定およびクローニングが含まれる。

【0015】

本発明にはまた、本発明の<sup>5</sup>-不飽和化酵素および/または<sup>8</sup>-不飽和化酵素を利用する方法も含まれる。この態様の一例は、本発明の一方または両方の不飽和化酵素の遺伝子を有し、該不飽和化酵素の特徴によって、アラキドン酸および/もしくはEPAを産生する酵母または植物細胞である。

【0016】

#### 配列表

添付する配列表に挙げた核酸配列およびアミノ酸配列は、ヌクレオチド塩基については標準的な略記文字、アミノ酸については三文字コードを用いて示している。それぞれの核酸

10

20

30

40

50

配列の一方の鎖のみを示しているが、相補鎖は、表示した鎖の任意の参照に含まれるものと解釈される。

配列番号：1は、センチュウ (*Caenorhabditis elegans*) 由来の脂肪酸<sup>5</sup>-不飽和化酵素のオープンリーディングフレームに対応するヌクレオチド配列である。

配列番号：2は、センチュウ由来の脂肪酸<sup>5</sup>-不飽和化酵素の一次アミノ酸配列である。

配列番号：3は、原生生物ミドリムシ (*Euglena gracilis*) 由来の脂肪酸<sup>8</sup>-不飽和化酵素のオープンリーディングフレームに対応するヌクレオチド配列である。

配列番号：4は、原生生物ミドリムシ由来の脂肪酸<sup>8</sup>-不飽和化酵素の一次アミノ酸配列である。

配列番号：5～配列番号：8は、<sup>8</sup>-不飽和化酵素をコードする核酸配列の増幅およびクローニングに用いたプライマーである。

配列番号：9は、ポリアデニル化シグナルである。

配列番号：10は、<sup>5</sup>-不飽和化酵素をコードする核酸配列の増幅およびクローニングに用いたプライマーである。

配列番号：11は、短いRNAリーダー配列である。

配列番号：12は、ヒスチジンボックスモチーフのアミノ酸配列である。

配列番号：13は、ヒスチジンボックスモチーフのアミノ酸配列である。

#### 【0017】

##### 発明の説明

以下の定義および方法は、本発明をより良く定義するため、および当業者を本発明の実践に向けて導くために提供される。特に言及する場合を除き、用語は関連する技術分野の当業者による従来の用法に従って理解されるものとする。分子生物学における一般的用語の定義は、リーガー (Rieger) ら、「遺伝学用語集：古典的および分子的 (Glossary of Genetics: Classical and Molecular)」、第5版、Springer-Verlag: New York、1991；ならびにレビン (Lewin)、「遺伝子VI (Genes VI)」、Oxford University Press: New York、1997に見出される。37 C.F.R. § 1.822に記載されたようなDNA塩基の命名法を用いる。アミノ酸残基については標準的な一文字命名法および三文字命名法を用いる。

#### 【0018】

##### 定義

部分 (portion)：核酸分子の部分とは、該分子の配列に対応する一続きの連続した核酸であり、長さは約15ヌクレオチド、20ヌクレオチド、30ヌクレオチド、40ヌクレオチド、50ヌクレオチドまたは60ヌクレオチドでありうる。このようなヌクレオチド部分はプロンプまたはプライマーとして用いられうる。蛋白質の部分とは、該蛋白質のアミノ酸配列に対応する一続きの連続したアミノ酸であり、長さは約5残基、10残基、20残基、30残基、40残基または50残基でありうる。本明細書で用いる場合、このような部分は、核酸分子の任意の区間に対応してよく、例えばこのような部分は図6Bに示された配列の1ヌクレオチド～500ヌクレオチド、501ヌクレオチド～1000ヌクレオチドもしくは1001ヌクレオチド～1451ヌクレオチド、または図7Bに示された配列の1ヌクレオチド～400ヌクレオチド、401ヌクレオチド～800ヌクレオチド、801ヌクレオチド～1251ヌクレオチドからなる区間に対応しうる。

#### 【0019】

不飽和化酵素：不飽和化酵素とは、炭化水素分子における炭素-炭素二重結合の形成を促進する酵素である。

#### 【0020】

酵素を含む調製物を、適当な形態の基質脂肪酸と共にインキュベートし、該基質の、予想される脂肪酸産物への転換を分析するアッセイ法によって、不飽和化酵素の活性が示されうる。または、不飽和化酵素蛋白質をコードするように計画されたDNA配列に適したベクター構築物に組み入れることができ、それによって、特定の脂肪酸基質を不飽和化する能力を通常は持たない種類の細胞内で発現させることができる。その後、不飽和化酵素をコードするDNA配列を含むベクターにより形質転換された細胞および適当な対照細胞 (例え

10

20

30

40

50

ば、空ベクターのみにより形質転換されたもの)に、適当な形態の基質脂肪酸を供給することにより、該DNA配列によってコードされる不飽和化酵素の活性を示すことができる。このような実験では、予想される脂肪酸産物が、不飽和化酵素をコードするDNA配列を含む細胞内では検出され対照細胞では検出されないことにより、不飽和化酵素活性が立証される。この種のアッセイ法の例は、例えば、リー (Lee) ら、Science 280 : 915 ~ 918、1998 ; ネイピア (Napier) ら、Biochem. J. 330 : 611 ~ 614、1998 ; およびミカエルソン (Michaelson) ら、J. Biol. Chem. 273 : 19055 ~ 19059、1998に記載されており、これらは参照として本明細書に組み入れられる。

#### 【0021】

<sup>5</sup>-不飽和化酵素活性は、例えば、20:3<sup>8, 11, 14</sup>を基質として用い、20:4<sup>5, 8, 11, 14</sup>を産物として検出する技法により、アッセイされうる (Michaelsonら、J. Biol. Chem. 273 : 19005 ~ 19059、1998)。<sup>5</sup>活性アッセイ法における使用のための潜在的な他の基質には、これらに限定されないが、10:2<sup>11, 14</sup> (20:5<sup>5, 11, 14</sup>を産物として生じる) および20:3<sup>11, 14, 17</sup> (20:4<sup>5, 11, 14, 17</sup>が産物として生じる) が含まれる。

#### 【0022】

<sup>8</sup>-不飽和化酵素は、例えば、20:3<sup>11, 14, 17</sup>を基質として用い、20:4<sup>8, 11, 14, 17</sup>を産物として検出する同様の技法によってアッセイされうる。

#### 【0023】

ORF : オープンリーディングフレーム。ORFとは、アミノ酸をコードする連続した一連のヌクレオチドトリプレットである。通常、これらの配列はペプチドに翻訳されうる。

#### 【0024】

ホモログ : 共通の祖先配列を有し、該祖先配列を有する種が2つの種に分かれた際に分岐した、2つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列。ホモログはしばしば、かなりの程度の配列同一性を示す。

#### 【0025】

形質転換された (transformed) : 形質転換細胞とは、分子生物学の技法によって核酸分子が内部に導入された細胞である。この用語は、核酸分子をこのような細胞に導入しうる、ウイルスベクターによるトランスフェクション、プラスミドベクターによる形質転換、ならびにエレクトロポレーション、リポフェクションおよびパーティクルガン加速による裸の (naked) DNAの導入を含む、すべての技法を含む。

#### 【0026】

精製された (purified) : 精製されたという用語は、絶対的な純度を必要とはせず、むしろ相対的な用語として意図されている。このため、例えば、精製された蛋白質調製物とは、対象蛋白質または他の基質において、細胞内の自然環境下よりも純粋な蛋白質調製物である。一般に、蛋白質調製物は、該蛋白質が調製物の総蛋白質含有量の少なくとも50%を占めるように精製される。

#### 【0027】

動作可能に結合した (operably linked) : 第1の核酸配列が第2の核酸配列と機能的に関係して位置している場合に、第1の核酸配列は第2の核酸配列と動作可能に結合している。例えば、プロモーターがコード配列の転写または発現に影響を及ぼす場合には、該プロモーターは該コード配列と動作可能に結合している。一般に、動作可能に結合したDNA配列は隣接しており、2つの蛋白質のコード領域を連結する必要がある場合には、同じ読みとり枠内に存在する。イントロンが存在する場合には、動作可能に結合したDNA配列は隣接しなくてもよい。

#### 【0028】

細胞 : 植物、動物、原生生物、細菌または真菌の細胞。

#### 【0029】

配列類似性 : 2つの核酸または2つのアミノ酸の間の類似性は、配列同一率によって示される。2つの配列間で配列同一率が高いほど、2つの配列の類似性は高い。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 3 0 】

蛋白質の整列化の場合には、類似性は同一率によってだけでなく、保存的アミノ酸置換も考慮に入れて計測される。一般に、このような保存的置換では置換された残基の疎水性および酸性度が保持され、したがって折りたたまれた蛋白質の構造（およびその結果機能も）が保持される。蛋白質の類似性を算出するために用いたコンピュータプログラムでは標準化アルゴリズムを用いており、標準化された状況で用いた場合には、蛋白質の異なる対の間の類似性の、意味のある比較が可能である。

## 【 0 0 3 1 】

アラインメント中のギャップを許可して配列の整列化を行い、コンピュータ化アルゴリズムを用いて、同一性のある領域を定量化する。一般に、ギャップ許容度および他の変数の設定にはコンピュータプログラム中のデフォルトパラメーターを用いる。

10

## 【 0 0 3 2 】

比較のための配列の整列化の方法は当技術分野では周知である。種々のプログラムおよび整列化アルゴリズムが、ピアソン (Pearson) ら、Methods in Molecular Biology 24 : 307 ~ 331、1994およびアルチュール (Altschul) ら、Nature Genet. 6 : 119 ~ 129、1994により記載されている。アルチュール (Altschul) らは、配列の整列化法および相同性算出の詳細な考察を示した。

## 【 0 0 3 3 】

NCBIの基本的局所整列化検索ツール (Basic Local Alignment Search Tool) (BLAST (登録商標)) (Altschulら、J. Mol. Biol. 215 : 403 ~ 410、1990) は、米国国立バイオテクノロジー情報センター (National Center for Biotechnology Information) (NCBI、Bethesda, MD) を含むいくつかの入手元およびインターネット上から入手可能であり、配列解析プログラムblastp、blastn、blastx、tblastnおよびtblastxと関係して用いられる。BLAST (登録商標) には<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>においてアクセス可能である。このプログラムを用いて配列同一性を決定する方法の説明はウェブサイトで行うことができる。本明細書中で用いられるように、配列同一性は一般に、デフォルトパラメーターを設定されたBLAST (登録商標) ソフトウェアを用いて決定される。例えば、2つの核酸配列間の配列同一性を決定するために、デフォルトパラメーター (期待値 (expect) = 10、行列 (matrix) = BLOSUM62、フィルター (filter) = DUST (TatusovおよびLipmann、1999年12月1日時点で出版準備中；ならびにHancockおよびArmstrong、Comput. Appl. Biosci. 10 : 67 ~ 70、1994)、ギャップ存在コスト (gap existence cost) = 11、1残基当たりのギャップコスト (per residue gap cost) = 1、およびラムダ比 (lambda ratio) = 0.85) を用いたblastn (バージョン2.0) ソフトウェアを使用することができる。2つのポリペプチドの比較のためには、デフォルトパラメーター (期待値 = 10、フィルター = SEG (WoottonおよびFederhen、Computers in Chemistry 17 : 149 ~ 163、1993)、行列 = BLOSUM62、ギャップ存在コスト = 11、1残基当たりのギャップコスト = 1、ラムダ比 = 0.85) によるblastp (バージョン2.0) ソフトウェアが用いられる。

20

30

## 【 0 0 3 4 】

短いペプチド (ほぼ30アミノ酸未満) の整列化を行う場合には、デフォルトパラメーター (オープンギャップペナルティー9、エクステンションギャップペナルティー1) に設定したPAM30行列セットを用いたBlast 2配列機能を用いて、整列化を行わねばならない。

40

## 【 0 0 3 5 】

代替整列化ツールの一つに、バイオロジーワークベンチ (Biology Workbench) (<http://biology.ncsa.uiuc.edu>) から入手可能なALIGNグローバル最適整列化ツール (Global Optimal Alignment tool) (バージョン3.0) がある。このツールを、2つの既知の配列を整列化するために、デフォルトパラメーターに設定された設定値と共に用いることができる。このツールに関する参考文献には、マイヤース (Meyers) およびミラー (Miller)、CA BIOS 4 : 11 ~ 17、1989が含まれる。

## 【 0 0 3 6 】

保存的アミノ酸置換とは、起こった場合に元の蛋白質の特性をほとんど妨げないような置

50



換、すなわち蛋白質の構造および特に機能が保存されており、該置換によって著しく変化しないような置換のことである。以下の表には、蛋白質中の元のアミノ酸と置換されることができ、それが保存的置換とみなされるようなアミノ酸を示している。

【表 1】

本来の残基	保存的置換
ala	ser
arg	lys
asn	gln; his
asp	glu
cys	ser
gln	asn
glu	asp
gly	pro
his	asn; gln
ile	leu; val
leu	ile; val
lys	arg; gln; glu
met	leu; ile
phe	met; leu; tyr
ser	thr
thr	ser
trp	tyr
tyr	trp; phe
val	ile; leu

10

20

## 【0037】

保存的置換では一般に、(a) 置換領域におけるポリペプチド骨格の構造、例えばシート状もしくはヘリックス状のコンフォメーション；(b) 標的部位における分子の電荷もしくは疎水性；または(c) 側鎖の容積(bulk)が維持される。

30

## 【0038】

蛋白質の特性に重大な変化をもたらすと一般に予想される置換、例えば(a) セリルもしくはトレオニルなどの親水性残基によって、ロイシル、イソロイシル、フェニルアラニル、バリルもしくはアラニルなどの疎水性残基が置換される(またはその逆)、(b) システインもしくはプロリンによって任意の他の残基が置換される(またはその逆)、(c) リシル、アルギニルもしくはヒスチジルなどの陽性荷電側鎖を有する残基によって、グルタミルもしくはアスパルチルなどの陰性荷電側鎖が置換される(またはその逆)、または(d) フェニルアラニンなど容積の大きい側鎖を有する残基によってグリシンなどの側鎖を持たない残基が置換される(またはその逆)などの場合における変化は、非保存的であると考えられる。

40

## 【0039】

プローブ：検出可能な標識またはレポーター分子が結合した、単離された核酸。典型的な標識には放射性同位元素、リガンド、化学発光剤および酵素が含まれる。

## 【0040】

プライマー：核酸ハイブリダイゼーションによって相補的な標的DNA鎖とアニーリングしてプライマーと標的DNA鎖とのハイブリッドを形成することができ、続いてDNAポリメラーゼによって標的DNA鎖に沿って伸長できる短い核酸、好ましくは10ヌクレオチドまたはそれ以上の長さのDNA オリゴヌクレオチド。プライマー対は、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)または当技術分野において公知の他の核酸増幅法による、核酸配列の増幅に用

50

いることができる。

【0041】

本発明に用いるプローブおよびプライマーは通常、少なくとも15個の連続したヌクレオチドを含む。特異性を増大するために、開示された核酸配列の少なくとも20個、30個、40個、50個、60個、70個、80個、90個、100個または150個の連続したヌクレオチドを含むプローブおよびプライマーのように、さらに長いプローブおよびプライマーが用いられうる。

【0042】

または、このようなプローブおよびプライマーは、開示された配列の1つと規定レベルの配列同一性を有する、例えば、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%または95%の配列同一性を有する、少なくとも15個、20個、30個、40個、50個、60個、70個、80個、90個、100個または150個の連続したヌクレオチドを含んでもよい。

【0043】

または、このようなプローブおよびプライマーは、以下に提示するような、特定の条件下でハイブリダイズし、特定の洗浄条件下でハイブリダイズし続けるヌクレオチド分子であってもよい。これらの条件を、不飽和化酵素の変異体を同定するために用いることができる。不飽和化酵素のcDNAおよび遺伝子配列由来の核酸分子には、開示された不飽和化酵素の核酸分子またはその断片と、種々の条件下でハイブリダイズする分子が含まれる。一般にハイブリダイゼーション条件は、例えば、極めて高いストリンジェンシー、高ストリンジェンシーおよび低ストリンジェンシーといった型に分類される。長さが約600塩基対またはそれ以上のプローブのための条件を、3つの対応する型別に提供する。

【表12-1】

極めて高いストリンジェンシー（配列同一性が90%の配列を検出）

ハイブリダイゼーション	SSC中で	65°Cにおいて	16時間
2回洗浄	SSC中で	室温において	各15分間
2回洗浄	SSC中で	65°Cにおいて	各20分間

【表12-2】

高ストリンジェンシー（配列同一性が80%またはそれ以上の配列を検出）

ハイブリダイゼーション	SSC中で	65°C～70°C において	16～20時間
2回洗浄	SSC中で	室温において	各5～20分間
2回洗浄	SSC中で	65°C～55°C において	各30分間

【表12-3】

低ストリンジェンシー（配列同一性が50%を上回る配列を検出）

ハイブリダイゼーション	SSC中で	室温～55°C において	16～20時間
少なくとも2回洗浄	SSC中で	室温～55°C において	各20～30分間

【0044】

プローブおよびプライマーの調製および使用のための方法は、例えば、サムブルック（Sambrook）ら、「分子クローニング：実験室マニュアル（Molecular Cloning: A Laboratory Manual）」、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、NY、1989；アウスユーベル（Ausubel）ら、「分子生物学における最新プロトコール（Current Protocols in Mole

cular Biology)」、Greene Publishing Associates and Wiley-Intersciences、1987；およびイニス (Innis) ら、「PCRプロトコール、方法および応用の手引き (PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications)」、Academic Press, Inc., San Diego, California、1990などの参照に記載されている。例えば、Primer (バージョン0.5、1991、Whitehead Institute for Biomedical Research、Cambridge、MA) などのその目的のためのコンピュータプログラムを用いることによって、PCRプライマー対を既知の配列から得ることができる。

【0045】

組換え核酸：天然に存在しない配列、または隔たった2つの異なる区間の人為的組み合わせによって作製される配列を有する配列。この人為的組み合わせはしばしば化学的合成によって、またはより一般的には、例えばサムブルック (Sambrook) ら、「分子クローニング：実験室マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、NY、1989に記載されたものなどの遺伝子操作技法による、核酸分子の単離された区間の人為的操作によって行われる。組換えという用語には、単に核酸の一部の付加、置換または欠失のみによって改変された核酸も含まれる。

10

【0046】

天然の (native)：「天然の」という用語は、天然に存在する (「野生型」) 核酸またはポリペプチドを指す。天然の核酸または蛋白質は、天然に存在する特定の生物から物理的に採取してもよく、天然に存在する核酸または蛋白質と同一な、人工的に構築された核酸もしくは蛋白質でもよい。

20

【0047】

単離された (isolated)：「単離された」核酸とは、該核酸が天然に存在する生物の細胞内の他の核酸配列、すなわち、他の染色体DNAおよび染色体RNA、ならびに染色体外DNAおよび染色体外RNAから、従来の核酸精製法によって実質的に分離または精製されたものである。この用語にはまた、組換え核酸および化学合成された核酸も含まれる。

【0048】

植物 (plant)：「植物」という用語には、単子葉植物 (例えば、トウモロコシ、イネ、コムギ、オオムギ、ナタネ、ダイズ、ヒマワリなど)、双子葉植物 (例えば、ジャガイモ、トマトなど) を含む任意の高等植物およびその子孫が含まれ、さらに種子、果実、塊茎などを含む植物の部分も含まれる。

30

【0049】

本発明は本明細書中の実施例を参照することによってさらに良く理解され则认为られる。しかし、本発明の範囲がそれに制限されるとみなされるべきではない。

【0050】

発明の説明および一般的方法

本発明では、別に明記する場合を除き、核酸のクローニング、操作およびシーケンシング、蛋白質の精製および分析、ならびに他の分子生物学的技法および生化学的技法に関して標準的な実験方法を用いる。このような技法は、サムブルック (Sambrook) ら、「分子クローニング：実験室マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、NY、1989；およびアウスコーベル (Ausubel) ら、「分子生物学における最新プロトコール (Current Protocols in Molecular Biology)」、Green and Wiley Interscience、NY、1987などの標準的な実験マニュアルにおいて詳細に説明されている。

40

【0051】

本発明者らは、共に多価不飽和脂肪酸を産生するために用いられうる、原生生物ミドリムシ (*Euglena gracilis*) 由来の新規な脂肪酸<sup>8</sup>-不飽和化酵素、およびセンチュウ (*Caenorhabditis elegans*) 由来の新規な脂肪酸<sup>5</sup>-不飽和化酵素の同定、クローニングおよび発現を行った。

【0052】

本発明は、精製された新規<sup>5</sup>蛋白質および<sup>8</sup>蛋白質 (それぞれ図6Aおよび図7A) を提

50

供する。また、本発明は、1つまたは複数の保存的アミノ酸置換の点で図6Aおよび図7Aの蛋白質とは異なる蛋白質、ならびに図6Aおよび図7Aの蛋白質と「実質的な類似性」を示す蛋白質も提供する。実質的な類似性は「定義」の項で定義される。本発明の蛋白質には、図6Aおよび図7Aに示した蛋白質と少なくとも50%のアミノ酸類似性を示す蛋白質が含まれる。「50%のアミノ酸類似性」という用語は、デフォルトパラメーターに設定されたblastp配列解析ソフトウェアを用いることによって客観的に、一貫して定義される。本発明の蛋白質には、blastpをデフォルトパラメーターで用いて（図6Aまたは図7Aの配列と）少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%および少なくとも95%の類似性を示す蛋白質も含まれる。

【0053】

本発明は、前述の蛋白質をコードする単離された新規核酸、該核酸を含む組換え核酸、および該組換え核酸を含む細胞を提供する。したがって、本発明の核酸には、以下をコードする核酸が含まれる：

（1）図6Aおよび図7Aに示されたアミノ酸配列；（2）1つまたは複数の保存的アミノ酸置換の点で図6Aおよび図7Aに示された配列とは異なるアミノ酸配列；ならびに（3）図6および図7Aの配列と（デフォルトパラメーターのblastpによる計測により）少なくとも50%の類似性を示すアミノ酸配列。

【0054】

本発明の核酸には、図6Bおよび図7Bに示された核酸と少なくとも「50%の類似性」を示す核酸も含まれる。「50%の類似性」という用語は、デフォルトパラメーターに設定されたblastnソフトウェアの使用により客観的に定義される。本発明の核酸にはまた、blastnをデフォルトパラメーターで用いて（図6Bおよび図7Bの配列と）少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%および少なくとも95%の類似性を示す配列も含まれる。

【0055】

例えば代謝経路において20:3脂肪酸および20:4脂肪酸などの多価不飽和脂肪酸を産生させるために、新規<sup>5</sup>-不飽和化酵素および<sup>8</sup>-不飽和化酵素を個別に用いることもでき、または互いに組み合わせて用いることもできる。図1Bは、このような代謝経路の一例を示している。適切な発現系を用いることにより、任意の細胞内でこのような経路を操作することができる。このような要素を提供する簡単なやり方の一つは、以下で詳細に考察される、市販の発現系を用いるものである。

【0056】

本発明の範囲には、新規<sup>5</sup>-不飽和化酵素および<sup>8</sup>-不飽和化酵素（ならびにこのような酵素に実質的に類似した誘導体）をコードする核酸全体のみでなく、このような核酸の「部分」（本明細書の「定義」の項に定義されている）も含まれる。このような、請求された部分は、それらが図6Bおよび図7Bのヌクレオチドの同様の大きさの部分と一定程度の類似性を有することにより同定され、長さは約15個、20個、30個、40個または50個の連続したヌクレオチドであってよい。類似性は、米国国立バイオテクノロジー情報センター（National Center for Biotechnology Information）（NCBI、Bethesda, MD）およびインターネットの<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>から入手されうる「blastn」および「blastp」ソフトウェアなどの配列比較ソフトウェアによって客観的に計測される。請求された核酸の部分と、図6Bおよび図7Bの核酸配列の同様の大きさの部分との類似性は、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%でよく、98%でもよい。核酸のこのような部分は、例えば、研究目的および診断目的のプライマーおよびプローブとして用いられうる。図6Bまたは図7Bに示された配列の任意の領域、例えば図中で番号が振られた100個の核酸の第1、第2、第3の群などから、核酸の部分を選択してもよい。

【0057】

例えば組換え核酸は、前述の通り、例えば蛋白質を発現するように設計されたクローンの一部としてのプロモーターなど、別の核酸要素と動作可能に結合した、開示された核酸の全体または一部を含みうる。このような目的のためのクローニング系および発現系は市

10

20

30

40

50

販されている。

【0058】

蛋白質の発現および精製のために種々の酵母株および酵母由来ベクターが一般的に用いられており、例えば、ピヒア・パストリス (*Pichia pastoris*) 発現系はインビトロゲン (Invitrogen) 社 (Carlsbad, CA) から入手可能である。このような系は、適当なピヒア・パストリス株、ベクター、試薬、シークエンシング用プライマーおよび培地を含む。サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) における蛋白質発現のための同様の系もまたインビトロゲン社から入手可能であり、これにはベクター、試薬および培地が含まれる。例えば、ヌクレオチド配列 (例えば、本発明の<sup>5</sup>-不飽和化酵素または<sup>8</sup>-不飽和化酵素をコードする遺伝子) を酵母発現ベクターpYES2中にクローニングし、ガラクトース誘導性プロモーター (GAL1) などの誘導性プロモーターの制御下で発現させることができる。

10

【0059】

本発明の不飽和化酵素の発現のために非酵母の真核生物ベクターもまた用いられうる。このような系の例は、公知のパキユロウイルス系、遺伝子発現の制御を可能にするためにキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) 由来の調節因子を用いるエクジソン誘導性哺乳動物発現系、および種々の哺乳動物細胞系における高レベルの発現を可能にするシンドビスウイルス発現系がある。これらの発現系もまたインビトロゲン (Invitrogen) 社から入手可能である。

【0060】

20

例えば、サムブルック (Sambrook) ら、1989に記載されたpBR322、pUC18またはpUC19などの、標準的な原核生物クローニングベクターもまた用いられうる。本発明の不飽和化酵素をコードする核酸をこのようなベクター中にクローニングし、続いて大腸菌 (*E. coli*) などの細菌をこれで形質転換し、関心対象の蛋白質を発現させるためにそれを培養することができる。他の原核生物発現系には、例えば、厳密に制御された発現調節を可能にするアラビノース誘導性pBAD発現系、組換え蛋白質の迅速精製を容易にするIPTG誘導性pRSET系、および真核生物遺伝子の最適な翻訳のために構築されたIPTG誘導性pSE402系が含まれる。これらの3つの系はインビトロゲン (Invitrogen) 社から市販されており、製造者の指示に従って用いられれば、蛋白質の定常的な発現および精製が可能になる。

【0061】

30

または、本発明には特に重要であるが、植物発現系を用いることができた。植物発現系は市販されている。本発明の関心対象の遺伝子をベクター中にクローニングでき、その構築物を植物細胞の形質転換に用いることができる。例えば、パウエルズ (Pouwels) ら、「クローニングベクター：実験室マニュアル (Cloning Vectors: A Laboratory Manual)」、1985、補遺 (supp)、1987；ワイ斯巴ハ (Weissbach) およびワイ斯巴ハ (Weissbach)、「植物分子生物学の方法 (Methods for Plant Molecular Biology)」、Academic Press、1989；ならびにゲルビン (Gelvin) ら、「植物分子生物学マニュアル (Plant Molecular Biology Manual)」、Kluwer Academic Publishers、1990に記載されたものを含む、植物細胞の安定的形質転換および/またはトランスジェニック植物の確立のために適した任意の周知のベクターを用いることができる。このような植物発現ベクターは、発現制御配列 (例えば、誘導性もしくは構成性の、環境的もしくは発生的な調節を受ける、または細胞特異的な発現制御配列もしくは組織特異的な発現制御配列) を含むことができる。

40

【0062】

植物内での不飽和化酵素の発現に有用な構成性植物プロモーターの例には、これらに限定されないが、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35Sプロモーター (例えば、Odelら、Nature 313: 810、1985；Dekeyserら、Plant Cell 2: 591、1990；ならびにTeradaおよびShimamoto、Mol. Gen. Genet. 220: 389、1990を参照)、ノパリンシンターゼプロモーター (Anら、Plant Physiol. 88: 547、1988) およびオクトピンシンターゼプロモーター (Frommら、Plant Cell 1: 977、1989) が含まれる。

【0063】

50

環境的、ホルモンの、化学的および/または発生的なシグナルに応じて調節される種々の植物遺伝子プロモーターもまた植物細胞における蛋白質発現のために用いることができ、これには、以下によって調節されるプロモーターが含まれる：(1) 熱 (Callisら、Plant Physiol. 88 : 965、1988) ; (2) 光 (例えば、エンドウマメ rbcS-3Aプロモーター、Kuhlemeierら、Plant Cell 1 : 471、1989 ; トウモロコシ rbcSプロモーター、SchaffnerおよびSheen、Plant Cell 3 : 997、1991 ; または葉緑素a/b結合蛋白質プロモーター、Simpsonら、EMBO J. 4 : 2723、1985) ; (3) アブシジン酸 (Marcotteら、Plant Cell 1 : 969、1989) などのホルモン ; (4) 損傷 (例えば、wun1、Siebertzら、Plant Cell 1 : 961、1989) ; または (5) ジヤスモン酸メチル、サリチル酸もしくは毒性緩和剤 (safener) などの化学物質。また、(6) 器官特異的プロモーター (例えば、Roshalら、EMBO J. 6 : 1155、1987 ; Scherthalerら、EMBO J. 7 : 1249、1988 ; Bustosら、Plant Cell 1 : 839、1989 ; Zhengら、Plant J. 4 : 357 ~ 366、1993) を用いることも有用と思われる。組織特異的な発現はある種のプロモーターの使用によって容易になると思われ、例えば、ナピン (napi) プロモーターはアブラナ属由来の種子貯蔵蛋白質プロモーターであり、種子の発生に対して特異的である。-コングリシニンプロモーターは組換え核酸の発現を引き起こし、従って本発明の<sup>5</sup>蛋白質または<sup>8</sup>蛋白質を、例えば種子組織など特定の組織のみで発現させることが可能となる。

#### 【0064】

植物発現ベクターには、植物遺伝子の3'-非翻訳領域由来の調節配列 (Thornburgら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 : 744、1987 ; Anら、Plant Cell 1 : 115、1989) 、例えば、ジャガイモのPI~PIIターミネーター領域またはオクトピンシンターゼ3'ターミネーター領域もしくはノパリンシンターゼ3'ターミネーター領域など、mRNAのmRNA安定性を高める3'ターミネーター領域が含まれる。

#### 【0065】

植物細胞における発現のために有用な優性選択マーカー遺伝子には、これらに限定されないが抗生物質耐性遺伝子 (例えば、ハイグロマイシン、カナマイシン、ブレオマイシン、G418、ストレプトマイシンまたはスペクチノマイシンに対する耐性) をコードする遺伝子 ; および除草剤耐性遺伝子 (例えば、フォスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ) が含まれる。有用でスクリーニング可能なマーカーには、-グルクロニダーゼおよび緑色蛍光蛋白質が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0066】

また、本発明は、新規の<sup>5</sup>-不飽和化酵素および/または<sup>8</sup>-不飽和化酵素をコードする、新規に発見されたポリヌクレオチドの全体または一部を含む組換え核酸構築物により形質転換された細胞または植物または生物を提供する。このような形質転換植物または生物の一例は、ジャガイモ、トマト、ナタネ、ヒマワリ、ダイズ、コムギまたはトウモロコシであると考えられる。食用キノコなどの多細胞真菌もまた形質転換されうる。形質転換された脂肪種子植物は、種子油中にC20多価不飽和脂肪酸が蓄積すると考えられるため、特に関心がもたれる。

#### 【0067】

本発明による核酸を発現する核酸構築物は、脂肪酸生合成を変化させるために種々の宿主細胞または生物に導入されうる。高等植物細胞、真核生物宿主細胞および原核生物宿主細胞はすべて、前述の適切な発現系により形質転換されうる。

#### 【0068】

不飽和化酵素をコードするcDNA (または遺伝子) が単離された後、植物の特定の性質を改変するために、標準的な技法を用いてトランスジェニック植物細胞において該cDNAを発現させることができる。基本的なアプローチは、植物細胞におけるcDNAの発現を指示する制御配列 (例えば、プロモーター) にcDNAが動作可能に結合するように、cDNAを形質転換ベクター中にクローニングすることである。続いて、任意の種々の技法、例えばアグロバクテリウムを介した植物もしくは植物組織の形質転換により、またはプロトプラストの電圧ポレーションにより、植物細胞に形質転換ベクターを導入し、導入したcDNAを含

む子孫植物を選抜する。形質転換ベクターの全体または一部は植物細胞のゲノム中に安定的に組み込まれる。植物細胞に組み込まれ、導入したcDNAおよび発現制御のための関連配列（導入された「導入遺伝子（transgene）」）を含む形質転換ベクターの部分を、「組換え発現カセット」と呼ぶことができる。

【0069】

導入された導入遺伝子を含む子孫植物の選抜は、改変された表現型の検出に基づいて行うことができる。このような表現型は、形質転換ベクター中にクローニングされたcDNAに直接起因してもよく、形質転換ベクターに組み入れられた優性選択マーカー遺伝子の含有の結果としての化学物質（抗生物質など）に対する耐性の増大によって明らかになってもよい。

10

【0070】

クローニングされたcDNAを用いた形質転換による植物の性質の改変が成功した例は、技術文献および科学文献中に満載されている。この技術分野における知識を例示する一助となる主な例には以下が含まれる：

米国特許第5,571,706号（「植物ウイルス耐性遺伝子および方法（Plant Virus Resistance Gene and Methods）」）；

米国特許第5,677,175号（「植物病原体誘導性蛋白質（Plant Pathogen Induced Proteins）」）；

米国特許第5,510,471号（「植物の形質転換のためのキメラ遺伝子（Chimeric Gene for the Transformation of Plants）」）；

20

米国特許第5,750,386号（「病原体耐性トランスジェニック植物（Pathogen-Resistant Transgenic Plants）」）；

米国特許第5,597,945号（「疾患抵抗性が遺伝的に高められた植物（Plants Genetically Enhanced for Disease Resistance）」）；

米国特許第5,589,615号（「改変型2S貯蔵アルブミンの発現によって栄養価が増大したトランスジェニック植物の生産方法（Process for the Production of Transgenic Plants with Increased Nutritional Value Via the Expression of Modified 2S Storage Albumins）」）；

米国特許第5,750,871号（「アブラナ属における形質転換および外来遺伝子の発現（Transformation and Foreign Gene Expression in Brassica Species）」）；

30

米国特許第5,268,526号（「トランスジェニック植物におけるフィトクロムの過剰発現（Overexpression of Phytochrome in Transgenic Plants）」）；

米国特許第5,262,316号（「遺伝的に形質転換されたコショウ植物体およびその作出方法（Genetically Transformed Pepper Plants and Methods for their Production）」）；

米国特許第5,569,831号（改変型ポリガラクトンナーゼアイソフォームを有するトランスジェニックトマト（Transgenic Tomato Plants with Altered Polygalacturonase Isoforms）」）。

【0071】

これらの例には、形質転換ベクターの選択、形質転換の技法、および導入したcDNAを過剰発現するように設計された構築物の構築に関する記載が含まれる。前述の、ならびに不飽和化酵素のアミノ酸配列および核酸配列に関する本明細書の規定を考慮に入れることにより、当業者が不飽和化酵素活性が強化された植物を産生するために、cDNAまたはこれらの分子のホモログもしくは誘導体を植物に誘導することができると考えられる。さらに、植物における1つまたは複数の不飽和化酵素の発現は、多価不飽和脂肪酸の生産性が強化された植物の元となりうる。

40

【0072】

本発明は、不飽和化酵素に対する抗体およびその断片にも関し、これらの抗体は不飽和化酵素の精製および検出のために有用であることができる。不飽和化酵素の配列を提供することにより、該酵素に対する、特異的抗体による結合剤の生産が可能になる。

【0073】

50

不飽和化酵素、不飽和化酵素の部分またはその変異体に対するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体が作製されうる。最適には、これらの抗原上のエピトープに対して産生された抗体は、本酵素を特異的に検出すると考えられる。すなわち、不飽和化酵素に対して産生された抗体は、不飽和化酵素を認識してそれと結合するが、他の蛋白質には実質的に認識も結合もしないと考えられる。抗体が抗原と特異的に結合するという確認は、例えばウエスタンブロット法、サンプブルック (Sambrook) ら (編)、「分子クローニング：実験室マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」, 第2版、第1～3巻、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、NY、1989などの、数多くの標準的な免疫測定法の任意の1つを用いて行われる。

#### 【0074】

所定の抗体調製物 ( 5 - 不飽和化酵素に対してマウスで産生された調製物など ) が不飽和化酵素を特異的に検出することをウエスタンブロット法によって確認するためには、細胞から全細胞蛋白質を抽出し、SDS- ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動する。続いて蛋白質をウエスタンブロット法によって膜 (例えば、ニトロセルロース) に転写し、抗体調製物を膜とともにインキュベートする。非特異的に結合した抗体を除去するために膜を洗浄した後、特異的に結合した抗体の存在を、アルカリホスファターゼなどの酵素を接合させた抗マウス抗体を用いることによって検出する。5-ブロモ-4-クロロ-3-インドイルリン酸 / ニトロブルー-テトラゾリウムを適用すると、免疫局在性のアルカリホスファターゼにより、濃青色の化合物が生成される。

#### 【0075】

不飽和化酵素を特異的に検出する抗体は、この技法により、不飽和化酵素のバンド (ゲル上の、不飽和化酵素の分子量によって決定される位置にある) のみと実質的に結合することが示されると考えられる。抗体の他の蛋白質との非特異的結合が生じたり、ウエスタンブロット上で弱いシグナル (自動X線撮影によって定量化可能) として検出されうる。特異的抗不飽和化酵素結合による強い主要シグナルと比較して、ウエスタンブロットにおけるシグナルが弱いことから、この結合の非特異的な性質が当業者により認識されると考えられる。不飽和化酵素と特異的に結合する抗体は、本明細書で「特異的結合剤」と呼ばれる一群の分子に属する。本発明の不飽和化酵素と特異的に結合できる特異的結合剤には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ならびにFab、F(ab')<sub>2</sub>およびFv断片などのモノクローナル抗体の断片、さらには蛋白質の1つまたは複数のエピトープと特異的に結合

#### 【0076】

免疫原としての使用に適した実質的に純粋な不飽和化酵素は、トランスフェクトされた細胞、形質転換細胞または野生型細胞から単離されうる。最終調製物における蛋白質の濃度は、例えば、アミコン (Amicon) 濾過装置において数  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のレベルに濃縮することによって調節される。または、不飽和化酵素のペプチド断片を免疫原として用いてもよい。このような断片を標準的な方法を用いて化学的に合成することができ、または完全な不飽和化酵素を切断した後、所望のペプチド断片を精製することによって得ることができる。長さが3アミノ酸または4アミノ酸の短いペプチドは、MHCクラスIまたはMHCクラスIIなどの主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) 分子と関連した免疫系に供されると免疫原性を持つ。従って、開示された不飽和化酵素のアミノ酸配列の少なくとも3個、好ましくは少なくとも4個、5個、6個またはそれ以上の連続したアミノ酸を含むペプチドは、抗体産生のための免疫原として用いられうる。

#### 【0077】

ペプチド配列を線状分子として見ると、蛋白質上の天然に存在するエピトープはしばしばペプチド内で隣接して並んでいないアミノ酸残基を含むので、抗体産生のために不飽和化酵素のアミノ酸配列からのより長いペプチド断片を用いることが有益と思われる。したがって、例えば、アミノ酸配列の少なくとも10個、15個、20個、25個または30個の連続したアミノ酸残基を含むペプチドを用いるとよい。無傷の不飽和化酵素またはそのペプチド断片に対するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体は以下に述べる通りに調製しう



る。

#### 【0078】

本明細書に記載されたように同定および単離された不飽和化酵素の任意の様々なエピトープに対するモノクローナル抗体は、ケーラー (Kohler) およびミルスタイン (Milstein) 、Nature 256 : 495、1975の古典的方法またはその派生的な方法に従って、マウスハイブリドーマから調製されうる。簡潔に述べると、数  $\mu\text{g}$  の選抜された蛋白質を、数週間にわたってマウスに反復接種する。その後にマウスを殺し、脾臓の抗体産生細胞を単離する。脾細胞をポリエチレングリコールを用いてマウス骨髓腫細胞と融合させ、この系をアミノプテリンを含む選択培地 (HAT培地) 上で増殖させることにより、過剰な非融合細胞を破壊する。うまく融合した細胞を希釈し、希釈アリコートマイクロタイタープレートのウェルに入れて培養物の増殖を続ける。エンゲバル (Engvall) 、Enzymol. 70 : 419、1980によって最初に記載されたELISA法、またはその派生的方法などの免疫測定法によってウェルの上清液中の抗体を検出することにより、抗体産生性クローンを同定する。選抜された陽性クローンを増殖させ、モノクローナル抗体産物を使用のために収集する。モノクローナル抗体の産生のための詳細な方法は、ハーロウ (Harlow) およびレーン (Lane) 、「抗体、実験室マニュアル (Antibodies, A Laboratory Manual) 」、Cold Spring Harbor Laboratory、New York、1988に記載されている。

10

#### 【0079】

単一の蛋白質の不均一なエピトープに対する抗体を含むポリクローナル抗血清は、免疫原性を高めるために、適当な動物を発現蛋白質 (改変していないものでもよく、改変したものでよい) で免疫化することによって調製されうる。効果的なポリクローナル抗体産生は、抗原および宿主種の双方に関連した多くの要素により影響を受ける。例えば、小さな分子は他の分子よりも免疫原性が弱い傾向があり、担体およびアジュバントの使用が必要になると思われる。また、接種部位および投与量に応じて宿主動物も一様ではなく、抗原の投与量が不十分でも過剰でも力価の低い抗血清が生じる。低用量 (ng程度) の抗原を皮内部位に多回投与することが最も確実と思われる。ウサギの効果的な免疫化プロトコールは、バイツカイトイス (Vaitukaitis) ら、J. Clin. Endocrinol. Metab. 33 : 988 ~ 991、1971において見出される。

20

#### 【0080】

追加免疫注射を定期的に行うことができ、既知の濃度の抗原に対する寒天中での二重免疫拡散法などにより半定量的に測定された抗体力価が低下し始めた時点で、抗血清を収集する。例えば、オクタロニー (Ouchterlony) ら、「実験免疫学ハンドブック (Handbook of Experimental Immunology) 」、ウィア (Wier, D.) (編)、第19章、Blackwell、1973を参照のこと。抗体のプラトー濃度は通常、 $0.1\text{mg} / \text{血清ml} \sim 0.2\text{mg} / \text{血清ml}$  (約  $12\mu\text{M}$ ) の範囲である。抗原に対する抗血清の親和性は、従来の方法を用いた競合結合曲線の調製により決定される。

30

#### 【0081】

本酵素を発現するDNAベクターをマウスなどの実験動物に皮下注射することによって、本発明の不飽和化酵素に対する抗体が産生されうる。動物の体内への組換えベクターの送達を、手持ち式の微粒子銃システム (Sanfordら、Particulate Sci. Technol. 5 : 27 ~ 37、1987、Tangら、Nature (London) 356 : 153 ~ 154、1992に記載) を用いて行うことができる。この目的に適した発現ベクターには、ヒト  $\beta$ -アクトニンプロモーターまたはサイトメガロウイルス (CMV) プロモーターの転写制御下において酵素のcDNAを発現するものが含まれうる。DNAが動物の体内で発現するような様式で裸DNAを動物に投与する方法は公知であり、例えば、米国特許第5,620,896号 (「ロタウイルス感染に対するDNAワクチン (DNA Vaccines Against Rotavirus Infections) 」) ; 米国特許第5,643,578号 (「DNA転写ユニットの接種による免疫化 (Immunization by Inoculation of DNA Transcription Unit) 」) ; および米国特許第5,593,972号 (「遺伝子的免疫化 (Genetic Immunization) 」) 、ならびにそれらに引用された参考文献に記載されている。

40

#### 【0082】

50

完全な抗体の代わりに抗体断片を用いてもよく、それは原核宿主細胞内で容易に発現させることができる。「抗体断片」とも呼ばれる、モノクローナル抗体の、免疫学的に有効な部分の作製および使用の方法は周知であり、ベター (Better) およびホロビッツ (Horowitz)、Methods Enzymol. 178: 476~496、1989; グロックシューバー (Glockshuber) ら、Biochemistry 29: 1362~1367、1990; ならびに米国特許第5,648,237号 (「機能性抗体断片の発現 (Expression of Functional Antibody Fragments)」); 米国特許第4,946,778号 (「単鎖ポリペプチド結合分子 (Single Polypeptide Chain Binding Molecules)」); および米国特許第5,455,030号 (「単鎖ポリペプチド結合分子を用いた免疫療法 (Immunotherapy Using Single Chain Polypeptide Binding Molecules)」)、ならびにそれらに記載された参考文献に記載されたものがこれに含まれる。

10

#### 【0083】

##### 実施例

##### 実施例1: 生物の系統および培養

ミドリムシ (*Euglena gracilis*) Z株を、コロンビアサイエンティフィック (Columbia Scientific) 社から入手した。炭素源としてスクロースを加えたクラメール・マイヤーズ培地 (CramerおよびMeyers、Archiv für Mikrobiologie 17: 384~402、1952) でこの生物を培養した。培養物は完全暗黒下で25℃で維持した。

#### 【0084】

センチュウ (*C. elegans*) は線虫遺伝学センター (Caenorhabditis Genetics Center)、St. Paul、Minnesotaから入手し、標準的な条件下で育生した (Sulstonら、「線虫セノラプディティス・エレガンス (Nematode *Caenorhabditis elegans*)」 (Wood, W.B. 編)、pp.587~606、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、NY、1988)。

20

#### 【0085】

##### 実施例2: センチュウ (*C. elegans*) 遺伝子ホモログに関するデータベース検索

サンガーセンター (The Sanger Center) ([http://www.sanger.ac.uk/projects/c\\_elegans/blast\\_server.shtml](http://www.sanger.ac.uk/projects/c_elegans/blast_server.shtml)) のセンチュウ・ゲノムデータベースで、BLAST (登録商標) を用いて、ルリヂサ (*B. officinalis*)<sup>6</sup> -不飽和化酵素 (GenBankアクセス番号U79010) を含む植物不飽和化酵素の配列を検索した。最も高いスコアが得られた2つのセンチュウ (*C. elegans*) ポリペプチドは、コスミドW08D2 (ハイスコア163) およびT13F2 (ハイスコア121) に存在するペプチドであった。

30

#### 【0086】

##### 実施例3: RNA単離、逆転写PCR、およびRACE (cDNA末端の迅速増幅)

ミドリムシ (*E. gracilis*)<sup>8</sup> 遺伝子に関しては、フェノール-SDSプロトコール (Ausubel、「分子生物学における最新プロトコール (Current Protocols In Molecular Biology)」、1988) を用いて、ミドリムシの従属栄養培養物から全RNAを単離した。ポリA-トラクトシステム (polyA-tract system) (Promega Scientific、Madison、Wisconsin) を用いて、全RNAからメッセンジャーRNAを精製した。逆転写反応はスーパースクリプトII (Superscript II) (Life Technologies、Rockville、Maryland) を用いて行った。初期反応における一本目の鎖の合成のプライミングには、アンカー (anchored) ポリTプライマー (Clontech、Palo Alto、California) を用いた。二本目の鎖の合成は記載された通りに行い (Life Technologies)、遺伝子のコア領域のポリメラーゼ連鎖反応増幅は、センチュウ<sup>6</sup> -不飽和化酵素遺伝子の第1および第3のHis-ボックス領域に重複する配列が完全に縮重するように設計したプライマー (GGCTGGCTGACNCAYGARTTYTGAY; 配列番号: 5) および (CATCGTTGGAAANARRTGRTGYTCDATYTG; 配列番号: 6) を用いて行った。

40

#### 【0087】

縮重プライマーの使用に関して公知のガイドライン (Compton、「PCRプロトコール: 方法および応用の手引き (PCR Protocols: A Guide To Methods and Applications)」、1990) を用いて増幅プロトコールを開発した。増幅は、極めて低いアニーリング温度での5つの予備的段階 (94℃で30秒、1分間で37℃まで下降、37℃で45秒、3分間で72℃まで上昇

50

）に続いて、高温での30サイクル（94 で30秒、1分間で50 まで下降、50 で45秒、3分間で72 まで上昇）を行うことからなる。熱サイクリングのパラメーターを最適化するための予備的増幅にはPfu DNAポリメラーゼ（Stratagene、La Jolla、California）を用いた。3mMマグネシウムおよび4 μMの各プライマーの下で増幅が成功した。その後の同一条件下での増幅にはTaqポリメラーゼを用いた。

#### 【0088】

350bp～750bpのポリメラーゼ連鎖反応産物を市販の試薬（Qiagen、Valencia、California）を用いてアガロースゲルから単離し、縮重プライマーおよびダイターミネーションシーケンシング技術（dye-termination sequencing technology）（Applied Biosystems、Foster City、California）を直接用いてシーケンシングを行った。BLAST（登録商標）  
10 検索（Altschulら、Nucleic Acids Res. 25：3389～3402、1997）によって解析したところ、同一の増幅産物の一群は既知の不飽和化酵素と相同なオープンリーディングフレームを含んでいた。コア配列の内部から増幅するように設計された入れ子状（nested）プライマーの対を用いて、マラソンRACEシステム（Marathon RACE system）（Clontech）により、完全mRNAの5'配列および3'配列を得た。遺伝子の完全な5'末端をクローニングするためには、オープンリーディングフレームの配列に特異的なプライマーを用いた逆転写を反復し、5' RACE増幅を反復することが必要であった。

#### 【0089】

センチュウ（*C. elegans*）<sup>5</sup> 遺伝子に関しては、以下の通りにRNAの単離および逆転写PCRを行った。RT-PCRは、2つの推定不飽和化酵素遺伝子のコード配列を増幅するために用いた。さまざまな段階のセンチュウからの全RNAをRT-PCRの鋳型として用いた。記載された通りに寒天平板上で線虫を生育させ、フェノール/SDS法（Sluderら、Dev. Biol. 184：303～319、1997）を用いてRNAを単離した。RT-PCRはスーパースクリプト（Superscript）（登録商標）ワンステップRT-PCRシステム（One-Step RT-PCR system）（Gibco-BRL/Life Technologies）を用いて行った。0.2mMの各dNTP、1.2mM MgSO<sub>4</sub>、スーパースクリプトII（Superscript II）（登録商標）RT/Taqポリメラーゼ混合物、ならびに200 μMの適切な下流プライマーおよび上流プライマーからなる反応混合物に約1mgの全RNAを添加した。反応物を50 で30分間インキュベートした後、35サイクルのPCR増幅に供した。T13F2.1遺伝子（*fat-4*）に関しては、コスミドT13F2の34339塩基～34361塩基に対応する5'プライマー  
20 を用いた。クローニングを容易にするために、これらの配列にSmaI、HindIIIおよびXhoI制限酵素部位を付加した。その結果得られたプライマー [CCCGGAAGCTTCTCGAGGAATTTCAATCCTCCTTGGGTC；配列番号：7] は、*fat-4*遺伝子の推定開始コドンATGの19塩基対～42塩基対上流でコスミドT13F2とアニーリングする。*fat-4*遺伝子の3'末端を増幅するために、関心対象のポリヌクレオチドのクローニングを容易するためにSmaI部位およびBamHI部位を付加した、コスミドT13F2の37075塩基～37095塩基の逆相補物に対応するプライマー：[CCCGGTGGATCCGGAACATATCACACGAAACAG；配列番号：8]を用いた。このプライマーは推定停止コドンTAGの93塩基対下流から始まり、*fat-4*遺伝子の推定ポリアデニル化シグナル（AAUAAA；配列番号：9）の20塩基対上流で終わる。  
30

#### 【0090】

特定のリーダー配列のトランススプライシングを決定するために、T13F2.1に関して、T13F2の35009塩基～35028塩基の相補物に対応する下流プライマー（TCTGGGATCTCTGGTTCTTG；配列番号：10）を用いた。上流PCRプライマーはSL1-20またはSL2-20のいずれかとした（Spiethら、Cell 73：521～532、1993）。リボソーム蛋白質L37のセンチュウ（*C. elegans*）ホモログをSL1特異的対照として用い、K06H7.3をSL2特異的対照として用いた（Zorioら、Nature 372：270～272、1994）。SL1-20、SL2-20および対照プライマーはディエゴ・A・R・ゾリオ（Diego A.R. Zorio）氏から寄贈を得た。ゲル電気泳動によって可視化されたRT-PCR産物を、ゲルのプロッティングおよび以前に記載された適切な遺伝子（Spiethら、Cell 73：21～532、1993）に対応する遺伝子特異的オリゴヌクレオチドによるプローブ検索によって確認した。  
40

#### 【0091】

実施例4: <sup>5</sup>-不飽和化酵素および <sup>8</sup>-不飽和化酵素をコードする遺伝子のPCR増幅

DNAおよび蛋白質の配列は Wisconsin (Wisconsin) -GCG プログラムパッケージ (Devereuxら、Nucleic Acids Res. 12: 387~95、1984) を用いて解析された。

【0092】

ミドリムシ (*E. gracilis*) ( <sup>8</sup> ) オープンリーディングフレームを単一のDNA断片としてクローニングするために、一組のプライマーを用いて、オープンリーディングフレームに特異的な逆転写のプライミングを行った。遺伝子の5'末端のためのプライマーは開始コドンの3ヌクレオチド前から始まり、オープンリーディングフレームの最初の26ヌクレオチドを含んでいた。3'プライマーは、予想停止コドンの下流22ヌクレオチド~52ヌクレオチドの配列に相補的であった。増幅の誤りの可能性を最小化するために、Pfuポリメラーゼを用いてPCR増幅を行った。アガロースゲル電気泳動により分析したところ、PCR反応から予想されるサイズの単一のバンドが得られた。このバンドをベクターpCR-Script Cam (登録商標) (Stratagene) 中にクローニングし、pJW541と命名した単一クローンを分析用に選抜した。

10

【0093】

センチュウ (*C. elegans*) <sup>5</sup>-不飽和化酵素を発現させるためには、fat-4 cDNA増幅産物 (実施例3参照) をHindIIIおよびBamHIで消化し、HindIIIおよびBamHIで切断された酵母発現ベクターpYES2 (Invitrogen) と連結した。得られたプラスミドをpYFAT4と命名した。

【0094】

20

実施例5: <sup>5</sup>-不飽和化酵素および <sup>8</sup>-不飽和化酵素の発現

ミドリムシ (*E. gracilis*) に関して、ニューイングランドバイオラプス (New England Biolabs) 社、Beverly、Massachusettsから入手した酵素を用いる標準的なクローニング法 (Ausubel、*「分子生物学における最新プロトコル (Current Protocols In Molecular Biology)」*、1988) により、クローニングされた <sup>8</sup> 遺伝子を酵母発現ベクターpYES2 (Invitrogen、Carlsbad、California) に移行させた。得られた、ガラクトース誘導性プロモーターの制御下にあるオープンリーディングフレームを含む酵母発現構築物を、pYES2-541と命名した。

【0095】

サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) INVSc1株 (Invitrogen) をpYES2-541で形質転換し、標準的な方法 (Ausubel、*「分子生物学における最新プロトコル (Current Protocols In Molecular Biology)」*、1988) を用いて培養した。2%ガラクトースを含む液体培地に、脂肪酸石けん (NuCheck Prep、Elysian MN) を最終濃度0.2mMとなるように添加した。脂肪酸の取り込みを増大するため (Stukeyら、*J. Biol. Chem.* 264: 16537~16544、1989)、酵母培養物にターゲットール (Tergitol) (1%、NP40) を添加したが、20:1を含む培養物に限っては5%DM50を代用した。酵母を28℃で一晩インキュベートし、遠心分離法によって回収し、1%ターゲットールで1回、0.5%ターゲットールで1回、最後に蒸留水で1回洗浄した。

30

【0096】

センチュウ (*C. elegans*) <sup>5</sup> 遺伝子に関しては、S.c. イージーコンプ (S.c. EasyComp) 形質転換キット (Invitrogen) を用いて、構築物をサッカロミセス・セレビシエ INVSc1株に導入した。FAT-4ペプチドを用いる実験に関しては、形質転換された酵母を、2%ガラクトース、0.2mM脂肪酸および1%NP-40を含むウラシル欠乏培地で一晩増殖させた。これらの条件下においては、添加された脂肪酸が酵母脂質中に取り込まれた割合は、総酵母脂肪酸の14%~28%の範囲であった。20:1 <sup>1</sup> <sup>1</sup> を基質として用いた実験に関しては、脂肪酸がより取り込まれるように、1%NP-40の代わりに5%DMSOを用いた。

40

【0097】実施例6: ガスクロマトグラフィーおよびGC-質量分析法を用いた脂肪酸の分析

脂質の抽出および脂肪酸メチルエステルの調製を、標準的な方法によって行った (MiquelおよびBrowse、*J. Biol. Chem.* 267: 1502~1509、1992)。メチルエステルのガスクロマ

50

トグラフィーを、確立された方法により行った (Spychallaら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 1142~1147、1997)。酵母脂質抽出物の脂肪酸4,4'-ジメチルオキサゾリン (DMOX) 誘導体を、標準的な方法を用いて調製した (FayおよびRichli、J. Chromatogr. 541: 89~98、1991)。GC-質量分析は、30m×0.25μmのHP5MSカラムを装着したヒューレット・パカード (Hewlett-Packard) 6890シリーズGC-MSを、イオン化電圧70eVおよびスキャン範囲50Da~550Daで動作させて行った。脂肪酸およびそれらの誘導体を、可能なものについては、基準試料 (NuCheck Prep) との比較によって同定した。

#### 【0098】

##### 実施例7: ミドリムシ<sup>8</sup>-不飽和化酵素遺伝子の同定および増幅

従属栄養培養物から単離したメッセンジャーRNAを逆転写の鋳型として用い、続いてミクロソーム不飽和化酵素蛋白質の第1保存的ヒスチジンリッチ領域および第3保存的ヒスチジンリッチ領域の範囲に及ぶ縮重プライマーを用いるPCR増幅を行った。センチウ<sup>6</sup>-不飽和化酵素遺伝子であるFAT-3をプライマー設計の主な基盤とした。プライマー対に必要な高い縮重性を補うため、増幅反応を低温アニーリングの5回のサイクルから始め、アニーリングと重合ステップの間には長い温度上昇期間 (ramp) をおいた。熱サイクリングのパラメーターを最適化するための予備的増幅には、校正Pfu DNAポリメラーゼを用いた。高濃度のプライマーおよびマグネシウムを用いたPfu増幅反応がうまく行われた後に、検出可能な多数のバンドがアガロースゲル上に生成されるようにTaqポリメラーゼを用いた。

#### 【0099】

このうち約650bpのバンドのいくつかは同一の配列を有していた。DNA配列は、予想アミノ酸配列が他の膜不飽和化酵素と相同であるようなオープンリーディングフレームを含んでおり、中央部に特徴的なHisボックスを含んでいた。増幅配列に特異的であるように設計されたプライマーを用い、3'RACE法および5'RACE法を用いてcDNA末端を増幅した。この遺伝子のcDNAの完全長は1745bpであった。1272bpのオープンリーディングフレームおよび472bpの3'非翻訳領域が含まれた。ほとんどのミドリムシのメッセンジャーRNAは、短い5' RNAリーダー配列であるトランススプライストリーダー (trans-spliced leader) (Tessierら、Embo. J. 10: 2621~2625、1991) の付加を通じて処理される。RNAプロセッシング段階において、各メッセージの開始部に保存的配列 (TTTTTTTCG; 配列番号: 11) が残される (Cuiら、J. Biochem. (Tokyo) 115: 98~107、1994)。cDNA配列におけるリーダー配列の存在により、該メッセージが5'末端では完全長であることが立証された。5'末端および3'末端でオープンリーディングフレームと隣接するプライマーを用いたRT-PCRによって単一のバンドが得られたため、これをベクターpCR-Script Cam (登録商標) (Stratagene) 中にクローニングし、pJW541と命名した。このORFに対応する遺伝子をEFD1 (*Euglena fatty acid desaturase 1*) と命名した。

#### 【0100】

##### 実施例8: ミドリムシ<sup>8</sup>-不飽和化酵素と他の蛋白質との類似性

翻訳されたオープンリーディングフレームから、422アミノ酸からなり、推定分子量が48.8kDaである蛋白質が示された (図3)。配列データベースのBLAST (登録商標) 検索により、推定蛋白質配列には、高度に保存されたヒスチジンリッチ領域 (Shanklinら、Biochemistry 33: 12787~12794、1994) において特に、膜脂肪酸不飽和化酵素の既知の一群との相同領域が存在することが明らかになった。

#### 【0101】

個々のHisボックスモチーフはEFD1蛋白質中に存在する。第1のもの (HXXXH) はアミノ酸146位から始まり、第2のもの (HXXHH; 配列番号: 12) はアミノ酸183位から始まる (図3)。さらにEFD1はアミノ酸361位から始まる変異型の第3のHisボックスQXXHH (配列番号: 13) を含んでおり、これはクローニングされた<sup>5</sup>-不飽和化酵素および<sup>6</sup>-不飽和化酵素と類似している。EFD1は、高度に保存された領域の周辺領域において、特にセンチウの<sup>6</sup>-不飽和化酵素および<sup>5</sup>-不飽和化酵素であるFAT-3およびFAT-4と蛋白質配列の保存性を示す (図3)。高度に保存された領域の外側では、他の不飽和化酵素とのアミノ酸配

列の類似性は非常に低い。全体的には、FAT-3およびFAT-4とのアミノ酸の同一性は33%であり、一方、ルリヂサ<sup>6</sup>-不飽和化酵素との同一性は28%である。

#### 【0102】

EFD1はまた、N末端にシトクロムb<sub>5</sub>様モチーフを含む。この蛋白質は、ヘム結合に寄与する、シトクロムb<sub>5</sub>に特徴的な最も高度に保存された8つのアミノ酸のうち7つをコードしている(図3)。類似のモチーフは、FAT-3およびFAT-4のN末端領域(図3)、ならびにルリヂサ<sup>6</sup>蛋白質、さらには酵母<sup>9</sup>蛋白質のカルボキシ末端にも見出される。

#### 【0103】

このミドリムシ蛋白質の構造はまた、既知の不飽和化酵素との類似性も示す。膜不飽和化酵素はII型多重膜貫通型蛋白質であり、クローニングされたミドリムシ遺伝子のヒドロパシー分析により、予想される蛋白質には、膜二重層を2回貫通するだけの長さが十分にある有意な疎水性領域が少なくとも3つあることが示された。ほとんどの不飽和化酵素にとって、第1の2つのHisボックスの間には31個のアミノ酸残基が存在する。第2のHisボックスおよび第3のHisボックスの間の距離は173残基であり、これは以前に観察されている範囲内である(ShanklinおよびCahoon、Annu. Rev. 植物Physiol. 植物Mol. Biol. 48: 611~641、1998)。

#### 【0104】

実施例9: ミドリムシ<sup>8</sup>-不飽和化酵素蛋白質の活性

酵素の活性を確認するため、EFD1 cDNAをpJW541から、ガラクトース誘導性プロモーターの制御下にある酵母発現ベクターpYES2に移行させた。得られた構築物pYES2-541を*S. セレピシエ*(*S. cerevisiae*)に導入した。酵母膜はC20脂肪酸を含まないが、培地からそれらを取り込む。このため、対照として空ベクターを含む酵母株を用いて、酵母培養物に種々の脂肪酸石けんを添加し、培養物の脂肪酸をメチルエステル誘導体化およびガスクロマトグラフィーによって分析した。

#### 【0105】

これらの実験における不飽和化活性のパターンから、pYES2-541は<sup>5</sup>活性および<sup>6</sup>活性を持たない<sup>8</sup>-不飽和化酵素を発現することが示された。実験酵母株が<sup>8</sup>-不飽和化を生成する能力は培養培地に20:2を添加した場合に示された(図4)。保持時間が20:3基準試料と同一な不飽和化のピークが得られた。ベクターのみの対照培養物は20:2を不飽和化しなかった(図4)。ミドリムシ遺伝子を発現する酵母株もまた20:3および20:1を不飽和化し(図4)、対照培養物には不飽和化活性はみられなかった。クローニングされたミドリムシ蛋白質は20:3および20:2を基質とした場合に最も活性が高く、取り込まれた総C20脂肪酸の70%および73%を不飽和化した。EFD1は20:1に対する活性が最も低く、不飽和化産物に転換された基質は32%であった(図4)。

#### 【0106】

培養培地に<sup>5</sup>-不飽和化のための基質である20:4を添加した場合には、脂肪酸は酵母に取り込まれたが、20:5不飽和化産物は産生されなかった。同様に、培地に18:2および18:3を添加した場合にも不飽和化は起こらず、このことからクローニングされた遺伝子は<sup>6</sup>-不飽和化酵素を発現しないことが示された。

#### 【0107】

不飽和化が<sup>8</sup>位で起こったことを確認するために、酵母脂肪酸の4,4-ジメチルオキサゾリン(DMOX)誘導体をGC-MSによって分析した。DMOX誘導体の質量スペクトルは、メチルエステルのスペクトルよりも解析が容易であり、多価不飽和脂肪酸における二重結合の位置の明確な決定を可能にする(Christie、Lipids 33: 343~353、1998)。脂肪酸20:2を不飽和化した実験において、GC-MS装置における産物の保持時間は16.8分であり、20:3基準試料のDMOX誘導体と同一であった。不飽和化産物およびその分子イオン( $m/z$  359)の質量スペクトルから、それが20:3化合物であることが示された。 $m/z$  182および $m/z$  194における2つのスペクトル周波数ピークの差はわずかに12 a.m.u.で、導入された二重結合が<sup>8</sup>位にあることが示された(図5)(基質20:2は8位で飽和しており、ピークは182および196で、差が14 a.m.u.である)。この産物のスペクトルは、不飽和化ピークも含め、20

:3基準試料のものと同一であった (LuthriaおよびSprecher, Lipids 28 : 561 ~ 564, 1993)。他の基質20:1および20:3もまた、EFD1によって<sup>8</sup>位で不飽和化された。それぞれのスペクトルにおいて、 $m/z$  182および $m/z$  194におけるピークが見られ、いずれの場合も分子イオンは基質のものより2小さかった (図5)。

【0108】

#### 実施例10：2種類のセンチュウ (*C. elegans*) 不飽和化酵素遺伝子の同定およびクローニング

ルリヂサ<sup>6</sup>-不飽和化酵素の蛋白質配列を用いたセンチュウ (*C. elegans*) ゲノムDNAデータベースの検索により、高スコアのオープンリーディングフレームが2つ同定された。オープンリーディングフレームから予想された蛋白質W08D2.4およびT13F2.1はいずれも、特徴的な (HPGG) ヘム結合ドメインおよび第3のヒスチジンボックスにおけるH→Q置換を含む、シトクロム $b_5$ と類似したN末端配列を含んでいた。いずれも脂肪酸不飽和化酵素をコードすることが示されたため、W08D2.4遺伝子をfat-3と表記し、T13F2.1遺伝子をfat-4と表記した。興味深いことに、fat-3遺伝子およびfat-4遺伝子は重複するコスミド上で同じ5'→3'方向に互いに隣接して存在しており、fat-4遺伝子のポリアデニル化シグナルと推定されるものとfat-3遺伝子のATG開始コドンとの隔たりは858ヌクレオチド塩基対に過ぎなかった (図8)。この遺伝子構成は、2つまたは複数の遺伝子が、単一のプロモーターおよび調節領域の制御下で転写される、オペロンに類似している。

【0109】

センチュウにおいて、多シストロン性前 (pre-) mRNAが、上流遺伝子の3'末端での切断およびポリアデニル化ならびに、下流遺伝子の5'末端でのSL2配列とのトランススプライシングによって単シストロン性mRNAに変換され、その後、2つのmRNAは別々に翻訳される。しかし、30種以上のこのようなオペロンの分析から、上流遺伝子の3'末端と下流遺伝子の5'末端の間の距離は一般に約100塩基対であり、300塩基対~400塩基対離れていたものは少数であった (Blumenthalら、線虫II (*C. elegans* II)、pp.117~145、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring、NY、1997)。

【0110】

センチュウfat-3遺伝子およびfat-4遺伝子が単一のオペロンにおいて同時転写されるかどうかを明らかにする目的で、それらがSL1またはSL2とトランススプライシングするか否かを明らかにするための試験を行った。fat-4遺伝子はSL1とトランススプライシングするが、fat-3遺伝子はいずれのスプライストリーダー配列ともトランススプライシングしないことが見出された。従って、各遺伝子は自身の5'プロモーターおよび調節領域を含むことが結論づけられた。

【0111】

これらの遺伝子の双方を、RT-PCRを用いてクローニングした。fat-4遺伝子の配列はT13F2ゲノム配列と正確に一致した。しかし、cDNAによってコードされた遺伝子産物は、ジーンファインダー (Genefinder) により推定されたT13F2.1 (GenBankアクセッション番号Z81122) の予測よりも7アミノ酸短かったが、これはアミノ酸残基198位~204位をコードするDNA配列がfat-4 cDNAに存在しなかったためである。結果として生じたペプチドの長さは、事前に推定された454アミノ酸ではなく447アミノ酸であった。fat-3 cDNAにコードされた遺伝子産物もまた、W08D2.4のゲノム配列 (GenBankアクセッション番号Z70271) と完全に一致した。しかし、この遺伝子産物も推定蛋白質配列より短かった。cDNAにはW08D2.4のアミノ酸残基38位~67位のコドンが存在しなかった。両方の場合において、ゲノム配列決定プロジェクトに用いられた遺伝子予測ソフトウェアは、いくつかのイントロンDNAをコード配列と誤認したと考えられた。

【0112】

#### 実施例11：センチュウ (*C. elegans*)<sup>5</sup> に関する配列比較

センチュウFAT-3蛋白質およびFAT-4蛋白質、モルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*)<sup>5</sup>-不飽和化酵素、ならびにルリヂサ (*B. officinails*)<sup>6</sup>-不飽和化酵素はいずれも、N末端シトクロム $b_5$ ドメイン、3つのヒスチジンボックスおよび、デンマーク工科大

10

20

30

40

50

学 (Technical University of Denmark) 生物学的配列解析センター (Center for Biological Sequence Analysis) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-1.0/>) のTMHMMプログラムによって推定された独特な疎水性膜貫通ドメインを含むという点で、類似した構造をもつ蛋白質であると考えられる。推定構造は、不飽和化酵素の構造モデルとして提唱されたものと一致する (Stukeyら、J. Biol. Chem., 265: 20144~20149, 1990)。このような類似性にもかかわらず、この4種類の蛋白質の全体的な配列同一性は非常に低い。例えば、FAT-3<sup>6</sup>-不飽和化酵素とルリヂサ<sup>6</sup>-不飽和化酵素は、アミノ酸レベルで28%の同一性しか持たない。fat-4遺伝子産物のルリヂサ<sup>6</sup>-不飽和化酵素とのアミノ酸配列同一性は25%であり、モルティエラ・アルピナ<sup>5</sup>-不飽和化酵素とのアミノ酸同一性は19%である。FAT-4蛋白質の、M. アルピナ<sup>5</sup>-不飽和化酵素と高い相同性を示す部分は、実際には第3のHisボックスが組み入れられた36残基の配列のみであり、44%の同一性および56%の類似性を有する。最も密接な関連がみられる配列の対はfat-3およびfat-4であり、アミノ酸レベルでの同一性は46%、全cDNA配列を通じての同一性は54%である。

#### 【0113】

図9は、ルリヂサ<sup>6</sup>-不飽和化酵素、センチュウFAT-3、センチュウFAT-4、およびモルティエラ・アルピナ<sup>5</sup>-不飽和化酵素の配列比較を示す。類似したヘム結合ドメイン (HPGG) および3つのヒスチジンボックス領域に下線を施している。保存的モチーフの存在は、fat-4遺伝子が不飽和化酵素または関連した脂肪酸修飾酵素をコードする可能性を示す。しかし、配列比較のみでは、この遺伝子が<sup>6</sup>-不飽和化酵素、<sup>5</sup>-不飽和化酵素またはより関連性の低い酵素をコードするか否かを推定することはできない。

#### 【0114】

実施例12：センチュウ (C. elegans) <sup>5</sup> の、酵母における脂肪酸不飽和化酵素活性および基質特異性

FAT-4不飽和化酵素様蛋白質の酵素活性を決定するために、サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) 内で該蛋白質を発現させ、該酵母内に通常は存在しない多価不飽和脂肪酸基質を添加した。FAT-4蛋白質を、ガラクトースおよび種々の脂肪酸の存在下で細胞を育成することによって、GAL1プロモーターから酵母発現ベクターpYES2において発現させた。16時間増殖させた後に、ガスクロマトグラフィー (GC) によって全脂肪酸組成について細胞を分析した。fat-4コード配列を含むpYES2を有するジホモ-<sup>-</sup>リノレン酸 (20:3<sup>8, 11, 14</sup>) を添加した細胞とベクターのみを有する細胞を比較したところ、FAT-4を発現する細胞において14.49分の時点で溶出する、新たな大きいピークが存在することが明らかになった (図10B)。この新規ピークの保持時間はアラキドン酸メチルエステル (20:4<sup>5, 8, 11, 14</sup>) 基準試料のものと同一であり、m/z 318に質量イオンピークがあることを含め、その質量スペクトルがアラキドン酸メチルエステル基準試料のものと同一であったことから、アラキドン酸 (20:4<sup>5, 8, 11, 14</sup>) であることが確定された。

#### 【0115】

炭化水素鎖における二重結合の位置の決定を簡単にする構造特異的質量スペクトルを作製するために、酵母脂肪酸メチルエステルをオキサゾリン誘導体に転換することにより、この化合物の特徴がさらに立証された。新規20:4成分のDMOX誘導体の質量スペクトルは、アラキドン酸に関して公知のスペクトルと一致し、<sup>5</sup>位の二重結合の指標となるm/z 153において顕著なピークを含んでいた。したがって、fat-4遺伝子がジ-ホモ-<sup>-</sup>リノレン酸基質からアラキドン酸を合成しうる<sup>5</sup>-不飽和化酵素をコードすることが結論づけられた。これに対して、FAT-4蛋白質はリノール酸 (18:2<sup>9, 12</sup>) または<sup>-</sup>リノレン酸 (18:3<sup>9, 12, 15</sup>) を基質として供した場合に全く活性を示さず、このことから<sup>6</sup>-不飽和化酵素活性をもたないことが示された。

#### 【0116】

fat-4を発現する酵母細胞の全脂肪酸のGC図面をさらに分析したところ、空ベクター対照細胞には存在しない、12.91分の時点で溶出する第2の新規ピークが存在することが明らかになった。新規ピークの質量スペクトルの分析により、二重結合が2つあるC18脂肪酸の



メチルエステル (18:2) のものと同じ294単位 of 分子イオン種の存在が明らかになったが、その保持時間および質量スペクトルは一般的な共通異性体18:2<sup>9, 12</sup>とは同一でなかった。

#### 【0117】

哺乳動物肝臓のミクロソーム抽出物において、<sup>5</sup>-不飽和化酵素活性は多数のC18およびC20前駆体に対して作用し、18:2<sup>5, 11</sup>、20:3<sup>5, 11, 14</sup>および20:4<sup>5, 11, 14, 17</sup> (28, 29) などの稀な脂肪酸を生成することが報告されている。2種類の粘菌も18:2<sup>5, 9</sup>、18:2<sup>5, 11</sup>、20:3<sup>5, 11, 14</sup>および20:4<sup>5, 11, 14, 17</sup>を少量産生することが報告されている (Rezanka, *Phytochemistry*, 33: 1441~1444, 1993)。二重結合が、メチレン断続性の通常のパターン (3つの炭素ごとに1つの二重結合が存在する) に従わない、点でこれらの脂肪酸は特殊である。

10

#### 【0118】

従って、GCスペクトルにおいて示された新規ピークは、センチュウ<sup>5</sup>-不飽和化酵素が18:1<sup>9</sup> [または、サッカロミセス・セレピシエの18:1全体の15%~20%を占める18:1<sup>11</sup>] 化合物に作用し、特殊な異性体18:2<sup>5, 9</sup>または18:2<sup>5, 11</sup>を生成した結果であると推定された。これらの酵母脂肪酸メチルエステルはオキサゾリン誘導体に変換された。新規18:2成分のDMOX誘導体の質量スペクトルが、m/z 153における<sup>5</sup>特異的ピークを含むことが見出された。しかし、酵母全抽出物中にこの分子が少量しか存在しなかったため、<sup>9</sup>位または<sup>11</sup>位での二重結合に特徴的なさらに大きいイオンピークは検出されなかった。

20

#### 【0119】

センチュウ<sup>5</sup>-不飽和化酵素が他の基質を不飽和化して他の稀な、メチレン非断続性の脂肪酸を生成しうるかどうかを試験するため、FAT-4-不飽和化酵素を発現する酵母に、20:1<sup>11</sup>、20:2<sup>11, 14</sup>および20:3<sup>11, 14, 17</sup>などの特殊な<sup>5</sup>基質を添加した。基質20:1<sup>11</sup>を酵母に供給した場合には、新規ピークは検出されなかった。しかし、20:2<sup>11, 14</sup>および20:3<sup>11, 14, 17</sup>を基質として与えた場合には、それぞれ14.62分および14.69分に溶出する新規ピークが検出された (それぞれ図11Aおよび11B)。これらの分子のDMOX誘導体の質量スペクトル分析を行ったところ、m/z 153に顕著なイオンピークがあること (これは<sup>5</sup>位における二重結合の指標である) を含め、20:3<sup>5, 11, 14</sup>および20:4<sup>5, 11, 14, 17</sup>に関して公知の値と一致する結果が得られた。しかし、これらの脂肪酸はアラキドン酸 (20:4<sup>5, 8, 11, 14</sup>) と同じ程度には産生されないことが見出された (図12)。これらの実験では、外因性の供給ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸 (20:3<sup>8, 11, 14</sup>) の55%がアラキドン酸に転換されたが、18:1基質、20:3<sup>11, 14</sup>基質および20:2<sup>11, 14, 17</sup>基質は5%、27%および26%しか転換されなかった (図12)。

30

#### 【0120】

構成性ADHプロモーターを含む酵母発現ベクターpMK195においてfat-3遺伝子を発現させた。公知の結果と一致して (Napierら、*Biochem. J.* 330: 611~614, 1998)、FAT-3蛋白質はリノール酸 (18:2<sup>9, 12</sup>) を不飽和化して $\gamma$ -リノレン酸 (18:3<sup>6, 9, 12</sup>) を生成することが可能である。また、FAT-3が $\gamma$ -リノレン酸 (18:3<sup>9, 12, 15</sup>) を不飽和化して18:4<sup>6, 9, 12, 15</sup>を生成するという、哺乳動物における一般的な反応を生じうることも明らかになった。FAT-3蛋白質は、20:1<sup>11</sup>、20:2<sup>11, 14</sup>、20:3<sup>8, 11, 14</sup>または20:3<sup>11, 14, 17</sup>における活性は示さなかった。このため、センチュウ<sup>5</sup>-不飽和化酵素および<sup>6</sup>-不飽和化酵素の基質特異性は特異的であり、重複しないことが明らかにされた。

40

#### 【0121】

##### 実施例13: ミドリムシ<sup>8</sup>-不飽和化酵素に関する考察

これまでにクローニングされたどの遺伝子についても、<sup>8</sup>位での不飽和化は報告されていない (Tocherら、*Prog. Lipid Res.* 37: 73~117, 1998)。

#### 【0122】

50

推定EFD1蛋白質は、FAT-3およびFAT-4といずれも33%のアミノ酸同一性を有し(図9)、クローニングされたルリヂサ<sup>6</sup>-不飽和化酵素との同一性は28%であった。最も高度な配列保存性が認められたのは、不飽和化酵素活性に重要なHisボックスモチーフにおいてであり、これは活性部位のオキシ二鉄(diiron-oxo)成分として働くためである可能性が高い(Shanklinら、Biochemistry 33:12787~12794、1994)。FAT-3およびFAT-4に保持されているシトクロムb<sub>5</sub>の必須残基(Lederer、Biochimie 76:674~692、1994)の大部分がEFD1蛋白質にも存在している場合、配列保存性はまたN末端シトクロムb<sub>5</sub>様ドメインにおいても明らかであった(図3)。

#### 【0123】

酵母におけるEFD1遺伝子の発現を用いて、活性の特徴を調べた。<sup>11</sup>位に二重結合を有する3つの異なるC20基質を不飽和化し(図4)、産物を分析したところ、それぞれについて不飽和化が<sup>8</sup>位で生じたことが示された(図5)。クローニングされたミドリムシ不飽和化酵素は代謝的に重要な基質に明らかな偏好性を示し、20:2および20:3に対する偏好性は20:1よりも2倍以上高かった(Ulsamerら、J. Cell Biol. 43:105~114、1969)。EFD1が他のミクロソームの不飽和化酵素と極めて類似しているにもかかわらず、<sup>5</sup>-不飽和化および<sup>6</sup>-不飽和化における基質の不活性に証明されるように、その活性は特殊であった(図12)。

#### 【0124】

<sup>8</sup>-不飽和化のためのC20基質は、従属栄養的に増殖したミドリムシにおいて入手される(図2)。典型的な<sup>6</sup>-不飽和化と競合して、20:2および20:3は18:2および18:3の伸長によって産生されることから、同様の基質はまた哺乳動物にもみられる(図1)。ラット肝臓ホモジネートを用いた標識化実験から、C18脂肪酸の伸長はそれと競合する不飽和化よりも5倍以上速いことが示されている(Pawloskyら、J. Lipid Res. 33:1711~1717、1992)。

#### 【0125】

現在の理解に事実上含まれているC20多価不飽和脂肪酸の生合成の<sup>6</sup>経路とは、経路の流れを制御するための不飽和化と伸長の繰り返しの依ったものである。伸長はしばしば非特異的であると考えられるが、不飽和化のほとんどは基質の鎖長および脂肪酸の不飽和化パターンの双方に関して特異的である(Heinz、植物における脂質代謝(Lipid Metabolism in Plants)、pp.33~89、1993)。しかし、哺乳動物組織(BernertおよびSprecher、Biochim. Biophys. Acta. 398:354~363、1975; Albertら、Lipids 14:498~500、1979)およびセンチュウ<sup>5</sup>-不飽和化酵素遺伝子を発現する酵母(図12)を用いた実験によるデータからは、<sup>5</sup>酵素が、<sup>8</sup>位ではなく<sup>11</sup>位に二重結合をもつ脂肪酸を不飽和化し、メチレン非断続性の20:3化合物および20:4化合物を有意な速度で産生することが示されている。<sup>8</sup>経路の場合、<sup>8</sup>-不飽和化は20:2基質および20:3基質における<sup>5</sup>活性と競合して起こる。<sup>5</sup>酵素の乱交雑にかかわらず、哺乳動物組織の脂質プロフィールには<sup>5</sup>・<sup>11</sup>(Heinz、植物における脂質代謝(Lipid Metabolism in Plants)、pp.33~89、1993; およびUlsamerら、J. Cell Biol. 43:105~114、1969)不飽和化パターンを有する脂肪酸は含まれず、それらはミドリムシにおいても見られない。

#### 【0126】

一つの説明として、一般的な基質の<sup>8</sup>-不飽和化は非常に速く起こるが、<sup>5</sup>-不飽和化の進行はそれよりも遅いため、<sup>5</sup>・<sup>11</sup>産物はほとんど形成されないといえる。この説明を裏づけるように、酵母で発現した場合、同様に発現した<sup>5</sup>-不飽和化酵素と比べてミドリムシ<sup>8</sup>は非常に活性な不飽和化酵素であると考えられる(図4)。ミドリムシ不飽和化酵素は、急速に増殖するミドリムシ培養物の長鎖多価不飽和脂肪酸のすべてを担うだけの十分な活性を有する必要がある(図2)。これに対して、哺乳動物組織における既知の<sup>8</sup>-不飽和化の速度は比較的遅い。<sup>6</sup>活性のない癌性組織において見かけの速度が最も高く、<sup>8</sup>-不飽和化は、<sup>6</sup>活性を有する同等の正常組織のレベルのわずか17%のアラキドン酸の産生を可能にする(Grammatikosら、Br. J. Cancer 70:219~227、1994)。

## 【0127】

または、膜における<sup>5</sup>,<sup>11</sup>不飽和脂肪酸の欠乏は、<sup>8</sup>-不飽和化酵素がこれらの脂肪酸を不飽和化に利用すると仮定すれば説明されうる。<sup>8</sup>-不飽和化が<sup>5</sup>活性に先行するという従来の決まり(図1)は、不飽和化反応が脂肪酸の炭化水素鎖に沿って連続して進行するという観察に基づく。<sup>5</sup>-飽和が<sup>8</sup>-不飽和化に先行するという逆の順序の不飽和化も主張されており(Takagi、J. Chem. Bull. Japan 38:2055~2057、1965)、哺乳動物の肝臓においては否定され(Schlenkら、Lipids 5:575~577、1970)、重水素化基質を用いた神経膠腫細胞における実験に基づいて、可能性の高い経路であると提唱されている(Cookら、J. Lipid Res. 32:1265~1273、1991)。

## 【0128】

ミドリムシにおいては、<sup>8</sup>-不飽和化の産物である20:3<sup>8,11,14</sup>および20:4<sup>8,11,14,17</sup>は、膜に直接取り込まれることができ、またはアラキドン酸およびエイコサペンタエン酸を産生するために、<sup>5</sup>位における不飽和化に供されることができる(Hulanickaら、J. Biol. Chem. 239:2778~2787、1964)。さらなる伸長および不飽和化によって、いくつかのC22多価不飽和脂肪酸がもたらされる(図2)。哺乳動物では、産物が<sup>8</sup>活性または<sup>6</sup>活性のいずれに由来するかにかかわらず、類似の過程によってほとんどはアラキドン酸、エイコサペンタエン酸およびドコサヘキサエン酸(22:6(Hwang、「食物中の脂肪酸およびその健康への影響(Fatty Acids in Foods and Their Health Implications)」、pp.545~557、1992;BernertおよびSprecher、Biochim. Biophys. Acta 398:354~363、1975;LeesおよびKorn、Biochemistry 5:1475~1481、1966;AlbertおよびConiglio、Biochim. Biophys. Acta 489:390~396、1977;Bardonら、Cancer Lett. 99:51~58、1996;ならびにSprecherおよびLee、Biochim. Biophys. Acta. 388:113~125、1975)が産生されるが、いくつかの20:3はシリーズ1(series 1)エイコサノイド代謝調節因子へと直接代謝される(Hwang、「食物中の脂肪酸およびその健康への影響(Fatty Acids in Foods and Their Health Implications)」、pp.545~557、1992)。

## 【0129】

興味深いことに、<sup>8</sup>-不飽和化の代替経路は伸長段階から始まる。ミドリムシにおいては、伸長は標準的な経路であり、これによってかなりの量の20:2(7.4%)および20:3(1.4%)が産生される(図2)。<sup>6</sup>活性がほとんどまたは全くない哺乳動物組織においては(Grammatikosら、Br. J. Cancer 70:219~227、1994)、これは必須脂肪酸18:2および必須脂肪酸18:3がそれぞれのC20誘導体に代謝される最初の段階と考えられる。最近、脂肪酸鎖伸長が脂肪酸生合成における調節段階として作用することが新たに重要視されている(Garciaら、Lipids 25:211~215、1990;Sprecherら、Prostag. Leukot. Essent. Fatty Acids 52:99~101、1995)。乳癌細胞は18:2よりも18:3を選択的に伸長させることができ、この伸長に続いて<sup>8</sup>-不飽和化が起こるという証拠(Bardonら、Cancer Lett. 99:51~58、1996)は、<sup>8</sup>-不飽和化がある種の癌細胞では重要な役割を果たしていることが示される。

## 【0130】

<sup>8</sup>-不飽和化酵素遺伝子の同定およびクローニングによって、C20多価不飽和脂肪酸の生合成のための代替経路の試験が可能になり、<sup>8</sup>-不飽和化の予想される機構に関する洞察も得られると考えられる。哺乳動物においては、この代替経路の作用は、多価不飽和脂肪酸に対する需要が律速段階である<sup>6</sup>-不飽和化を介した供給を上回るような、特殊化された組織に限定されると思われる。<sup>6</sup>-不飽和化がわずかであるか存在しない場合には、この経路は非常に重要でありうる。脂肪酸不飽和化酵素の代謝は、形質転換株(Grammatikosら、Ann. N. Y. Acad. Sci. 745:92~105、1994)および非形質転換株(Rosenthal、Prog. Lipid Res. 26:87~124、1987)の双方の多くの細胞株で乱されることから、<sup>8</sup>活性は<sup>6</sup>活性がない場合にのみ現れることができる。一方、細胞の腫瘍化に伴って<sup>8</sup>活性が出現または上昇することができる。<sup>8</sup>遺伝子の単離および試験、ならびにその基質特異性の分析により、哺乳動物の正常組織および癌性組織の双方における<sup>8</sup>活

10

20

30

40

50

性の役割の決定が容易になると思われる。

【0131】

実施例14：センチュウ<sup>5</sup>-不飽和化酵素に関する考察

本実施例において、本発明者らは、<sup>5</sup>-不飽和化酵素遺伝子および<sup>6</sup>-不飽和化酵素遺伝子を含むことが記載されている染色体IVの4.88位に位置するセンチュウ (*C. elegans*) ゲノムの領域について記載する。この2つの遺伝子によってコードされるアミノ酸配列は互いに46%の同一性をもち、それぞれが電子伝達体であるシトクロムb<sub>5</sub>に典型的なN末端ヘム結合ドメイン、および3つのヒスチジンボックスを含む。両方の遺伝子が、9位以下の炭素での二重結合挿入に関与するミクロソーム性不飽和化酵素に特有なことがこれまでに示されている、第3のHisボックスの共通配列 (QXXHH; 配列番号: 11) を含む。

10

【0132】

このような類似性があるにもかかわらず、これら2つのミクロソーム性不飽和化酵素が示す基質特異性は全く重複しない。酵母サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) において過剰発現させた場合、センチュウ<sup>6</sup>-不飽和化酵素 (FAT-3) は、リノール酸および $\gamma$ -リノレン酸という2種類のC18基質に特異的に作用し、常にメチレン断続性パターン (3つの炭素ごとに1つの二重結合が存在) で不飽和化を行う。哺乳動物<sup>6</sup>-不飽和化酵素系も同様に、メチレン断続性パターンにおいて二重結合を厳密に挿入し、C20基質に対する活性をもたないことが示されている (Schmitzら、*Lipids* 12: 307~313、1997)。これに対して、センチュウ<sup>5</sup>-不飽和化酵素 (FAT-4) は酵母の内因性18:1脂肪酸と同様多くのC20基質にも作用し、メチレン非断続性パターンにおいて二重結合を挿入することができる。

20

【0133】

20:2<sup>5, 11, 14</sup>、20:3<sup>5, 11, 14</sup>および18:2<sup>5, 11</sup>などのメチレン非断続性脂肪酸は、脂肪欠乏食で育てたラットに<sup>14</sup>C標識基質を与えることにより、哺乳動物細胞で検出される (Ulmanら、*Biochem. Biophys. Acta* 248: 186~197、1971)。しかし、これらは、プロスタグランジンなどのシグナル伝達分子に対する前駆体となることが示されておらず、脂肪欠乏食により前条件付け (preconditioned) されていないラットの組織脂質中にも検出されないため、「行き止まりの (dead end)」代謝産物と考えられる (本発明者らもまたセンチュウ脂質抽出物においてこれらの脂肪酸を検出しなかった)。

【0134】

センチュウ<sup>5</sup>-不飽和化酵素遺伝子を発現する酵母において、転換された基質の量は代謝的に意味のある基質20:3<sup>8, 11, 14</sup>で最も多かった (図13)。不飽和化された20:2<sup>11, 14</sup>および20:3<sup>11, 14, 17</sup>の量は、不飽和化された通常量の基質の量の半以下だった。これは哺乳動物肝臓のミクロソーム抽出物における不飽和化の速度と一致しており、標識化20:2<sup>11, 14</sup>の20:3<sup>5, 11, 14</sup>への転換速度は、標識化20:3<sup>8, 11, 14</sup>の20:4<sup>5, 8, 11, 14</sup>への転換速度の41%である (Bernetら、*Biochem. Biophys. Acta* 398: 354~313、1975)。

30

【0135】

センチュウfat-3遺伝子およびfat-4遺伝子は1つの遺伝子クラスター中に同じ5'→3'方向で存在する。しかし、センチュウにおけるこの種の他の遺伝子クラスターとは異なり、下流のfat-3遺伝子はSL2とトランススプライシングしないため、従って上流のfat-4遺伝子と同時転写される可能性は低いと思われる。この2つの遺伝子は太古の遺伝子重複事象の結果として互いに隣接して位置できたと考えられる。cDNAコード配列全体を通じてのDNA配列の同一性は54%である; しかし、これらの遺伝子は共通のイントロン/エクソン境界を全く持たない (図8)。

40

【0136】

これは、動物由来の初めて開示された<sup>5</sup>-不飽和化酵素遺伝子の配列である。センチュウ<sup>5</sup>-不飽和化酵素の配列は、すでに報告されている細菌および真菌の<sup>5</sup>-不飽和化酵素とは大きく隔たっており、該動物性配列は、ヒトおよび他の哺乳動物由来の不飽和化酵素をコードする配列の検索を容易にするはずである。<sup>5</sup>-不飽和化酵素および<sup>6</sup>-不飽

50

和化酵素はいずれもヒトにおいて重要な調節酵素である。それらは、食物性必須脂肪酸であるリノール酸およびリノレン酸から、ホルモン様エイコサノイド分子を合成するための前駆体を産生する経路における決定的な段階にかかわっている。これらの不飽和化酵素の活性はホルモンの制御下および栄養的制御下にあることが示されているが、制御機構は未だ未知である。

#### 【0137】

糖尿病などのある種の疾患は<sup>5</sup>-不飽和化酵素活性の低下をもたらし、一方、固形肝癌由来の腹水腫瘍から単離したHTC細胞では<sup>5</sup>-不飽和化酵素活性の上昇が認められる。センチュウでは変異および逆遺伝学のツールを用いることができ、細胞生物学および発生生物学の知見も増加しつつあることから、センチュウは発生、生殖および動物のその他の細胞段階における多価不飽和脂肪酸およびその代謝産物の役割を研究する上で魅力的な系となっている。

10

#### 【0138】

実施例15：本発明の<sup>5</sup>-不飽和化酵素遺伝子および<sup>8</sup>-不飽和化酵素遺伝子により形質転換された植物細胞

本明細書に記載した方法を用いることにより、C20多価不飽和脂肪酸の量が増大した植物を作出する目的で、本発明の<sup>5</sup>-不飽和化酵素および<sup>8</sup>-不飽和化酵素を植物中にクローニングして発現させることができる。このような植物は、容易に収穫可能で食用に適した形態での、これらの重要な脂肪酸の安価で便利な供給源を提供する。

#### 【0139】

20

例えば、本発明の<sup>5</sup>-不飽和化酵素および<sup>8</sup>-不飽和化酵素を、トウモロコシ、コムギ、ジャガイモ、トマト、ヤマノイモ(yams)、リンゴ、ナシなどの一般的な食用作物、またはヒマワリ、ナタネ、ダイズもしくはラッカセイ植物体などの脂肪種子植物中にクローニングすることができる。得られる植物は、C20多価不飽和脂肪酸の形成を触媒すると思われる適切な酵素を発現すると考えられる。脂肪種子植物の場合には、種子油はC20多価不飽和脂肪酸の豊富な供給源になると考えられる。

#### 【0140】

<sup>5</sup>-不飽和化酵素および<sup>8</sup>-不飽和化酵素遺伝子の宿主植物細胞におけるクローニングおよび発現は個別に行ってもよく、または一緒に行ってもよい。対応する不飽和化酵素を、プロモーター、エンハンサーおよび3'終止配列などの種々の異なる制御配列を用いて発現させることが可能である。これらの制御配列は、それぞれの不飽和化酵素の発現を個別に制御するために用いられうる。例えば、<sup>5</sup>-不飽和化酵素を強力なプロモーターの制御下におかれるようにクローニングでき、<sup>8</sup>-不飽和化酵素が弱いプロモーターの制御下におかれるようにクローニングできることにより、結果として<sup>5</sup>-不飽和化酵素を<sup>8</sup>-不飽和化酵素よりも多く発現するトランスジェニック植物が得られる。さらに、誘導物質、リプレッサー、抑制解除物質(de-repressor)または阻害物質などの適切な調節剤への植物細胞の曝露によって、1つまたは複数の関心対象の不飽和化酵素遺伝子を活性化されるプロモーターへ動作可能的に結合させることで、発現を制御することもできる。このような調節については前述で考察している。または、第1の遺伝子の発現を、第2の遺伝子の発現を誘導または抑制解除する誘導物質または抑制解除物質分子の発現と連結することにより、隣接していない遺伝子の発現を協調させることもできる。

30

40

#### 【0141】

本発明の遺伝子を、植物(例えば、アグロバクテリウムを介したT-DNA導入による)または動物(例えば、アデノウイルスベクターなどの広宿主域レトロウイルスの使用による)のゲノム中に組み込み、本発明の<sup>5</sup>-不飽和化酵素および<sup>8</sup>-不飽和化酵素をゲノムの一部として発現させることができる。トランスジェニック植物については、導入遺伝子(<sup>5</sup>および/または<sup>8</sup>)の宿主細胞ゲノムへの組み込みをもたらすと考えられるT-DNAベクターを用いてもよい。

#### 【0142】

例えば、アラビドプシス(Arabidopsis)などの植物における<sup>5</sup>-不飽和化酵素および

50

<sup>8</sup>-不飽和化酵素の発現は、それぞれの不飽和化酵素のcDNAを植物に導入するための植物形質転換ベクター構築によって達成されうる。ベクターは、不飽和化酵素蛋白質が種子成長中に発現されるように組織特異的プロモーターを含むことができる。種子特異的プロモーターの例には、ファゼオリンに対するプロモーター (van der GeestおよびHall、Plant Mol. Biol. 32 : 579 ~ 88、1996) またはナピン (napin) に対するプロモーター (Stalbergら、Plant Mol. Biol. 23 : 671 ~ 83、1993) が含まれる。用いられうるその他の種子特異的プロモーターは、アラビドプシス・ゲノムのゲノムBACクローンT24A18 (遺伝子座ATT24A18. (1999) 45980bp シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) DNA 第4染色体、アクセッション番号AL035680、NID g4490701) 上に位置するものである。これらのプロモーターはアラビドプシスにおける種子貯蔵蛋白質の発現を調節する。(Parcyら、Plant Cell 6 : 1567 ~ 1582、1994) に記載されているもののような、種子において遺伝子を特異的に発現させるその他のプロモーターも用いられうる。その後、不飽和化酵素コード配列およびプロモーター配列を含む構築物を、pART27 (Gleave、Plant Mol. Biol. 20 : 1203 ~ 1207、1992)、pGPTV (Beckerら、Plant Mol. Biol. 20 : 1195 ~ 7、1992) またはpJIT119 (Guerineauら、Plant Mol. Biol. 15 : 127 ~ 136、1992) に類似した標準的な植物形質転換T-DNAベクターに移行させることができる。2種類の構築物、すなわち一方が<sup>8</sup>-不飽和化酵素をコードし、もう一方が<sup>5</sup>-不飽和化酵素をコードする構築物で植物を形質転換する場合には、二重形質転換体のみが再生するように2つの異なる選抜マーカーを選択することが好ましい。例えば、カナマイシン (nptII) 遺伝子を含むように<sup>5</sup>-不飽和化酵素を有するベクターを構築し、フォスフィノスリシン (bar) 遺伝子を含むように<sup>8</sup>-不飽和化酵素を有するベクターを構築することができる。その後、カナマイシンおよびフォスフィノスリシンを含む培地で形質転換体を選抜する。アグロバクテリウムを介した減圧浸潤法 (Katavicら、Mol. Gen. Genet. 245 : 363 ~ 70、1994) またはそのフローラルディップ変法 (CloughおよびBent、Plant J. 16 : 735 ~ 43、1998) によって、アラビドプシスの形質転換を容易に行うことができるが、いくつかの他の方法もまた一般に用いられている。トランスジェニック子孫は、カナマイシンもしくはフォスフィノスリシンのいずれかまたはその両方などの

、適切な抗生物質または除草剤を用いた選抜によって同定されると考えられる。<sup>8</sup>構築物および<sup>5</sup>構築物は異なる選抜マーカーを用いているため、二重形質転換体は容易に単離される。トランスジェニック選抜で生き残った植物を成熟するまで育成し、種子を収集する。脂肪酸メチルエステルの単離およびその後の脂肪酸組成を決定するためのガスクロマトグラフィーによって、形質転換植物の種子を分析する。

#### 【0143】

<sup>8</sup>-不飽和化酵素のみを発現する植物は、アラビドプシス種子に天然に存在する20:1<sup>11</sup>脂肪酸を20:2<sup>8</sup>、<sup>11</sup>へと不飽和化すると考えられる。さらに、両方の不飽和化酵素により二重形質転換された植物から収穫した種子は、<sup>5</sup>-不飽和化酵素の発現の結果、<sup>8</sup>-不飽和化酵素植物の20:2<sup>8</sup>、<sup>11</sup>産物を20:3<sup>5</sup>、<sup>8</sup>、<sup>11</sup>に変換すると考えられる。これらの変化は脂肪酸メチルエステルの分析によって容易に検出されうると考えられる。

#### 【0144】

実施例16：本発明の<sup>5</sup>-不飽和化酵素遺伝子および<sup>8</sup>-不飽和化酵素遺伝子による形質転換がなされた酵母細胞

ミドリムシ<sup>8</sup>-不飽和化酵素を含むpJW541 (WallisおよびBrowse、Arch. Biochem. Biophys. 365 : 307 ~ 316、1999) のcDNA部分を、制限酵素EcoRIおよびSpeIを用いて該プラスミドから切り出した。挿入物を表す精製されたDNA断片を、適合性のある付着末端を得るためにEcoRI消化およびNheI消化により調製された酵母発現ベクターpYX232 (R&D Systems, Inc.) に連結した (プラスミドpYX232はトリプトファンに対する原栄養性 (TRP1変異) を酵母に付与するマーカーを有し、挿入DNAの構成性発現のためのトリオースリン酸イソメラーゼ (TPI) プロモーターを用いる)。得られたプラスミドpYX232-541を、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) の、ウラシルに対する原栄養性を酵母

に付与する<sup>5</sup>-不飽和化酵素 (pYFAT4; WattsおよびBrowse、Arch. Biochem. Biophys. 362: 175~182、1999) プラスミドをすでに有している株に、酢酸リチウム形質転換法 (In vitro) を用いて導入した。ウラシル原栄養性およびトリプトファン原栄養性に関して形質転換体の同時選抜を行った。形質転換後に生じた選択コロニーを、ウラシルおよびトリプトファンの両方を含まない酵母最小培地に播種した。

#### 【0145】

活性の分析に関しては、ナトリウム塩として提供された3種類の脂肪酸基質のうち1つを別々の培養物に対して、記載の通りに添加した (WallisおよびBrowse、Arch. Biochem. Biophys. 365: 307~316、1999)。28℃で一晩培養した後、培養物を遠心分離によって回収し、洗浄した。ミケル (Miquel) およびブラウズ (Browse)、J. Biol. Chem. 267: 1502~1509、1992に記載された標準的な方法を用いて、脂肪酸メチルエステルを調製した。

#### 【0146】

ガスクロマトグラフィーによる分析から、各基質が2回不飽和化されたことが示された。3種類の基質の取り込みには差がみられ、他の実験で示された通り (WallisおよびBrowse、Arch. Biochem. Biophys. 365: 307~316、1999およびWattsおよびBrowse、Arch. Biochem. Biophys. 362: 175~182、1999)、不飽和度の高い基質ほど細胞の脂肪酸組成物の主要な部分を占めた。不飽和部位が3つある基質20:3<sup>11,14,17</sup>についてはC20脂肪酸が全細胞脂肪酸の37%を占め、20:2<sup>11,14</sup>ではC20脂肪酸レベルは21%であり、20:1<sup>11</sup>ではC20脂肪酸レベルは13%にしか達しなかった。しかし、不飽和化酵素の活性は3種類の基質すべてに対して実質的に同一であった。70%~72%の間の基質は転換されず、17%または18%は一方の酵素のみによる単一の不飽和化を受けた。しかし、各基質において、11%~13%の間の基質は、共同作用する両方の酵素によって不飽和化され、供給した基質の分子よりも多い、2つの二重結合を持つ脂肪酸が生成された。

#### 【0147】

#### 【表2】

添加した脂肪酸	脂肪酸の取り込み*	転換されなかった基質#	不飽和化が加わったもの#	二重不飽和化産物#	
20:3 (11,14,17)	37	71	17	11	20:5 (5,8,11,14,17)
20:2 (11,14)	21	70	18	13	20:4 (5,8,11,14)
20:1 (11)	13	72	18	11	20:3 (5,8,11)

\* 細胞の脂肪酸全体に占める質量%

# 取り込まれたC<sub>20</sub>脂肪酸の質量%

#### 【0148】

前述の態様および実施例は例として提供されたものに過ぎず、決して特許請求される本発明の範囲を制限するためのものではない。

#### 【0149】

本発明の範囲または精神を逸脱することなく、本明細書に記載された発明が手順および詳細の点で改変されうるのは、当業者には明らかであると考えられる。本発明者らはこのような改変のすべてを特許請求する。

#### 【0150】

本明細書で参照した参考文献および刊行物は参照として本明細書に組み入れられる。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1A】 C18脂肪酸の<sup>6</sup>-不飽和化から始まり、続いてC2伸長が起こり、その後さらに不飽和化および伸長が起こる、C20多価不飽和脂肪酸の合成のための共通経路を

示す。

【図1B】 C18脂肪酸のC20脂肪酸への伸長から始まり、続いて<sup>8</sup>-不飽和化および<sup>5</sup>位での第2の不飽和化が起こる代替経路を示す。

【図1C】<sup>5</sup>-不飽和化酵素、<sup>6</sup>-不飽和化酵素および<sup>8</sup>-不飽和化酵素を用いてアラキドン酸およびEPAを産生する、多価不飽和脂肪酸の合成の代替経路を示す。

【図2】 シュークロスを炭素源として、暗所で（従属栄養的に）育成したミドリムシ（*E. gracilis*）由来の脂肪酸メチルエステルのガスクロマトグラフィー（GC）分析を示す。既知の標準との保持時間の比較によって、脂肪酸を同定した。重要なピークには番号を付し、保持時間および総脂肪酸に占める比率とともに示した。

【図3】 ミドリムシ<sup>8</sup>-不飽和化酵素蛋白質（EFD1）とセンチュウ（*C. elegans*）の不飽和化酵素の間のアミノ酸配列の類似性を示す。EFD1遺伝子の推定アミノ酸配列は、センチュウ<sup>6</sup>（FAT-3）-不飽和化酵素および<sup>5</sup>（FAT-4）-不飽和化酵素との類似性を示す（Napierら、*Biochem. J.* 330: 611~614、1998）。この類似性は機能保存領域で最も高い。N末端領域にはシトクロムb<sub>5</sub>様ドメイン（Lederer、*Biochimie* 76: 674~692、1994）を形成するアミノ酸が示される。同定された他の膜不飽和化酵素には、下線を施した文字で示されたHis-ボックスモチーフが存在する（Napierら、*Biochem. J.* 330: 611~614、1998；Michaelsonら、*J. Biol. Chem.* 273: 19055~19059、1998；ならびにShanklinおよびCahoon、*Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 611~641、1998）。

【図4】 組換え酵母由来の脂肪酸メチルエステルのガスクロマトグラフィーの結果を示す。対照pYES2、またはミドリムシ<sup>8</sup>-不飽和化酵素（EFD1）遺伝子を発現するpYES2-541のいずれかを含む酵母の培養物に、表記のC20脂肪酸を添加した。対照株は外因性脂肪酸を不飽和化しなかった。実験株では、不飽和化ピークを矢印で示す。

【図5】 不飽和化産物の質量分析（MS）の結果を示す。EFD1不飽和化産物のDMOX誘導体をGC-質量分析法によって分析した。各脂肪酸の分子イオンは、二重結合の挿入により予想された通り、供給した基質よりも2 a.m.u.（原子質量単位）小さかった。<sup>8</sup>位における不飽和化は、括弧によって示した各産物の特徴的なm/z 182およびm/z 194のピークによって確認された。

【図6A】 センチュウ（*Caenorhabditis elegans*）由来の脂肪酸<sup>5</sup>-不飽和化酵素の一次アミノ酸配列を示す。

【図6B】 センチュウ由来の脂肪酸<sup>5</sup>-不飽和化酵素をコードするORF（オープンリーディングフレーム）を含むヌクレオチド配列を示す。

【図7A】 原生生物ミドリムシ（*Euglena gracilis*）由来の脂肪酸<sup>8</sup>-不飽和化酵素の一次アミノ酸配列を示す。

【図7B】 原生生物ミドリムシ由来の<sup>8</sup>-不飽和化酵素をコードするORFを含むヌクレオチド配列を示している。

【図8】 センチュウ（*C. elegans*）<sup>5</sup>-不飽和化酵素遺伝子および<sup>6</sup>-不飽和化酵素遺伝子の構造のいくつかの特徴を示す。上方に遺伝子産物T13F2.1およびW08D2.4の相対位置をそれぞれのコスミド上に示した。下方に、SL1スプライス部位、シトクロムb<sub>5</sub>（cyt b<sub>5</sub>）のヘム結合モチーフおよび3つの保存的ヒスチジンボックスモチーフ（HBX）をコードする配列の部位を示すT13F2.1（fat-4）およびW08D2.4（fat-3）のエクソン構造を示している。

【図9】 ルリヂサ（*borage*）<sup>6</sup>-不飽和化酵素（bord6）、センチュウFAT-3（fat3）、センチュウFAT-4（fat4）およびモルティエラ・アルピナ（*Mortierella alpina*）<sup>5</sup>-（mord5）不飽和化酵素の推定アミノ酸配列の比較を示す。同一または保存的な残基には陰をつけ、保存的なHPGGヘム結合ドメインおよび保存的なヒスチジンボックスには下線を施した。略記：bord6 = ルリヂサ（*Borago officinalis*）<sup>6</sup>-不飽和化酵素（GenBankアクセッション番号U79010）；fat4 = センチュウFAT-4不飽和化酵素；fat3 = cDNA配列に基づいて編集され、アミノ酸38位~67位が除去されたW08D2.4のセンチュウ<sup>6</sup>-不飽和化酵素配列（GenBankアクセッション番号Z70271）；mord5 = モルティエラ・アルピナ<sup>5</sup>-不飽和化酵素（GenBankアクセッション番号AF054824）。

10

20

30

40

50



【図10A～10C】 ガスクロマトグラフ質量分析法（GC-MS）による、トランスジェニック酵母におけるアラキドン酸の同定を示す。0.2mMジホモ- $\gamma$ -リノレン酸を添加した誘導条件（2%ガラクトース）下で16時間育成したサッカロミセス・セレビシエ（*S. cerevisiae*）の総脂質の脂肪酸メチルエステルをGC-MSによって分析した。（A）（空）ベクター-pYES2により形質転換された酵母。（B）fat-4を有するpYES2ベクターにより形質転換された酵母。共通ピークは16:0（11.19分～11.12分）、16:1（11.38分）、18:0（13.07分～13.08分）、18:1（13.29分）、20:3（11.64分～11.65分）と同定された。新規ピークはアラキドン酸（14.49分）および18:2（12.91分）である。（C）14.49分に溶出するピークの質量スペクトル。このスペクトルはメチル-アラキドン酸基準試料のものと区別不能である。

10

【図11Aおよび11B】  $\delta^8$ -二重結合をもたない基質由来の新規不飽和化産物を示す。（A）20:2  $^{11,14}$ （14.81分）が添加された、fat-4  $^5$ -不飽和化酵素を発現する酵母由来の脂肪酸メチルエステルの部分GC図面。この基質の不飽和化産物は14.62分において溶出し、20:3  $^{5,11,14}$ と同定された。（B）20:3  $^{11,14,17}$ （14.87分）が添加された、fat-4  $^5$ -不飽和化酵素を発現する酵母の部分GC図面。この基質の不飽和化産物は14.69分において溶出し、20:4  $^{5,11,14,17}$ と同定された。

【図12】 センチュウ  $^5$ -不飽和化酵素および  $^6$ -不飽和化酵素の基質特異性を比較した表である。

【図13】 対照構築物pYES、およびミドリムシ  $\delta^8$ -不飽和化酵素遺伝子EGD1を含むクローンであるpYES-541による形質転換を受けた酵母株による脂肪酸の取り込みおよび不飽和化を比較した表である。対照ベクター（pYES）を含む、またはEGD1を発現する（pYES-541）サッカロミセス・セレビシエ株を、表記の脂肪酸の存在下で培養した。この培養物を収集、洗浄し、全細胞からメチルエステルを調製してGCによって分析した。総脂肪酸メチルエステルに占める重量%を示している。

20

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Browse, John et al.

&lt;120&gt; Desaturases and Methods of Using Them for Synthesis of Polyunsaturated Fatty Acids

&lt;130&gt; 53860

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;150&gt; 60/111,301

&lt;151&gt; 1998-12-07

&lt;160&gt; 13

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1461

&lt;212&gt; DNA

<213> *Caenorhabditis elegans*

&lt;400&gt; 1

```

gaatttttcaa tctctcttgg gtccaccgc tgtgatatca aaatgggtatt acgagagcaa 60
gagcaigagc cattcttcat taaaattgat ggaaaatggg gtcaaatga cgatgctgtc 120
ctgagatcac atccaggtgg tagtgcaatt actacctata aaaatatgga tgccactacc 180
gtattccaca cattccatac tgggttctaaa gaagcgtatc aatggctgac agaattgaaa 240
aaagagtgcc ctacacaaga accagagatc ccagatatta aggatgacc aatcaaagga 300
attgatgatg tgaacatggg aactttcaat atttctgaga aacgatctgc ccaataaaat 360
aaaagtttca ctgatctacg tatgcgagtt cgtgcagaag gacttatgga tggatctcct 420
ttgttctaca ttagaaaaat tcttgaaaca atcttcacaa ttctttttgc attctacctt 480
caataccaca catattatct tccatcagct attctaatgg gagtgtcgtg gcaacaattg 540
ggatggttaa tccatgaatt cgcacatcat cagttgttca aaaacagata ctacaatgat 600
ttggccagct atttcgttgg aaacttttta caaggattct catctgggtg ttggaaagag 660
cagcacaatg tgcacacgc agccacaaat gttgttgagc gagacggaga tcttgattta 720
gtcccatctc atgctacagt ggcagaacat ctcaacaatt attctcagga ttcattgggt 780
atgactctat tcagatggca acatgttcat tggacattca tgttaccatt cctccgtctc 840
tcgtggcttc ttcagtcaat catttttgtt agtcagatgc caactcatta ttatgactat 900
tacagaaata ctgcatgta tgaacagggt ggtctctctt tgcactgggc ttggtcattg 960
ggtcaattgt atttcttacc cgatttgtca actagaataa tgttcttctt tgtttctcat 1020
cttgttggag gtttctctgt ctctcatgta gttactttca atcattattc agtggagaag 1080
tttgcatgga gctcgaacat catgtcaaat tacgcttgtc ttcaaatcat gaccacaaga 1140
aatatgagac ctggaagatt cattgactgg ctttggggag gtcttaacta tcagattgag 1200
caccatcttt tcccaacgat gccacgacac aacttgaaca ctgttatgcc acttggttaag 1260
gagtttgagc cagcaaatgg ttaccatac atggtcgacg attatttcac aggattctgg 1320
cttgaatttg agcaattccg aaatattgca aatgttgctg ctcaattgac taaaaagatt 1380
gcctagatta cgattaatta atcaatttat ttcatgttc tattcgtgtg ttttaattat 1440
ttccaaattt ttacctattc c 1461

```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 447

&lt;212&gt; PRT

<213> *Caenorhabditis elegans*

&lt;400&gt; 2

```

Met Val Leu Arg Glu Gln Glu His Glu Pro Phe Phe Ile Lys Ile Asp
  1             5             10             15

```

```

Gly Lys Trp Cys Gln Ile Asp Asp Ala Val Leu Arg Ser His Pro Gly

```

10

20

30

40

40

Ile Met Ser Asn Tyr Ala Cys Leu Gln Ile Met Thr Thr Arg Asn Met  
 355 360 365

Arg Pro Gly Arg Phe Ile Asp Trp Leu Trp Gly Gly Leu Asn Tyr Gln  
 370 375 380

Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg His Asn Leu Asn Thr  
 385 390 395 400

Val Met Pro Leu Val Lys Glu Phe Ala Ala Ala Asn Gly Leu Pro Tyr  
 405 410 415

Met Val Asp Asp Tyr Phe Thr Gly Phe Trp Leu Glu Ile Glu Gln Phe  
 420 425 430

Arg Asn Ile Ala Asn Val Ala Ala Lys Leu Thr Lys Lys Ile Ala  
 435 440 445

10

<210> 3  
 <211> 1275  
 <212> DNA  
 <213> *Euglena gracilis*

<400> 3  
 attttttttt gaaatgaagt caaagcgcca agcgctatcc ccettacaat tgatggaaca 60  
 aacatatgat gtggtcaatt tccaccttg gggtgcggaa attatagaga attaccaagg 120  
 aagggatgcc actgatgcct tcatgggtat gcactttcaa gaagccttcg acaagctcaa 180  
 gcgcagtgccc aaaatcaatc ccagttttga gttgccaccc caggctgcag tgaatgaagc 240  
 tcaagaggat ttccggaagc tccgagaaga gttgatcgca actggcatgt ttgatgcctc 300  
 cccctctctg tactcataca aaatcagcac cacactgggc cttggagtgc tgggttattt 360  
 cctgatgggt cagtatcaga tgtatttcct tggggcagtg ttgcttggga tgcactatca 420  
 acagatgggc tggctttctc atgacatttg ccaccaccag actttcaaga accggaactg 480  
 gaacaacctc gtgggactgg tatttggcaa tgggtctgcaa ggtttttccg tgacatgttg 540  
 gaaggacaga cacaatgcac atcattcggc aaccaatgtt caagggcacg accctgatat 600  
 tgacaacctc ccccccctag cctgggtctga ggatgacgtc acacgggcgt caccgatttc 660  
 ccgcaagctc attcagttcc agcagtacta tttcttggtc atctgtatct tgttgcggtt 720  
 catttgggtg ttccagtgcg tgttgaccgt gcgcagtttg aaggacagag ataaccaatt 780  
 ctatcgctct cagtataaga aggaggccat tggcctcgcc ctgcaactgga ccttgaaggc 840  
 cctgttccac ttattcttta tgcccagcat cctcacatcg ctgttgggtg ttttcgtttc 900  
 ggagctggtt ggcggtctcg gcattgcgat cgtgggtgtt atgaaccact acccactgga 960  
 gaagatcggg gaccocagtct gggatggcca tggattctcg gttggccaga tccatgagac 1020  
 catgaacatt cggcgaggga ttatcacaga ttgggttttc ggaggcttga attaccagat 1080  
 tgagcaccat ttgtggccga cctccctcgc ccacaacctg acagcgggta gctaccaggt 1140  
 ggaacagctg tgccagaagc acaacctgcc gtatcggaac ccgctgccc atgaagggtt 1200  
 ggtcatcctg ctgcgctatc tggcggtgtt cgcccgatg gcggagaagc aaccgcggg 1260  
 gaaggctcta taagg 1275

20

30

<210> 4  
 <211> 422  
 <212> PRT  
 <213> *Euglena gracilis*

<400> 4  
 Met Lys Ser Lys Arg Gln Ala Leu Ser Pro Leu Gln Leu Met Glu Gln  
 1 5 10 15

Thr Tyr Asp Val Ser Ala Trp Val Asn Phe His Pro Gly Gly Ala Glu  
 20 25 30

Ile Ile Glu Asn Tyr Gln Gly Arg Asp Ala Thr Asp Ala Phe Met Val  
 35 40 45  
 Met His Phe Gln Glu Ala Phe Asp Lys Leu Lys Arg Met Pro Lys Ile  
 50 55 60  
 Asn Pro Ser Phe Glu Leu Pro Pro Gln Ala Ala Val Asn Glu Ala Gln  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Arg Lys Leu Arg Glu Glu Leu Ile Ala Thr Gly Met Phe  
 85 90 95  
 Asp Ala Ser Pro Leu Trp Tyr Ser Tyr Lys Ile Ser Thr Thr Leu Gly  
 100 105 110  
 Leu Gly Val Leu Gly Tyr Phe Leu Met Val Gln Tyr Gln Met Tyr Phe  
 115 120 125  
 Ile Gly Ala Val Leu Leu Gly Met His Tyr Gln Gln Met Gly Trp Leu  
 130 135 140  
 Ser His Asp Ile Cys His His Gln Thr Phe Lys Asn Arg Asn Trp Asn  
 145 150 155 160  
 Asn Leu Val Gly Leu Val Phe Gly Asn Gly Leu Gln Gly Phe Ser Val  
 165 170 175  
 Thr Cys Trp Lys Asp Arg His Asn Ala His His Ser Ala Thr Asn Val  
 180 185 190  
 Gln Gly His Asp Pro Asp Ile Asp Asn Leu Pro Pro Leu Ala Trp Ser  
 195 200 205  
 Glu Asp Asp Val Thr Arg Ala Ser Pro Ile Ser Arg Lys Leu Ile Gln  
 210 215 220  
 Phe Gln Gln Tyr Tyr Phe Leu Val Ile Cys Ile Leu Leu Arg Phe Ile  
 225 230 235 240  
 Trp Cys Phe Gln Cys Val Leu Thr Val Arg Ser Leu Lys Asp Arg Asp  
 245 250 255  
 Asn Gln Phe Tyr Arg Ser Gln Tyr Lys Lys Glu Ala Ile Gly Leu Ala  
 260 265 270  
 Leu His Trp Thr Leu Lys Ala Leu Phe His Leu Phe Phe Met Pro Ser  
 275 280 285  
 Ile Leu Thr Ser Leu Leu Val Phe Phe Val Ser Glu Leu Val Gly Gly  
 290 295 300  
 Phe Gly Ile Ala Ile Val Val Phe Met Asn His Tyr Pro Leu Glu Lys  
 305 310 315 320  
 Ile Gly Asp Pro Val Trp Asp Gly His Gly Phe Ser Val Gly Gln Ile  
 325 330 335  
 His Glu Thr Met Asn Ile Arg Arg Gly Ile Ile Thr Asp Trp Phe Phe  
 340 345 350  
 Gly Gly Leu Asn Tyr Gln Ile Glu His His Leu Trp Pro Thr Leu Pro

10

20

30

40

355                      360                      365  
 Arg His Asn Leu Thr Ala Val Ser Tyr Gln Val Glu Gln Leu Cys Gln  
 370                      375                      380  
 Lys His Asn Leu Pro Tyr Arg Asn Pro Leu Pro His Glu Gly Leu Val  
 385                      390                      395                      400  
 Ile Leu Leu Arg Tyr Leu Ala Val Phe Ala Arg Met Ala Glu Lys Gln  
 405                      410                      415  
 Pro Ala Gly Lys Ala Leu  
 420

<210> 5  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

10

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer  
 <220>  
 <221> variation  
 <222> (1)..(27)  
 <223> y = t or c

<220>  
 <221> variation  
 <222> (1)..(27)  
 <223> n= a, t, c, or g

20

<220>  
 <221> variation  
 <222> (1)..(27)  
 <223> r = a or g

<400> 5  
 ggctggctga cncaygartt ytgycay

27

<210> 6  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

30

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer  
 <220>  
 <221> variation  
 <222> (1)..(30)  
 <223> n = a, t, g, or c

<220>  
 <221> variation  
 <222> (1)..(30)  
 <223> r = a or g

<220>  
 <221> variation

40

<222> (1)..(30)  
 <223> y = t or c

<400> 6  
 catcgttgga aanarrtgrt gytcdatytg 30

<210> 7  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer

<400> 7  
 cccgggaagc ttctcgagga attttcaatc ctcccttggt c 41 10

<210> 8  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer

<400> 8  
 cccgggtgga tccggaacat atcacacgaa acag 34

<210> 9  
 <211> 6  
 <212> RNA 20  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:  
 Polyadenylation Signal

<400> 9  
 aauaaaa 6

<210> 10  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer 30

<400> 10  
 tctgggatct ctggttcttg 20

<210> 11  
 <211> 9  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Histidine box

<400> 11  
 uuuuuuucg 9 40

<210> 12  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Histidine Box

<220>  
<221> VARIANT  
<222> (1)..(5)  
<223> Xaa = any amino acid

<400> 12  
His Xaa Xaa His His  
1 5

10

<210> 13  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

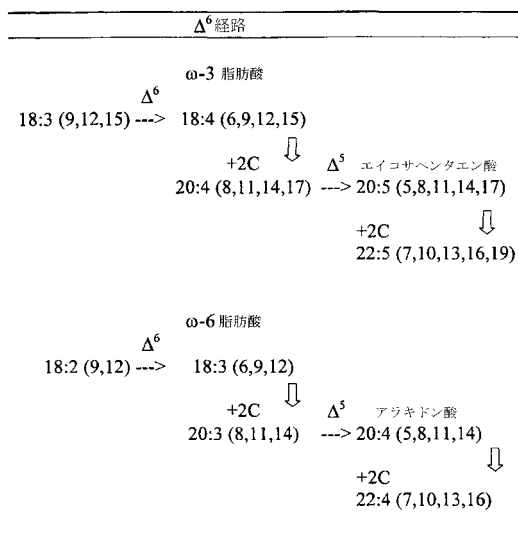
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Histidine Box

<220>  
<221> VARIANT  
<222> (1)..(5)  
<223> Xaa = any amino acid

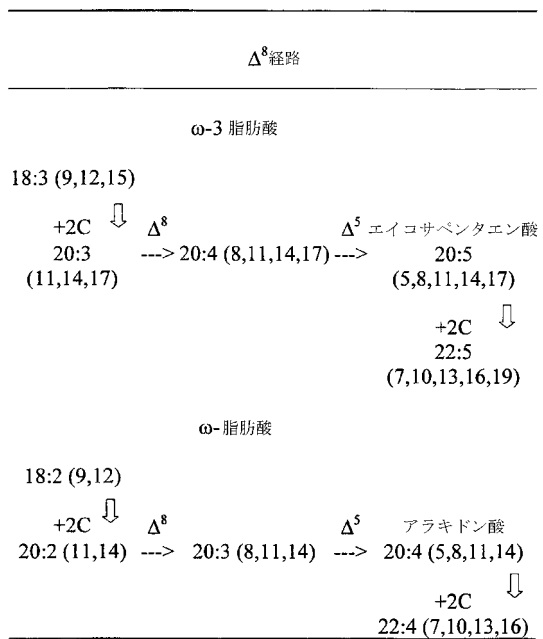
<400> 13  
Gln Xaa Xaa His His  
1 5

20

## 【図 1 A】

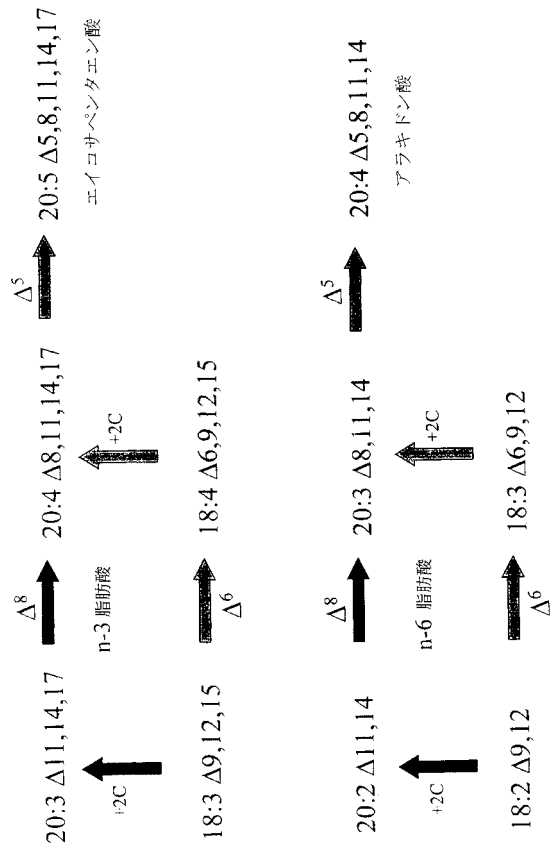


## 【図 1 B】

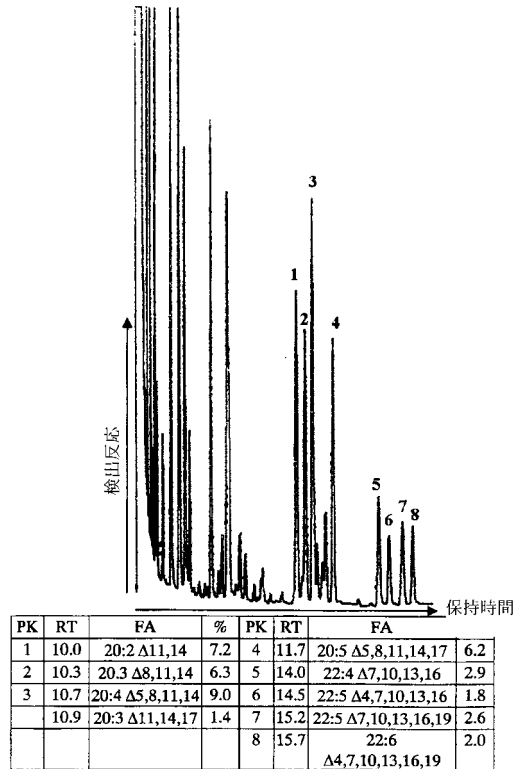




【図 1 C】



【図 2】



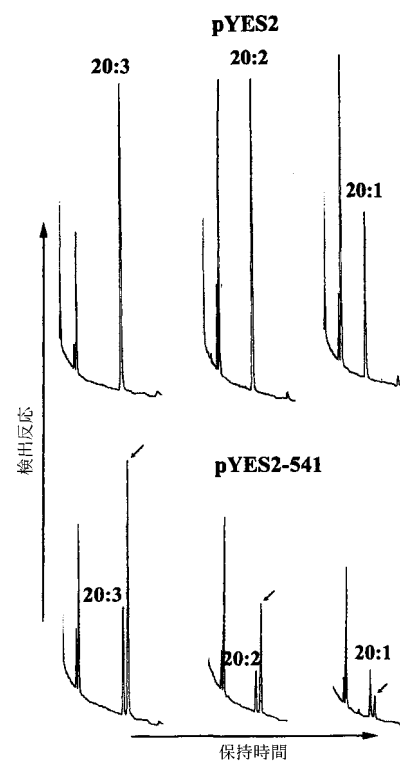
【図 3】

シクロクロム b<sub>5</sub> 様ドメインの氨基酸配列を示す図。図中、脂肪酸の組成変化を示す脂肪酸の組成は、 $\Delta^5$ 、 $\Delta^8$ 、 $\Delta^6$ 、 $\Delta^4$ 、 $\Delta^2$ 、 $\Delta^0$ の位置で示される。

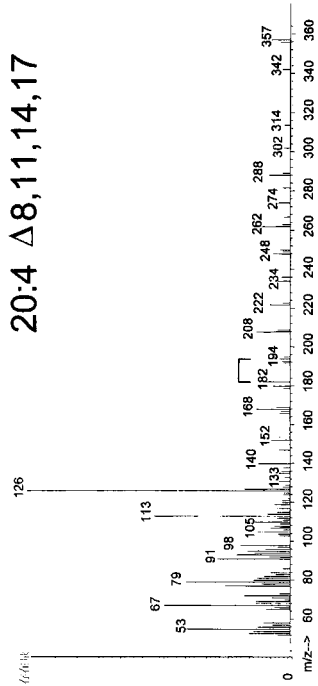
シクロクロム b<sub>5</sub> 様ドメインの氨基酸配列を示す図。図中、脂肪酸の組成変化を示す脂肪酸の組成は、 $\Delta^5$ 、 $\Delta^8$ 、 $\Delta^6$ 、 $\Delta^4$ 、 $\Delta^2$ 、 $\Delta^0$ の位置で示される。

シクロクロム b<sub>5</sub> 様ドメインの氨基酸配列を示す図。図中、脂肪酸の組成変化を示す脂肪酸の組成は、 $\Delta^5$ 、 $\Delta^8$ 、 $\Delta^6$ 、 $\Delta^4$ 、 $\Delta^2$ 、 $\Delta^0$ の位置で示される。

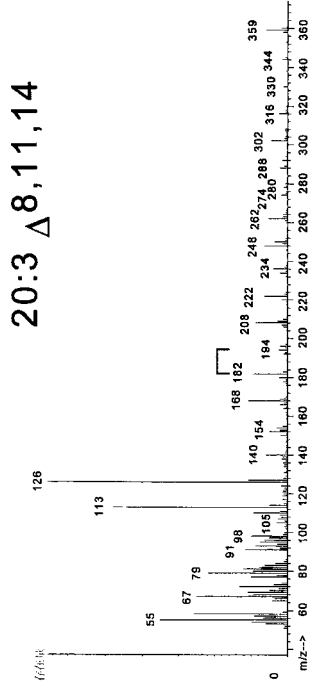
【図 4】



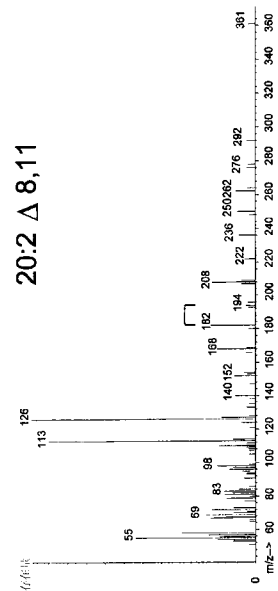
【 図 5 A 】



【 図 5 B 】



【 図 5 C 】



【 図 6 A 】

```
1 MYLREQEHEP FFIKIDGKWC QIDDAVLRSR PGGSALITTK NMDATTVEHT
51 FHTGSKEAYQ WLTELKKECP TQSEPIIDIK DDPINGIDDV NMGTFNISEK
101 RSAQINKSFT DLRMVRVARG LMDGSPLFYI RKILETIPTI LEAFYLVQYHT
151 YYLPSAILMG VANQQLGWLI HEFAHQFLPK NRYINDLASY FVGNFLQGS
201 SGGWKEQHNV HHAATNVVGR DGDLDLVFFY ATVAEHLNRY SQDSWVMTLF
251 RWQHVHNTFM LPFLRLSWLL QSIIFVSQMP TRYDYRYNT AIYEQVGLSL
301 HWANSLGQLY FLAPDMSTKIM FFLVSHLVGG FLLSHVVTFN KYSVEKFALS
351 SNIMSNYACL QIMITRMRP GRFIDWLWGG LNYQIEHRLF PTMPRHMLAT
401 VMPLVKEPAA ANGLPYMVD YPTQFWLEIE QFRNIANVAA KLYKKIA
```

## 【図 6 B】

1 GAATTTTCAA TCTCTCTGG GTCCGACGCG TTGTATATCA AATGTGTATT  
51 ACAGAGCCAA GAGCATGAGC CATCTCTCAT TAAATTTGAT GGAAATGTGT  
101 GTCAAAATGA CATCTCTCTC CTGAGATCAC ATCCAGGTGG TAGTGCATAT  
151 ACTACTATA AATATATGGA TGGCATACCC GTATTCGACA CATTCATCAC  
201 TGGTCTTAAA GAGGCTATCC AATGGCTGAC AGAATTTGAA AAGAGTGTCC  
251 CTACACAGA ACCGAGATC CCAGATATTA AGGTGACCC AATCAAGGA  
301 ATGTATGATG TGAACATGCG AACTTTCAAT ATTCTGAGA AAGCATCTGC  
351 CCAATAAAT AAAAGTTTCA CTGACTACAG TATGAGAGTT CGTCGAGAG  
401 GACTATGGA TGGATCTCTT TTTCTTACA TTGAGAAAT TCTTGAACA  
451 AACTTCAGAA TTTCTTTGG ATTCTACCTT CAATACCGCA CATATATCT  
501 TCCATCACTT ATTCTAATGG GAGTGTCTGG GCACCAATGG GAGTGTGTA  
551 TCCATGAATT CGCATATCAT CAGTTGTCCA AAAAGAGATA CTACATGAT  
601 TTGGCCAGCT ATTTCTGTGG AAATCTTTTA CAAGGATCTT CATCTGGTGG  
651 TTGGAAGAG CAGCACAATG TGCATACGCG AGCCACAAT GTTGTGGAC  
701 GAGACGGAGA TCTTGATTA GTCCCATCTT ATGCTACAGT GCGAGAACAT  
751 CTCACCAATT ATTCATGGA TTATGGGTT ATGACTATAT TCGAGTGGCA  
801 ACATTTCAAT TGGACATTA TGTACCATT CTTCTGCTTC TGTGGCTTC  
851 TTGAGTCAAT CATTTTGTG AGTCAGATGC CAATCATTA TTATGACTAT  
901 TACAGAAATA CTGGGATTA TGAAGAGTT GGTCTCTCTT TGCATGGGC  
951 TTGATCATGG GGTCAATTTT ATTCTCTACC CGATTGATCA ACTAAATAA  
1001 TTTCTTCTCT TTTCTCTCAT CTGTGTGAG GTTCTCTGCT CTCTCATGTA  
1051 GTTACTTTCA ATCATATATC AGTGAGAGAG TTGCTATGGA GCTGAGAACAT  
1101 CATGTCAAT CATGCTGTGC TTCAATCAT GACCGACAGA AATATGAGAC  
1151 CTGGAGATT CATGACTGG CTTTGGGGAG GTCTTAACATA TCGAGTTGAG  
1201 CACCATCTTT TCCCAAGAT GCGACGACAC AACTTGAACA CTGTATGGC  
1251 ACTTGTAAAG GAGTTTGGAG CAGCAATGG TTATCATATC ATGTGTGAG  
1301 ATTATTTTCA AGGATTTCTG CTGGAATTT AGCATTTCCG AATATTTGCA  
1351 AATGTGTGCT CTAAATGAC TAAAGAGAT GCTGAGATTA CATTAATTA  
1401 ATCAATTTAT TTCAATGTC TATGTGTGTT TTATATATTT TCCAAATTT  
1451 TTACCTATTC C

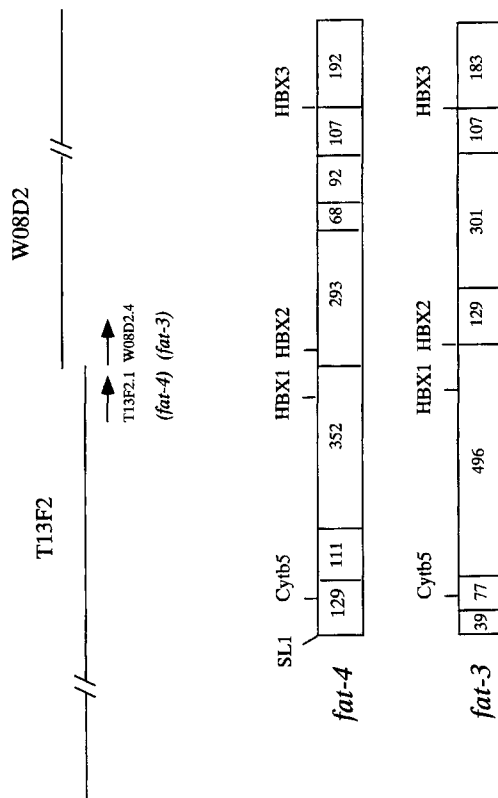
## 【図 7 A】

1 MKSKRQALSP LQLMBQTYDV SAWVPHPG AEIENYQGR DATDAPVMEH  
51 PQEAFDKLER MPKINPSFEL PPQAAVNEAQ EDFKLEEL IATGMPDASP  
101 LWYSYKIST LGLSVLGYFL MVQYQMYFEG AVLLGMHYQQ MGWLSHDICH  
151 HQTFFKRWNN NLVLVPGNG LQGPSVTCWK DRHNAHSAT NVQGHDPDID  
201 NLPLPASED DVTRASPISR KLIQFQYFF IVICILLRFI WCFQCVLTVR  
251 SLKDRNDQFY RSQYKKEAIG LALHNTLKL PHLFMPSPIL TSLVFFVSE  
301 LVGGFGIAIV VPMHYPLEK IGDVNDGNG FSUQIHEIM NIRRLIITW  
351 PFGGLNQIE HHLWPTLPH NLTAVSQVE QLCQKHLFY RNPLPHGLV  
401 ILLRYLAVFA RMAEKQAPAG AL

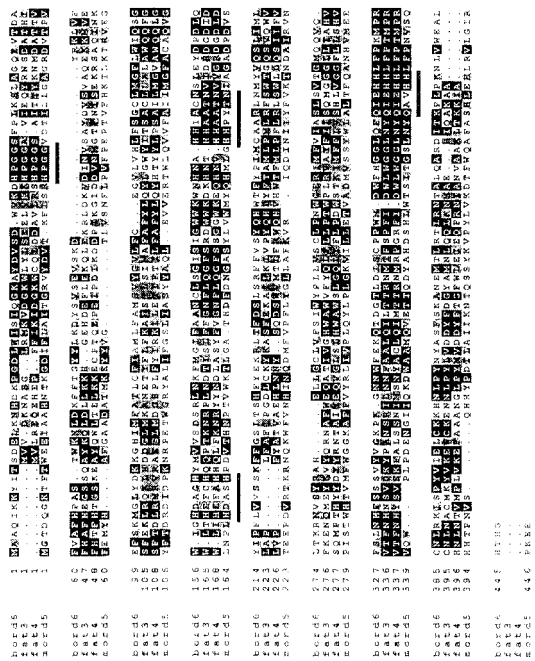
## 【図 7 B】

1 ATTTTTTTTC GAAATGAAT CAAGCGCCA AGCCTATCC CCCTTACAAT  
51 TGATGGAACA AACATATGAT GTGGTCAAT TCCACCTGG TGTGTGGGAA  
101 ATTATGAGA ATTACCAAG AGGAGATGC ACTATGCTT TCATGTTAT  
151 GCACTTTTCA GAAGCCTTGG ACAAGCTCAA GGCATGCCC AAATCAATC  
201 CCAGTTTGA GTTGCACCCC CAGGCTGCG TGAATGAAG TCAAGAGGAT  
251 TTCCCGAAG TCCGAGAGA GTTATGCGA ACTGCAATG TTGATGCTC  
301 CCCCCCTGG TACTCATACA AATCAGCAC CACTGCGG CTGAGAGTGC  
351 TGGGTATTT CCGATGTTT CAGTATCGA TGTATTTAT TGGGCGAGTG  
401 TTGCTGGGA TGCATATCA ACAGATGCG TGGCTTTCT ATGACATTTG  
451 CCAACCCAG ACTTTCAGA ACCGAGACTG GAACAACCTG GTGGAGTGG  
501 TATTTGGCAA TGGTTCGAA GTTTTTCGG TGACATGTT GAAGACAGA  
551 CACAATGAC ATCATTTGGC AACCAATGT CAAGGAGCAG ACCCTGATAT  
601 TGAACAACCT CCCCCCTG CCGTGTCTGA GGTAGAGTC ACACGGGCGT  
651 CACGATTTT CCGCAAGCTC ATTCAGTTC AGCAGTACTA TTTCTTGGTC  
701 ATCTGTATCT TGTGTGGTT CATTTGTGT TTCCAGTGG TGTGACCGT  
751 GCGCAGTTG AAGGACAGG ATAAACAAT CTATGCTCT CAGTATAGA  
801 AGGAGGCTT TGGCTGCGC CTGCACTGGA CCTGAAGGC CTTGTTCCAC  
851 TTAATCTTAA TGGCGAGCAT CCGCATGCG CTGTTGTGT TTTGTGTTT  
901 GGAGCTGTT GGCGGCTTG GCATTGCGT CCGTGTGTT ATGAACCACT  
951 ACCCATGGA GAAGATCGG GACCCAGTCT GGGATGGCCA TGGATTTCTG  
1001 GTTGGCGAGA TGCATGAGC CATGAACAT CGCGAGGGA TTATCAGAGA  
1051 TTGTTTTC GAGGCTTGA ATTACAGAT TGAACAACAT TTGTGCGGGA  
1101 CCGTCTCTG CCACAACCTG ACAGCGTTA GCTACAGGT GGAACAGCTG  
1151 TGCAGAGAG ACAACCTGCC GTATCGAAC CCGTACCCC ATGAAGGGTT  
1201 GTTCATCTG CTGCGCTATC TGGCGGTGTT CCGCGGATG GCGAGAGAGC  
1251 AACCGCGGG GAAGGCTCTA TAAG

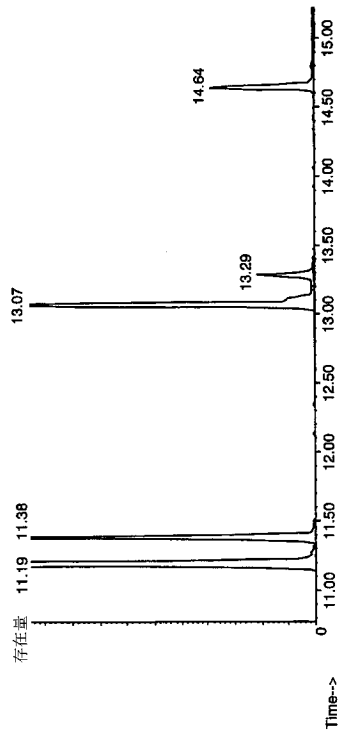
## 【図 8】



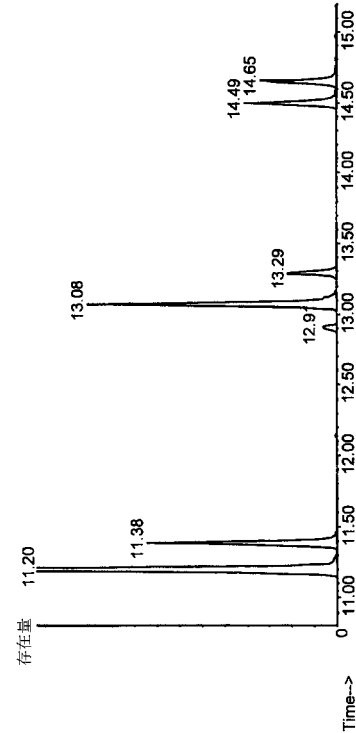
## 【図 9】



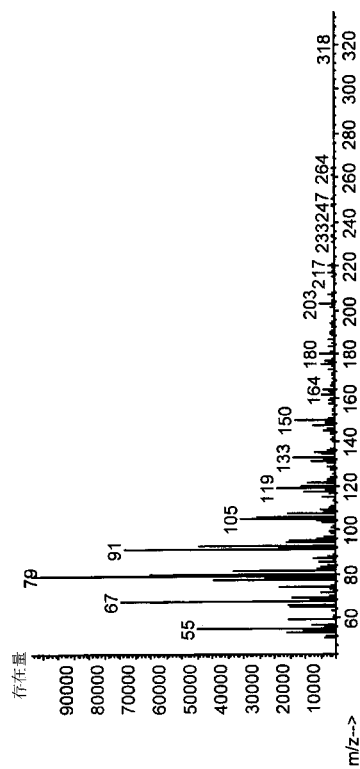
【図10A】



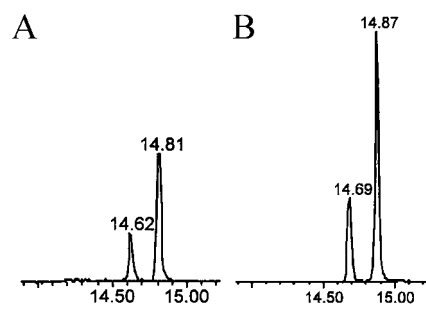
【図10B】



【図10C】



【図11】



【図12】

FAT-3 ( $\Delta^6$ -不飽和化酵素)		FAT-4 ( $\Delta^5$ -不飽和化酵素)	
基質	転換された基質の割合 (%)	基質	転換された基質の割合 (%)
18:1 $\Delta^9$	0	18:1 $\Delta^9$	5
18:2 $\Delta^9,12$	14	18:2 $\Delta^9,12$	0
18:3 $\Delta^9,12,15$	17	18:3 $\Delta^9,12,15$	0
20:1 $\Delta^{11}$	0	20:1 $\Delta^{11}$	0
20:2 $\Delta^{11,14}$	0	20:2 $\Delta^{11,14}$	27
20:3 $\Delta^{11,14,17}$	0	20:3 $\Delta^{11,14,17}$	26
20:3 $\Delta^{8,11,14}$	0	20:3 $\Delta^{8,11,14}$	55

【図 13】

	pYES		pYES-541	
	取り込み	不飽和化	取り込み	不飽和化
$\Delta^5$ 基質				
20:3 (11,14,17)	45.9	0	38.4	27.2
20:2 (11,14)	16.7	0	21.3	14.8
20:1 (11)	15.5	0	18.8	6.1
$\Delta^5$ 基質				
18:3 (9,12,15)	20.9	0	19.2	0
18:2 (9,12)	15.8	0	18.5	0
$\Delta^5$ 基質				
20:3 (8,11,14)	34.4	0	35.6	0

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

<b>A 0 1 K</b>	<b>67/033</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 0 1 K</b>	<b>67/033</b>	<b>5 0 1</b>
<b>C 1 2 N</b>	<b>1/15</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 1 2 N</b>	<b>1/15</b>	
<b>C 1 2 N</b>	<b>1/19</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 1 2 N</b>	<b>1/19</b>	
<b>C 1 2 N</b>	<b>1/21</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 1 2 N</b>	<b>1/21</b>	
<b>C 1 2 N</b>	<b>5/10</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 1 2 N</b>	<b>5/00</b>	<b>A</b>
<b>C 1 2 P</b>	<b>7/64</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 1 2 P</b>	<b>7/64</b>	
<b>C 1 2 Q</b>	<b>1/68</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 1 2 Q</b>	<b>1/68</b>	<b>A</b>

(72)発明者 ワッツ ジェニファー エル .

アメリカ合衆国 アイダホ州 モスコー ノース ヴァン ビューレン ストリート 3 0 4

審査官 六笠 紀子

(56)参考文献 特表 2 0 0 2 - 5 0 8 9 3 2 ( J P , A )

FEBS Letters,Nov.1998,Vol.439,p.215-218

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N 15/00-15/90

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq