

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-500514
(P2016-500514A)

(43) 公表日 平成28年1月14日(2016.1.14)

(51) Int.Cl.

C 12 N 1/13 (2006.01)
C 12 P 7/64 (2006.01)
C 12 N 15/09 (2006.01)
A 23 L 33/10 (2016.01)
A 61 K 8/36 (2006.01)

F 1

C 12 N 1/13
C 12 P 7/64
C 12 N 15/00
A 23 L 1/30
A 61 K 8/36

Z N A
A
Z
A
Z

テーマコード (参考)
2 B 15 O
4 B 01 8
4 B 02 4
4 B 06 4
4 B 06 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 88 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願2015-533701 (P2015-533701)

(86) (22) 出願日

平成25年10月1日 (2013.10.1)

(85) 翻訳文提出日

平成27年5月29日 (2015.5.29)

(86) 國際出願番号

PCT/GB2013/052553

(87) 國際公開番号

W02014/053821

(87) 國際公開日

平成26年4月10日 (2014.4.10)

(31) 優先権主張番号

1217524.6

(32) 優先日

平成24年10月1日 (2012.10.1)

(33) 優先権主張国

英國 (GB)

(71) 出願人 515088795

ロザムステッド リサーチ リミテッド
ROTHAMSTED RESEARCH
L I M I T E Dイギリス国 ハートフォードシャー エイ
エル5 2 ジェイキュー ハーベンテン
ウェスト コモン

(74) 代理人 100147485

弁理士 杉村 憲司

(74) 代理人 100119530

弁理士 富田 和幸

(74) 代理人 100136858

弁理士 池田 浩

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】組換え有機体

(57) 【要約】

本発明はオメガ3長鎖多価不飽和脂肪酸の高められた生
成を有する遺伝子組換え有機体に関する。

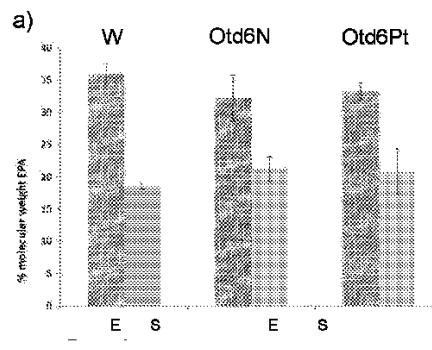


FIGURE 1 20°C 60 μmol photons m⁻² s⁻¹

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

オメガ3 LC-PUFAsの増加した生成を有するトランスジェニック微細藻類。

【請求項 2】

微細藻類は珪藻類である、請求項1に従うトランスジェニック微細藻類。

【請求項 3】

珪藻は*P. tricornutum*(フェオダクチラム・トリコルヌーム)である、請求項2に従うトランスジェニック微細藻類。

【請求項 4】

オメガ3 LC-PUFAはEPAまたはDHAから選ばれる、先行請求項に従うトランスジェニック微細藻類。 10

【請求項 5】

オメガ3 LC-PUFAはDHAである、請求項4に従うトランスジェニック微細藻類。

【請求項 6】

増加したDHA含有量は合計脂肪酸の割合としてコントロール微細藻類に比べて少なくとも1%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%またはそれよりも高く増加する、請求項5に従うトランスジェニック微細藻類。

【請求項 7】

5エロンガーゼをコードする核酸を発現する、先行請求項に従うトランスジェニック微細藻類。 20

【請求項 8】

前記核酸には、配列番号1か、または配列番号2に対して少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の相同性を有する 5エロンガーゼをコードする配列が含まれる、請求項7に従うトランスジェニック微細藻類。

【請求項 9】

トランスジェニック微細藻類は、さらに、LC-PUFA経路の調節に関するポリペプチドをコードする一以上の核酸を含む、請求項7ないし9のいずれかに従うトランスジェニック微細藻類。

【請求項 10】

前記核酸は、配列番号4または6か、または配列番号4または6に対して少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の相同性を有する 6デサチュラーゼがコードされる配列が含まれる 6デサチュラーゼをコードする、請求項9に従うトランスジェニック微細藻類。 30

【請求項 11】

核酸は、配列番号8または10か、または配列番号8または10に対して少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の相同性を有する6 デサチュラーゼがコードされる配列が含まれる6 デサチュラーゼをコードする、請求項9に従うトランスジェニック微細藻類。 40

【請求項 12】

オメガ3脂肪酸はEPAである、請求項1ないし4のいずれかに従うトランスジェニック微細藻類。

【請求項 13】

前記微細藻類は 6デサチュラーゼをコードする核酸を発現する、請求項12に従うトランスジェニック微細藻類。

【請求項 14】

前記核酸は、配列番号4または6か、または配列番号4または6に対して少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、

10

20

30

40

50

少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の相同性を有する 6デサチュラーゼがコードされる配列が含まれる 6デサチュラーゼをコードする、請求項12に従うトランスジェニック微細藻類。

【請求項 15】

前記核酸は、配列番号8または10か、または配列番号8または10に対して少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の相同性を有する 6デサチュラーゼがコードされる配列が含まれる 6デサチュラーゼをコードする、請求項12に従うトランスジェニック微細藻類。

【請求項 16】

前記核酸はさらに制御配列を含む、請求項7ないし15のいずれかに従うトランスジェニック微細藻類。

【請求項 17】

オメガ3 LC-PUFAsを生成させること、または一以上のオメガ3 LC-PUFAsを増大させることにおける、先行請求項に従うトランスジェニック微細藻類の使用。

【請求項 18】

オメガ3 LC-PUFAはEPAまたはDHAである、請求項17に従う使用。

【請求項 19】

オメガ3 LC-PUFAsはDHAである、請求項17に従う使用。

【請求項 20】

増加したオメガ3 LC-PUFAsの含量を有するトランスジェニック微細藻類を生産するための方法。

【請求項 21】

オメガ3 LC-PUFAはDHAであり、そして方法には、5エロンガーゼがコードされる核酸により微細藻類を変換することが含まれる、請求項20に従う方法。

【請求項 22】

オメガ3 LC-PUFAはEPAであり、そして方法には、6デサチュラーゼがコードされる核酸により微細藻類を変換することが含まれる、請求項20に従う方法。

【請求項 23】

微細藻類においてより一層多くのオメガ3 LC-PUFAの一つの生成を増大させるにあたり、

a) より一層多くのオメガ3 LC-PUFAsの一つの生成を可能にする条件下で請求項1ないし16のいずれかに従うトランスジェニック微細藻類を培養すること、および

b) 前記より一層多くのオメガ3 LC-PUFAの一つを、トランスジェニック微細藻類から得ること

を含む、方法。

【請求項 24】

前記オメガ3 LC-PUFAはDHAであり、そして方法には、

a) DHAの生成を可能にする条件下で請求項5ないし11または16のいずれかに従うトランスジェニック微細藻類を培養すること、および

b) 前記DHAをトランスジェニック微細藻類から得ること

が含まれる、請求項23に従う方法。

【請求項 25】

前記オメガ3 LC-PUFAはEPAであり、そして方法には、

a) EPAの生成を可能にする条件下で請求項12ないし16のいずれかに従うトランスジェニック微細藻類を培養すること、および

b) 前記EPAをトランスジェニック微細藻類から得ること

が含まれる、請求項20に従う方法。

【請求項 26】

請求項1ないし16のいずれかに従う微細藻類から分離される油または請求項1ないし16の

10

20

30

40

50

いずれかに従う微細藻類から得られる食物、飼料、栄養補助食料または化粧料。

【請求項 27】

請求項1ないし16に従うトランスジェニック微細藻類または請求項26に従う油を含む組成物。

【請求項 28】

薬としての使用のための請求項1ないし16のいずれかに従うトランスジェニック微細藻類を含む組成物。

【請求項 29】

アテローム性動脈硬化症、血栓症、高血圧、心筋梗塞を含む心臓血管状態およびアテローム性動脈硬化、炎症状態、うつ病、認知低下、関節炎、湿疹、メタボリックシンドromeおよびII型糖尿病の処置または防止における使用のための請求項1ないし16のいずれかに従うトランスジェニック微細藻類を含む組成物。10

【請求項 30】

食物、飼料、栄養補助食料または化粧料としての使用のための請求項1ないし16のいずれかに従うトランスジェニック微細藻類または請求項1ないし16のいずれかに従うトランスジェニック微細藻類を含む組成物。

【請求項 31】

飼料を作成するにあたり、

a) より一層多くのオメガ3 LC-PUFAsの一つの生成を可能にする条件下での請求項1ないし16のいずれかに規定の異種導入遺伝子が含まれるトランスジェニック微細藻類を培養すること、および20

b) 前記より一層多くのオメガ3 LC-PUFAの一つをトランスジェニック微細藻類から得ること

を含む、方法。

【請求項 32】

配列番号7または9が含まれる分離された核酸であって、配列番号8または10が含まれる 6デサチュラーゼ (Ost809_6)、その機能的変種または配列番号8または11に対して少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の相同性を有する 6デサチュラーゼがコードされる、核酸。30

【請求項 33】

配列番号15または17が含まれる分離された核酸であって、配列番号16または18が含まれる 4デサチュラーゼ (Ost809_4)、その機能的変種または配列番号16または18に対して少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の相同性を有する 4デサチュラーゼがコードされる、核酸。

【請求項 34】

配列番号19が含まれる分離された核酸であって、ID番号20その機能的変種が含まれる 6エロンガーゼ (FcEL06) または配列番号20に対して少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の相同性を有する 6エロンガーゼがコードされる、核酸。40

【請求項 35】

配列番号21が含まれる分離された核酸であって、ID番号22その機能的変種が含まれる 5デサチュラーゼまたは配列番号22に対して少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の相同性を有する 6エロンガーゼがコードされる、核酸。

【請求項 36】

請求項32、33、34および/または35に従う分離された核のものを含むベクター。

【請求項 37】

10

20

30

40

50

請求項36に従うベクターを含む宿主細胞。

【請求項38】

宿主細胞は藻類または高等植物細胞である、請求項37に従う宿主細胞。

【請求項39】

微細藻類でのオメガ3 LC-PUFAsの生産の増強、食物、飼料、栄養補助食料、化粧料または薬の調製における請求項32、33、34および/または34に従う分離された核酸の使用。

【請求項40】

オメガ3 LC-PUFAsはEPAまたはDHAである、請求項39に従う使用。

【請求項41】

微細藻類においてより一層多くのオメガ3 LC-PUFAの一つの生産を増大させるにあたり

10

a) より一層多くのオメガ3 LC-PUFAsの一つの生産を可能にする条件下で請求項30、31または32に規定する核酸の一以上を含む異種導入遺伝子が含まれるトランスジェニック微細藻類を培養すること、および

b) 前記より一層多くのオメガ3 LC-PUFAの一つを、トランスジェニック微細藻類から得ること

を含む、方法。

【請求項42】

異種 5エロンガーゼを発現する増加したDHAレベルを有するトランスジェニック有機体。

20

【請求項43】

5エロンガーゼはOstreococcus tauri (オストレオコッカス・タウリ)からの 5エロンガーゼである、請求42に従うトランスジェニック有機体。

【請求項44】

LC-PUFAの生合成経路の調節に関する他の異種導入遺伝子は、前記有機体において発現されない、請求項42および43に従うトランスジェニック有機体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

以下、本発明の分野を説明する。

30

本発明は、オメガ3長鎖多価不飽和脂肪酸の増強産生を有するトランスジェニック有機体、特に、トランスジェニック微細藻類、関連する方法および使用に関する。

【背景技術】

【0002】

以下に序論を述べる。

長鎖多価不飽和脂肪酸 (LC-PUFAs) は、少なくとも20個の炭素の長さの炭素骨格を有し、そして複数の二重結合の不飽和化を含む。長鎖多価不飽和脂肪酸は、オメガ3 (-3) またはオメガ-6 (-6) カテゴリーの、メチル、または 脂肪酸末端からの最初の二重結合の位置に基づいていざれかに分類することができる。

【0003】

オメガ-3 LC-PUFAs、特にエイコサペンタエン酸 (EPA; 20:5 5、8、11、14、17) およびドコサヘキサエン酸 (DHA; 22:6 4、7、10、13、16、19) は、ヒト栄養の必須成分であり、そして幼児または子供の成長および発達において、およびそれらの免疫系への影響を通じて健康を維持することにおいて、重要な役割を持つことは今日十分に確立されている [Voigt (フォークト) ら、2000; Calder (カルダー)、2003]。ヒトのダイエット (規定食) 中のオメガ-3 LC-PUFAsの存在は、心血管疾患、肥満、メタボリックシンドromeおよび湿疹のような状態における治療上の効果を有するという臨床研究からの証拠が増加している [Navarro (ナバロ) ら、2000; Nugent (ニュージェント)、2004; Das (ダス)、2002]。

40

【発明の概要】

50

【発明が解決しようとする課題】**【0004】**

海産魚はEPAおよびDHAの主要な栄養源ではあるが、海洋環境の魚類資源の消耗および汚染は、LC-PUFAsの代替物および持続可能なソースのための緊急の必要性を示す。海洋微生物は、水中食物連鎖において、LC-PUFAsの一次生産者であり、そして、EPAおよびDHAが豊富な微細藻類は、ヒトの消費のための魚油に対する有望な代替供給源であることが実証されている。このように、*Cryptocodium cohnii* (クリプテコディニウム・コーニー) および*Schizochytrium sp.* (シゾキトリウム種) の商業上の培養は、DHAの产生のために好首尾に開発され、および若干の海洋微生物は、EPA [*Nannochloropsis species* (ナンノクロロプシス種) 、*Phaeodactylum species* (フェオダクチラム種、海洋性珪藻種) 、*Nitzschia spp.* (ニッチア種群)] の産業上の生産についての可能性を実証した [Harwood (ハーウッド) およびGuschina (グッシナ) 、2009]。しかしながら、オメガ-3 LC-PUFAsのような大いに貴重な生産物の商業的生産は、維持するのに高価であり、そして本質上の技術的な課題である。

【0005】

LC-PUFAsのレベルを増加させるアプローチの一つは、アシル-CoA依存デサチュラーゼ [Venegas-Calero (ベネガス・キャレロン) ら、2010] を使用することである。近年では、かなりの焦点は、高等植物を、それらの種子油において超長鎖多価不飽和脂肪酸 (VLC-PUFAs) の生産のために操作することに置かれている。最近では、トランスジェニック (遺伝子導入) の*Arabidopsis* (シロイヌナズナ属) および*Camelina* (カメリナ) 植物においてLC-PUFAsを合成するために*Ostreococcus tauri* (オストレオコッカス・タウリ) (*OtD6*) からのアシルCoA依存 6-デサチュラーゼ (不飽和化酵素) を使用することの利益が実証されている [Sayanova (サヤノバ) ら、2012、Ruiz-Lopez (ルイス・ロペス) N. ら、2012]。これらの研究は、LC-PUFA経路、 6-不飽和化での最初のステップが律速であることを示す。

【0006】

LC-PUFAsを生産する代わりの方法として、微細藻類の代謝工学への関心が高まっており、および藻類の株の遺伝的改変は、持続可能なオメガ-3油を生産するために有望な戦略を代表する。商業的生産用に増加したレベルのLC-PUFAsを生産するために、微細藻類の効果的な組換え技術は、グローバルな必要性に対処し、そしてこのようにして操作された微細藻類は、世界的な需要を満たすために、水産養殖を含めて、食品添加物および動物用飼料として有用であろう。

【0007】

Phaeodactylum tricornutum (フェオダクチラム・トリコルヌツム) は、30 %までのEPAおよび痕跡量だけのDHAを蓄積し、そしてEPAの産業上生産のための良好な供給源と考えられている単細胞珪藻である [Molina Grima (モリナ・グリマ) ら、1996]。[14C]アセタート (酢酸塩) での第一標識実験は、*P. tricornutum*が脂肪酸の伸びおよび好気的不飽和化によってEPAをデノボ合成することを示唆した [Moreno (モレノ) ら、1979]。パルスチェイス実験においてArao (アラオ) およびYamada (ヤマダ) はEPAが4つの異なる経路によって合成できること、そして好ましい経路が双方のオメガ-6およびオメガ-3の経路の中間体に関与することを実証した (Arao よりYamada、1994)。EPAの大部分は、たとえば、トリアシルグリセロールなどのような中性脂質とは対照的に、ガラクト脂質において見出された [Arao ら、1987 ; Yongmanitchai (ヤングマニトチャイ) よりWarid (ウォード) 、1993]。最近、*P. tricornutum*においてEPA生合成に関与する 5-および

6-デサチュラーゼをコードする遺伝子がクローニングされ、そして特徴付けられた [Domerque (ドマーク) ら、2002]。双方のデサチュラーゼが双方の経路に等しく寄与するミクロソーム酵素であり、そしてそれらがオメガ-6およびオメガ-3の経路に同時に作用する好ましい経路をサポートすることが示された。このことは、*P. tricornutum*においてEPAの生合成に関与する 6-および 5-の不飽和化および 6-伸長 (エロングーション) が小胞体 (ER) において行われ、そして新たに合成されたEPAはプラスチド (色素体) 中に後

10

20

30

40

50

にインポートされることを示唆する。EPA生合成経路のすべての中間体のごくわずかな量だけの存在は、*P. tricornutum*が単一の最終生成物としてのEPAの蓄積に向けた非常に効率的なメカニズムを発達させたことを示す(AraoおよびYamada、1994)。いくつかの微細藻類では、EPAの伸長によってDHAは特異的な5-エロンガーゼによるドコサペンタエン酸(DPA; 22:5 7、10、13、16、19)にまで合成することができ、DPAは次いで4-デサチュラーゼによってDHAへの転換を伴う。

【0008】

本発明は、様々な有機体(生物と言うこともある)での、特に、藻類におけるLC-PUFAsの生成での欠点を減ずることを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

以下、本発明の概略を説明する。

本発明は、概して、トランスジェニック有機体類、特に、トランスジェニック微細藻類であって、LC-PUFAs、とりわけ、オメガ-3 LC-PUFAs、たとえば、DHAおよび/またはEPAなどのようなものの高められた生産を伴うものに関する。トランスジェニック有機体、特に、トランスジェニック微細藻類は、LC-PUFAsの生合成経路に関するポリペプチドをコードするーまたはそれよりも多く(ー以上)の異種核酸を発現する。本発明はまた、トランスジェニック有機体、特に、トランスジェニック微細藻類を作成(作出)するための方法、トランスジェニック有機体、特に、トランスジェニック微細藻類の使用、およびLC-PUFAs、特に、オメガ-3 LC-PUFAs、より一層具体的には、有機体、特に、微細藻類においてDHAおよび/またはEPAの生産を増加させるための方法に関する。本発明はまた、LC-PUFAs、特に、トランスジェニック有機体において、オメガ-3 LC-PUFAsの高められる生産のための方法において、分離された核酸およびそれらの使用に関する。

【0010】

本発明者らは、微細藻類が、LC-PUFAs、特に、EPAおよびDHAの増加した量を、異種遺伝子発現の使用により生産するために、組換え法を用いて操作することができるることを示した。本発明者らは、驚くべきことに、*Ostreococcus tauri*(オストレオコッカス・タウリ)単独からの5-エロンガーゼの異種発現が、トランスジェニック系統において合計脂肪酸の13%にまで達するDHAレベルを有する*P. tricornutum*(*P.トリコルヌーム*)におけるDHAの増加した蓄積をもたらすことを実証した。本発明者らはまた、*P.トリコルヌーム*でのOtD6の過剰発現がEPAレベルに対する正の効果を有することを示した。これらの知見は、異種遺伝子を発現し、およびトランスジェニック微細藻類での代謝工学を通してLC-PUFAsの生合成経路を高める有効性について証拠を提供する。さらに、動物および植物を含め、EPA/DHAを作る他の生物は、オストレオコッカス・タウリからの5-エロンガーゼの過剰発現によって同じように操作することができる。

【0011】

したがって、一見地(一態様ともいう)において、本発明は、ー以上のオメガ-3 LC-PUFAsの増加した生産を有するトランスジェニック微細藻類に関する。ー具体化(ー実施形態ともいう)において、オメガ-3 LC-PUFAsはDHAおよび/またはEPAから選択される。別の見地において、本発明は、オメガ-3 LC-PUFAsを生産するトランスジェニック微細藻類の使用に関する。別の見地において、本発明は、増加したオメガ-3 LC-PUFAsの含有量を有するトランスジェニック微細藻類を作成するための方法に関する。別の見地において、本発明は、微細藻類においてー以上のオメガ-3 LC-PUFAsの生産を増加させるための方法に關し、それには、

- a) 微細藻類において異種核酸を導入すること、および発現させること、
- b) 前記微細藻類を培養すること、および
- c) トランスジェニック微細藻類からの前記ー以上のオメガ-3 LC-PUFAを取得することが含まれる。

【0012】

別の見地において、本発明は、微細藻類においてDHAの生産を増加させる方法に関する

10

20

30

40

50

。別の見地において、本発明は、微細藻類においてEPAの生産を増加させる方法に関する。

【0013】

本発明はまた、ここに記載の微細藻類またはここに記載のトランスジェニック微細藻類またはそこからの生成物を含む組成物から分離（単離を含む）された油、およびその使用に関する。

【0014】

別の見地において、本発明は飼料を作成するための方法に関し、それには、

a) ここに記載のトランスジェニック微細藻類を培養すること、および

b) トランスジェニック微細藻類から前記一以上のオメガ-3 LC-PUFAを取得すること
が含まれる。

10

【0015】

別の見地において、本発明は、配列番号7または9が包含される分離された核酸で、配列番号8または10が含まれる 6-デサチュラーゼ (Ost809_6)、またはその機能的変種（変形物、変異体ともいう）または配列番号8または10に対して少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の相同性を有する 6-デサチュラーゼが含まれるものをコードするもの、およびそれらの使用に関する。本発明はまた、配列番号15または17が包含される分離された核酸で、配列番号16または18が含まれる 4-デサチュラーゼ (Ost809_4)、その機能的変種または配列番号16または18と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の相同性を有する 4-デサチュラーゼが含まれるものをコードするもの、およびその使用に関する。別の見地において、本発明は、配列番号19が包含される分離された核酸で、配列番号20が含まれる 6-エロンガーゼ (FcEL06)、その機能的変種または配列番号20と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の相同性を有する 6-エロンガーゼが含まれるものをコードするもの、および配列番号21が包含される分離された核酸で、配列番号22が含まれる 5-デサチュラーゼ、その機能的変種または配列番号22と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の相同性を有する 5-デサチュラーゼが含まれるものをコードするもの、およびそれらの使用に関する。
20

20

30

【0016】

別の見地において、本発明は、ここに記載の分離された核酸の、微細藻類または高等植物における、オメガ-3 LC-PUFAs、特に、DHAおよび/またはEPAの生産を増加させることについての使用に関する。

【0017】

さらに、本発明は、トランスジェニック有機体、好適には、微細藻類で、異種 5-エロンガーゼを発現する増加したDHAレベルを有するものに関する。

40

【図面の簡単な説明】

【0018】

図面を説明する。

本発明をさらに、以下の非制限的な図面において説明する。

【図1】二つの異なる増殖段階で異なる増殖条件下、a) 20[°]Cで60 μモル光子（フォトン）m⁻²s⁻¹；b) 20[°]Cで25 μモル光子m⁻²s⁻¹；c) 18[°]Cで25 μモル光子m⁻²s⁻¹でのO. tauri 6-デサチュラーゼ（不飽和化酵素）を発現するWTおよびトランスジェニックのP. tricornutumにおけるEPA含量の図である。

【図2】aは、対数期(E)および定常期(S)の間にOtE1o5を発現するWTおよびトランスジェニックP. tricornutumの細胞の全脂肪酸組成の図である。培養物は、一定の照明60 μモル光子·m⁻²s⁻¹下で攪拌しながら20[°]Cで増殖させた。各値は、3回の別々の実験の平均
50

± SDを表す。bはOtElo5を発現するWTおよびトランスジェニックP. tricornutumにおけるEPA<DPAおよびDHA含有量の図である。培養物を70rpmでの一定の攪拌下に20にて60 μモル光子m-2s-1下で増殖させた。各測定は3つの生物学的複製の平均である。

【図3】オストレオコッカスElo5(B)を発現するWT(A)およびトランスジェニックP. tricornutumのアシル-CoAプロファイルの図である。BにおけるLC-PUFAアシル-CoAsの蓄積は点線で囲まれる。内部標準(istd)が17:00アシル-CoAである。

【図4】WTおよびトランスジェニックOtElo5のP. tricornutumの細胞の全FA抽出物中のEPAおよびDHA含量の図である。

【図5 A】増殖の定常期におけるWTおよびトランスジェニックのP. tricornutumからのTAG種の分布の図である。

【図5 B】増殖の異なる段階でのWTおよびトランスジェニックのP. tricornutumからのTAG種の分布の図である。

【図6】増殖サイクルの異なる段階：特異的TAGsにおけるA-DHA；TAG含有DHAのB-%でのOtElo5を発現するWTおよびトランスジェニックP. tricornutumからのTAG種におけるDHAの分布の図である。

【図7】オメガ3 PUFA生合成経路の図である(略図)。

【図8】外因性の基質18:3n-3(ALA)の存在下でのトランスジェニック酵母におけるOst809 6-デサチュラーゼの発現の図である。(BPX72カラム)。ALAの高度不飽和形態への転換(SDA-矢印)に注目される。空ベクターを含む酵母株では転換が生じず(pYES2-C)、そしてOst809デサチュラーゼの発現がガラクトースの添加によって誘導されたときだけである(Gal+; B)。

【図9】酵母におけるOst809 6の機能的特徴の図である(BPX72カラム)。LAおよびALAを補充した酵母細胞。18:2(LA)および18:3(ALA)の双方を補充した酵母でのオストレオコッカス809 6の発現。ALAでまったくであるが、LAではなく、高度不飽和への特異的転換はないことに注目される。転換は空ベクターを含む酵母株では生じず(pYES2-C)、そしてOst809デサチュラーゼの発現がガラクトースの添加によって誘導されるときだけである(Gal+; B)。

【図10】DPAの存在におけるOst809 4デサチュラーゼを発現するトランスジェニック酵母のFAMEsプロファイル(C22:5n-3)。外因22:5(DPA)を補充した酵母細胞におけるオストレオコッカス809 4の発現。22:5n-3の高度不飽和形態への転換に注目される(22:6n-3; DHA-矢印)。転換は空ベクターを含む酵母株で行われず(pYES2-C)、Ost809 D4デサチュラーゼの発現がガラクトースの添加によって誘導されるときだけである(Gal+; B)。NB。これらのC22 PUFAは、HP1 GCカラム上で最も良好に分離され-この場合、(ポリ)不飽和脂肪酸がより一層少ない飽和形態よりも早く溶出し-これは、上記使用のBPX72カラムと比較して逆である。

【図11】FcElo6を発現するトランスジェニック酵母のFAMEのプロファイルの図である(BPX72カラム)。酵母は18:3n-6(GLA)で補充した。外因性18:3(GLA)を補充した酵母細胞におけるFragilaropsis cylindrus(フラジラリオプシス・シリンドラス)Elo6の発現。18:3 ALAの細長い形態20:3n-3への転換に注目される(矢印)。転換は、空ベクターを含む酵母株で発生せず(pYES2-C)、そしてFragilaropsis Elo6の発現がガラクトースの添加によって誘導されるときだけである(Gal+; B)。

【図12】n-3特異的Ost809 6デサチュラーゼおよび他の 6デサチュラーゼ間の関係を示す系統樹の図である。

【図13】最大で14-17%のDHAレベルの増加をもたらしたFcElo6の発現の図である。FcElo6を発現するPt細胞からの全FAプロファイルのGC-MS分析。

【図14】ベクターシステムpPTOS2の模式図である。

【図15】P. tricornutumにおける2つの異種オメガ-3 LC-PUFA生合成活性の同時発現の図である。16および20での増殖のS期の間でのPt_WT、pPhOS2.1(OtElo5を発現する)およびpPhOS2.2(OtD6PtおよびOtElo5を発現する)細胞の脂肪酸組成。値は3つの実験の平均である(+/-標準誤差)。

10

20

30

40

50

【図16】pPhOS_Ppglut (OtElo5およびPpグルコーストランスポーターを発現する)細胞の70rpmで一定の攪拌下、20 、100 μ モル $m^{-2}s^{-1}$ での増殖のS期の間での脂肪酸組成の図である。N=1。

【図17】pPhOS_Hsglut (OtElo5およびヒトグルコーストランスポーターを発現する)細胞の70rpmで一定の攪拌下、20 、100 μ モル $m^{-2}s^{-1}$ での増殖のS期の間での脂肪酸組成の図である。N=1。

【図18】暗所でのWtおよびpPhOS_Ppglut Pt細胞の増殖の図である。

【発明を実施するための形態】

【0019】

以下詳しく説明する。

10

【0020】

本発明を次に、さらに説明する。以下の節では、本発明の異なる見地をより一層詳細に規定する。そのように規定される各見地は、反することが明確に示されない限り、任意の他の見地または見地群(複数の意)と組み合わせてもよい。特に、好ましいか、または有利なものとして示される任意の特徴は、好ましいか、または有利なものとして示されている任意の他の特徴または特徴群と組み合わせることができる。

【0021】

本発明の実行は、別に示さない限り、微生物学、組織培養、分子生物学、化学、生化学および組換えDNA技術の慣習的技術を採用され、それらは当該技術の熟練の範囲内である。そのような技術は、文献において十分に説明されている。

20

【0022】

本発明は、微細藻類における脂肪酸生合成経路の遺伝子操作に関する。とりわけ、本発明は、LC-PUFA、特に、オメガ-3 LC-PUFAsの、たとえば、有機体(生物)、特に、微細藻類において一またはそれよりも多く(一以上)のオメガ-3 LC-PUFAの生産を増加させるための方法に関する。

【0023】

ポリ(多価)不飽和脂肪酸は、脂肪酸炭素鎖のメチル末端に最も近い最初の二重結合の位置(n)に応じて、2つの主要なファミリーに分類することができる。そのようにして、オメガ-6脂肪酸(-6)は、分子のオメガ(メチル)末端から最初の不飽和二重結合まで6個の炭素原子を有し、そしてさらに、合計または二以上の二重結合を有し、各々は続いて分子のカルボキシル末端に向かって3つの追加の不飽和発生炭素原子を有する。対照的に、オメガ-3脂肪酸(-3)は分子のオメガ末端から離れて最初の不飽和二重結合三つの炭素原子を有し、そしてさらに、三以上の二重結合の総数を有し、各々は続いて分子のカルボキシル末端に向かって3つの追加の不飽和を発生する炭素原子を有する。

30

【0024】

表Iは、オメガ3脂肪酸の一般名および本明細書を通して使用される略称を要約する。

【0025】

【表1】

表I

| 一般名 | 略称 | 簡便表記 |
|------------|------|--------------------------------|
| オレイン酸 | OA | 18:1 ^{Δ9} |
| リノール酸 | LA | 18:2 ^{Δ9,12} |
| γ-リノレン酸 | GLA | 18:3 ^{Δ6,9,12} |
| ジホモγ-リノレン酸 | DGLA | 20:3 ^{Δ8,11,14} |
| アラキドン酸 | ARA | 20:4 ^{Δ5,8,11,14} |
| α-リノレン酸 | ALA | 18:3 ^{Δ9,12,15} |
| ステアリドン酸 | SDA | 18:4 ^{Δ6,9,12,15} |
| エイコサテトラエン酸 | ETA | 20:4 ^{Δ8,11,14,17} |
| エイコサペンタエン酸 | EPA | 20:5 ^{Δ5,8,11,14,17} |
| ドコサペンタエン酸 | DPA | 22:5 ^{Δ7,10,13,16,19} |
| ドコサヘキサエン酸 | DHA | 22:6 Δ4,7,10,13,16,19 |

10

20

【0026】

図7に示すように、オメガ-3 PUFA生合成経路に関する酵素は多数存在する。これらには、デサチュラーゼおよびエロンガーゼが含まれる。

【0027】

石油生産に関する様々な遺伝子が異なる有機体において遺伝的手段を通して確かめられており、そしてこれらの遺伝子の若干のもののDNA配列は公的に入手可能である。非制限的な例を以下に示す。

【0028】

【表2-1】

| 受託番号 | 説明 | |
|-----------|--|----|
| AY131238 | <i>Argania spinosa</i> (アルガンスピノサ) Δ6-デサチュラーゼ | |
| Y055118 | <i>Echium pitardii</i> var. <i>pitardii</i> (エチウム・ピタルディの変種ピタルディ) Δ6-デサチュラーゼ | |
| AY055117 | <i>Echium gentianoides</i> (エチウム・ゲンチアノイデス) Δ6-デサチュラーゼ | |
| AF296076 | <i>Mucor rouxii</i> (ムコール・ロウキシ) Δ6-デサチュラーゼ | |
| AF007561 | <i>Borago officinalis</i> (ボラゴ・オッフィキナリス) Δ6-デサチュラーゼ | 10 |
| L11421 | <i>Synechocystis</i> sp (シネコシスティス種) Δ6-デサチュラーゼ | |
| NM_031344 | <i>Rattus norvegicus</i> (ラットス・ノーヴィジアス、ドブネズミ) Δ6 脂肪酸 デサチュラーゼ | |
| AF465283 | <i>Moritierella alpine</i> (モルティエレーラ・アルピーナ) Δ6 脂肪酸デサチ ュラーゼ | |
| AF465282 | <i>Moritierella isabellina</i> (モルティエレーラ・イサベリナ) Δ6 脂肪酸デ サチュラーゼ | |
| AF419296 | <i>Pythium irregularare</i> (ピチウム・イレグラレ) Δ6 脂肪酸デサチュラーゼ | 20 |
| AB052086 | Δ6 脂肪酸デサチュラーゼについての <i>Mucor circinelloides</i> (ムコール・シ ルシネロイデス) D6D の mRNA | |
| AJ250735 | Δ6 脂肪酸デサチュラーゼについての <i>Ceratodon purpureus</i> (セラトドン・ パー・パレウス) の mRNA | |
| AF126799 | <i>Homo sapiens</i> (ホモ・サピエンス) Δ6 脂肪酸デサチュラーゼ | |
| AF126798 | <i>Mus musculus</i> (マス・ムスクルス、ハツカネズミ) Δ6 脂肪酸デサチュラー ゼ | |
| AF199596 | <i>Homo sapiens</i> (ホモ・サピエンス) Δ5 デサチュラーゼ | 30 |
| AF320509 | <i>Rattus norvegicus</i> (クマネズミ属) 肝臓Δ5 デサチュラーゼ | |
| AB072976 | Δ5 デサチュラーゼについての <i>Mus musculus</i> D5D の mRNA | |
| AF489588 | <i>Thraustochytrium</i> sp. (スラウストキトリウム種) ATCC21685 Δ5 デサチュ ラーゼ | |
| AJ510244 | Δ5 脂肪酸デサチュラーゼについての <i>Phytophthora megasperma</i> (フィトフ トラ・メガスペルマ) の mRNA | |
| AF419297 | <i>Pythium irregularare</i> Δ5 脂肪酸デサチュラーゼ | 40 |
| AF07879 | <i>Caenorhabditis elegans</i> (カエノラブディティス・エレガヌス、線虫) の Δ 5 脂肪酸デサチュラーゼ | |
| AF067654 | <i>Mortierella alpine</i> (モルティエレーラ・アルピーナ) Δ5 脂肪酸デサチ ュラーゼ | |

【表2-2】

| | | |
|------------|---|----|
| AB022097 | Δ5 脂肪酸デサチュラーゼについての <i>Dictyostelium discoideum</i> (ディク トヨステリウム・ディスコイデウム) の mRNA | |
| AF489589.1 | <i>Thraustochytrium</i> sp. ATcc21685 Δ4 脂肪酸デサチュラーゼ | |
| AY332747 | <i>Pavlova lutheri</i> (パブロバ・ルセリ) Δ4 脂肪酸デサチュラーゼ (des1) の mRNA | |
| AAG36933 | <i>Emericella nidulans</i> (エメリセラ・ニダランス) オレインΔ12 デサチュラ ーゼ | 10 |
| AF110509 | <i>Mortierella alpine</i> Δ12 脂肪酸デサチュラーゼの mRNA | |
| AAL13300 | <i>Mortierella alpina</i> Δ12 脂肪酸デサチュラーゼの mRNA | |
| AF417244 | <i>Mortierella alpine</i> ATCC 16266 Δ12 脂肪酸デサチュラーゼ | |
| AF161219 | <i>Mucor rouxii</i> Δ12 デサチュラーゼの mRNA | |
| X86736 S | <i>Piruline platensis</i> (ピルリン・プラテンシス) Δ12 デサチュラーゼ | |
| AF240777 | <i>Caenorhabditis elegans</i> (カエノラブディティス・エレガヌス) Δ12 デサ チュラーゼ | 20 |
| AB007640 | <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (クラミドモナス・ラインハードゥアイ) Δ12 デサチュラーゼ | |
| AB075526 | <i>Chorella vulgaris</i> (クロレラ・ブルガリス) Δ12 デサチュラーゼ | |
| AP002063 | <i>Arabidopsis thaliana</i> (アラビドプシス・サリアナ、シロイヌナズナ) ミク ロソームΔ12 デサチュラーゼ | |
| NP_441622 | <i>Synechocystis</i> sp. (シネコシスティス種) PCC6803 Δ15 デサチュラーゼ | |
| AAL36934 | <i>Perilla frutescens</i> (ペリラ・フルテスケンス、シソエゴマ) Δ15 デサチ ュラーゼ | 30 |

【0029】

配列番号へのすべてのここでの言及は参照により具体的に組み込まれる。

【0030】

さらに、特許文献、多価不飽和脂肪酸生産に関する遺伝子の多くの付加的なDNA配列（および/または上記の遺伝子のいくつか、およびそれらの分離の方法についての詳細）を提供する〔たとえば：米国特許第5968809号（5-デサチュラーゼ）；米国特許第5972664号および米国特許第6075183号（5デサチュラーゼ）；国際公開第WO 91/13972および米国特許第5057419号（9-デサチュラーゼ）；国際公開第WO 93/11245号（15-デサチュラーゼ）；国際公開第WO 94/1 1516号。米国特許第5443974号および国際公開第WO 03/099216号（12-デサチュラーゼ）；米国特許出願公開第2003/0196217A1号（17-デサチュラーゼ）；国際公開第WO 02/090493号（4-デサチュラーゼ）；および国際公開第WO 00/12720号および米国特許出願公開第2002/0139974A1号（エロンガーゼ）、参照〕。

【0031】

ここで用いるように用語「デサチュラーゼ（不飽和化酵素）」は、多酵素複合体のポリペプチド成分をいい、それは、興味があるモノ-またはポリ不飽和脂肪酸またはその前駆体を生産するために、一以上の脂肪酸において、不飽和化し、すなわち二重結合を導入することができる。若干の不飽和化は二以上の基質上で活性を有する。脂肪酸デサチュラーゼの特異性は、適切な宿主を脂肪酸デサチュラーゼのための遺伝子により変換（形質転換）すること、およびその宿主の脂肪酸プロファイルに対するその効果を決定することに

よって経験的に決定することが望ましいことがある。種々の有機体から分離されるデサチュラーゼをコードする核酸は、本発明の様々な見地に従って使用することができ、それらの例は、*Ostreococcus* sp. (オストレオコッカス種) を含めて、ここに記載される。

【0032】

デサチュラーゼには、オメガ-3-デサチュラーゼ、6-デサチュラーゼ、5-デサチュラーゼ、12-デサチュラーゼ、19-デサチュラーゼ、17-デサチュラーゼおよび4-デサチュラーゼが含まれる。

【0033】

ここで用いられるように用語「エロンガーゼ」は、エロンガーゼが作用する脂肪酸基質よりも2個の炭素長い酸を生成するように、脂肪酸炭素鎖を伸長することができるポリペプチドに言及する。種々の生物から分離されたエロンガーゼをコードする核酸は、本発明の様々な見地に従って使用することができ、それらの例は、オストレオコッカス種を含めて、ここに記載される。

【0034】

エロンガーゼシステムにより触媒される反応の例は、GLAのDGLAへの、SDAのETAへの、ARAのDTAへの、およびEPAのDPAへの転換である。大抵、エロンガーゼの基質選択性はいくぶん広いが、鎖長および不飽和の程度とタイプの双方によって分かれる。

【0035】

たとえば、C14/16エロンガーゼはC14基質(たとえば、ミリスチン酸)を利用し、C16/18エロンガーゼはC16基質(たとえば、パルミチン酸)を利用し、C18/20エロンガーゼはC18基質(たとえば、GLA、SDA、LA、ALA)を利用し、およびC20/22エロンガーゼ(5-エロンガーゼとも呼ばれる)はC20基質(たとえば、ARA、EPA)を利用する。

【0036】

若干のエロンガーゼは広い特異性を有しているので、単一の酵素は、いくつかのエロンガーゼ反応を触媒することが可能でありうる(たとえば、それによってC16/18エロンガーゼおよびC18/20エロンガーゼの双方として作用する)。脂肪酸エロンガーゼの特異性は、適切な宿主を脂肪酸エロンガーゼのために遺伝子により形質転換すること、および宿主の脂肪酸プロファイルに対するその効果を決定することによって、経験的に決定することが望ましい場合がある。

【0037】

エロンガーゼには、6-、5-および9-エロンガーゼが含まれる。5-エロンガーゼは、概してDHAの生産において律速と見なされず、そして大抵は、LC-PUFA経路、D6-飽和での最初のステップが律速であると仮定される。

【0038】

トランスジェニック微細藻類においてオメガ-3 LC-PUFAsの生産に関する本発明の具体化を以下に説明する。熟練者(当業者)は、これらの具体化が、トランスジェニック微細藻類に制限されるものでなく、オメガ-3 LC-PUFAsを生産するために他の有機体にも適用できることを理解するであろう。有機体は、動物、たとえば、哺乳動物でありうる。一具体化において、人間(ヒト)は特別に除外される。別の具体化では、有機体は、植物、たとえば、作物(crop plant)である。

【0039】

第一の見地において、本発明は、オメガ-3 LC-PUFAs、たとえば、一以上のオメガ-3 LC-PUFAまたは合計オメガ-3 LC-PUFA含量の増加した生産を有するトランスジェニック微細藻類に関する。本発明の様々な見地によれば、オメガ-3 LC-PUFAsは、SDA、ETA、EPA、DPAまたはDHAから選ぶことができる。一具体化において、オメガ-3 LC-PUFAsはDHAである。別の具体化では、オメガ3脂肪酸はEPAである。

【0040】

ここに記載の本発明の種々の見地によれば、DHAまたはEPAの生産においての増加は、合計脂肪酸(TFA)においての異なるオメガ-3 LC-PUFAsの個々の含量として測定される。言

10

20

30

40

50

い換えると、増加は、合計脂肪酸含量のパーセンテージとして測定される。好ましくは、増加は、コントロール（対照）微細藻類と比較して、少なくとも2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%またはそれよりも多い（モル%）。

【0041】

一具体化において、オメガ-3 LC-PUFAsはDHAである。本発明のトランスジェニック微細藻類では、DHA含有量は、コントロール微細藻類に比べて少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%またはそれよりも多くによって増加する。一具体化において、オメガ-3 LC-PUFAsはDHAである。本発明のトランスジェニック微細藻類では、DHA含量が対照微細藻類でのものよりも、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、または少なくとも10倍よりも高い。好ましくは、合計DHA含有量は、合計脂肪酸含有量の少なくとも10%である（モル%）。

10

【0042】

別の具体化において、オメガ-3 LC-PUFAsはEPAである。本発明の種々の見地によるトランスジェニック微細藻類において、EPA含有量は少なくとも2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%だけ増加される。好ましくは、合計EPAの含有量は全脂肪酸含有量の少なくとも20%である（モル%）。

20

【0043】

本発明の種々な見地によると、合計脂肪酸含量、LC-PUFAsの含有量、オメガ-3 LC-PUFAsの含量またはたとえば、DHAなどのような個々の脂肪酸の含有量は、対照の微細藻類と比較して増加する。ここで用いるように対照微細藻類は、本発明の方法に従って修飾されてない微細藻類である。したがって、対照微細藻類は、LC-PUFA含有量を変化させるためにここに記載のように核酸を発現するために遺伝的に改変されていない。一具体化では、対照微細藻類は、野生型微細藻類である。別の具体化では、対照微細藻類は、ここに記載の方法に従って導入遺伝子を保有しない微細藻類であるが、異なる導入遺伝子を発現する。対照微細藻類は、典型的には、同じ藻類種である。

20

【0044】

用語「合計脂肪酸含量」は、ここにおいて、一定のサンプルにおいてベースエステル交換法によって脂肪酸メチルエ斯特ルに誘導体化することができるすべての細胞脂肪酸の和に言及する〔技術として、たとえば、Sayanova（サヤノバ）ら、（1997）； Sayanovaら、（2003）FEBS Lett.（FEBSレターズ）2003年5月8日、542（1-3）：100-4に記載されているように知られている〕。

30

【0045】

本発明の種々な見地によれば、増加は定常期において測定される。

【0046】

本発明の種々な見地によれば、用語の微細藻類には、LC-PUFAを作る能力を持つすべての微細藻類が含まれる。藻類は従属栄養または独立栄養（autothrophic）藻類であつてよい。

40

【0047】

当業者は、用語「微細藻類」には、いくつかの別個の生物群からの単細胞、光合成微生物が含まれ、これらには、たとえば、藻類の真核緑藻植物、紅藻類、不等毛（heterokont）、ハプト藻（haptophyta）部門および原核生物シアノバクテリアが含まれることを知るであろう。

【0048】

EPAはクラスの珪藻綱（Bacillariophyceae）〔珪藻類（diatoms）〕、緑藻綱（Chlorophyceae）、黄金藻綱（Chrysophyceae）、褐色鞭藻綱（Cryptophyceae）、真正眼点藻綱（Eustigmatophyceae）およびプラシノ藻綱（Prasinophyceae）を含めて、多種多様な海洋微細藻類において見出された（表II参照）。したがって、本発明の種々な見地によれば、微細藻類は、これらのオーダー（目）、クラス（綱）またはスピーシーズ（種）から選ぶ

50

ことができる。

【0049】

本発明の様々な見地によれば、微細藻類は、表IIに挙げられる微細藻類から選ぶことができる。

【0050】

【表3-1】

表II：海洋微細藻類におけるPUFAsの割合

*Emiliania huxleyi(エミリアニア・ハクスレイ)は目下Coccolithus huxleyi(コッコリタス・ハクスレイ)について受け入れられた名称である。

10

| オメガ3LC-PUFAs(合計脂肪酸の%) | | | |
|--|------|------|---|
| 微細藻類種(Mircoalgae sp.) (目/綱/種) | EPA | DHA | 参考文献 |
| 緑藻植物(緑藻類) | | | |
| <u>緑藻綱</u> | | | |
| <i>Chlorella minutissima</i> (クロレラ・ミニティッシマ) | 45.0 | - | Seto(セト)ら、(1984) |
| <u>プラシノ藻綱</u> | | | |
| <i>Ostreococcus tauri</i> | 2.0 | 12.0 | Wagner(ワーグナー)M.ら、(2010) |
| <i>Ostreococcus lucimarinus</i> (オストレオコッカス・ルシマリヌス) | 2.1 | 3.8 | Ahmann(アーマン)ら、(2011) |
| <i>Heteromastix rotundata</i> (ヘテルマストリクス・ロタンドラ) | 28 | 7 | Yongmanitchai(ヤングマニチアイ) およびWard(ウォード)、(1989) |
| <u>ハプト藻</u> | | | |
| <u>パブロバ亜綱(Pavlovophyceae)</u> | | | |
| <i>Pavlova lutheri</i> | 11.6 | 9.1 | Tonon(トノン)ら、(2002) |
| <u>プリネシウム亜綱</u> | | | |

20

30

40

【表3-2】

| | | | | |
|---|------|------|--------------------------------|----|
| <u>(Prymnesiophyceae)</u> | | | | |
| <i>Isochrysis galbana</i> (イソクリシス・ガルバナ) | 22.6 | 8.4 | Molina Grima(モリナ・グリマ)ら、(1995) | |
| <i>Emilinaia huxleyi</i> (エミリアニア・ハクスレイ)* | 17 | - | Yongmanitchai および Ward、(1989) | |
| 褐色鞭藻綱 | | | | 10 |
| <u>クリプトモナス科</u> | | | | |
| <u>(Cryptomonadaceae)</u> | | | | |
| <i>Cryptomonas maculate</i> (クリプトモナス・マクラテ) | 17 | - | Yongmanitchai および Ward、(1989) | |
| <i>Chromonas sp.</i> (クリプトモナス種) | 12 | 6.6 | Renaud(レノー)ら、(1999) | |
| <i>Cryptomonas sp.</i> | 16 | 10 | Yongmanitchai および Ward、(1989) | |
| <i>Rhodomonas sp.</i> (ロドモナス種) 不等毛(Heterokont) | 8.7 | 4.6 | Renaud ら、(1999) | 20 |
| 珪藻綱(珪藻類) | | | | |
| <i>Asterionella japonica</i> (アステリオネラ・ジャポニカ) | 20 | - | Yongmanitchai および Ward、(1989) | |
| <i>Amphora coffeiformis</i> (アムフォラ・コフェアエフォルミス) | 1.39 | 0.39 | Renaud ら、(1999) | |
| <i>Biddulphia sinensis</i> (ビダルフィア・シネンシス) | 24.0 | 1.0 | Yongmanitchai および Ward、(1989) | 30 |
| <i>Chaetoceros sp.</i> (キートセラス種) | 16.7 | 0.8 | Renaud ら、(1999) | |
| <i>Cylindrotheca fusiformis</i> (シリンドロテカ・フシフォルミス) | 18.8 | - | Tan(タン)および Johns(ジョーンズ)、(1996) | |
| <i>Fragilaria pinnata</i> (フラジラリア・ピンナータ) | 6.8 | 1.0 | Renaud ら、(1999) | |
| <i>Nitzchia angularis</i> (ニッチア・アンギュラリス) | 21 | - | Kyle(カイル)ら、(1992) | |
| <i>Navicula incerta</i> (ナビクラ・インケルタ) | 25.2 | - | Tan および Johns, (1996) | 40 |
| <i>Navicula pelliculosa</i> (ナビクラ・ペリクローサ) | 9.4 | - | Tan および Johns, (1996) | |
| <i>Navicula saprophila</i> (ナビクラ・サプロフィラ) | 16.0 | - | Kitano(キタノ)ら、(1997) | |
| <i>Nitzschia closterium</i> (ニッチア・ク | 15.2 | - | Renaud ら、(1994) | |

【表3-3】

| | | | | |
|--|------|-----|--|----|
| ロステリウム) <i>Nitzschia frustulum</i> (ニッチア・クロ ステリウム) | 23.1 | - | Renaudら、(1994) | |
| <i>Nitzschia laevis</i> (ニッチア・ラエビ ス) | 19.1 | - | Wen(ウェン)およびChen(チェン)、 (2001) | |
| <i>Phaeodactylum tricornutum</i> | 34.5 | - | Yongmanitchai およびWard、(1991) | 10 |
| <i>Skeletonema costatum</i> (スケレトネ マ・コスタークム) | 29.2 | 3.4 | Blanchemain(ブランチメイン)およ びGrizeau(グリゼオウ)、(1999) | |
| <i>Thalassiosira pseudonana</i> (タラシオ シラ・シュードナナ) | 12.2 | - | Tononら、(2002) | |
| | | | | |
| <u>黄金藻綱(Chrysophyceae) [黄金色 藻類(golden algae)]</u> | | | | |
| <i>Monochrysis lutheri</i> (モノクリシ ス・ルテリ) | 19 | - | Yongmanitchai およびWard、 (1989); Kyle、(1992) | 20 |
| <i>Pseudopedinella sp.</i> (シードペデ イネラ種) | 27 | - | Yongmanitchai およびWard、(1989) | |
| <i>Crisosphaera carterae</i> (クリソスフ アエラ・カルテラエ) | 20 | - | Yongmanitchai およびWard、(1989) | |
| <i>C.elongate</i> (C.エロングエーロ) | 28 | - | Yongmanitchai およびWard、(1989) | |
| | | | | |
| <u>真正眼点藻綱(Eustigmatophyceae)</u> | | | | |
| <i>Nannochloropsis salina</i> (ナンノクロ ロプシス・サリナ) | 15 | - | Yongmanitchai およびWard、(1989) | 30 |
| <i>Nannochloropsis sp.</i> | 35 | - | Sukerik(スークリク)、(1991) | |
| <i>Nannochloris sp.</i> (ナンノクロリス 種) | 27 | - | Yongmanitchai およびWard、(1989) | |
| <i>Monodus subterraneus</i> (モノダス・ サブテラネウス) | 32.9 | - | Quiang(キアン)ら、(1997) | |

【0051】

—具体化では、PUFAsの一次生産体として独立栄養性微細藻類が好ましい。たとえば、微細藻類は、*Phaeodactylum* (フェオダクチラム、海洋性珪藻)、*Nannochloropsis* (ナンノクロロプシス)、*Thraustochytrium* (スラウストキトリウム) または*Schizochytrium* (シゾチトリウム) から選ぶことができる。他の属には、*Spirulina* (スピルリナ)、*Dunaliella* (ドナリエラ)、*Chlorella* (クロレラ)、*Thalassiosira* (タラシオシラ)、*Isochrysis* (イソクリシス)、*Porphyridium* (ポルフィリディウム、チノリモ)、*Nannochloropsis* (ナンノクロロプシス)、*Pavlova* (パブロワ)、*Chaetoceros* (キートケロス)、*Cryptocodonium* (クリプテコディウム)、*Fragilariaopsi* (フラジラリオプシス) および*Nitzchia* (ニッチア) が含まれる。

【0052】

たとえば、微細藻類は、*Chaetoceros calcitrans* (キートセラス・カリストラヌス)、

40

50

Isochrysis galbana、*Pavlova lutheri*、*Pseudoisochrysis paradoxa*（シードイソクリシス・パラドキサ）、*Tetraselmis suecica*（テトラセルミス・スエシカ）および*Skeletocystis costatum*、*Nannochloropsis oculata*（ナンノクロロプシス・オキュラータ）、*Thalassiosira pseudonana*、*Pavlova lutheria*（パブロワ・ルテリア）、*Porphyridium irregularis*（ポルフィリジウム・イレギュラ）、*Cryptothecodium cohnii*、*Porphyridium purpureum*（ポルフィリジウム・パープレウム）および*Porphyridium cruentum*（ポルフィリジウム・クルエンタム）から選ぶことができる。

【0053】

一具体化において、微細藻類は珪藻である。珪藻は世界の一次生産力の20%近くを占める海洋および淡水生態系を通して見出される褐藻類である。珪藻を決定付ける特徴は、それらの高度に装飾的なパターン化されたケイ化細胞壁（弁殻または被殻として知られる）であり、それは種特異性のナノスケール構造を表示する。

10

【0054】

珪藻は中心珪藻類または羽状（pennate）珪藻類であってよい。一具体化では、珪藻はナビクラ（Naviculales）の目に属する。一具体化では、珪藻は、*P. tricornutum*または*Thalassiosira pseudonana*である。好ましい具体化では、珪藻は*P. tricornutum*（*P. トリコルヌツム*）である。別の具体化において、珪藻は*Fragilariaopsis*種、たとえば、*Fragilariaopsis cylindrus*である。

【0055】

当業者は、本発明の見地が、*P. tricornutum*に制限されないことを理解するであろう。実際、当業者は、本発明が、EPAおよび/またはDHAを合成する能力を有する任意の微細藻類にも適用することができることを理解するであろう。

20

【0056】

本発明の種々の見地によるトランスジェニック微細藻類は、LC-PUFAsの生合成に関与する一以上の核酸についてコードする一以上の異種導入遺伝子を発現する。配列に関して「異種」は、外来種に由来するか、または、同じ種からの場合、意図的な人間の介入により組成および/またはゲノム遺伝子座におけるその天然型から大幅に修飾された配列を意味する。異種導入遺伝子は、好適には、微細藻類から誘導または分離される。一具体化では、異種導入遺伝子は、プラシノ藻綱、たとえば、*Ostreococcus*種から誘導されるか、または分離される。異種導入遺伝子の配列は、標的の有機体における発現のために最適化されるコドンであるように修飾することができる。そのようにして、本発明は、組換え法により得られるトランスジェニック有機体に関する。

30

【0057】

たとえば、異種導入遺伝子は 15-デサチュラーゼ、6デサチュラーゼ、5デサチュラーゼ、4デサチュラーゼ、12デサチュラーゼ、5エロンガーゼ、6エロンガーゼまたはそれらの組合せの一以上をコード（符号化）することができる。

【0058】

一具体化において、トランスジェニック微細藻類は、5エロンガーゼをコードする異種核酸を発現する。このように、一見地（画面）では、本発明は、5エロンガーゼをコードする核酸を発現するトランスジェニック微細藻類に関する。たとえば、トランスジェニック微細藻類は、5エロンガーゼがコードされる核酸を発現するが、LC-PUFAsの生合成経路の調節に関するポリペプチドの任意の他の導入遺伝子コーディングを発現しない。他の具体化において、トランスジェニック微細藻類は、5エロンガーゼをコードする核酸およびLC-PUFAsの生合成経路の調節に関する一以上の追加の異種遺伝子、たとえば、OtD6などのような 6デサチュラーゼを、例4に示すように発現する。このようにして、

40

5エロンガーゼおよび 6デサチュラーゼをコードする核酸が共発現される具体化は、具体的には、本発明の一部である。5エロンガーゼおよび 6デサチュラーゼはここに規定するようなものである。

【0059】

一具体化において、ここに記載のトランスジェニック微細藻類は、LC-PUFAsの生合成経

50

路の調節に関与していない異種核酸、たとえば、例5に示すように、グルコーストランスポーター遺伝子を、LC-PUFAsの生合成経路の調節に関与する異種核酸、たとえば、OtE1o5などのようなものと一緒に共発現する。例において示すように、ベクターは異なる特性で、一つはオメガ3sのための、および一つは、グルコーストランスポーター（グルコース輸送体）の発現により、藻類が暗所で増殖するのを可能にするものの調節に関与する二つの異種核酸の共発現を可能にするために用いることができる。細胞を、次いで、たとえば、グルコースなどの外因性炭素源を提供する場合、それらは暗所において増殖することができます。このようにして、一具体化では、たとえば、OtE1o5などのLC-PUFAsの生合成経路およびグルコースレポーターの調節に関与する遺伝子を発現する藻類を培養するとき、たとえば、グルコースなどの外因性炭素源が提供される。グルコースレポーターをコードする本発明に従って使用することができる核酸の例は、配列番号23および配列番号25に示される。各々のペプチドは、配列番号24および配列番号26に示される。

10

【0060】

ここで使用される用語「核酸」、「核酸配列」、「ヌクレオチド」、または「ポリヌクレオチド」は、DNA分子（たとえば、cDNAまたはゲノムDNA）、RNA分子（たとえば、mRNA）、自然に発生し、変異した、合成DNAまたはRNA分子、およびヌクレオチド類似体を使用して生成されるDNAまたはRNAの類似体を含むことが意図される。それは、一本鎖または二本鎖であることができる。そのような核酸またはポリヌクレオチドには、制限されないが、構造遺伝子のコード配列、アンチセンス配列、およびmRNAsまたはタンパク質産物をコードしない非コード制御配列が含まれる。これらの用語はまた、遺伝子を包含する。用語「遺伝子」または「遺伝子配列」は、生物学的機能に関連するDNAの核酸を指すために広く使用される。したがって、遺伝子は、ゲノム配列のように、インtronおよびエキソンを含んでもよく、またはcDNAsのようにコード配列だけを含んでもよく、および/または制御（調節）配列と組み合わせてcDNAsを含んでいてもよい。本発明の種々の見地の一具体化において、cDNA配列の合成の（推定される）オープンリーディングフレーム、cDNAに対する類似体が好ましい。

20

【0061】

本発明の目的として、「トランスジェニック」、「導入遺伝子」または「組換え」は、たとえば、核酸配列、発現力セット、遺伝子構築物、ベクターまたは自律複製要素で、たとえば、核酸配列を含む人工染色体または本発明に従う核酸配列、発現力セットまたはベクターで形質転換された有機体などのものに関して、組換え法によりもたらされるすべての構築物を意味し、そこでは、

30

- (a) 本発明の方法において有用なタンパク質をコードする核酸配列、または
- (b) 本発明による核酸配列と作動可能に連結される遺伝的制御配列（遺伝子調節配列）（群、複数も可能の意）、たとえば、プロモーター、または
- (c) a) およびb) のいずれか

40

を、それらの自然の遺伝的環境に配置してないか、または組換え方法、たとえば、変異誘発（突然変異誘発）などのものによって修飾されており、修飾（改変）は、たとえば、一またはそれよりも多く（一以上）のヌクレオチド残基の置換、付加、欠失、逆位、または挿入の形態をとることが可能である。自然の遺伝的環境は、元の微細藻類またはゲノムライブラリーでの存在における自然ゲノム遺伝子座または染色体座を意味すると理解される。

【0062】

本発明の目的のためのトランスジェニック微細藻類は、このようにして、その核およびプラスチド（色素体）のゲノム内に異種ポリヌクレオチドを含む微細藻類を意味すると理解される。異種ポリヌクレオチドは、好ましくは、ヌクレオチドが続く世代に渡されるように、ゲノム内に安定に統合される。異種ポリヌクレオチドは、単独で、または組換えDNA構築物の一部として、ゲノム内に統合されてもよい。

【0063】

本発明の関連では、5エロンガーゼはEPAのDPAへの転換を触媒する。したがって、EPA

50

のDPAへの転換を触媒する 5エロンガーゼをコードする任意の核酸は、導入遺伝子として、本発明の様々な見地に従って使用することができる。一具体化では、本発明において使用される 5エロンガーゼは *Ostreococcus* (オストレオコッカス)、可能なら、*Ostreococcus tauri* (オストレオコッカス・タウリ) から誘導されるか、または分離される。好適には、 5エロンガーゼは、*Ostreococcus tauri* から誘導されるか、または分離される OTE105 である。一具体化では、本発明に従うトランスジェニック微細藻類は、配列番号1が含まれる核酸、その機能的変種または 5エロンガーゼをコードする配列で、そこでは、前記エロンガーゼは、配列番号2に対して少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の相同性を有するものを発現する。好適な具体化において、微細藻類は、*P. tricornutum* であり、そして核酸は配列番号2が含まれるか、またはそれからなる 5エロンガーゼをコードする。

10

【0064】

本発明の見地に従って使用されるような機能的変種は、生物学的に活性な変種である。たとえば、配列番号1の生物学的に活性な変種は、核酸配列であり、それは、たとえば、*P. tricornutum* (*P. トリコルヌーム*) などのような微細藻類において発現されるとき、DHAの産生を増加させる。用語の変種には、標的の有機体での発現のために、たとえば、*P. tricornutum* における発現のために、コドン最適化用に変えられた配列が含まれる。

20

【0065】

このようにして、当業者が理解するように、本発明の見地が、そこでは、一定のポリヌクレオチドを用い、その方法および使用が含まれ、特定された配列よりも多くのものを包含するだけでなく、ペプチドでの生物学的機能に影響を与えない改変を含むことが理解される。たとえば、一定の部位での化学的に等価なアミノ酸の生成をもたらすが、コードされるポリペプチドの機能的特性に影響しない核酸断片での改変は、当技術においてよく知られている。たとえば、アミノ酸アラニン、疎水性アミノ酸のためのコドンは、別のより一層疎水性の低い残基、たとえば、グリシンなどのようなもの、またはさらに疎水性の残基、たとえば、バリン、ロイシン、またはイソロイシンなどのようなものをコードするコドンによって置換されていてもよい。同様に、他のものために一の負に荷電した残基、たとえば、グルタミン酸についてのアスパラギン酸などのようなもの、または他のもののために一の正に荷電した残基、たとえば、アルギニンについてのリジンなどのようなものの置換をもたらす変化はまた、機能的に同等の生成物を生産することができる。ポリペプチド分子のN末端およびC末端部分の改変をもたらすヌクレオチド変化はまた、ポリペプチドの活性をえるとは思われない。コードされる生成物の生物学的活性の保持の決定と同様に、提案された修飾の各々は、当技術における日常的技術の範囲内である。

30

【0066】

一具体化において、本発明の種々の見地に従う前記核酸は、制御配列（レギュレートリ配列）に動作可能に連結される。

40

【0067】

用語「調節エレメント（調節要素）」は、「コントロール配列」および「プロモーター」により、ここでは交換可能に使用され、そしてすべての用語は、それらが連結される配列の発現を起こすことができる制御核酸配列を指すために広い前後関係で解釈されるべきである。用語「プロモーター」は、典型的には、遺伝子の転写開始から上流に位置する核酸コントロール配列に言及し、そしてそれはRNAポリメラーゼおよび他のタンパク質の認識および結合に関与し、それによって、作動可能に連結された核酸の転写が指向される。古典的真核生物ゲノム遺伝子から導かれる転写制御配列（正確な転写開始に必要とされるTATAボックスを含むが、CCAATボックス配列の有無にかかわらない）、および追加の調節エレメント（すなわち、上流の活性化配列、エンハンサーおよびサイレンサー）は、上記の用語に包含され、それらは発達および/または外部刺激に応答して、または組織特異的

50

マナーにおいて遺伝子発現を変えさせる。また、-35ボックス配列および/または-10ボックス転写制御配列を含むことができる場合、古典的な原核生物遺伝子の転写制御配列はその用語の範囲内に含まれる。用語「調節エレメント」はまた、細胞、組織または器官における核酸分子の発現を付与し、活性化し、または増強する合成融合分子または誘導体を包含する。

【0068】

適切なプロモーターは例において確認される。たとえば、微細藻類がP. tricornutumである場合、そのプロモーターはP. tricornutumのプロモーターfcpAであってもよい。しかし、熟練者（当業者）は、他のプロモーターを使用することもできることを理解するであろう。たとえば、適切なプロモーターはまた、特定の環境的または化学的刺激に応答する誘導性プロモーターから選ぶことができる。

10

【0069】

ここで使用されるように用語「作動可能に連結される」は、プロモーター配列が興味のある遺伝子の転写を開始することができるように、プロモーター配列および興味のある遺伝子間の機能的連結に言及する。

【0070】

導入遺伝子は、一以上の制御配列に加えて、選択マーカーをも含む、ベクターの一部であってもよい。これらは当技術において知られている。微細藻類の形質転換は、当技術で知られる標準的な手順によって、たとえば、微粒子銃（粒子衝突）、またはエレクトロポレーションによって遂行することができる。

20

【0071】

5エロンガーゼをコードする核酸を発現するトランスジェニック微細藻類は、対照（コントロール）微細藻類と比較したDHAおよびDPAでの増加によって特徴付けられる。具体的には、合計脂肪酸含量のパーセンテージとして測定されるように、増大は、対照微細藻類においてよりも少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも、少なくとも8、少なくとも9または少なくとも10倍高い。具体的には、DHA含量は、対照微細藻類におけるよりも少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも、少なくとも8、少なくとも9または少なくとも10倍高い。好ましくは、合計DHA含量は、合計LC-PUFAsの含量の少なくとも10%（モル%）である。一具体化では、5エロンガーゼをコードする核酸を発現するトランスジェニック微細藻類は、LC-PUFAsの経路の調節に、好ましくはオメガ-3 LC-PUFAsの経路の調節に関与する別のポリペプチドをコードする第二導入遺伝子を発現しない。

30

【0072】

本発明の種々の見地の一具体化では、5エロンガーゼをコードする異種核酸を発現するトランスジェニック微細藻類は、さらに、LC-PUFAsの経路の調節に、好ましくは、オメガ-3 LC-PUFAsの経路の調節に関与する一以上のポリペプチドコードする一以上の追加の異種核酸をさらに発現することができる。言い換えれば、トランスジェニック微細藻類には、LC-PUFAsの経路の調節に関与する一以上のポリペプチドをコードする一以上のさらなる導入遺伝子が含まれる。ポリペプチドは、好ましくは、図7に示すように、オメガ-3 PUFA生合成経路に関与する任意のデサチュラーゼ（不飽和化酵素）またはエロンガーゼから選ばれる。デサチュラーゼおよびエロンガーゼの任意の組み合わせを使用することもできる。このようにして、核酸は、一以上の 15デサチュラーゼ、6デサチュラーゼ、5デサチュラーゼ、4デサチュラーゼ、6デサチュラーゼ、5エロンガーゼ、6エロンガーゼまたはそれらの組合せをコードすることができる。

40

【0073】

一具体化では、核酸は 6デサチュラーゼをコードする。本発明の関連において、6デサチュラーゼは、ALAのSDAへの、およびまたLAのGLAへの転換をも触媒する。6デサチュラーゼは、国際公開第WO 93/06712号、米国（特許第）5,614,393号、米国5614393号、WO 96/21022号、WO 02/1557号およびWO 99/27111号に記載され、およびトランスジェニック生物の生産へのそれらの応用も、たとえば、WO 98/46763号、WO 98/46764号およびWO 98/

50

46765号に記載されている。一具体化では、本発明において使用される 6デサチュラーゼは、*Ostreococcus*から導かれるか、または分離され、なるべくなら、*Ostreococcus tauri*からのOtD6である〔Domergue(ドマーグ)ら(2005)、AY746357〕。一具体化では、核酸には、配列番号3または5が含まれ、そして配列番号4または6が含まれるか、またはそれからなる6 デサチュラーゼ、その機能的変種、または配列番号4または6に対し少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の相同性を有する6 デサチュラーゼをコードするポリペプチドをコードする。

10

【0074】

別の具体化では、 6デサチュラーゼは、微細藻類のオストレオコッカス (*Ostreococcus*) RCC 809からのものである。好ましくは、核酸には、配列番号7または9が含まれ、そして配列番号8または10が含まれるか、またはそれからなる微細藻類のオストレオコッカス RCC 809からの6 デサチュラーゼ、その機能的変種または配列番号8または10に対して少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の相同性を有する6 デサチュラーゼをコードする配列をコードする。

20

【0075】

別の具体化では、核酸は 4デサチュラーゼをコードする。本発明の様々な見地によれば、 4デサチュラーゼは *E. huxleyi* (E.ハクスレイ) から導かれるか、または分離することができる。このようにして、一具体化では、核酸には、配列番号1が含まれ、それは、配列番号12が含まれるか、またはそれからなる 4デサチュラーゼ、その機能的変種または配列番号12に対して少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の相同性を有する 4デサチュラーゼをコードする。

30

【0076】

別の具体化では、 4デサチュラーゼは *T. pseudonana* (T.シュードナナ) から導かれ、または分離される。このように、一具体化では、核酸には、配列番号13が含まれ、それは、配列番号14が含まれるか、またはそれからなる 4デサチュラーゼ、その機能的変種または配列番号14に対して少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の相同性を有する 4デサチュラーゼをコードする。

40

【0077】

別の具体化では、 4デサチュラーゼは、オストレオコッカス (*Ostreococcus*) RCC809から導かれ、または分離される。一具体化では、核酸には、配列番号15または17が含まれ、それは、配列番号16または18が含まれるか、またはそれからなる 4デサチュラーゼ、その機能的変種または配列番号16または18に対して少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の相同性を有する 4デサチュラーゼをコードする。

【0078】

別の具体化では、 6エロンガーゼは *Fragilariaopsis cylindrus* (フラジラリオプシス

50

・シリンドラス)からのものである。一具体化では、核酸は、配列番号19が含まれるものであり、配列番号20が含まれるか、またはそれからなる 6エロンガーゼ、その機能的変種または配列番号20に対して少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の相同性を有する 6エロンガーゼをコードする。

【0079】

別の具体化では、 5デサチュラーゼは*Fragilariaopsis cylindrus*からのものである。
一具体化では、核酸は、配列番号21が含まれるものであり、配列番号22が含まれるか、またはそれからなる 6エロンガーゼ、その機能的変種または配列番号22に対して少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%の相同性を有する 6デサチュラーゼをコードする。

10

【0080】

別の見地において、本発明のトランスジェニック微細藻類は、 6デサチュラーゼ、 5デサチュラーゼ、 4デサチュラーゼ、 6エロンガーゼまたはそれらの組合せをコードする異種核酸を発現する。これらの酵素はここで規定される。

20

【0081】

一見地では、本発明のトランスジェニック微細藻類は、 6デサチュラーゼをコードする異種核酸を発現する。このようにして、別の見地において、本発明はまた、 6デサチュラーゼをコードする異種核酸を発現するトランスジェニック微細藻類に関する。たとえば、トランスジェニック微細藻類は、 6デサチュラーゼをコードする核酸を発現するが、LC-PUFAsの生合成経路の調節に関与する任意の他の遺伝子を発現しない。他の具体化において、トランスジェニック微細藻類は、LC-PUFAsの生合成経路の調節に関与する 6デサチュラーゼおよび追加の導入遺伝子、たとえば、 5エロンガーゼ、たとえば、例に示されるように、*OtEl05*を発現する。

30

【0082】

一具体化において、微細藻類は*P. tricornutum*である。一具体化では、配列番号3または5が含まれるか、またはそれからなる核酸は、 6デサチュラーゼまたは配列番号4または6に対して少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の相同性を有する 6デサチュラーゼをコードする配列をコードする。好適な具体化において、微細藻類は、*P. tricornutum*であり、そして核酸は配列番号4または6が含まれるか、またはそれからなる 6デサチュラーゼをコードする。

【0083】

6デサチュラーゼをコードする核酸を発現するトランスジェニック微細藻類は、合計脂肪酸含量、特に、オメガ3 LC-PUFA含量が対照微細藻類と比較して変わることを特徴とする。とりわけ、オメガ-3 LC-PUFA含量は、少なくとも2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%またはそれよりも多くだけ増加する。具体的に、EPA含量は、対照微細藻類に比べて、少なくとも2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%だけ増加する。好ましくは、合計EPA含量は、合計LC-PUFAsの含量の少なくとも20%（モル%）である。また、トランスジェニック藻類におけるDHA含量は、少なくとも0.5%だけ増加する。

40

【0084】

一具体化において、本発明の様々な見地はバイオ燃料の製造に関する具体化を除く。

50

【0085】

別の見地において、本発明は、LC-PUFAsの生合成経路に関するポリペプチドをコードする異種核酸を微細藻類において導入すること、および発現させることが含まれる増加したオメガ-3 LC-PUFA含量を有するトランスジェニック微細藻類を产生するための方法に関する。オメガ-3脂肪酸は、ALA、SDA、ETA、EPA、DPAまたはDHAから選ぶことができる。一具体化において、オメガ-3 LC-PUFAsはDHAである。別の具体化では、オメガ3脂肪酸はEPAである。核酸は、6デサチュラーゼ、5デサチュラーゼ、4デサチュラーゼ、5エロングガーゼ、6エロングガーゼまたはそれらの組合せをコードすることができる。

【0086】

一具体化では、本方法は、増加したDHAレベルを有するトランスジェニック微細藻類を生産することに關し、前記方法には、5エロングガーゼをコードする異種核酸により微細藻類を形質転換することが包含される。この具体化によれば、本方法はさらに、オメガ-3脂肪酸の生成を調節する一以上の追加の異種核酸により前記微細藻類を変換すること、たとえば、6デサチュラーゼをコードする核酸で形質転換することが含まれうる。別の具体化では、オメガ-3脂肪酸の生成を調節する追加の核酸は、前記微細藻類中に導入されず、そして異種核酸として発現されない。

10

【0087】

別の具体化において、本発明は、増加したEPAレベルを有するトランスジェニック微細藻類を生産するための方法に關し、前記方法は、6デサチュラーゼをコードする核酸により微細藻類を形質転換することを包含する。この具体化によれば、本方法は、オメガ-3 LC-PUFAsの生成を調節する一以上の追加の核酸により前記微細藻類を変換することがさらに含まれうる。別の具体化では、オメガ3脂肪酸の生成を調節する追加の核酸は前記微細藻類中に導入されない。

20

【0088】

一具体化では、方法は、オメガ-3 LC-PUFAsの生成を調節しない一以上の核酸、たとえば、グルコーストランスポーター遺伝子による前記微細藻類の変換が含まれる。

【0089】

それらの方法群によって取得された、または得られうる微細藻類はまた、本発明の範囲内である。

30

【0090】

別の見地において、本発明は、微細藻類においてより一層多くのオメガ-3 LC-PUFAの一つの生成を増加させるための方法に關し、それには、

- a) ここに記載されるトランスジェニック微細藻類を培養すること、および
 - b) 前記より一層多くのオメガ-3 LC-PUFAの一つをトランスジェニック微細藻類から取得すること
- が含まれる。

【0091】

具体的には、本発明は、微細藻類において一以上のオメガ-3 LC-PUFAsの生成を増加させるための方法に關し、それには、

- a) 微細藻類においてLC-PUFAの生合成経路に関するポリペプチドをコードする異種核酸を導入すること、および発現させること、
 - b) 前記異種核酸を発現するトランスジェニック微細藻類を培養すること、および
 - c) 一以上のオメガ-3脂肪酸をトランスジェニック微細藻類から得ること
- が含まれる。

40

【0092】

トランスジェニック微細藻類はここに記載のようなものであり、そして一以上のオメガ-3 LC-PUFAsの生成を可能にする条件下で培養される。ここに記載されるように、核酸は、15デサチュラーゼ、6デサチュラーゼ、5デサチュラーゼ、4デサチュラーゼ、12デサチュラーゼ、5エロングガーゼ、6エロングガーゼまたはそれらの組合せをコードしてよい。

50

【0093】

一具体化において、本方法は、微細藻類においてDHA産生を増加させることにも関し、それには、

- a) 微細藻類において 5エロンガーゼをコードする異種核酸を導入すること、および発現させること、
 - b) 前記異種核酸を発現するトランスジェニック微細藻類を培養すること、および
 - c) DHAをトランスジェニック微細藻類から得ること
- が含まれる。

【0094】

微細藻類はここに記載されるようなものである。 5エロンガーゼはここに記載されるようなものである。一具体化において、微細藻類は、オメガ-3 LC-PUFAsの合成の調節に関する酵素をコードする第二の異種核酸が含まれず、そして発現しない。別の具体化では、微細藻類には、オメガ-3 LC-PUFAsの合成の調節に関するポリペプチドをコードする第二の異種核酸が含まれ、そしてそれが発現する。別の具体化では、微細藻類には、オメガ-3 LC-PUFAsの合成の調節に関するポリペプチド、たとえば、グルコーストランスポーターをコードする第二の異種核酸が含まれ、そしてそれが発現する。トランスジェニック微細藻類はDHAの生成を可能にする条件下で培養される。

10

【0095】

一具体化において、本方法は、微細藻類においてDHA生成を増加させることにも関し、それには、

20

- a) *P. tricornutum*において 5エロンガーゼをコードする異種核酸を導入すること、および発現すること、
 - b) 前記異種核酸を発現する*P. tricornutum*を培養すること、および
 - c) 前記DHAを*P. tricornutum*から得ること
- が含まれる。

【0096】

微細藻類はここに記載されるようなものである。 5エロンガーゼはここに記載されるようなものである。一具体化において、微細藻類は、オメガ-3 LC-PUFAsの合成の調節に関する酵素をコードする第二の異種核酸を含まず、そして発現しない。別の具体化では、微細藻類には、-3 LC-PUFAの合成の調節に関する酵素をコードする第二の異種核酸が含まれ、そしてそれが発現される。別の具体化では、微細藻類には、オメガ-3 LC-PUFAsの合成の調節に関するポリペプチド、たとえば、グルコーストランスポーターをコードする第二の異種核酸が含まれ、そしてそれが発現される。

30

【0097】

*P. tricornutum*はDHAの生産を可能にする条件下で培養される。これらの条件は、当業者には明らかであろう。たとえば、*P. tricornutum*のための好適な培養条件は、約60-80 μモル光子m⁻²s⁻¹における一定の（連続）照明の下での約20 °である。一具体化では、本方法には、前記微細藻類を、オメガ-3 LC-PUFAsの生産を調節しない以上の追加の核酸、たとえば、グルコーストランスポーター遺伝子により変換すること、および外因性炭素源を供給することが含まれる。藻類は暗所で増殖することができる。

40

【0098】

別の具体化では、本方法は、微細藻類においてEPAを増加させることに関し、それには、

- a) 微細藻類において6 デサチュラーゼをコードする異種核酸を導入すること、および発現させること、
 - b) トランスジェニック微細藻類を培養すること、および
 - c) 前記EPAをトランスジェニック微細藻類から得ること
- が含まれる。

【0099】

微細藻類はここに記載されるようであり、6 デサチュラーゼはここに記載されるよう

50

なものである。微細藻類は(microalgaeis)EPAの生産を可能にする条件下で培養した。

【0100】

一具体化において、本方法は、微細藻類においてEPA生産を増加させることにも関し、それには、

a) P. triconutumにおいて6デサチュラーゼをコードする異種核酸を導入すること、および発現させること、

b) P. triconutumを培養すること、および

c) 前記EPAをP. triconutumから得ることが含まれる。

【0101】

微細藻類はここに記載されるようであり、6デサチュラーゼはここに記載されるようなものである。P. triconutumはEPAの生産を可能にする条件下で培養される。

【0102】

これらの条件は当業者には明らかであろう。たとえば、P. triconutumのための好適な培養条件は、約0-80 μモル光子m⁻²s⁻¹において一定の照明下で約20°であり、または好ましくは約25 μモル光子m⁻²s⁻¹において一定の照明下で約18°である。一具体化において、本方法には、前記微細藻類を、オメガ-3 LC-PUFAsの生産を調節しない一以上の追加の核酸、たとえば、グルコーストランスポーター遺伝子により変換すること、および外因性炭素源を供給することが含まれる。藻類は暗所で増殖させることができる。

【0103】

別の見地において、本発明は、油、脂質または脂肪酸組成物を製造するための方法に関し、それには、

a) ここに記載されるようなトランスジェニック微細藻類を、一以上のオメガ-3 LC-PUFAsの、生産を可能にする条件下で培養すること、

b) 前記一以上のオメガ-3 LC-PUFAsをトランスジェニック微細藻類から得ることが含まれる。

【0104】

好適な具体化において、オメガ-3 LC-PUFsはDHAまたはEPAである。

【0105】

別の見地において、本発明は、ここに記載されるようにトランスジェニック微細藻類から分離されたオメガ-3 LC-PUFAsまたは油に関する。

【0106】

本発明のプロセスによって生産される脂肪酸は、油、脂質または遊離脂肪酸の形で微細藻類から分離することができる。したがって、本発明の一具体化は、本発明の方法によって生産された油、脂質、または脂肪酸またはそれらの画分(フラクション)であり、特に好ましくは、油、脂質または脂肪酸組成物で、EPAまたはDHAが含まれるもの、およびトランスジェニック微細藻類に由来するものである。

【0107】

用語「油」、または「脂質」は、不飽和の、好ましくは、エステル化した、脂肪酸(群)が含まれる脂肪酸混合物を意味するものと理解される。油または脂質は、好適には、オメガ-3ポリ不飽和の、または、有利には、エステル化された、脂肪酸(群)において高い。特に好ましい具体化において、油または脂質は、高いALA、ETA、EPA、DPAおよび/またはDHA含量、好ましくは、高いEPAおよび/またはDHA含量を有する。

【0108】

分析について、脂肪酸含量は、たとえば、脂肪酸を、脂質のエステル交換反応によって、たとえば、トリアルギリセリドおよび/またはリン脂質などのようなメチルエステルに転換した後、ガスクロマトグラフィーにより測定することができる。

【0109】

本発明の方法において生産されるオメガ-3ポリ不飽和脂肪酸、たとえば、EPAおよびDHAは、脂肪酸誘導体の形態、たとえば、スフィンゴ脂質、ホスホグリセリド、脂質、糖脂質

10

20

30

40

50

、リン脂質、モノアシルグリセロール、ジアシルグリセロール (diacylglycerol) 、トリアシルグリセロール (triacylglycerol) または他の脂肪酸エステルでありうる。

【 0 1 1 0 】

存在するオメガ-3および他の多価不飽和脂肪酸は、たとえば、アルカリ、たとえば、水性KOHまたはNaOH、または酸加水分解で、有利には、メタノール、エタノールなどのアルコールの存在下での処理を介して、または酵素開裂を介して遊離させ、そしてたとえば、相分離およびその後の、たとえば、H₂SO₄を介した酸性化を介して分離することができる。脂肪酸はまた、上述した処理ステップを伴わずに直接に遊離させることもできる。

【 0 1 1 1 】

さらに精製が必要な場合、標準的な方法を採用することができる。そのような方法には、抽出、尿素を用いた処理、分別再結晶 (fractional crystallization) 、HPLC、分別蒸留、シリカゲルクロマトグラフィー、高速遠心分離または蒸留、またはこれらの技術の組合せが含まれうる。反応性基の保護、たとえば、酸またはアルケニル基などのものは、既知の技術によって任意のステップで行うことができる〔たとえば、アルキル化、ヨード化、ブチル化ヒドロキシトルエン (BHT) の使用〕。使用される方法には、メチル (m ethy) エステルを生成するために脂肪酸のメチル化が含まれる。同様に、保護基は任意のステップで除去することができる。望ましくは、たとえば、ALA、STA、ETA、EPA、DPAおよびDHAを含有する画分の精製は、尿素および/または分別蒸留での処理によって達成することができる。

【 0 1 1 2 】

藻類からの脂肪酸の大規模な精製方法は、当技術で知られている。たとえば、微細藻類株をフォトバイオリアクター、オープンpond（開放池）、レースウェイ（導水路）、ハイブリッドシステムを使用して細胞密度を増加させるために培養される。藻細胞は、ろ過、凝集または遠心分離によって、次いで抽出を改善するために、乾燥によって培地から分けられる。次に、脂質抽出は、通常、非水混和性有機溶媒を用いて行われる。より一層大規模な抽出は、典型的に、溶媒としてヘキサンを用いて行われる。続いて、不飽和脂肪酸は、合計脂質から、分別（分子）蒸留または脱ろうによって分離され、それにより油温はより一層多く飽和された脂質を沈殿するために低減される。PUFA油の品質、貯蔵寿命および量を改善するために更なる処理には、ろ過、ブリーチング（脱色）、脱臭、ポリッシング（つや出し）、酸化防止剤添加を含むことができる。これらの方法はすべて当業者に知られる。

【 0 1 1 3 】

別の見地において、本発明はまた、ここに記載されるように、脂肪酸、好適には、オメガ-3脂肪酸の生産におけるトランスジェニック有機体、好適には、微細藻類の使用に関する。本発明は、ここに記載されるように、トランスジェニック有機体、好適には、微細藻類の、またはここに記載されるように、トランスジェニック有機体、好適には、微細藻類から得られる油、脂質、脂肪酸の、飼料、食物、化粧料、栄養補助食料（ニュートリストティカル）または薬における使用を包含する。本発明は、ここ記載されるように、飼料、食物、化粧料、栄養補助食料または薬の生産におけるトランスジェニック有機体、好適には、微細藻類の使用を包含する。別の見地において、本発明はまた、ここに記載されるように、動物、好適には、魚用の飼料としての、トランスジェニック微細藻類の使用に関する。

【 0 1 1 4 】

別の見地において、本発明はまた、ここに記載されるように、トランスジェニック微細藻類または前記微細藻類から得られる脂肪酸、好適には、オメガ-3脂肪酸、油、または脂質が含まれる組成物にも関する。好適な具体化において、組成物には、ここに記載されるように、トランスジェニック微細藻類またはそれから得られるか、または得ることが可能な生成物、たとえば、油などのようなものが含まれる。一具体化において、組成物は、食物サプリメント、または動物用飼料が含まれる製薬上の組成物、化粧料、食物であってよい。とりわけ、本発明は、ここに記載されるように、トランスジェニック微細藻類また

10

20

30

40

50

は前記藻類から得られる脂肪酸、好適には、オメガ-3脂肪酸、油、または脂質が含まれる食物に関する。これは、魚油を含むダイエタリーサプリメントの形態であることができる。本発明はまた、動物飼料、特に、水産養殖のためのものに関し、それには、ここに記載されるように、トランスジェニック微細藻類または前記藻類から得られる脂肪酸、好適には、オメガ-3脂肪酸、油、または脂質が含まれる。

【0115】

別の見地において、本発明は、医学において使用するために、ここに記載されるように、トランスジェニック微細藻類、前記微細藻類から得られる脂肪酸、好ましくは、オメガ-3脂肪酸、油、または脂質が含まれる組成物に関する。とりわけ、本組成物は、突然死のリスクを低減する高血圧の個体において血圧および心拍数の双方を低下させ、炎症を軽減するために、およびアテローム性動脈硬化症および虚血性心疾患の長期的なリスクを低減するために使用することができる。組成物はまた、湿疹または代謝症候群を処置するために用いることができる。また、DHAが豊富な食餌（ダイエット）は増加した認知能力およびうつに関連付けられ、そして関節炎およびII型糖尿病にプラスの効果を有する〔Horrocks（ホロックス）ら、1999〕。そのように、本発明はまた、ここに記載されるように、トランスジェニック微細藻類または前記微細藻類から得られる脂肪酸、好ましくは、オメガ-3脂肪酸、油、または脂質が、アテローム性動脈硬化（症）、血栓症、高血圧、心筋梗塞を含める心血管状態およびアテローム性動脈硬化、炎症状態、うつ病、認知低下、関節炎、およびII型糖尿病の処置または防止における使用のために含まれる組成物に関連する。また、本発明の範囲に包含されるのは、心血管および炎症の状態、うつ病、認知機能低下、関節炎およびII型糖尿病を処置または防止する方法であり、それには、ここに記載されるように、トランスジェニック微細藻類、前記微細藻類から得られる脂肪酸、好ましくは、オメガ3脂肪酸、油、または脂質の治療上の量が含まれる組成物を、それを必要とするペイシェント（受動体、患者）に投与することが含まれる。本発明はまた、アテローム性動脈硬化、血栓症、高血圧、心筋梗塞を含める心血管状態およびアテローム性動脈硬化、炎症状態、うつ病、認知機能低下、関節炎、およびII型糖尿病を処置するための薬の製造における、ここに記載されるようなトランスジェニック微細藻類が含まれる組成物の使用にも関する。

【0116】

好ましい具体化において、組成物は、ここに記載されるように、6デサチュラーゼがコードされる核酸を発現するトランスジェニック微細藻類および/または5エロンガーゼがコードされる核酸を発現するトランスジェニック微細藻類を含んでもよく、またはそれから得られる。

【0117】

本発明者らは、微細藻類を、異種遺伝子発現を使用して、LC-PUFAs、とりわけ、EPAおよびDHAの増加した量を生成するために組換え法を用いて操作することができることを示した。本発明者らは、驚くべきことに、*Ostreococcus tauri*（オストレオコッカス・タウリ）単独からの5エロンガーゼの異種発現が、合計脂肪酸の最大で13%にまで達するトランスジェニック株におけるDHAレベルを有する*P. tricornutum*（*P. トリコルヌーム*）でのDHAの増加した蓄積をもたらすことを実証した。当業者は、本発明が、藻類に制限されず、そして実際、EPA/DHAを作成する任意の有機体に適用できることを理解するであろう。このように、本発明はまた、異種5エロンガーゼ、好ましくは、*Ostreococcus tauri*からの5-エロンガーゼを発現する、増加したDHAのレベルを有するトランスジェニック有機体に関する。一具体化において、他の導入遺伝子はトランスジェニック有機体において発現されない。ここに記載するように、別の具体化では、さらなる導入遺伝子を発現させることができる。さらに、本発明はまた、トランスジェニック有機体におけるDHAの生産を増加させるための方法に関する。これは、前記有機体における異種5エロンガーゼ、好ましくは、*Ostreococcus tauri*からの5エロンガーゼを発現させることによって達成される。前記方法の詳細をここに記載する。

【0118】

10

20

30

40

50

有機体は、動物、たとえば、哺乳動物でありうる。一具体化において、人間は特別に除外される。別の具体化では、有機体は、たとえば、单子葉植物または双子葉植物、たとえば、作物植物である。作物植物には、制限されないが、メイズ(トウモロコシ)、イネ、コムギ、アブラナ(ナタネ)/キャノーラ(セイヨウアブラナ)、ソルガム(モロコシ)、ダイズ、ヒマワリ、アルファルファ、ポテト(ジャガイモ)、トマト、タバコ、ブドウ、オオムギ、ピー(エンドウ)、ビーン(マメ)、ソラマメ、レタス、ワタ(コットン)、サトウキビ、テンサイ、ブロッコリーまたは他のアブラナ属植物類またはポプラが含まれる。

【0119】

別の見地において、本発明は、藻類および高等植物におけるオメガ-3長鎖多価不飽和脂肪酸合成経路の異種再構成に有用でありうるデサチュラーゼおよびエロンガーゼの新規な形態をコードする分離された核酸に関する。具体的には、本発明は、6デサチュラーゼ(Ost809_6)、4デサチュラーゼ(Ost809_4)および6エロンガーゼ(FcEL06)およびそれらの対応するポリペプチドをコードする分離された核酸に関する。

10

【0120】

一具体化において、本発明は、配列番号7または9のものが包含される分離された核酸で、配列番号8または10が含まれるか、またはそれからなる5デサチュラーゼ(Ost809_6)、その機能的変種または配列番号8または10と少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の相同性を有する6デサチュラーゼをコードするものに関する。配列はまた、発現標的有機体のために最適化されたコドンであることができる。

20

【0121】

一具体化において、本発明は、配列番号15または17のものが包含される分離された核酸で、配列番号16または18が含まれるか、またはそれからなる4デサチュラーゼ(Ost809_4)、その機能的変種または配列番号16または18と少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の相同性を有する4デサチュラーゼをコードするものに関する。配列はまた、発現標的有機体のために最適化されたコドンあってよい。

30

【0122】

一具体化において、本発明は、配列番号19のものが包含される分離された核酸で、配列番号20が含まれるか、またはそれからなる6エロンガーゼ(FcEL06)、その機能的変種または配列番号20と少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の相同性を有する6エロンガーゼをコードするものに関する。配列はまた、発現標的有機体のために最適化されるコドンでありうる。

40

【0123】

一具体化において、本発明は、配列番号21のものが包含される分離された核酸で、配列番号22が含まれるか、またはそれからなる5デサチュラーゼ、その機能的変種または配列番号22と少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の相同性を有する5デサチュラーゼをコードするものに関する。配列はまた、発現標的有機体のために最適化されるコドンであることができる。

50

【 0 1 2 4 】

本発明はまた、上記で特定されるように、分離された核酸の一以上が含まれるベクターに関する。ベクターは制御配列をさらに含むことができる。

【 0 1 2 5 】

本発明はまた、オメガ-3 LC-PUFAsの増加した生成を有するトランスジェニック微細藻類にも関連し、そこでは、前記微細藻類は核酸を発現し、それらには、配列番号7、9、15、17、19または21か、または配列番号8、10、16、18、20または22と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の相同性を有するペプチドをコードする配列が含まれる。
トランスジェニック微細藻類、油またはそれから分離される脂質が含まれる組成物、およびここに記載されるように、医学的薬または薬剤の調剤、処置の方法または飼料、食物、製薬または栄養補助食料においての使用は、本発明の範囲内である。

10

【 0 1 2 6 】

理論に縛られることを望まないが、本発明者らは、これらのヌクレオチドの活性が、藻類および植物におけるオメガ-3長鎖多価不飽和脂肪酸生合成経路の異種再構成において有用であろうと考える。たとえば、Ost809_6酵素の優れた基質選択性は、それを他のOstreococcus(オストトレオコッカス)D6デサチュラーゼと区別し、そしてn-3経路を通して基質のフラックス(流動)を最大化するために用いることができる。同様に、Ost809_4活性は、トランスジェニック光合成有機体におけるDPAのDHAへの特異的転換において有用であり、一方でFcEL06活性はGLAが20:3n-6まで伸長することができる手段を提供することが分かるであろう。

20

【 0 1 2 7 】

別の具体化において、本発明は、従って配列番号7または9のものが含まれるか、またはそれからなる核酸で、配列番号8または10が含まれるか、またはそれからなる6デサチュラーゼ(Ost809_6)、その機能的変種または配列番号8または10と少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の相同性を有する6デサチュラーゼをコードするもの、または配列番号16または18、その機能的変種または配列番号16または18と少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の相同性を有する4デサチュラーゼが含まれるか、またはそれからなる核酸、配列番号19のものが含まれるか、またはそれからなる核酸で、配列番号20が含まれるか、またはそれからなる6エロンガーゼ(FcEL06)、その機能的変種または配列番号20と少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の相同性を有する6エロンガーゼをコードするもの、または配列番号21のものが含まれるか、またはそれからなる核酸で、配列番号22が含まれるか、またはそれからなる5デサチュラーゼ、その機能的変種または配列番号22と少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の相同性を有する5デサチュラーゼをコードするものから選ばれる分離された核酸の、増加したオメガ-3脂肪酸含量を有するトランスジェニック有機体の生産における使用に関する。とりわけ、本発明は、n-3経路を通して基質のフラックスを最大化し、そしてEPAおよび/またはDHAの増強されたレベルを生成するために6デサチュラ

30

40

50

ーゼ(Ost809_6)をコードする分離された核酸の使用に関する。別の具体化において、本発明は、DPAをDHAに転換するために4デサチュラーゼ(Ost809_4)をコードする分離された核酸の使用に関する。別の具体化において、本発明は、GLAを20:3にまで長くするために6エロンガーゼをコードする分離された核酸の使用に関する。

【0128】

別の具体化において、本発明は、配列番号19のものが含まれるか、またはそれからなる核酸で、配列番号20が含まれるか、またはそれからなる6エロンガーゼ(FcEL06)、その機能的変種、または配列番号20と少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の相同性を有する6エロンガーゼをコードするもの、または配列番号21のものが含まれるか、またはそれからなる核酸で、配列番号22が含まれるか、またはそれからなる5デサチュラーゼ、その機能的変種または配列番号22と少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の相同性を有する5デサチュラーゼをコードするものから選ばれる分離された核酸の、DHA含量を増加させることでの使用に関する。例および図13に示されるように、DHAは、少なくとも10%、たとえば、14-17%だけ増加される。

10

20

30

40

【0129】

別の具体化において、本発明は、オメガ-3 LC-PUFAs生産の、とりわけ、DHAおよび/またはEPAの増加を有するトランスジェニック有機体を生産するための方法に関し、それに配列番号7または9のものが含まれるか、またはそれからなる分離された核酸で、配列番号8または10が含まれるか、またはそれからなる6デサチュラーゼ(Ost809_6)、その機能的変種または配列番号8または10と少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の相同性を有する6デサチュラーゼをコードするもの、または配列番号16または18、その機能的変種または配列番号16または18と少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の相同性を有する4デサチュラーゼが含まれるか、またはそれからなる核酸、配列番号19のものが含まれるか、またはそれからなる核酸で、配列番号20が含まれるか、またはそれからなる6エロンガーゼ(FcEL06)、その機能的変異体または配列番号20と少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の相同性を有する6エロンガーゼをコードするもの、または配列番号21のものが含まれるか、またはそれからなる核酸で、配列番号22が含まれるか、またはそれからなる5デサチュラーゼ、またはその機能的変種または配列番号22と少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の相同性を有する5デサチュラーゼをコードするもので有機体を変換することが含まれる。

【0130】

—具体化において、本発明は、DHA生成の増加を有するトランスジェニック有機体を生

50

産するための方法に關し、それには、有機体を分離された核酸により変換することが含まれ、核酸は、配列番号19が包含されるか、またはそれからなる核酸で、配列番号20が含まれるか、またはそれからなる 6エロンガーゼ (FcEL06)、その機能的変種または配列番号20と少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の相同性を有する 6エロンガーゼをコードするもの、または配列番号21が包含されるか、またはそれからなる核酸で、配列番号22が含まれるか、またはそれからなる 5-デサチュラーゼ、その機能性変種または配列番号22と少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の相同性を有する 5 デサチュラーゼをコードするものから、DHA含量を増加させることにおいて選ばれる。例および図13において示すように、DHAは、少なくとも10%、たとえば、14-17%で増加させられる。

【0131】

別の具体化において、本発明は、オメガ3脂肪酸の生産を増加させるための方法に關し、配列番号7または9のものが包含されるか、またはそれからなる分離された核酸で、配列番号8または10が含まれるか、またはそれからなる 6デサチュラーゼ (Ost809_6)、その機能的変種または配列番号8または10と少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の相同性を有する 6デサチュラーゼをコードするもの、配列番号16または18、その機能的変種または配列番号16または18と少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の相同性を有する 4デサチュラーゼが包含されるか、またはそれからなる核酸、配列番号19のものが包含されるか、またはそれからなる核酸で、配列番号20が含まれるか、またはそれからなる 6エロンガーゼ (FcEL06)、その機能的変種または配列番号20と少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の相同性を有する 6エロンガーゼをコードするもの、または配列番号21が包含されるか、またはそれからなる核酸で、配列番号22が含まれるか、またはそれからなる 5デサチュラーゼ、その機能的変種または配列番号22と少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の相同性を有する 5デサチュラーゼをコードするもので有機体が変換される。

【0132】

一具体化において、本発明は、オメガ3脂肪酸の生産を増加させるための方法に關し、有機体が分離された核酸により変換され、核酸は、配列番号19のものが包含されるか、またはそれからなる核酸で、配列番号20が含まれるか、またはそれからなる 6エロンガーゼ (FcEL06)、その機能的変種または配列番号20と少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の相同性を有する 6エロンガーゼをコードするもの、または配列番号21が包含されるか、またはそれからなる核酸で、配列番号22が含まれるか、またはそれからなる 5デサチュラーゼ、その機能的変種または配列番号22と少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の相同性を有する 5デサチュラーゼをコードするもので有機体が変換される。

10

20

30

40

50

なくとも99%の相同性を有する 6エロンガーゼをコードするもの、または配列番号21のものが包含されるか、またはそれからなる核酸で、配列番号22が含まれるか、またはそれからなる 5デサチュラーゼ、その機能的変種または配列番号22と少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の相同性を有する 5デサチュラーゼをコードするものから、DHA含量を増加させることにおいて選ばれる。例および図13において示すように、DHAは、少なくとも10%、たとえば、14-17%により増加される。

【0133】

10

本方法の一具体化において、方法にはさらに、前記微細藻類をオメガ-3脂肪酸の生産を調節する一以上の追加の核酸により変換することが含まれてもよい。別の具体化では、オメガ-3脂肪酸の生産を調節する追加の核酸は、前記微細藻類中に導入されない。他の異種核酸、たとえば、グルコーストランスポーターがコードされるものは、含まれてもよい。

【0134】

別の見地において、本発明は、ここに規定される分離された核酸の一以上が含まれるベクターにより変換された宿主細胞に関し、具体的に、分離された核酸には、配列番号1、3、5、7、9、15、17、19または21のものが含まれる。一具体化において、宿主細胞は、ここに規定される分離された核酸のいずれかが含まれるベクターを用いて変換され、そしてLC-PUFAsの合成経路の調節に関する他の異種導入遺伝子は、前記有機体において発現されない。

20

【0135】

宿主細胞は藻類または高等植物細胞であることができる。たとえば、宿主細胞は微細藻類である。一具体化において、宿主細胞は珪藻類である。宿主細胞はまた、一以上の追加の導入遺伝子を含んでもよい。たとえば、宿主細胞は、5エロンガーゼをコードする核酸を発現する、ここに記載されるトランスジェニック微細藻類であってもよい。

30

【0136】

上記の方法に従うトランスジェニック有機体は、微細藻類または高等植物でよい。好適には、記載された方法に従うトランスジェニック有機体は、微細藻類である。用語の微細藻類は、ここでの他の箇所で規定され、そしてそれには、珪藻類が含まれる。一具体化において、微細藻類はP. tricornutum (P. トリコルヌーム)である。用語の高等植物には、単子葉植物および双子葉植物が含まれる。一具体化において、ここに記載されるように、植物は作物である。

40

【0137】

本開示において引用されるすべての参考文献は、それらの全体の開示内容および具体的に本出願で言及される開示内容について、参照によりここに組み込まれる。

50

【0138】

ここで使用される「および/または」は、他の方法で指示されない限り、複数の特定の特徴または成分のそれぞれの具体的開示として、それぞれの組合せにて他を伴うか、または伴わないで解釈されるべきである。たとえば、「A、Bおよび/またはC」は、(i) A、(ii) B、(iii) C、(iv) AおよびB、(v) BおよびCまたは(vi) AおよびBおよびC、それぞれが個別にここに記載されているかのように、そのそれぞれの具体的開示として解釈されるべきである。

50

【0139】

文脈上他に指示されない限り、上記に示された特徴の説明および定義は、本発明の任意の特定の見地または具体化に制限されず、および記載されるすべての見地および具体化に等しく適用される。

50

【0140】

本発明はさらに、以下の非制限的な例において説明される。

50

【実施例】

【 0 1 4 1 】

例1 6デサチュラーゼ過剰発現トランスジェニック藻類の生成および 5エロンガーゼ過剰発現トランスジェニック藻類の生成

【 0 1 4 2 】

材料と方法

【 0 1 4 3 】

株および増殖条件

P. tricornutum (*P. トリコルヌーム*) UTEX 646はESAW培地 [Harrison (ハリソン) ら、1980] 中で18 および20 での一定の照明における白色蛍光の下で緩やかな振とうと共に増殖させた ($30 \mu\text{モル}$ および $60 \mu\text{モル} \text{光子} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)。野生型およびトランスジェニック藻類の分析は、対数期および定常増殖期の間で行われた。

10

【 0 1 4 4 】

プラスミド設計およびクローニング

Ostreococcus tauri (*オストレオコッカス・タウリ*)、OtD6 [Domergue (ドマーグ) ら、2005] からの 6デサチュラーゼおよび*O. tauri* の 5エロンガーゼOtElo [Meyer (マイヤー) ら、2004] のコード配列は、それぞれ、Kpn-XbaおよびEcoRV-SacI断片として、D. P.G.Kroth (P.G.Kクロス博士) [Universitat Konstanz (コンスタンツ大学)、ドイツ国] の好意によって提供されたpPha-T1ベクター [Zaslavskaya (ザスラフスカイヤ) ら、2000] 中に挿入された。OtD6のコード領域は、*P. tricornutum*の中での発現用に、コドン最適化スクレオチド配列OtD6PTを化学的に合成するために鋳型として使用した [Genscript Corporation (ジェンスクリプト・コーポレーション)、NJ (ニュージャージー州)]。このコドン最適化 6デサチュラーゼ配列を、EcoRV-SacI部位を用いて、pPha-T1ベクター中にクローニングした。*P. tricornutum* (*P. トリコルヌーム*)からの 6デサチュラーゼ、PtD6 (Domergueら、2002) のためのコード配列を、pPha-T1ベクター中にBamHI-XbaI断片として挿入した (Zaslavskayaら、2000)。

20

【 0 1 4 5 】

微粒子錠変換

P. tricornutum (*P. トリコルヌーム*) の微粒子錠形質転換は、以前の記載に従って行った (Zaslavskayaら、2000; Kroth 2007)。衝撃を与えられた細胞は $75 \mu\text{g}/\text{ml}$ のゼオシンを含むESAW寒天プレート上に移した。ゼオシンプレートを蛍光 ($50 \mu\text{モル} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) の下で24時間光に入れ、そして3週間20 でインキュベートした。選定されたゼオシン耐性コロニーは、脂質分析用に液体培地マイナス抗生物質に移す前に、新鮮なゼオシンプレートおよび2mlのESAW+ゼオシン培養に移した。

30

【 0 1 4 6 】

脂肪酸分析

藻類または酵母細胞を遠心分離により収集した。脂肪酸は、記載されるように、わずかな修飾を伴って抽出し、そしてメチル化した [Garces (ガルセス) およびMancha (マンチャ)、1993]。藻類培養の15mlアリコートを収集し；メチル化後、ヘプタン画分を濃縮し、そしてGCカラム上への $1 \mu\text{l}$ の注入前に $40 \mu\text{l}$ の溶媒において再懸濁させた。抽出した合計脂肪酸のメチルエステル誘導体を、Agilent (アジレント) DB-225カラムを用いたGCによって分析し、そして既知の標品を用いて確認した。

40

【 0 1 4 7 】

アシルCoAプロファイリング

藻類細胞を、遠心分離によって収集し、液体窒素中で凍結し、蛍光アシルエテノアセチルCoA誘導体の定量分析または陽イオンモードでのエレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析 (マルチ反応モニタリング) のいずれかを用いた逆相LCのために、Larson (ラーソン) およびGraham (グラハム) (2001) 後に抽出した エテノCoA誘導体の分析のために、HPLC [Agilent 1200 LCシステム ; Phenomenex (フェノメネックス) LUNA 150 · 2mmのC18 (2) カラム] を以前に記載の方法および勾配条件を使用して行い (LarsonおよびGraham 2001) ; その一方で、LC-MS/MS+MRM分析が、Haynes (ヘインズ) ら、2008によって記

50

載された方法に従った [Agilent 1200 LCシステム ; Gemini (ジェミニ) C18カラム、2mmの内径、5mmの粒子を有する150mm]。識別および較正の目的のために、C14からC20までのアシル鎖長を有する標準的なアシルCoAエステルを、遊離酸またはリチウム塩としてSigma (シグマ社) から購入した。

【0148】

脂質プロファイリング

TAGsおよびPLsの分子種は、エレクトロスプレーイオン化トリプル四極子質量分析法によって分析した [API 4000 QTRAP ; Applied Biosystems (アプライド・バイオシステムズ)]。極性脂質の分子種は、頭部基断片およびESIによって形成された無傷の脂質イオンの質量/電荷の存在によって規定された [Welti (ウェルチ) ら、2002 ; Devaiah (デバイア) ら、2006に、Xiao (シャオ) ら、2010によって記載された修飾を伴う]。そのようなタンデムESI-MS/MS前駆体および生成物イオンスキャンは、頭部基断片 (ヘッドグループフラグメント) に基づいて、個々の脂肪酸アシル種を定めない。代わりに、極性脂質は、クラス、合計アシル炭素、およびアシル炭素-炭素二重結合の合計数のレベルで識別される。極性脂質は一連の極性脂質内部標準と比較して定量化された。Krank (クランク) ら (2007) の後の測定されたトリアシルグリセロール (TAGs) は、一つのアシルフラグメントの存在および無傷の脂質から形成されたイオンの質量/電荷 (ニュートラルロスプロファイリング) によって定義された。これは、一つのTAGアシル種および合計アシル炭素および他の二つの鎖におけるアシル二重結合の合計数の確認を可能にする。手順は、他の二つの脂肪酸の個々の、または個々のアシル鎖がグリセロール上に占める位置 (sn-1, sn-2、またはsn-3) の識別を可能にしない。TAGsは、極性脂質と同様の方法で定量し、バックグラウンド減算、平滑化、統合、同位体デコンボリューション (同位体逆重畠) および試料ピークの内部標準のものとの比較 [LipidView (リピドビュー)、Applied Biosystems (アプライド・バイオシステムズ社) を使用] が含まれた。しかし、クラス内極性脂質は、同様の質量スペクトル応答ファクター (応答係数) を示すのに対し、種々のTAG種の質量スペクトル応答は、個々の分子TAG種の差動イオン化のため可変である。ここに示したデータでは、応答補正がデータに適用されなかった。データは内部標準tri15:0およびtri19:0に対して標準化された。

10

20

30

【0149】

結果

【0150】

6デサチュラーゼ過剰発現のトランスジェニック藻類の生成。

自然コードOtD6およびO.tauri 6デサチュラーゼのためのP. tricornutumのヌクレオチド配列中での発現のために最適化されたコドンを、pPha-T1ベクター中にクローニングし、それぞれ、発現カセットOtD6NおよびOtD6Ptが生成され、そして得られた構築物はP. tricornutumを変換するために使用された。

【0151】

OtD6N構築物の発現

13ゼオシン耐性コロニーを、OtD6Nでの変換によって得、およびさらなるスクリーニングのために選定した。選定したコロニーを液体培地に移し、そしてOtD6Nを含むいくつかの陽性形質転換体を同定した。本発明者らは、EPAおよび全脂肪酸のWtおよびトランスジェニックのP. tricornutumでの生産に対する温度および光の影響を研究した。培養物は、異なる温度 (18 および20) で増殖させ、異なる光強度において一定の照明下であった (25 μモルおよび60 μモル光子m⁻²s⁻¹)。GC-MS分析は、細胞増殖の対数期 (E) および定常期 (S) 中に実行された。WTおよび変異体の脂肪酸プロファイリングは、パルミトレイン酸 (16:1⁹)、EPA (20:5n-3)、パルミチン酸 (16:0) およびミリスチン酸 (14:0) が藻類細胞増殖において双方の段階で検出される主要なFAsであることを示した。Tono n (トノン) ら (Tonon 2002) によって240 μE m⁻²s⁻¹での18 で増殖させたP. tricornutum (CCAP 1052/1A) 細胞培養の研究から得られた結果と同様に、EPAおよびDHAの量における減少が対数期から定常期にシフトする本発明者らの研究で用いたP. tricornutum UTEXS

40

50

646の細胞としてあった。脂肪酸分析は、Otd6Nにより形質転換し、そして光強度 $25\text{ }\mu\text{mol}$ および $60\text{ }\mu\text{mol}$ 光子 $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ で20にて増殖させた細胞において、EPAおよびDHAは、定常期への移行の際に減少したことを明らかにした。しかし、定常期において $20\text{ }、60\text{ }\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ にて増殖させたOtd6N細胞におけるEPAおよびDHAのレベルは、WTはP. tricornutumのものよりも高かった(WTにおけるEPAの18.5%およびDHAの1.3%と比較して、Otd6NにおいてEPAの21.2%およびDHAの1.8%(表III、図1))。対照的に、本発明者らは、 $18\text{ }、25\text{ }\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ にて増殖させたトランスジェニックOtd6N細胞において、EPAおよびDHAのレベルが対数期に比べて定常期に増加し、そしてWT試料よりも著しく高いことがわかった(WTにおいてEPAの16.5%およびDHAの0.9%に比べてOtd6NにおいてEPAの30.2%およびDHAの1.8%)。WtおよびOtd6NジェニックのP. tricornutumからの脂肪酸プロファイルは、6不飽和脂肪酸(GLAおよびSDA)組成に差を示さず、それはかろうじて存在していた。

10

【0152】

OtD6PT構築物の発現

OtD6PTによる形質転換により得られた4ゼオシン耐性コロニーを、さらなるスクリーニングおよびGC-MS分析用に培養物に接種するために選定した。定常期にEPAおよびDHAのレベルを低下させる方向への同じ傾向が異なる光強度および温度で増殖させたトランスジェニックOtd6Pt細胞について観察された(表III、図1)。組換え細胞はEPAのより一層高いレベルを発現した(定常期において $20\text{ }、60\text{ }\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ にての20.8%、および $18\text{ }、25\text{ }\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ にての22.2%は、それぞれWTにおいての18.5%および16.8%と比較される)。EPAの一層高いレベルの検出に加え、本発明者らはまた、DHAレベルにおいて増殖の二相の間の軽微な変動と共に増加を観察した(表III、図1)。

20

【0153】

OtE1o5過剰発現のトランスジェニック藻類の生成

OtE1o5で形質転換して得られた3ゼオシン耐性クローンを最初のスクリーニングで同定し、さらにスクリーニングおよびGC-MS分析のための培養物に接種するために使用した。培養物を、20にて、 $60\text{ }\mu\text{mol}$ 光子 $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ における一定の照明の下で増殖させた。OtE1o5により形質転換したP. tricornutumのFAMEs(脂肪酸メチルエステル)分析は、細胞増殖の対数期(E)および定常期(S)中に実行され、そしてWTにおいては検出されなかつたトランスジェニッククローンにおける2.8-4.7%の範囲でのDPAの存在が明らかにされた(表IV、図2a)。形質転換したクローンにおけるEPAのレベルは、増殖の対数期におけるWTでの35.9%に比べて17.7%の平均値に、およびE1o5遺伝子過剰発現クローンにおいて定常期中のWTでの18.5%に比べて8.2%に減少した。DHAにおける大幅な増加は、すべての3つのトランスジェニッククローンにおいて、対数期で7.4%および定常期で10.4%の平均を、WTでのそれぞれ2.0%および1.3%と比較して観察された。DHA蓄積は定常期への移行の際に増加した。

30

【0154】

アシル-CoAプール組成の決定

珪藻においてアシル不飽和化(アシル脱饱和)のプロセスをより一層良好に理解するために、アシル-CoAプールの組成を、OtE1o5エロンガーゼを発現する野生型(WT)およびトランスジェニックP. tricornutumについて決定した(図3)。増殖の定常期におけるWTのP. tricornutumのアシル-CoAプロファイルの研究は、パルミチン酸、パルミトレイン酸、ステアリン酸、オレイン酸およびEPA-CoAが最も豊富であり、このようにして、アシルCoAプールでの自然な脂肪酸対合計脂肪酸のレベルの間の直接的な関係を示すことを明らかにした。EPA-CoAはアシルCoAプールの5.7%を占め、EPA-CoAのこのレベルが、潜在的に22:5n-3への伸長および22:6n-3への不飽和化を通してDHAの合成における中間体として作用することができることが示された。22:4n-6、22:5n-3(DPA)およびDHAのトレース(痕跡量)だけ(<1.0)が、WTのP. tricornutumのCoAプールで検出された。図3に見られるように、トランスジェニックのP. tricornutumの同様の分析は、22:4n-6、22:5n-3(EPA)およびDHAのレベルでの大幅な増加を、EPAレベルの減少を伴って実証した。図4に示すように、細胞増殖の異なる段階を通じたアシル-CoAプールの組成の詳細な分析は、EPAお

40

50

よびDHAが対数期から定常期までに積的に蓄積し、定常期において5.2%および6.3%の最大レベルが表示されたことを明らかにした。

【0155】

TAG分子種のプロファイリング

この研究では、本発明者らは、WTおよび0tElo5トランスジェニック*P. tricornutum*によって形成されたTAGsの分子種を同定し、そして比較し、および対数期から定常期への移行に応じてTAGs合成における変化を調べた。培養物を20にて、 $60 \mu\text{M}$ モル光子 $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ での一定の照明下で増殖させ、およびESI-MSを用いて分析した。藻類の脂質抽出物の直接注入ESI-MSから得られた質量スペクトルは、その大部分の分子イオンが750および950の質量/電荷 (m/z) 間で観察されることを示した。本発明者らは、WTの*P. tricornutum*で26の個々のTAG種を検出した。WTの油抽出物は、大部分がTAGs 46:1、46:2 48:1、48:2、48:2および48:3および50:3から構成され、パルミチン酸 (16:1)、パルミトオレイン酸 (16:1)、およびミリスチン酸 (14:0) の酸置換基を有する。TAG 48:1 (16:0/16:0/16:1) および48:2 (16:0/16:1/16:1) は*P. tricornutum*細胞の経時的分析を通じて発現されるメインTAG分子種を構成する (図5aおよび図5B)。TAG分子種の多様性の増加 (できるだけ多くの29の個々のTAGsと共に) は、0tElo5エロンガーゼ (elongase) を発現する細胞から検出された。具体的には、新たなTAG種、54:8、54:9および56:8が観察され、そしてトランスジェニック細胞は、54:7の著しく高いレベルを示した。DHAは、TAGs 52:7、54:7、54:8、54:9および56:8に組み込まれた。時間経過 (図6) もまた、TAGs 54:7および56:8は、細胞が対数増殖期から定常期にシフトするように、TAGs中に組み込まれるより一層多くのDHAを有すると考えられることを明らかにした。TAGsの分子種52:7、54:8および54:9は、培養物を対数期から定常期にシフトさせるととき多少一定のDHAの割合を示した。TAGs含有DHAのレベルは対数関数的段階での12.5%および定常期での10.5%を平均した。

【0156】

10

20

【表4】

表 III。二つの増殖段階での異なる増殖条件下に *O. Tauri* (O. タウリ) Δ6 デサチュラーゼを発現する WT およびトランスジェニック *P. tricornutum* の脂肪酸組成 (モル%) であり、ここで、E は対数増殖期であり、S は定常増殖期である。各測定は三回の生物学的複製の平均である。

| 細胞株 | 20°C 60μmol フォトン | | 20°C 25μmol フォトン | | 18°C 25μmol フォトン | |
|-------------|------------------|----------|------------------|----------|------------------|----------|
| | E | S | E | S | E | S |
| Otd6N 14:0 | 6.3±1.1 | 5.6±1.6 | 11.5±0.7 | 7.6±1.5 | 13.0±1.1 | 10.9±1.0 |
| | 16:0 | 16.0±0.5 | 21.0±1.3 | 12.8±0.9 | 16.8±1.6 | 15.3±0.8 |
| | 16:1 | 28.3±1.7 | 36.5±1.6 | 32.8±0.2 | 30.3±1.9 | 35.1±2.1 |
| | 16:3 | 2.5±0.2 | 0.9±0.2 | 4.0±0.6 | 0.9±0.1 | 3.6±0.0 |
| | 18:0 | 0.5±0.0 | 0.7±0.0 | 0.3±0.0 | 0.4±0.0 | ND |
| | 18:1 | 6.2±1.4 | 8.6±1.5 | 18.1±0.0 | 24.9±0.3 | 2.1±0.2 |
| | 18:2n-6 | 1.5±0.1 | 0.6±0.0 | ND(不検出) | ND | 1.4±0.2 |
| | 18:3 n-6 | 0.7±0.3 | 1.3±0.3 | ND | ND | ND |
| | 18:4 n-3 | 0.8±0.1 | 0.8±0.1 | ND | 0.4±0.0 | 1.0±0.4 |
| | 20:5 n-3 | 32.2±3.6 | 21.2±1.9 | 20.6±1.1 | 17.8±2.6 | 27.1±2.7 |
| | 22:6 n-3 | 2.3±0.2 | 1.8±0.3 | 1.4±0.1 | 1.0±0.1 | 1.4±0.4 |
| | その他 | 6.89±0.6 | 4.3±0.6 | 12.2±1.8 | 6.0±0.2 | 5.7±0.4 |
| | | | | | | 6.2±0.6 |
| Otd6Pt 14:0 | 7.0±1.4 | 4.9±1.0 | 5.6±0.2 | 4.9±0.2 | 12.8±0.1 | 7.4±0.4 |
| | 16:0 | 16.3±1.3 | 20.2±1.5 | 9.5±0.3 | 16.8±0.7 | 17.0±0.9 |
| | 16:1 | 27.1±4.0 | 38.6±3.6 | 24.5±0.2 | 33.4±7.9 | 28.3±1.2 |
| | 16:3 | 2.5±0.2 | 1.1±0.3 | 4.0±0.6 | 1.4±0.1 | 2.9±0.0 |
| | 18:0 | 0.5±0.1 | 0.6±0.1 | 0.3±0.0 | 0.4±0.0 | ND |
| | 18:1 | 7.8±0.2 | 8.7±0.4 | 26.9±5.4 | 24.9±0.3 | 6.0±0.9 |
| | 18:2 n-6 | 1.1±0.2 | 1.1±0.1 | ND | ND | 1.2±0.0 |
| | 18:3 n-6 | 1.2±0.2 | 0.8±0.0 | 0.2±0.0 | 0.2±0.0 | ND |
| | 18:4 n-3 | 1.1±0.1 | 1.2±0.1 | 0.6±0.1 | 0.6±0.0 | 1.5±0.0 |
| | 20:5 n-3 | 33.2±1.4 | 20.8±3.5 | 27.0±4.0 | 16.6±2.0 | 25.8±0.1 |
| | 22:6 n-3 | 1.7±0.3 | 1.5±0.4 | 1.3±0.1 | 1.2±0.6 | 1.1±0.0 |
| | その他 | 9.2±0.6 | 4.3±0.9 | 12.3±1.8 | 5.5±3.6 | 7.3±0.3 |
| | | | | | | 3.1±0.3 |
| WT | 14:0 | 7.7±0.5 | 4.8±0.1 | 5.1±0.2 | 4.8±0.5 | 10.9±0.5 |
| | 16:0 | 16.5±0.4 | 22.2±0.6 | 11.0±2.0 | 16.6±3.2 | 19.7±0.4 |
| | 16:1 | 28.4±0.6 | 41.8±0.5 | 22.3±1.1 | 32.2±4.1 | 35.8±0.6 |
| | 16:3 | 2.4±0.3 | 1.0±0.1 | 2.6±0.6 | 0.6±0.1 | 2.4±0.3 |
| | 18:0 | 0.4±0.0 | 0.5±0.0 | 0.3±0.1 | 0.3±0.1 | ND |
| | 18:1 | 3.8±0.8 | 7.3±0.2 | 28.9±1.4 | 25.7±4.9 | 6.1±0.3 |
| | 18:2n-6 | 1.4±0.1 | 0.6±0.0 | ND | ND | 1.1±0.1 |
| | 18:3n-6 | 0.7±0.0 | 0.6±0.0 | ND | ND | ND |
| | 18:4 n-3 | 0.8±0.0 | 1.0±0.0 | 0.6±0.0 | 0.4±0.1 | 1.0±0.7 |
| | 20:5n-3 | 35.9±1.6 | 18.5±0.4 | 27.6±2.3 | 17.1±2.5 | 22.2±0.7 |
| | 22:6n-3 | 2.0±0.3 | 1.3±0.0 | 1.8±0.1 | 1.3±0.3 | 0.8±0.1 |
| | その他 | 6.8±0.3 | 2.4±0.3 | 10.0±0.9 | 5.1±0.8 | 4.9±0.5 |
| | | | | | | 2.9±0.3 |

【0 1 5 7】

10

20

30

40

【表5】

表IV。対数期(E)および定常期(S)の間0t Elo5を発現するWTおよびトランスジェニック*P. tricornutum*の脂肪酸組成(モル%)。培養物を70rpmで一定の攪拌下に、20°C、60μモルm⁻²s⁻¹で増殖させた。各測定は3回の生物学的複製の平均値である。

| 脂肪酸 | WT | | OtElo5 | |
|----------|----------|----------|----------|----------|
| | E | S | E | S |
| 14:0 | 7.7±0.5 | 4.8±0.5 | 8.4±1.2 | 5.3±1.6 |
| 16:0 | 16.5±0.5 | 22.1±0.6 | 16.8±0.6 | 17.4±1.3 |
| 16:1 | 28.4±0.6 | 41.8±0.5 | 32.9±0.4 | 42.5±1.6 |
| 16:3 | 2.4±0.3 | 1.0±0.0 | 3.6±0.6 | 1.7±0.6 |
| 18:0 | 0.4±0.0 | 0.5±0.0 | 0.6±0.0 | 0.5±0.0 |
| 18:1 | 3.8±0.8 | 7.3±0.2 | 6.8±1.1 | 6.8±1.5 |
| 18:2 n-6 | 1.4±0.1 | 0.6±0.0 | 0.6±0.0 | 0.3±0.0 |
| 18:3n-6 | 0.7±0.0 | 0.6±0.0 | 0.2±0.0 | 0.2±0.2 |
| 18:4 n-3 | 0.8±0.0 | 1.0±0.0 | 1.6±0.0 | 2.0±0.1 |
| 20:5 n-3 | 35.9±1.6 | 18.5±0.4 | 17.7±2.4 | 8.2±2.0 |
| 22:5 n-3 | ND | ND | 3.3±0.5 | 3.4±1.2 |
| 22:6 n-3 | 2.0±0.3 | 1.3±0.1 | 7.4±1.2 | 10.4±0.3 |
| 24:0 | 5.2±0.2 | 2.1±0.0 | 5.2±0.4 | 3.1±0.4 |
| その他 | 1.8±0.3 | 0.3±0.3 | 4.1±0.4 | 2.4±0.6 |

10

20

30

【0158】

考察

【0159】

多くの海洋微生物は、EPAおよびDHAを高レベルで生産するが、ほんの数種がトリアシルグリセロール(TAGs)の形態でこれらの脂肪酸を貯蔵脂質に分配する能力を有する。藻類の大部分は、TAGsにおいて飽和およびモノ不飽和脂肪酸を蓄積する[Harwood(ハーウッド)、1998;Roessler(レスラー)、1990b]。TAGsへのLC-PUFAsのパーティショニング(分配)は、*Parietochloris incise*(パリエトクロリス・インシサ)[Bigogno(ビゴグノ)ら、2002]、淡水レッド微細藻類の*Porphyridium cruentum*(ポルフィリジウム・クルエンタム)[Cohen(コーヘン)ら、2000]、および海洋微細藻類の*Nannochloropsis oculata*(ナンノクロロプシス・オキュラータ)、*Phaeodactylum tricornutum*(フェオダクチラム・トリコルヌーム)、*Thalassiosira pseudonana*(タラシオシラ・シュードナナ)および*Pavlova lutheri*(パブロワ・ルテリ)、(Tononら、2002)において観察された。このようにして、これらの種は、微細藻類において貯蔵油中のLC-PUFAsの取込みの原因となるプロセスを理解するために、さらなる研究用の良好な候補である。

【0160】

現状では、一般的に油性藻類は最適増殖条件下でTAGの少量を生産することが認められている[Hu(フー)ら、2008]。微細藻類でのトリアシルグリセロールの蓄積および脂肪酸組成に影響を与える主な要因の中には、温度および光強度がある。概して、温度低下および微小光(low light)による脂肪酸不飽和の増大はPUFAsの形成に有利であると考えられる。たとえば、*P. tricornutum* UTEXS 640において、EPA生産のための最適培養温度は21.5ないし23℃であった(Yongmanitchai W.およびWard O.、1991)。微細藻類の増殖のための最適な温度は、多くの場合n-3 PUFAsの形成のそれよりも高いので、温度シフト戦略が全体的なn-3 PUFAs(EPAを含む)の生産を増強するために採用される[Jiang(チャン)およびChen(チェン)、2000]。そのような現象は、*P. cruentum*(P. クルエンタム)[Springer(スプリンガー)ら、1994]、*Nannochloropsis* sp.(ナンノクロロプシス種)[Sukenik(スーケニク)、1991]および*P. irregular*(P. イレギュラ)[Stinson(スティンソン)ら、1991]を含めて多くの異なった藻類種において観察される。しかし、Ohta(オオタ)ら(1993)は、*P. purpureum*の増殖のための最適な温度がまた、最も高い

40

50

EPA含量を有するバイオマスをもたらすことを観察した。これらの結果は、細胞増殖およびn-3 PUFA生産に対する温度の影響を個々の微細藻類種について注意深く検討する必要があることを示唆する。

【0161】

*P. tricornutum*におけるTAG種のプロファイリングは、以前に報告されている [YongmanitchaiおよびWard (ウォード) 1993 ; Yu (ユー) ら、2009]。本発明者らは、これらの初期の研究に記載されているように、TAGsに組み込まれる同じ主な脂肪酸を観察した (すなわち、14 : 0、16 : 0、16 : 1、16 : 3、および20 : 5)。YongmanitchaiおよびWard、1993は、逆相HPLC分析を介し、わずか18のTAG分子種を同定した。高い解像度およびESI-MSの感度のため、Yuら、2009は、藻類油抽出物においてさらに二倍の種を検出することができた (18種の14で、それらは、同等の組成比でHPLCにより検出された)。しかし、TAGsの48 : 7、48 : 9、48 : 12、および54 : 10は、検出されず、それは*P. tricornutum*株および培養条件における違いによって説明することができた。

10

【0162】

例2

藻類および植物におけるPUFAsの生合成のための新たな活性の同定および特徴付け

【0163】

2.1微細藻類の*Ostreococcus* (オストレオコッカス) RCC809からの 6デサチュラーゼの同定

20

【0164】

緑藻の*Ostreococcus* RCC809のゲノムを、クエリーとして既に知られるN末端シトクロムb5融合デサチュラーゼを使用してBLASTを用いて分析した。この分析は、推定上のPUFAデサチュラーゼについてコードするいくつかの遺伝子の存在を明らかにした。推断されるオープンリーディングフレームは、珪藻においての発現用にスクレオチド配列を最適化したコドンを化学的に合成するために鋳型として使用した (Genscript Corporation、NJ)。

【0165】

推定上の*Ostreococcus* RCC809の 6デサチュラーゼの酵母における機能的特徴付け。

【0166】

推定上の 6デサチュラーゼ (配列番号7ないし10、以下にOst809_6と称する) のオープンリーディングフレームを最適化するコドンは、酵母発現ベクターpYES2 [Invitrogen (インビトリオゲン社) 、 NJ] のガラクトース誘導性GAL1プロモーターの後ろのKpnI-SacI フラグメントとして挿入した。Ost809_6

30

【0167】

S. cerevisiae (*S. セレビシエ*) 株W303-1Aを、酢酸リチウム法を用いてプラスミドDNAにより形質転換した。培養物を48時間、2% (v/v) のラフィノースの存在下に22℃で増殖させ、および導入遺伝子の発現を、リノール酸 (LA、18 : 2n-6) の0.5mMおよび1% (w/v) のタージートルNP-40 (Sigma) の存在下での2%までのガラクトースの添加によって説明されたように誘導した (Sayanovaら、2001)。

【0168】

候補のデサチュラーゼOst809_6の予測される機能 (461アミノ酸のC18 6デサチュラーゼをコードすると予測される) は、潜在的な脂肪酸基質の範囲の存在下で*S. cerevisiae* (*S. セレビシエ*) における発現研究によって調査した。酵母細胞からの総脂肪酸メチルエ斯特ルは、次にGC-FIDによって分析し、そして新規ピークの同一性はGC-MSおよび真正標準との同時泳動により確認された。図8に示すように、Ost809_6をコードする合成ORFの発現は、外から供給された基質 (リノレン酸、ALA、C18 : 9、12、15) を 6不飽和化生成物SDA (18 : 4、n-3) に転換する酵素の能力を確認した。ガラクトースが存在しない場合、外因性基質ALAはSDAに転換されない。したがって、これらの結果に基づいて、Ost809_6はD6デサチュラーゼとして確認された。Ost809_6の基質選択性は、増殖培地中LAおよびALAの等量を外から供給することにより決定した。それが図9に示されるように、Ost809_6だけが基質としてn-3脂肪酸ALAを認識し、その一方で、n-6基質が不飽和化されなか

40

50

った。このことは、*Ostreococcus tauri* (オストレオコッカス・タウリ) から識別される 6デサチュラーゼ [Domergue (ドマーグ) ら、2005] とは区別され、それは基質としてLAおよびALAの双方に向けて活性を示した。したがって、Ost809_6は 6不飽和化n-3脂肪酸の排他的生産について優れ、そして区別される。

【0169】

酵母培養物は異なる可能性があるFA基質を補充した（表VIに挙げる）が、O809d6の不飽和化活性はALAの存在下でだけ検出された。

【0170】

2.2 O809からの推定上の 4デサチュラーゼの同定

【0171】

Ostreococcus (オストレオコッカス) RCC809、http://genome.jgi-psf.org/OstRCC809_2/OstRCC809_2.home.htmlは、4デサチュラーゼの、以前に機能的に特徴付けられた配列を用いて検索し、そして 4デサチュラーゼについての見かけの候補 (JGIタンパク質ID #40461) の存在を検出した。推定されるオープンリーディングフレームは、珪藻の*P. tricornutum*において発現用のコドン最適化ヌクレオチド配列 (codon-optimised nucleotide sequence) (配列番号15ないし18) を化学的に合成するために鋳型 (Genscript Corporation, NJ) として使用した。

【0172】

酵母でのO809からの推定上の 4デサチュラーゼの機能的特徴付け。

【0173】

P. tricornutum (*P. トリコルヌーム*) のオープンリーディングフレームにおける推定上の 4デサチュラーゼの発現のために最適化されたコドンは、酵母発現ベクターpYES2 (Invitrogen, NJ) のガラクトース誘導性GAL1プロモーターの後ろのKpnI-SacI フラグメントとして挿入された。

【0174】

図10に見ることができるように、Ost809タンパク質40461のガラクトース依存的発現は、DPAのDHAへの 4不飽和化を招き、このORFのC22 4デサチュラーゼとしての機能が確認され、そしてこれに基づいて、本発明者らは、この遺伝子をOst809_4と命名した。誘導物質 (ガラクトース) が存在しない場合、またOst809_4 ORFの不存在でも、何らのDHAも検出されないことが注目される。

【0175】

2.3 *Fragilariaopsis cylindrus* (フラギラリオプシス・シリンドルス) からの 6エロンガーゼの同定

【0176】

海洋珪藻*Fragilariaopsis cylindrus* (フラギラリオプシス・シリンドルス) (<http://genome.jgi-psf.org/Fracy1/Fracy1.home.html>) の公的に入手可能なゲノム配列は、既に知られている 6エロンガーゼシーケンス (たとえば、*C.elegans* (カエノラブディティス・エレガヌス、線虫) からの 6エロンガーゼのようなもの、-Beaudoin (ボードイン) ら、2000) をクエリーとして使用するBLASTを用いて分析し、および候補のオープンリーディングフレーム (Frag (フラグ) #177742に指定) は、*T. pseudonana*において発現用にコドン最適化ヌクレオチド配列を化学的に合成するために鋳型として (Genscript Corporation, NJ) 使用した。

【0177】

トランスジェニック酵母におけるFc 6エロンガーゼの機能的特徴付け

【0178】

S. cerevisiae (*S.セレビシエ*) におけるFrag #177742の異種発現は、上述したように、酵母発現ベクターpYES2中にクローニングしたコドン最適化ORFにより正確に実施した。この構築物のガラクトース媒介誘導は、このORFが 6エロンガーゼとして機能し、特に、たとえば、GLAなどのようなC18 6不飽和化基質がC20の形態にまで伸長されることを確認した。図11に見られるように、GLAの20:3までの伸びは、ガラクトースおよびORF Frag #

10

20

30

40

50

177742の存在下でだけ起こる。これらの結果に基づいて、これをFcEL06に再指定した（re designated）。

【0 1 7 9】

【表6】

表V。テストした基質のリスト：

0st809 D6

18 : 2、ALA、GLA、18 : 2&18 : 3、20 : 4n-6 (ARA)、20 : 2、ERA、ETA、22 : 5n-6 (DPA)

FcElo6

10

18 : 2、GLA、GLA&SDA

0st809 Δ4

DPA

(下線付きの基質は働いたものである)

【0 1 8 0】

【表7】

20

表VI。0st809 Δ6、FcElo6 または 0st809 Δ4 を発現する酵母細胞の脂肪酸組成、およびこれらのそれぞれの基質特異性

| FA | 脂肪酸組成(モル濃度%) | | | | | | | | | | |
|--------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-------------------|-----------------|---------------------|---------------------|----------------|--------------|
| | 構築物 | | | | | | | | | | |
| | O809 Δ6 Gal - | O809 Δ6 Gal + | O809 Δ6 Gal - | O809 Δ6 Gal + | Fc Elo6 Gal - | Fc Elo6 Gal | O809 d4 + | O809 d4 Gal - | O809 d4 Gal + | pYes2 BPX72 | pYes2 HP1 |
| 16:0 | 26.2 | 26.0 | 24.8 | 22.4 | 25.2 | 23.2 | 22.8 | 20.4 | 26.1 | 22.2 | |
| 16:1 | 25.6 | 28.8 | 26.3 | 27.9 | 23.7 | 26.3 | 49.2 | 51.0 | 29.2 | 51.5 | |
| 18:0 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 4.2 | 4.4 | ND | 3.9 | |
| 18:1 | 15.2 | 16.3 | 13.6 | 15.4 | ND | ND | 20.2 | 21.6 | 17.5 | 19.7 | |
| 18:2 | 5.8 | 6.8 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | |
| GLA | ND | ND | ND | ND | 38.7 | 22.8 | ND | ND | ND | ND | |
| ALA | 25.6 | 11.9 | 32.9 | 15.7 | ND | ND | ND | ND | 27.2 | ND | |
| SDA | 1.6 | 10.3 | 2.3 | 18.5 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | |
| DHGLA | ND | ND | ND | ND | ND | 14.1 | ND | ND | ND | ND | |
| DPA | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 2.9 | 2.3 | ND | 2.7 | |
| DHA | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 0.4 | ND | ND | |

30

40

【0 1 8 1】

【表8】

表VII。基質特異性

| 基質特異性 | | |
|----------|----------|------|
| 構築物 | 基質 | % |
| Ost809Δ6 | 18:2 | 0.0 |
| Ost809Δ6 | 18:3 ALA | 54.1 |
| FcElo6 | 18:3 GLA | 38.1 |
| Ost809Δ4 | 22:5 DPA | 13.5 |

10

【0182】

6デサチュラーゼ(Ost809-6)、4デサチュラーゼ(Ost809-4)および6エロンガーゼ(FcEL06)の新規な形態の同定に基づき、これらの活性が、藻類および植物におけるオメガ-3長鎖多価不飽和脂肪酸合成経路の異種再構成において有用と証明されるであろう可能性が非常に高い。たとえば、Ost809-6酵素の優れた基質選択性(substrate-preference)は、それを他のOstreococcus(オストレオコッカス)6デサチュラーゼと区別し、およびn-3経路を通して基質のフラックスを最大化するために使用することができる。同様に、Ost809-4活性は、トランスジェニック光合成生物におけるDPAのDHAへの特異的転換において有用であり、その一方で、FcEL06活性は、GLAが20:3n-3まで伸長することができる手段を提供することができるであろう。

20

【0183】

例3

Pheodactylum tricornutum(フェオダクチラム・トリコルヌーム)での単一のオメガ-3 LC-PUFA合成遺伝子の発現は、DHAの内因性の蓄積を増加させることができる。

【0184】

材料および方法

【0185】

株および増殖条件

30

P. tricornutum UTEX 646は、ESAW培地[Harrison(ハリソン)ら、1980]中、20℃で適度に振とうしながら一定の照明(100 μモル光子m⁻²s⁻¹)において白色蛍光灯下に増殖させた。野生型およびトランスジェニック藻類の分析は、定常増殖期の間に行われた。

【0186】

プラスミド設計およびクローニング

6エロンガーゼFcElo6(タンパク質ID 177742)のコード配列は、*T. pseudonana*における発現用のコドン最適化スクレオチド配列(sequencea)を化学的に合成するための鑄型(Genscript Corporation、NJ)として使用した。コドン最適化配列は、それぞれ、EcoRV-SacI断片としてpPha-T1ベクター中に挿入した(Kroth、2007; Zaslavskaiaら、2000)。

40

【0187】

結果

FcElo6の発現はDHAレベルの14-17%までの増加をもたらした(図13)。

【0188】

例4

二つの遺伝子の同時発現

【0189】

材料および方法

二重遺伝子ベクターpPhOS2および形質転換カセットの設計

MCSを含むpPha-T1ベクターのEcoRI-HindIII断片は、独特の制限部位を有する3つの多重

50

クローニング部位（MCSs）に隣接したfcpAターミネーターおよびfcpAプロモーターから構成される合成配列によって置換された（図14）。O. tauri（O.タウリ）5エロンガーゼOtElo5についてのコード配列は、KpnI-SacI断片として、pPhOSベクター生成pPhOS2.1.1構築物の位置1中に挿入した。O. tauri 6デサチュラーゼOtD6Ptのためのコード配列のP. tricornutumでの発現のために最適化されたコドンは、BamHI-XbaI断片として、pPhOS2.1.1生成pPhOS2.2.1構築物の位置2中に挿入した。

【0190】

結果および考察

トランスジェニックP. tricornutum（P.トリコルヌーム）でのマルチ遺伝子（多重遺伝子）発現

P. tricornutumでの複数の異種遺伝子の発現を促進するために、新たなベクター（pPhOS2と命名-図14）を構築した。このベクターは、前述のpPha-T1ベクターに基づき（Zaslavskaiら、2000）、そして興味がある目的の遺伝子を挿入するためのユニークな制限部位を有する二つのマルチクローニング部位（MCS）が含まれる。これらのMCSは、それぞれFc pA遺伝子のプロモーターおよびターミネーター領域によって隣接され（Zaslavskaiら、2000）、二つの挿入された遺伝子の同時発現を促進する。O. tauri 5エロンガーゼOtElo5のコード配列は、pPhOS2ベクターの位置1に挿入され、そして得られた構築物pPhOS2.1.1は、P. tricornutumの形質転換用に用いられた。培養物を、一定の照明（ $60 \mu\text{mol光子m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ）の下で20 および16 にて増殖させた。複数（5）の無関係なゼオシン耐性コロニーを得てし、そしてさらにGC-MS分析のための培養物に接種するために使用した。分析されたpPhOS2.1.1株におけるDHAの平均レベルは、9.0%（図1、表VIII）であり、pPha-T1においてOtElo5発現と共に以前に観察されたレベルに類似し、この変換ベクターの機能性が確認された。O. tauri 6-デサチュラーゼOtD6Ptためのコドン最適化コード配列は、その後、構築物pPhOS2.1.1の位置2に挿入され、二つの遺伝子（プラス選択マーカー遺伝子ble）のpPhOS2.2.1ベクターが生成された。この発現プラスミドは、P. tricornutum中に遺伝子銃を介して導入され、そして複数の無関係なゼオシン耐性コロニーが得られ、そしてさらなるスクリーニング用に培養物に接種するために使用した。培養物は、一定の照明（ $60 \mu\text{mol光子m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ）の下で16および20 にて増殖させた。シングルまたはダブル遺伝子構築物のいずれかを発現するトランスジェニック株のFAMEs分析は、OtElo5およびOtD6Ptの双方を同時発現するトランスジェニック株におけるDHAレベルにおいてさらなる増加を明らかにし、ここで実証した可能性が高価値の脂質特性のためのP. tricornutumにおける反復代謝工学について示された（図15、表VIII）。

【0191】

10

20

30

【表9】

表VIII。野生型 (Pt_WT) および16°Cおよび20°Cにて pPhOS2.1 および pPhOS2.2 を発現するトランスジェニック P. tricornutum の脂肪酸組成 (モル%)。各測定は3つの生物学的反復の平均である (土標準誤差)。

| 脂肪酸 | Pt_WT | | pPhOS2.1 | | pPhOS2.2 | |
|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | 16°C | 20°C | 16°C | 20°C | 16°C | 20°C |
| 14:0 | 5.3±0.2 | 4.8±0.1 | 5.1±0.2 | 5.3±0.3 | 6.7±0.2 | 6.3±0.1 |
| 16:0 | 22.3±1.0 | 22.1±0.4 | 19.2±0.4 | 18.9±1.4 | 17.7±0.5 | 18.4±0.3 |
| 16:1 | 39.2±1.6 | 41.8±0.3 | 39.0±0.6 | 40.1±1.7 | 43.6±1.0 | 40.6±0.5 |
| 16:3 | 0.8±0.4 | 1.0±0.1 | 1.2±0.1 | 1.8±0.4 | nd(不検出) | 2.0±0.1 |
| 18:0 | 0.5±0.0 | 0.5±0.1 | 0.6±0.1 | 0.3±0.1 | 0.5±0.0 | 0.3±0.1 |
| 18:1 n-9 | 6.8±0.0 | 4.3±0.1 | 2.6±0.1 | 2.2±0.4 | 1.2±0.6 | 0.6±0.4 |
| 18:1 n-11 | 2.2±0.1 | 2.8±0.1 | 2.1±0.2 | 4.2±0.3 | 2.7±0.1 | 3.7±1.0 |
| 18:4 n-7 | 1.0±0.1 | 1.0±0.1 | 1.7±0.1 | 1.1±0.1 | 1.6±0.0 | 1.1±0.1 |
| 20:5 n-3 | 20.3±1.9 | 18.5±0.1 | 10.4±0.3 | 9.8±1.0 | 10.0±0.4 | 8.2±0.1 |
| 22:5 n-3 | nd | nd | 3.4±0.4 | 1.9±0.3 | 5.5±0.1 | 2.2±0.3 |
| 22:6 n-3 | 1.5±0.2 | 1.3±0.1 | 9.0±0.3 | 9.4±1.0 | 10.3±0.4 | 11.4±0.2 |
| 24:0 | 2.9±0.4 | 2.4±0.1 | 3.2±0.1 | 2.3±0.2 | 3.3±0.1 | 2.2±0.8 |
| その他 | 2.0±0.5 | 1.9±0.1 | 1.1±0.1 | 2.9±0.5 | 2.9±0.3 | 3.2±0.2 |

10

20

30

40

【0192】

例5

栄養要求性 (Auxorophic) 増殖

【0193】

材料および方法

二重遺伝子ベクター pPhOS2 および形質転換カセットの設計

MCSを含むpPha-T1ベクターのEcoRI-HindIII断片は、ユニークな制限部位を有する3つの多重クローニング部位 (MCSs) に隣接したfcpAターミネーターおよびfcpAプロモーターから構成される合成配列によって置換された (図16)。Physcomitrella patens (フィスコミトレラ・パテンス、ヒメツリガネゴケ) (Ppglut1と称す)、およびヒト赤血球 (Hsglut1) からのグルコーストランスポーターについてのコード配列のコード配列のP. tricornutumでの発現のために最適化されたコドンは、BamHI-XbaI断片として、pPhOS2.1.1生成pPhOS_PpglutおよびpPhOS_Hsglut構築物の位置2中に挿入した。得られる構築物は、遺伝子銃を介してP. tricornutumを形質転換するために用いた。

【0194】

結果

複数 (>10) の無関係なゼオシン耐性コロニーは、これらの二つの発現カセットによる形質転換によって得られ、そしてさらなるGC-MS分析用に培養物に接種するために使用した。トランスジェニック P. tricornutum 株は、pPhOS_Ppglut および pPhOS_Hsglut 構築物を発現し、DPAを蓄積し、そして高められたDHAのレベルは、さらなる分析のために選定した。(図16および図17)。形質転換体は、グルコースの0.5%を含有する固体培地に移し、完全な暗所の中に入れ、そして増殖について監視した (図18)。

【0195】

参考文献

50

【0196】

Ahmann, K., Heilmann (ハイルマン), M., Feussner (フォイスナー), I., 2011。Identification of a D4-desaturase from the microalga *Ostreococcus lucimarinus* (微細藻類の*Ostreococcus lucimarinus*からのD4デサチュラーゼの同定)。Eur. J. Lipid Sci. Technol (ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・リピッド・サイエンス・アンド・テクノロジー) 113、7、832-840。

【0197】

Arao, T., Kawaguchi (カワグチ), A., Yamada (ヤマダ), M., 1987. Positional distribution of fatty acids in lipids of the marine diatom, *Phaeodactylum tricornutum* (海洋珪藻、*Phaeodactylum tricornutum*の脂質中の脂肪酸の位置分布)。Phytochemistry (ファイトケミストリー) 26、2573-2576。

10

【0198】

Arao, T., Yamada, M., 1994. Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in the marine diatom, *Phaeodactylum tricornutum* (海洋珪藻、*Phaeodactylum tricornutum*における多価不飽和脂肪酸の生合成)。Phytochemistry 35、1177-1181。

【0199】

Bigogno, C., Khozin-Goldberg (ホージン-ゴールドバーグ), I., Boussiba (ブシバ), S., Vonshak (フォンシャク), A., Cohen (コーエン), Z., 2002. Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid (緑色油性藻類*Parietochloris incisa*の脂質および脂肪酸組成、アラキドン酸の最も豊富な植物源)。Phytochemistry, 60, 497-503。

20

【0200】

Blanchemain, A., Grizeau, D., 1999. Increased production of eicosapentaenoic acid by *Skeletonema costatum* cells after decantation at low temperature (低温でのデカンテーション後*Skeletonema costatum*細胞によるエイコサペンタエン酸の増加産生)。Biotechnol. Tech (バイオテクノロジー・テクニクス) 13, 497-501。

【0201】

Calder (カルダー), P.C., 2003. N-3 polyunsaturated fatty acids and inflammation: from molecular biology to the clinic (N-3多価不飽和脂肪酸および炎症: 分子生物学からクリニックへ)。Lipids (リピッズ) 38, 343-352。

30

【0202】

Cohen, Z., Khozin-Goldberg, I., Adlrestein, D., Bigogno, C., 2000. The role of triacylglycerols as a reservoir of polyunsaturated fatty acids for the rapid production of chloroplastic lipids in certain microalgae (一定の微細藻類における葉緑体脂質の迅速な生産のための多価不飽和脂肪酸の蓄積としてのトリアシルグリセロールの役割)。Biochem. Soc. Trans. (バイオケミカル・ソサイエティ・トランスタクションズ) 28, 740-743。

【0203】

Das (ダス), U., N., 2002. The lipids that matter from infant nutrition to insulin resistance (乳児栄養からインスリン抵抗性に重要な脂質)。Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids (プロスタグランジンズ、ロイコトリエンズ、アンド・エッセンシャル・ファティー・アシツ) 67, 1-12。

40

【0204】

Deviah, S.P., Roth (ロス) M.R., Baughman (ボーマン) E., Li (リー) M., Tamura (タムラ) P., Jeannotte R., Welti R., Wang (ワン) X., 2006. Quantitative profiling of polar glycerolipid species from organs of wild-type *Arabidopsis* and a PHOSPHOLIPASE Da1 knockout mutant (野生型シロイヌナズナおよびホスホリパーゼDa1ノックアウト変異体の器官からの極性グリセロ脂質種の定量的プロファイリング)。Phytochemistry 67, 1907-1924。

50

【0205】

Domergue(ドマーグ)F.、Lerchl J.、Zahringer U.、Heinz(ハインツ)E.、2002。Cloning and functional characterization of *Phaeodactylum tricornutum* front-end desaturases involved in eicosapentaenoic acid biosynthesis(エイコサペンタエン酸生合成に関する*Phaeodactylum tricornutum*のフロント・エンドのデサチュラーゼのクローニングおよびの機能的特徴付け)。Eur J Biochem(ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー)269、4105-4113。

【0206】

Domergue F、Abbadie A、Zahringer U、Moreau(モロー)H、Heinz(ハインツ)E、2005。In vivo characterization of the first acyl-CoA 6-desaturase from a member of the plant kingdom, the microalgae *Ostreococcus tauri*(植物界、微細藻類*Ostreococcus tauri*のメンバーからの最初のアシルCoA 6デサチュラーゼのインビート特徴付け)。Biochem J(ザ・バイオケミカル・ジャーナル)389、483-490。

10

【0207】

Garces, M.. Mancha(マンチャ), R.、1993。One-Step Lipid Extraction and Fatty Acid Methyl Esters Preparation from Fresh Plant Tissues(新鮮な植物組織からのワンステップ脂質抽出および脂肪酸メチルエステル調製)。Analytical Biochemistry(アナリティカル・バイオケミストリー)211、139-143。

【0208】

Harwood(ハーワッド), J.L.、Guschina I.A.、2009。The versatility of algae and their lipid metabolism(藻類の多様性およびそれらの脂質代謝)。Biochemie(バイオケミー)。91、679-684。

20

【0209】

Harrison(ハリソン), P.J.、Waters(ウォーターズ)R.E.、Taylor(ティラー)J.F.J.R.、1980。A broad spectrum artificial medium for coastal and open ocean phytoplankton(沿岸および外洋の植物プランクトンのための広範なスペクトルの人工媒体)。J. Phycol.(ジャーナル・オブ・フィコロジー)16、28-35。

【0210】

Haynes(ヘインズ), C.A.、Allegood, J.C.、Sims(シムズ), K.、Wang, E.W.、Cameron Sullards(キャメロンスラーズ), M.、Merril(メリル), A.H.、2008。Quantitation of fatty acyl-coenzyme As in mammalian cells by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry(液体クロマトグラフィー-エレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析法による哺乳動物細胞にあるような脂肪酸アシル補酵素の定量)。J. Lipid Res.(ジャーナル・オブ・リピッド・リサーチ)49、1113-1125。

30

【0211】

Harwood, J.L.、1998。Membrane lipids in algae(藻類における膜脂質)。In *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics*(Siegenthaler, P.A. and Murata, N., eds)〔光合成における脂質:構造、機能および遺伝学(シーゲンターラー, P.A.およびムラタ, N.、編)〕。Dordrecht(ドルドレヒト)、The Netherlands(オランダ): Kluwer Academic Publishers(クルワー・アカデミック・パブリッシャーズ)53-64。

40

【0212】

Hu, Q.、Sommerfeld(ゾンマーフェルト), M.、Jarvis(ジャービス), E.、Ghirardi, M.、Posewitz, M.、Seibert(サイバート), M.、Darzins, A.、2008。Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances(バイオ燃料生産のための原料として微細藻類トリアシルグリセロール: 視点と進歩)。Plant J.(ザ・プラント・ジャーナル)54、621-639。

【0213】

Horrocks(ホロックス), L.A.、Yeo(ヨ), Y.K.、1999。Health benefits of DHA(DHAの健康上の利点)。Pharmacological Research(ファーマコロジカル・リサーチ)40、211-225。

50

【0214】

Jiang (チアン) , Y.、Chen (チェン) F.、2000。Effects of temperature and temperature shift on docosahexaenoic acid production by the marine microalga Cryptothecodinium cohnii (海洋微細藻類Cryptothecodinium cohniiによるドコサヘキサエン酸生産に対する温度と温度変化の影響)。J. Am. Oil. Chem. Soc (ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・オイル・ケミスト・ソサイエティ) 77 613-617。

【0215】

Kitano (キタノ) , M.、Matsukawa (マツカワ) , R.、Karube (カルベ) , I.、1997。Changes in eicosapentaenoic acid content of *Navicula saprophilla*, *Rhodomonas salina* and *Nitzschia* sp. under mixotrophic conditions (混合栄養条件の下での*Navicula saprophila*、*Rhodomonas salina*および*Nitzschia* sp.のエイコサペンタエン酸含有量の変化)。J. Appl. Phycol (ジャーナル・オブ・アプライド・フィコロジー) 9, 559-563。

【0216】

Krank J.、Murphy (マーフィー) R. C.、Barkley (バークリー) R. M.、Duchoslav, E.、McAnoy, A.、2007。Qualitative analysis and quantitative assessment of changes in neutral glycerol lipid molecular species within cells (細胞内の中性グリセロール脂質分子種の変化の定性分析およびを定量的評価)。Methods in Enzymology (メソッド・イン・エンザイモロジー) 432, 1-20。

【0217】

Kroth, P.、2007。Genetic transformation: a tool for study protein targeting in diatoms (遺伝子形質転換: 珪藻でのタンパク質ターゲティング研究のためのツール)。Methods in Molecular Biology (Clifton, NJ) [メソッド・イン・モレキュラー・バイオロジー (クリ夫トン) NJ] 390, 257。

【0218】

Kyle (カイル) , D.J., Sicotte (シコット) , V.J., Singer (シンガー) , J. およびReeb (レーブ) , S.E.、1992。Bioproduction of docosahexaenoic acid (DHA) by microalgae (微細藻類によるドコサヘキサエン酸 (DHA) のバイオプロダクション)。In Industrial Applications of Single Cell Oils (Kyle, D.J. and Ratledge, C., eds) [単一細胞油の産業上アプリケーションにおいて (Kyle, D.J. およびRatledge, C.、編)]。Campaign (シャンペーン) 、IL (イリノイ州) : American Oil Chemists' Society (アメリカン・オイル・ケミスト・ソサイエティ) 。287-300。

【0219】

Larson (ラーソン) , T.R. およびGraham (グラハム) , I.A.、2001。A novel technique for the sensitive quantification of acyl CoA esters from plant tissues (植物組織からアシルCoAエステルの高感度定量のための新規な技術)。Plant J. 25, 115-125。

【0220】

Meyer (マイヤー) A., Kirsch (キルシュ) H, Domergue (ドマーグ) F, Abbadi (アバディ) A, Sperling (スパーリング) P, Bauer (バウアー) J, Cirpus (サーブス) P, Zank (ザンク) TK, Moreau (モロー) H, Roscoe (ロスコー) TJ, Zahringer U, Heinz (ハインツ) E., 2004。Novel fatty acid elongases and their use for the reconstitution of docosahexaenoic acid biosynthesis (ドコサヘキサエン酸合成の再構成のための新規脂肪酸エロングーゼおよびそれらの使用)。Journal of Lipid Research (ジャーナル・オブ・リピッド・リサーチ) 45, 1899-1909。

【0221】

Molina Grima (モリナグリマ) , E.、Sanchez Perez (サンチェスピレス) , J.A.、Garcia Sanchez (ガルシアサンチェス) , J.L.、Garcia Camacho (ガルシアカマチョ) , F.、Lopez Alonso (ロペス・アロンソ) , D.、1992。EPA from Isochrysis galbana (Isochrysis galbana (イソクリシス・ガルバナ) からのEPA)。Growth conditions and productivity (増殖条件および生産性)。Process Biochem (プロセス・バイオケミストリー) 27, 299-305。

10

20

30

40

50

【0222】

Molina Grima, E.、Robles Medina(ロブレスメディナ), A.、Gimenez Gimenez(ヒメネスヒメネス), A.、Ibanez Gonzalez(アイバニーズゴンザレス), M.J. 1996。Gram-scale purification of eicosapentaenoic acid (EPA, 20: 5n-3) from wet *Phaeodactylum tricornutum* UTEX 640 biomass [ウェット*Phaeodactylum tricornutum* UTEX 640バイオマスからのエイコサペンタエン酸(EPA、20:5n-3)のグラム規模精製]。J. Appl. Phycol. 8, 359-367。

【0223】

Moreno(モレノ), V.J., De Moreno(デ・モレノ), J.E.A., Brenner(ブレンナー), R.R.、1979。Biosynthesis of unsaturated fatty acids in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*(珪藻*Phaeodactylum tricornutum*における不飽和脂肪酸の生合成)。Lipids 14, 15-19。

10

【0224】

Navarro(ナバロ), E., Esteve(エステベ), M., Olive(オリーブ), A.、2000。Abnormal fatty acid pattern in rheumatoid arthritis(関節リウマチにおける異常な脂肪酸パターン)。A rationale for treatment with marine and botanical lipids(海洋および植物性脂質による処置のための理論的根拠)。J Rheumatol.(ザ・ジャーナル・オブ・リューマトロジー) 27, 298-303。

【0225】

Nugent(ニュージェント), A.P., 2004。The metabolic syndrome(メタボリックシンдро́м)、Nutr Bull(ニュートリション・ブレティン)、29, 36-43。

20

【0226】

Ohta(オオタ)S., Chang(チャン), T., Aozasa(アオザサ), O., Ikegami(イケガミ), N., Miyata(ミヤタ), H., 1993。Alterations in fatty acid composition of marine red alga *Porphyridium purpureum* by environmental factors(環境要因による海洋紅藻*Porphyridium purpureum*の脂肪酸組成における変化)。Bot. Mar(ボタニカ・マリーナ)、36, 103-107。

【0227】

Qiang, H., Zhengyu, H., Cohen, Z., Richmond, A., 1997。Enhancement of eicosapentaenoic acid (EPA) and I^3 -linolenic acid (GLA) production by manipulating algal density of outdoor cultures of *Monodus subterraneus* (Eustigmatophyta) and *Spirulina platensis* (Cyanobacteria) [*Monodus subterraneus* (Eustigmatophyta) および *Spirulina platensis* (シアノバクテリア) の屋外培養物の藻類密度を操作することによって、エイコサペンタエン酸(EPA)および I^3 リノレン酸(GLA)生産の増強]。Eur. J. Phycol(ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・フィコロジー) 32, 81-86。

30

【0228】

Qiu(チウ), X., Hong(ホン), H., MacKenzie(マッケンジー), S.L., 2001。Identification of a 4 fatty acid desaturase from *Thraustochytrium* sp. involved in the biosynthesis of docosahexanoic acid by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* and *Brassica juncea*(ドコサヘキサエン酸の生合成に関与する*Thraustochytrium* sp.からの4脂肪酸デサチュラーゼの、*Saccharomyces cerevisiae*および*Brassica juncea*における異種発現による同定)。J. Biol. Chem(ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー) 276, 31561-6。

40

【0229】

Radakovits, R., Eduafo, P., Posewitz M., 2011。Genetic engineering of fatty acid chain length in *Phaeodactylum tricornutum*(*Phaeodactylum tricornutum*における脂肪酸鎖長の遺伝子操作)。Metab. Eng(メタボリック・エンジニアリング) 13, 89-95。

【0230】

Renaud(ルノー), S.M., Parry(パリー), D.L., Thinh(ティン), L.V., 1994。Microalgae for use in tropical aquaculture: I. Gross chemical and fatty acid comp

50

osition of twelve species of microalgae from the North Territory, Australia (熱帶性水産養殖での使用のための微細藻類 : I. オーストラリア、ノーザンテリトリーからの12種の微細藻類のグロスの化学および脂肪酸の組成)。J. Appl. Phycol 6, 337-345。

【0231】

Renaud, S.M., Thinh (ティン), L.V., Parry (パリー), D.L., 1999. The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture (海洋牧場での使用の可能性のための熱帶性オーストラリア微細藻類の18種のグロスの化学組成および脂肪酸組成)。Aquaculture (アクアカルチャー) 170, 147-159.

【0232】

Roessler, P.G., 1990. Environmental control of glycerolipid metabolism in microalgae: commercial implications and future research directions (微細藻類におけるグリセロ脂質代謝の環境制御 : 商業上の意味と今後の研究の方向性)。J. Phycol 26, 393-399.

10

【0233】

Ruiz-Lopez (ルイス・ロペス) N., Haslam (ハスラム) R.P., Venegas-Caleron M., Li T., Bauer J., Napier J.A., 2012. Enhancing the accumulation of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids in transgenic *Arabidopsis thaliana* via iterative metabolic engineering and genetic crossing (反復的な代謝工学および遺伝子交叉によるトランスジェニック *Arabidopsis thaliana* におけるオメガ3長鎖多価不飽和脂肪酸の蓄積の増強)。Transgenic Res (トランスジェニック・リサーチ) 18.

20

【0234】

Sayanova, O., Smith, M.A., Lapinskas, P., Stobart, A.K., Dobson (ドブソン), G., Christie (クリスティ), W.W., Shewry, P.R., Napier (ネーピア), J.A., 1997. Expression of a borage desaturase cDNA containing an N-terminal cytochrome b5 domain results in the accumulation of high levels of 6-desaturated fatty acids in transgenic tobacco (N末端チトクロームb5ドメインを含むルリヂサデサチュラーゼcDNAの発現は、トランスジェニックタバコでの 6-不飽和化脂肪酸の高レベルの蓄積をもたらす)。Proc. Natl. Acad. Sci. USA (プロシードィングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシーズ・オブ・ザ・ユニティッド・ステーツ・オブ・アメリカ) 94, 4211-6.

30

【0235】

Sayanova, O., Beaudoin, F., Michaelson (マイケルソン), L., Shewry, P., Napier, J.A., 2003. Identification of *Primula* fatty acid 6-desaturases with n-3 substrate preferences (n-3基質選択性を有するプリムラ脂肪酸 6デサチュラーゼの同定)。FEBS Lett (FEBSレターズ) 542, 100-104.

【0236】

Sayanova O., Ruiz-Lopez N., Haslam R.P., Napier J.A., 2012. The role of 6-desaturase acyl-carrier specificity in the efficient synthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids in transgenic plants (トランスジェニック植物における長鎖多価不飽和脂肪酸の効率的な合成での 6デサチュラーゼアシルキャリア特異性の役割)。Plant Biotechnology Journal (プラント・バイオテクノロジー・ジャーナル) 10, 195-206.

40

【0237】

Seto, A., Wang, H.L., Hesseltine C.W., 1984. Culture conditions affect eicosapentaenoic acid content of *Chlorella minutissima* (培養条件は *Chlorella minutissima* のエイコサペンタエン酸含量に影響を与える)。J. Am. Oil Chem. Soc 61, 892-894.

【0238】

Siaut, M., Heijde, M., Mangogna, M., Montsant, A., Coesel, S., Allen, A., Manfredonia (マンフレドニア), A., Falciatore, A., Bowler (ボウラー), C., 2007. Mol

50

ecular toolbox for studying diatom biology in *Phaeodactylum tricornutum* (*Phaeodactylum tricornutum*において珪藻バイオロジーを研究するための分子ツールボックス)。Gene (ジーン) 406、23-35。

【0239】

Springer (スプリンガー), M., Franke (フランケ), H., Pulz, O., 1994. Increase of the content of polyunsaturated fatty acids in *Porphyridium cruentum* by low-temperature stress and acetate supply (低温ストレスおよび酢酸供給による*Porphyridium cruentum*における多価不飽和脂肪酸の含有量の増加)。J. Plant Physiology (ジャーナル・オブ・プラント・フィジオロジー) 143、534-537。

【0240】

Stinson (スティンソン), E.E., Kwoczak, R., Kurantz, M., 1991. Effect of culture conditions on production of eicosapentaenoic acid by *Pythium irregular* (*Pythium irregular*によるエイコサペンタエン酸の生産に対する培養条件の効果)。J. Ind. Microbiol (ジャーナル・オブ・インダストリアル・ミクロバイオロジー) 8、171-178。

【0241】

Sukernik A., 1991. Ecophysiological considerations in the optimization of eicosapentaenoic acid production by *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae) [*Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae)によるエイコサペンタエン酸生産の最適化における生態生理学上の配慮]。Bioresour. Technol (バイオリソース・テクノロジー) 35、263-269。

【0242】

Tan (タン), C.K., Johns, M.R., 1996. Screening of diatoms for heterotrophic eicosapentaenoic acid production (従属栄養エイコサペンタエン酸生産のための珪藻のスクリーニング)。J. Appl. Phycol 8、59-64。

【0243】

Tonon T., Harvey D., Tony R. Larson T.R., Graham I.A., 2002. Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae (四種の微細藻類における長鎖多価不飽和脂肪酸の生産とトリアシルグリセロールへの分配)。Phytochemistry 61、15-24。

【0244】

Venegas-Caleron M., Sayanova O., Napier J.A., 2010. An alternative to fish oil: metabolic engineering of oil-seed crops to produce omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids (魚油に対する代替：オメガ-3長鎖多価不飽和脂肪酸を生産するための脂肪種子作物の代謝工学)。Prog Lipid Res (プログレス・イン・リピド・リサーチ) 49、108-119。

【0245】

Voigt (フォークト), R.G., Jensen, C.L., Fraley, J.K., Rozelle, J.C., Brown, F.R., Heird, W.C., 2000. Relationship between omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid status during early infancy and neurodevelopmental status at 1 year of age (早期乳児期および1歳での神経発達の状態中のオメガ3長鎖多価不飽和脂肪酸の状態間の関係)。J Hum Nutr Diet (ジャーナル・オブ・ヒューマン・ニュートリション・アンド・ダイエティックス) 15、111-120。

【0246】

Wagner (ワグナー), M., Hoppe (ホッペ), K., Czabany , T., Heilmann , M., Daum , G., Feussner , I., Fulda, M., 2010. Identification and characterization of an acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 2 (DGAT2) gene from the microalga *O. tauri* [アシルCoAの同定および特徴付け：微細藻類*O. tauri*からのジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ2 (DGAT2) 遺伝子]。Plant Physiology and Biochemistry (プラント・フィジオロジー・アンド・バイオケミストリー) 48、6、407-416。

【0247】

Welti, R., Li, W., Li, M., Sang, Y., Biesiada, H., Zhou, H.E., Rajashekhar, C.B.

10

20

30

40

50

, Williams, T.D., Wang, X., 2002. Profiling membrane lipids in plant stress responses (植物のストレス応答における膜脂質のプロファイリング)。Role of phospholipase D alpha in freezing-induced lipid changes in Arabidopsis (Arabidopsisの凍結誘導脂質変化におけるホスホリパーゼDアルファの役割)。J Biol Chem. 30, 277, 35, 319-94。

【0248】

Wen, Z.Y., Chen, F., 2001. Optimization of nitrogen sources for heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by the diatom *Nitzschia laevis* (珪藻*Nitzschia laevis*によるエイコサペンタエン酸の従属栄養生産のための窒素源の最適化)。Enzyme Microb. Technol (エンザイム・アンド・ミクローバル・テクノロジー) 29, 341-347.

10

【0249】

Xiao, S., Gao, W., Chen, Q.F., Chan, S.W., Zheng, S.X., Ma, J., Wang, M., Welti, R., Chye, M.L., 2010. Overexpression of *Arabidopsis* acyl-CoA binding protein ACBP3 promotes starvation-induced and age-dependent leaf senescence (ArabidopsisアシルCoA結合タンパク質ACBP3の過剰発現は飢餓誘発性および年齢依存性の葉の老化が促進する)。Plant Cell (ザ・プラント・セル) 22, 5, 1463-82.

【0250】

Yongmanitchai, W., Ward, O.P., 1989. Omega-3 fatty acids: alternative sources of production (オメガ3脂肪酸：生産の代替源)。Process Biochem 24, 117-125.

20

【0251】

Yongmanitchai, W., Ward, O., 1991. Growth and omega-3 fatty acid production by the *Phaeodactylum tricornutum* under different culture conditions (異なる培養条件下での*Phaeodactylum tricornutum*による増殖およびオメガ3脂肪酸の生産)。Applied and Environmental Microbiology (アプライド・アンド・エンバイロンメンタル・ミクロバイオロジー) 419-425.

30

【0252】

Yongmanitchai, W., Ward, O.P., 1993. Positional distribution of fatty acids, and molecular species of polar lipids, in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* (珪藻*Phaeodactylum tricornutum*での、脂肪酸の位置分布、および極性脂質の分子種)。J Gen Microbiol (ジャーナル・オブ・ジェネラル・ミクロバイオロジー) 139, 465-472.

30

【0253】

Yu, E.T., Zendejas, F.J., Lane P.D., Gaucher, S., Simmons B.A., Lane, T.W., 2009. Triacylglycerol accumulation and profiling in the model diatoms *Thalassiosira pseudonana* and *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) during starvation (モデル珪藻の*Thalassiosira pseudonana*および*Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae)における飢餓中のトリアシルグリセロールの蓄積とプロファイリング)。J Appl Phycol 21, 669-681.

40

【0254】

Zaslavskaia, L.A., Lippmeier, J.C., Kroth, P.G., Grossman, A.R., Apt, K.E., 2000. Transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) with a variety of selectable marker and reporter genes [様々な選択可能なマーカーおよびレポーター遺伝子を有する珪藻*Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae)の変換]。J.Phycol 36, 379-986.

【0255】

配列リスト

cDNAに類似した核酸を示す。

【0256】

【化1】

配列番号1 核酸配列 0tElo5

atgagcgccctccggtcgtcgtccccgcacgcgtccgcgtacgcgtacgcgacg
 tacgcctacgccttgagtggtcgcacgcgaatggcatgcacaacgtcgacgcgcgag
 tggatcggtgcgtgtcggtggactcccgatcgacgcacgcgttgcaccgaagggttcatg
 tgcctggtcggaccgagggtatggcgaagcgcgaggcgttcgaccgaagggttcatg
 ctggcgtacaatgcgtatcagacggcgttcaacgtcgctgtcgatggatgttcgcgcga
 gagatctcgggctggggcagccgtgtggggtaaccatgcgtggagcgatagaaaa
 tcgttaagatcctcctcggggtgtgggtcactacaacaatattggagctattt
 gacactgtgttcatggttgcgcgaagaagacgaaggcagttgagcttgcacgttat
 catcacgcctgttcatctggcgtgtgggtgtgtacttgcattcacatcgatgtactcg
 tgtatcgatgcctacttcggcggcgtcaactcgatcgatgcgtcacaatcgatgtactcg
 tattatctcatgtcgccgtcgccattcgatgcgtggaaagcgatacatcaccaggt
 caaatgcctcaattcgatgttcgcacgcgtgtcgatgcgtcagaagcac
 tgcccggtcaccctcctggcgcaaatgttcgtcatgacgaacatgcgtcgatcgatc
 gggacttctacctaaggcgtactcgaaacaagtgcgcggcgcacggcgcgagttccgt
 aaaccagccgagaccacgcgcgcgcgcgtgcgacgcacgcgtatctcgaaaaattgac
 taa

10

20

【0 2 5 7】

【化2】

配列番号2 アミノ酸配列 0tElo5

MSASGALLPAIASAAYAYATYAYAFEWSHANGIDNVDAREWIGALSRLP
 AIATT
 MYLLFCLVGPRILMAKREAFDPKGFMLAYNAYQTA
 FNVVVLGMFAREISGLQPVW
 GSTMPWSDRKSFKILLGVWLHYNNKYLELLDTVM
 VARKTKQLSFLHVYHHALL
 IWA
 WLVCHLMATND
 CIDAYFGAACNSFIHIVMYSY
 YLMSALGIRCPWKRYITQA
 QMLQFVIVFAHAVFVLRQKHCPVTL
 PW
 QMFVMTNMLVLFGNFYL
 KAYS
 NKS
 RGD
 GASSVKPAETTRAPS
 VRTRSRKID*

30

【0 2 5 8】

【化3】

配列番号3 0tD6 核酸配列

atgtgcgtggagacggaaaataacgatggatccccacggtagatcgcggtcgacgg
 gagcgcgagcggccggaggcaaacgtgaagctgtcccgagaagatggagccggcggcg
 ctggcgaagacgttcgcgaggcggtacgtgtatcgaggggtggagtacgtgtgacg
 gattttaaaccccccggaggaacggttatcccgtatcggtgtcaaacaccggggcggac
 gcgacggaaagcggtcaaggagttcatcatcggtcgagaaaggcgaggaaaggccttggcg
 gcgctccgtctcgaccggccaagacggcaagggtggacgacgcggagatgctccaagat
 ttcgccaagtggcgaaagaattggagagatggattttcaagcccttcggcgac
 gtggcgtatcgcttcgcggagctcgccgatgtacgctctcggtacgtac
 gctcgatacgtcgcttcgtgtacgtacgcttgcgtttccggccggatgcgg
 tgggtgcacgacgaggcgacacagctcgctgacggcaacatttgtggacaagcgc
 atccaggccttacagccgggttcggctcgccgttagccgacatgtggactcgatg
 cacaacaagcatcagcgacgcctcaaaagggtcgacgacatggatctggacaccacc
 cccgcggggcggttcaacaccgcggtagggacaatcgccccgtggcttagcaag
 tactgggtgcgccttcaggcgtggaccttcatccccgtgacgtccggcttggctc
 ttctggatgtttccacccctcaaggcttgaagggtggcaagtacgaagagttg
 gtgtggatgctcgccgcacgtcatccgcacgtggacatcaaggcggtgaccggattc
 accgcgatgcagtccgttacggcttattttggcgacgagctgggtgagccgctgatctg
 tttgcacacttctccacgtcgacacgcacctggatgtggtgcccgacgacatctc
 tcctgggttcgatacgcgcgtcgatcacacgatcgacatcgatccgagtc
 aactgggtatggctacctaactgccaagtcatccaccacctttccgagcatgcc
 cagttccgccagcccgaggtatctcgccgttcgtcgcccttgcgaaaaagtggaac
 aactacaaggcatgacctaaccgcgggtgcgtggaaaggcaacgctcgaaac
 gtggtaagcactactacgtgcacggcaacactccggaaagacggcgtaa

10

20

30

【0 2 5 9】

【化4】

配列番号4 0tD6 アミノ酸配列

MCVETENNDIPTVEIAFDGERERAEEANVKLSAEKMEPAALAKTFARRYVVIEGV
 EYDVTDFKHPGGTVIFYALSNTGADATEAFKEFHHRSRKARKALAALPSRPAKTAKV
 VDDAEMLQDFAKWRKELERDGFFKPSPAHVAYRFAELAAMYALGTYL
 MYARYVVSSVLVYACFFGARCGWVQHEGGHSSLTGN
 NIWWDKRIQAFTAGFGLAGSGDMWN
 SMHNKHATPQKV
 VRHDMDLDTT
 PAVAFFNTAVEDNRPRGF
 SKYWLRLQAWTFIP
 VTGLVLLFWMFLHPS
 KALKGGKYEEL
 VWM
 LAHV
 IRTWT
 IKA
 VTGFTAM
 QSYGLFLAT
 SWVG
 CYLFAH
 FSTSHLD
 DVVP
 PADEHL
 SWVRY
 A
 DHTID
 IDPSQGW
 VNWL
 MGYLN
 CQVI
 HHLF
 PSMP
 QFRQPE
 VSRR
 FVA
 FAKK
 WNL
 NYKV
 MTYAG
 AWK
 ATLG
 NLD
 NVG
 KHYY
 VH
 QHSG
 KTA*

40

【0 2 6 0】

【化5】

配列番号5 OtD6Pt 核酸配列最適化コドン
 ggtaccaagcttgcataccaaa**atg**tgtcgaaacggaaaacaacgtgaaatccccacgg
 tcgaaattgccttgatggagaacgcgaacgcgcggaaagccaaacgtcaagctccgcggaaaa
 gatggaaaccgcgcctggccaagacacctcgcggcgctacgtcgatcattgaagggtgcgaa
 tacgatgtcaccgacttcaagcacccggaggtacggtcatctttacgccttcacaccg
 gagccgacgccacggaagcctcaaggaatttaccaccgttcccgaaggcccgtaaaggccct
 cggccgccttgcgcgcggccaagaccgcgaagggtcgacgtgccgaaatgcttcaggat
 ttcgccaagtggcgtaaggaactcgaacgcgacggctttaaggccctccggccacgtcg
 cctaccgtttgcgaactcgcgcgcattgtacgccttggAACCTACCATGTCAGCCGTTA
 CGTCGTCTCCTCGGTCTTGGCTACGCCTCGCTTGGATGGGTCCAGCAC
 GAAGGCGGACACTCCTCGCTACCGGAACACATTGGTGGATAAGCGTATCCAAGCCTCACCG
 CCGGATTGGTTGGCGGCTCCGGAGACATGTGAACTCGATGCACAACAAGCACCACGCCAC
 CCCCCAGAAGGTCCGTACGACATGGATCTCGACACCACGCCGGCGTCGCCTTAAACACC
 GCCGTCGAAGATAACCGTCCCCCGGATTCTCCAAGTACTGGCTCGTCTCCAAGCCTGACCT
 TCATTCCCGTCACGTCGGTTGGCTACGCCTCTTGGATGTTCTTCACCCGTCGAAGGC
 CCTCAAGGGTGGCAAGTACGAAGAATTGGTCTGGATGCTTGGCCACCGTCATTGTCACCTGG
 ACGATCAAGGCCGTACCGGTTACGCCATGCAAGTCCTACGGCTTCTGCCACCTCCT
 GGGTCTCGGGTTGCTACCTCTCGCCACTTTCCACCTCGCACACGCCACTTGGATGTCGTC
 CGCGACGAAACACCTTCCTGGTCCGCTACGCCGTGACCCACCGATTGACATTGACCGTC
 CAGGGATGGGTCAACTGGCTCATGGTTACTTGAACTGTCAAGTCATCCACCACTTCCC
 CCATGCCGAGTTCTGTCAACCGAAGTCTCGCGTCCTCGCCTTGGCCAAGAAGTGGAA
 CTGAAACTACAAGGTCACTGACCTACGCCGGAGCCTGGAAAGGCCACGCTTGGAAACCTTGATAAC
 GTCGGAAAGCACTACGTCCACGCCAGCACTCGGGAAAGACGCCCTAAGAGCTCGGTACCC
 TCGAG

10

20

30

【0261】

【化6】

配列番号6 OtD6 アミノ酸配列最適化コドン
 MCVETENNDGIPTVEIAFDGERERAEANVKLSAEKMEPAALAKTFARRYVVIEGVYDVT
 DFKHPGGTVIFYALSNTGADATEAFKEFHHRSRKARKALAALPSRPAKTAKVDDAEMLQD
 FAKWRKELERDGFFKPSPAHVAYRFAELAAMYALGTYLMYARYVVSSVLVYACFFGARCG
 WVQHEGGHSSLTGNIWWDKRIQAFTAGFGLAGSGDMWNSMHNKHATPQKVRHMDLDTT
 PAVAFFNTAVEDNRPRGFSKYWLRLQAWTFIPVTSGLVLLFWMFFLHPSKALKGGKYEEL
 VVMLAAHVIRTWTIKAVTGFATMQSYGLFLATSWVSGCYLFAHFSTSHLVDVVADEHL
 SWVRYAVDHTIDIDPSQGWVNWLGYLNQCQVIHHLFPSMPQFRQPEVSRRFVAFAKKWNL
 NYKVMTYAGAWKATLGNLDNVGKHYYVHGQHSGKTA

40

【化7】

配列番号7 *Ostreococcus* (オストレオコッカス) RCC809 からのΔ6 デサチュラーゼ核酸
 atgcgcgtcgaaacggaggacgacaacgttccgacggtcaccgtcgactgtcgaggag
 agcgacggatgaaggggcgagaaaccccgccccggcgcggcgtggaaatcgacgctcgag
 ccgcacgcggtgccaaagtcgtcgatcgacggtggtcaaggttgcggcgctcgactac
 gacgtcacggatttaagcatccggtggtatctgtgatttattacatgctgtcgaacacc
 ggacggacgcgacggaggcgttcaaagatcccattatcggtcgaaaaaggcgagaaag
 gcgttggcggcggtgcccgacgcgcgagccggaggacgcgtcgccagtggaaagacgcgaat
 atgttgaaggatttcgcgaaatggcgcaaagattggagcgcgagggtttcttaaccg
 tcgcccggcgcacgtggcgtacagattcgccgaaactcgccgcatgttcgcgctcgacg
 gcgttgcgtgcgggtgggtcaacacgagggtggtcacagctcgctgacggggagcattgg
 tggacaagcgaatccaagcgttcaccggcggttcggatttagcatcgagcggcgacatg
 tggAACCTCATGCACAACAAGCACCACGCCACTCCGAAAGGTGCGACACGACATGGAC
 CTCGACACCAACGCCGGCGTGGCCTCTCAACACTCGGTCGAGGAAAACCGTCCGCGC
 aagttcagtaagttatgggtgcgtgcaggcgtggacgttcgtccggcacctctgg
 ttgggtgtgcgcctggatgtacctcttgcacccatccgagacacattgcgtccgtaaaaac
 tacgaagaggctgcgtggatcgtcgccgcacgtcatccgcacgtcggtcatcaaagcc
 gtgaccggtaactcctggatcacgtctacggttttgtccaccatgtgggtgagc
 ggctgctacactcttgcgcacttctccacgtctcacacgcacccgcacgtcggtccgagc
 gataagcatctcttgggtgcgatacgcgcgtcgaccacaccatcgacatcgacccgagc
 aagagcgtcgtaactgggtatgggttacactgaactgccaggtcatccatcactgttt
 ccggacatgcctcagttccgtcagccgaagtctctcgcccttcgtctccttgcgaaa
 aagtggAACCTCAATTACAAGGTGAGCTACTACGGCGCGTGGAAAGGCCACCTCGGT
 aacttgaacgaggctggcaagcactattacatccaagggtctcaaatcacgaagaagacg
 gtgtaa

10

20

30

40

【0263】

【化8】

配列番号8 *Ostreococcus* RCC809 からのΔ6 デサチュラーゼアミノ酸
 MRVETEDDNVPTVTGLSEESDGMKGARNPGARAWKSTLEPHAVAKSFDRRWVKVDGVEYDVTDFKHPGGSVIYYMLSNTGADATEAFKEFHYRSKKARKALAALPQREPEDASPVEDANMLKDFAKWRKDLEREGFKPSPAHVAYRFAELAAMFALGTALMYARWHATSVFVTACFFGARCGWVQHEGGHSSLTGSIWWDKRIQAFTAGFGLASSGDMWNLMHNKHATPKVRHMDLDTTPAVAFFNTAVEENRPRKFSLWLRLVQAWTFVPVTSGLVLIAWMYLLHPRHIARRKNYEEAAWIVAAHVIIRTSVIKAVTGYSWITCYGLFLSTMWVSGCYLFAHFSTSHTHLDVPSDKHLSWVRYAVDHTIDIDPSKSVVNWLMGYLNQVIHHLPDMPQFRQPEVSRRFVSAKKWNLYKVMSSYYGAWKATFGNLNEVGKHYIQQSQTKKTV

【0264】

【化9】

配列番号9 T. pseudonana (T. シュードナナ) における発現のために最適化された
Ostreococcus RCC809 からの Δ6 デサチュラーゼ (Ost809Δ6) 核酸
atgcgtgtggaaaccgaagacgataatgtccaaactgtttactgtggattgtcagaggagtccg
atgaatgaagggagaaggaaaccccgagcacgtcttggaaagtgcacgttgaggccgcacgc
cgtggcaaagtcatcgatcgtaggtgggtaagggtgacgagtcgaatacgacgtactat
ttcaagcatcccggaggatcagttatctactatatgtttctaaccacccggagctgtatgccactg
aggcttcagaaggatttcactatcgtagtaagaaggccaggaaaggcacttgctgccctccaca
acgtgagcctgaagacgcgtcccgagtcgaggatgccaatatgtcaaggacttcgcaaagtgg
cgtaggattggagaggaaaggattttaaagccaaactgcctgctcacgtggccatccgtttcg
ccgaactcgcagctatgtttggaaactgccttatgtatgcacgttgcatgctacgtc
tgtttcgtaacagcctgtttggagcaagggtgtggatggatgttgcacacgaggagacat
tcttccttgaccggatccatctggggataagcgtattcaggcattactgtggattttggac
ttgccagttcggagacatgtgaacctcatgcacaataagcaccatgcaacgcacaaaaagt
taggcataatggacactcgataaccactcctgcagtggcttttaacacagctgttggaa
aatcgccatggaaagtctctaagttgtggcttcgtgtccaggcctggaccttgcgttgcgtta
cttccggattggactttggcatggatgttgcactttccacccgcgtatcgctgttgcgttgcgtta
gaactatgaggaagccgatggattgtggctgcccattgttatcaggacctccgttgcgttgcgttgcgtta
gtaacggatatacggttgcacatgttgcactttccacccgcgtatcgctgttgcgttgcgttgcgtta
gctaccttcgcactttcaacgtctcacacacatttggacgtggccatctgataagca
ccttcctgggtgcgttacccgttgcataccatgcacattgatccttcaagagtgtcgta
aactggctcatggatatttgcactgtcaggattccaccattttttccacatgcgttgcgttgcgtta
ttcgtcagccgaagtcgttaggttgcgtatcgccaaagaatctcaacgaagtggaaagcacttacaa
ggtcatgtttactatggggccttggaggcaacccttggaaatctcaacgaagtggaaagcacttacaa
tactacatccaaggaagtcaaataccaaaagaagacggtttag****

10

20

30

【0265】

【化10】

配列番号10 最適化 Ostreococcus RCC809 コドンからの Δ6 デサチュラーゼアミノ酸
 MRVETEDDNVPTVTGVLSEESDGMKGARNPGARAWKSTLEPHAVAKSFDRRWVKVDGVEY
 DVTDFKHPGGSVIYYMLSNTGADATEAFKEFHYRSKKARKALAALPQREPEDASPVEDAN
 MLKDFAKWRKDLEREGFFKPSAHVAYRFAELAAMFALGTALMYARWHATSVFVTACFFG
 ARCGWVQHEGGHSSLTGSIWWDKRIQAFTAGFGIASSGDMWNLMHNKHATPQKVRHMD
 LDTPPAVAFFNTAVEENRPRKFSKLWLRVQAWTFVPVTSGLVLLAWMYLLHPRHIARRKN
 YEEAAWIVAAHVIRTSVIKAVTGYSWITCYGLFLSTMWVSGCYLFAHFSTSHTLDVVPS
 DKHLSWVRYAVDHTIDIDPSKSVVNWLGYLNQVIHHLFPDMPQFRQPEVSRRFVSAK
 KWNLNKYKVMSSYYGAWKATFGNLNEVGKHYIQGSQITKKTV

【0266】

【化11】

配列番号11 Arabidopsis (アラビドプシス) における発現のために最適化された E. huxleyi (E. ハクスレイ) (EhD4) コドンからの Δ4 デサチュラーゼ
atgggaggcgccggcgagcggactgaacggcccaagtggaccacgatccacggcgccacg
tcgatgtgtcaaagtccgccacccgggtggAACATCATCGAGCTTCTATGGCATGGACTC
gacgagcgcgttcgagcagttccacggccaccacaaggcgcttggaaagatgctcaaggcgctg
ccgaccaaggaggtcgaccccgccacgtgccgcagcagccgcaggagcacgtgccgagatga
cgccgctgtatgacgtcgtggcgagcgcggccttttaagccgcgccccgtcgccctcgccat
ctacggtctcgccgtcgctgccatcgccgtgcacgcgcgcacgcgcggcat
ctgagcggatcgggctcgagctgtggcgacgtgcggcttcctgcagcacatggcgccc
accgcgagtgaaaaatgcggactccttcctgcagcacttctcgagggccttcataagg
cggtccgcctcggtggcgcaaccgcacaacaagcatcagcaaaagactaacgtcgcc
gaggacggcgacctcgccgacactccctttcgccctgggacccgacgcgtcgccaagaagg
cagactggtcgtcaagacgcaggccttccatcgccgcgtacgtcttgcacgcacatcgcc
cttcgtccatcgatcccaagtatgcgtcgtaagaagactctggcacgagctcgactcatg
atcgccactacgcgttctactacgcgtgcagctcgccgtgcgtcgccgcagg
tcgcctttactgcacccggctacgcctggcaaggcatctacctcggttttcgcgc
ccacttcgcgtcgagcgagttccctccaccgcacctggctcgagtcgtccatgcgc
gtcgactgggaggctccgcctttcggtacgtctccgcgttcctcaacatccagatcg
agcaccacatggcgcccgagatgcgcgtggagaaacctgcgcgcagatccgcgcactgc
gagcgccggagaagctcggttcctatcgccgtctccgcgcggcggtcaagctgatg
atggtcggctctggcgacggggacgagctgcagctgcgtccgcacaggcgcaagtagt
cgccacccaggcctacatggcgccgcctcggtggagaaacctcaaggcgactag

10

20

30

【0267】

【化12】

配列番号12 Arabidopsis における発現のために最適化された E. Huxleyi コドンからの
Δ4 デサチュラーゼ
MGNGNLPASTAQLKSTS PKQQHEHRTISKSEL AQHNTPKSAWCAVHSTPATDPSHSNNQH
LVLDITDFASRHPGGDLILLASGKDASVLFETYHPRGVPTSLIQKLQIGVMEEAFRDSFYSWT
DSDFYTVLKRRVVERLEERGLDRGSKEIWIKALFLLVGFYCLYKMYTTSDIDQYGIAIASI
GMGTFAAFIGTCIQHDGNHGAFFAQNKLLNKL
AGWTLDMI
GASAFTWELQHMLGHHPYTNVL
DG
EEERKERGEDVALEEKDQESDPDVFSSFPLMRMHPHTTSWYHKYQHLYAPPLFALMTLAKVFQ
QDFEVATSGRLYHIDANVRYGSVWNVMRFWAMKVITMGYMMGLPIYFHGVLRGVGLFVIGHLAC
GELLATMFIVNHVIEGVSYG
TKDLVGGASHGDEKKIVKPTTVLGDT
PMEKTREEALKNSNNNK
KKGEKNSVPSVPFNDWA
AVQCQTSVNWS
PGSWFWNFSGGLSHQIEHHLF
PSICHTNYCHIQDV
VESTCAEYGV
PYQSESNLFVAYGKMISHLKFLGKAKCE*

40

【0268】

50

【化13】

配列番号13 Thalassiosira pseudonana (タラシオシラ・シュードナナ) 核酸からのΔ (D) 4

デサチュラーゼ

atgggcaacggcaaccccccagcatccaccgcacagctcaagtccacccatcgaaaggccccagcagc
 aacatgagcatcgccaccatctccaagtccgagctcgcccaacacaacacgcacccaaatcagcatg
 gtgtgccgtccactccactccgcaccgaccatccactccaacaacaacacacgcacac
 ctatcctcgcacattaccgactttgcgtccgcacccatccactccaacaacaacacgcacac
 ccggcaaagacgcctcggtctgtttgaaacataccatccacgtggagttccgacgtctctcat
 tcaaaaagctgcagattggagtgtggaggaggaggcgttcggattcggttacagttggact
 gattctgactttatactgtgttgaagaggagggtgtggagcggttgaggagagggggttgg
 acaggaggggatcgaaagagattggatcaaggcttggatgtttggatgtttggatgttggact
 tttgtacaagatgtatactacgtcggtattgtatcagtggttgcattgcctattctatt
 ggaatgggaaccccttcggcattcatcgacgtgttcaacacacgtggaaatcacggtgcat
 tcgctcagaacaagttactcaacaagttggctggggacgttggatgttggatgttggact
 gtttacgtggagcttcagcacatgctgggcatcatccatatacgaatgtgttggatgggt
 gaggaggagaggaggaggaggatgttggatggaaagaaaaggatcagaatcagatc
 cagacgtatttcctccctctcatgagaatgcattccaccataaacctcatggtatca
 taaataccacacccctacgctccacccctttgcattgtatcactgccaatgtacgttatgg
 cggtatggaatgtcatgaggtttggctatgaaggtcattacgtggatgttggatt
 accaatctactttcatggagttactgaggggagttggatgttggatgttggatgggt
 ggagagttggatggcgacgttggatgttggatgttggatgttggatgttggatgg
 aggatttggatggatggatgttggatgttggatgttggatgttggatgttggatgg
 gggagataccaatggaaaagactcgcgaggaggattgttggatgttggatgttggatgg
 aagaaggagagaagaactcggtaccatccgttccattcaacgactggcagcagtc
 agacccctcgtaattggctccaggctatggatgttggatgttggatgttggatgg
 tcagattgagcatcactgttcccgattgtcatacaaactactgtcatatccaggatgt
 gtggagagtagtgcgtgactacggagttccgtatcagatgttggatgttggatgt
 atggaaagatgattgtcattgaagttttggtaaagccaaatgttggatgttggatgt

10

20

30

【0269】

【化14】

配列番号14 Thalassiosira pseudonana アミノ酸酸からのΔ (D) 4 デサチュラーゼ

MGGAGASEAERPWTIHRHVDSKFRHPGGNIELFYGMDSTSASFQFHGHKGAWKM

LKALPTKEVDPADVPQQPQEVAEMTRLMTSWRERGLFKPRPVASGIYGLAVVAAIVACI

ACAPHAPVLSGIGLGSCWAQCGFLQHMGGHREWGVRYSFLQHFFEGLLKGGSASWWRN

HNKHHAKTNVLGEDGDLRTTPFAWDPTLAKKVPDWLSLKTQAFTFLPALGAYVFVFAFTI

RKYAVVKKLWHELALMIAHYAMFYYALQLAGASLGSGLAFYCTGYAWQGIYLGFFFGLSH

FAVERVPSTATWLESSMIGTVDWGGSSAFCGYVSGFLNIQIEHHMAPQMPMENLRQIRAD

CKASAELGLPYRELSFAGAVKLMMVGLWRTGRDELQLRSDRRKYSRTQAYMAAASAVVE

NLKAD*

40

【0270】

【化15】

配列番号15 Δ4デサチュラーゼ *Ostreococcus RCC809* 核酸
atgccgacgactcgatcgccgcgcgcgtgacgacgccccctcgcgagacgcccacgagagcga
acaccgtcgccgcgtcgatcccgagcgcaagtacacgcgcattcgccgtcgtaacgt
cacggatttcgcccagccgtcatccgggtggcgcaattttatcgctgtgcgtggggagagac
gccaccatcctggagagtcacacccgtccggagggtggcaaaagtacacctaagacgc
ttcccggtggagggcgccggggcggttcgggcccggaggacgttccgaaaccgctcg
ctcgattgtaccgaaagattcagggcgcggtcgtaaagagatcgtaaccgttgaagatg
acgcgcggacgcgagccgcacggcgaggctggcgttgtggacgcgggggtgggttggctt
tcttcgcgttcgcgttggagttctatttgaagacgcgcacggtggcgacgggggtgcctttgg
gctcgccgggtactggagcgccaccggattgcaacacacggcgaaccacgggtggattggcaag
agtgggttttggaatcagtttggatggctgggaacgcgtcgccatggaaagagactcg
tggagtggagatatcatcacatggtgagccaccactcgattcaacgcgcggacactcgatca
agacgtgtacaccgcgctgccgttctcggtggaccgcgtcccgaggagttgaagtgggttccac
cgctaccaacgcgttctacgcgccgtatgtggccgtgtgtggctcgccgcgcagttgg
acgcgaaaatatttagtggataaggcgtctccggcggtcgagtacaaggcctcatgaagct
cgaagtgcgcgtgtacgttctcgaaagtttgcatttagtggctcgccgtaccggcc
tacttgcacgggtttcgaaacgcgttctcggttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
tcctgtgtgggtttcatcgtagtcacaacttggaggcggtgacccaatcaatctgagcaa
atccacgaagaatgactggggcggtggcaaatcgaaacttccgcgtcgtggcaacggcttc
tggagcttttctccggcggttgaatttgcataatcgagcaccacttgggttccgggttgcgc
acaacttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
caccgggttacggtgggtacttggctcctccatcaactcggttgcgttgcgttgcgttgc
aaaatggccgacaaagcaaaagtccgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
30

10

20

30

【0271】

【化16】

配列番号16 Δ4デサチュラーゼ *Ostreococcus RCC809* アミノ酸
MPTTRSRARVTTPPRETPTRANTVAALDPERKYTRIRGVVYDVTDFASRHPGQAQLLSLCVGRD
ATILVESHLRPEVVQKYLKTLPVVEGAAGAFGPEETFPKPLSDLYRKIQGRVRKEIVEPLKM
TRGREPHRGWCVLADGVVLAFFAFAFLGVYWKPTVATGCLLGLAGYWSGTGLQHTANHGLAK
SGFWNQFWGWLGNDAIGKSSVEWRYHHMVSHSYCNDADLDQDVYTALPLLRLDPSQELKWFH
RYQAFYAPLMWPMLWIAAQFGDAQNILVDKASPGEVKGLMKLEVALYVLGKFLHFSLLLGVPA
YLHGFANAIVPFIAYGAFGSFVLCWFFIVSHNLEALTPINLSKSTKNDWGAWQIETSASWGNGF
WSFFSGGLNLQIEHHLFPGCAHNLYPKMVPIIKEECEKAGVTYTGYGGYFGLLPITRDMFAYLY
KMGRQSKKSA*

40

【0272】

【化 1 7】

配列番号 17 Pt における発現のためのΔ4 デサチュラーゼ *Ostreococcus* RCC809 核酸コドン最適化酸
ggatccggtaccaagcttgcataccaaa**at**gccaactactcggttcgtgcgtgtttacta
ctccacacctgtgaaactcctactcgtgctaatactgttgcgtgttagatccagaacgtaaata
tacacgtattcgagggtgttatatgatgttactgatttgctagtcgacatccaggtggcga
caattattatcttatgtgtggcgtgatgctacaatttttagtagaatcacatcattacgac
cagaagttgtacaaaaatattaaaaacattacactgttgcgttagaagggtgcgtggcatttgg
tccagaagaaactttccaaaacctttagatagtgatttatatcgtaaaattcaaggcgtgtt
cgaaaagaaaattgtagaaccattaaaaatgacacgtggcgtgagaacacctcatggcgtgg
gtgttttagatgctggtgtttagctttcttgctttgcattaggtgtttattggaaaac
accactgttagctactggtttttaggtttagcaggttattggcgtgtacaggttacaa
catactgctaattcatggtggttagcaaaatcaggtttggaatcaatttgggttggtagg
aatgatgttgcattggtaatcaagtgtagaatggcgttatcatcatatggttcacatcat
agttattgtaatgatgctgattttagatcaagatgtttatacagcattaccattacgtttag
atccttcacaagaattaaaatggttcatcggttatcaagcatttatgcacccattatgtggcc
tatgttatggtagctgcacaatttggatgctcaaaatatttagttgataaagcaagtcc
ggtagataataaaagggttaatgaaatttagaagttgcattatgtttagggaaaatttt
cattttcttattatttaggtgttcctgcataattacatggtttgcattgtcaattgtaccat
ttattgttatggcatttggttcattgtttatgttggttttcattgtcaattgtaccat
agaagcatttaacaccaattaatttatcaaactaaaaatgattgggtgcgtggcaatt
gaaacttagtgcatttgggtatggttttggcattttctcagggtggtaatttacaa
ttgaacatcattatttcctgggtgtgcataatttatccaaaatggccattattaa
agaagaatgtgaaaaagcagggtttacatatactggttatgggttattttggttattacca
attactcgtgatgtttgcatttataaaatgggtgcgtcaattcaaaaaatctgcatt
aqctcggatccctcgactaga

【 0 2 7 3 】

【化 1 8】

配列番号 18 Pt における発現のための Δ4 デサチュラーゼ *0streococcus RCC809* アミノ酸コドン最滴化酸

MPTTRSRARVTPPRETPRANTVAALDPERKYTRIRGVVYDVTDFASRHPGGAQLLSLCVGRD
ATILVESHHLRPEVVQKYLKTLPVVEGAAGAFGPEETFPKPLDSLDRYRKIQGRVRKEIVEPLKM
TRGREPHGRGCVLDAGVVLAFFAFAFGVYWKPTVTAGCLLGLAGYWSGTGLQHTANHGLAK
SGFWNQFWGWLGNDAIGKSSVEWRYHHMVSRRSYCNDADLDQDVYTALPLLRLDPSQUELKWFH
RYQAFYAPLMWPMLWLAQQFGDAAQNILVDKASPGVEYKGLMKLEVALYVLGKFLHFSSLGVPA
YLHGFANAIVPFIAYGAFGSFVLCWFFIVSHNLEALTPINLSKSTKNDWGAWQIETSASWGNGF
WSFFSGGLNLQIEHHLFPGCCAHNLYPKMVPIIKEECEKAGVTYTGYGGYFGLLPITRDMFAYLY
KMGROSKKSA*

10

【 0 2 7 4 】

【化 1 9】

配列番号 19 *Fragilariopsis cylindrus* (フラギラリオプシス・シリンドルス) 核酸からの
△6 エロンガーゼ

20

30

[0 2 7 5]

【化20】

配列番号20 *Fragilariopsis cylindrus* アミノ酸からのΔ6エロンガーゼ
 MDEYKATLESVGDAIIQWADPESQFTGFTKGFLTDFTSAFSIALVYVLFVIIGSQVMKVLPAI
 DPYPIKFFYNVSQIMLCAYMTIEACLLAYRNGYTIMPVCVGYNRDDPAIGNLLWLFYVSKVWDFW
 DTIFIVLGKKWRQLSFLHVYHHTTIFLFYWLNNVYDGDYLTLIALNGFIHTVMYTYYFICMH
 TKDKKTGKSILPIWWKSSLTLLQLFQFITMMSQGLYLIIFGCESLSIRVTATYVVYILSLFFLFA
 QFFVASYMQPKKSCTA

10

【0276】

【化21】

配列番号21 *Fragilariopsis cylindrus* 核酸からのΔ5デサチュラーゼ (desurase)

1 ATGGCACCCGACGCCGATCACAAGCTGAGACAGCGCCGTCTAAAAGGCAGCAAGTTGT
 61 ATCGATGGAATTATCTATGATATATCATCCTTCGAGCATTCCGGTGGTATACTATCACAC
 121 GTATTGGTGGAAACGATGCAACAATTCACTGACAAATGATTCAACCGTACCATACCACG
 181 AACGATTTAGAAAAATGAAGGTAGTTGGTAAAGTTCCAGACTACTACTCAGAACACAA
 241 TGGGATACACCCTCGAACGTGAAATGAAACGTGAGGTATTAAAATTGTACGACGTGGA
 301 CAAGAATTGGTACAAATGGATATTTTCCGTGCCATTCTGATATTGCTATGTTTTT
 361 TATCTGCAATATTGATGCAAGAACCTCCTACACGTTAGCCATCGTACGGGATT
 421 AGTATGGGATTGATTGGACTGAATGTCCAGCATGATGCGAACACGGAGCTGCATCGAAA
 481 AAAGTGTGGGTGAATGACCTCCTAGGATTGGAGCAGACTTATCGGAGGATCGAAATGG
 541 TTGTTGGATGGAAAAACATTGGACGCATCATGCTTTACAAACCATCGAGAAAAGGATCCA
 601 GATGGGTTAGCAGCGAACCTTCCTATTGTTCAACGACTACGACTTGTCGAGTTCCAAA
 661 CGTGCTGGATATCATGCATAACCAAGGAATTATTAGCCTATTATTGTGTGGTATTGG
 721 CTTTCGGCAATTATTGATATACCTGTAATTGGAATCTACAAGATCGTGGTGCCTTACG
 781 GTAGGAATCCAGCTGGATAACGATTGGATTGCTAGTCGAAGAAAGTACGCGGTTAGTCTT
 841 CGAATCTTATACCTCTTGTAAACATCGTCGTCCTCTCTATAACAAATTCTCCTGGACA
 901 ACCGTGAGTCATATCAATGTAATGGAATTGTTGGTAGCCTACATTAGGACTACTTTT
 961 ACCTTGTGCGACAATTGAGAATGTAGATCGAGATCCTACCAACTGAACCTAAATGAA
 1021 ACAGAAGAACCTGTTGCTGGTCAAATCTCAAGTAGAAACTTCTTCAACATACGGGGGC
 1081 ATGATATCCGGATGGTTAACCGGGGATTAAACTTCAGGTTGAGCACCATTATTCCCG
 1141 AGAATGTCTAGTGTGCTGGTATCCATTGACCAAAAGTCGTGAAATTGCAAAAG
 1201 CACGGAGTTCGTTACGTATACTATCCATGGTGTGCAAAATATGTATTGACGTTGAAG
 1261 TACACCCACGAGGTTGGTGTGGCTCACATTGGAAGGATAATCCTTTAAGGGTGAAATG
 1321 TAG

20

30

40

【0277】

【化22】

配列番号22 *Fragilariaopsis cylindrus* アミノ酸からのΔ5デサチュラーゼ(desurase)

```

1 MAPDADHKLRQRRLGDEV CIDGIIYDISSFEHPGGDTINVFGGNDATIQYKMIHPYHTT
61 KHL EKMKVVGKVPDY SEYKWDTPFEREMKREVFKIVR RRGQEFGTNGYFFRAISYIAMFF
121 YLQYLWMQESSYTLAIVYGISMGLIGLNVQHDANHGAASKVWVNDLLGLGADFIGGSKW
181 LWMEKHWTTHAFTNHREKDPGLAAEPFLLFNDYDLSSSKRAGYHAYQGIYLVLLCGYW
241 LSAIIDIPVIWNLQDRGALTVGQLDNDWIASRRKYAVSLRILYLFNCNIVVPLYNFSWT
301 TVSHINVMGICGSLTLLFTLSHNENVDRDPTNLNLNETEPPVCWFKSQVETSSTYGG
361 MISGWL TGGLNFQVEHHLFPRMSSAWYPFIAPKVREICKKHGVRYVYPWLLQNMYSTLK
421 YTHEVGVGSHWKDNPKGEM-

```

10

【0278】

【化23】

配列番号23 *Phaeodactylum tricornutum* (フェオダクチラム・トリコルヌーム) における発現のために最適化された *P. patens* (*P. patens*) PpHUP1L コドン

```

1 ATGGCAGGGGGGGGTGTCGTTACGGCGGGGAGATCAAGCACTACCCCGGCCAACAAACC
61 TTCTTGATTATGGTCTGTATACTGGCGGCATCCGGAGGTCTCATGTTGGATACGAT
121 GTCGAATTTCAGGGGTGTCACGTCTATGGACGAATTGGCGAAATTTGGCGAAATTTTCCTGCG
181 GTGTTGGCGAAGAACGAGCAGAGGCAGCTCGGAGAGCGCCTACTGCAAGTATGATGAC
241 CAGAACGCTGCAAGCCTTCACATCGTCGCTGTACATTCCGACTCGTGTGACATTCTTC
301 TCGTCGTACACCACCAGGCACTACGGCCGTAATTACCATGCTCATAGCTGGTTCGCC
361 TTCTGCTTCGGCGTCATCTTACCGCCGCTGCGCAAGAACATCATGCTAATCATAGGG
421 CGCGTCCTCCTGGGTGGGTGTCGGATTCGCTAACACCAGGCTGTTCCGTTGTACCTCTCC
481 GAAATGGCACCCCTCCAAGTGGCGAGGTGCGCTAACATCCTCTTCAATTGGCGGTGACC
541 ATTGGCATCTGTTGCCAGTCTCGTGAACACTACGGCACAGAGAACGATGGCTCGAACGGG
601 TGGCGTGTTCCTCGCCATGCCCGCTGCCTGCGATCTTCATCACCTCGGAGGATTA
661 CTCCGCCAGACACACCGAACATTCCCTCGTGAACCGCGAACAGCACGAGAGCGCCGCCAG
721 GTCCTACGCAGGATTCGTTGGCGTCACAACATTGAGGAAGAGATTCGACGACATCCTCATT
781 GCCAGTAACGAAGCCCTCCGTGAAGCACCCCTCCGCAATATCTTGAACGCCGCAAC
841 CGCCCTCAGCTGGTCATCTCCATGGCTCTTCAGTTTCCAGCAATTCACTGGAATTAA
901 GCTATTATGTTTACCGCCTGCTTGTCCAGACGCTGGGATTGGGAGTTCCGCTTCA
961 CTTACTCTGCTGTATCGTTGGAGCCGTGAATGTGCTGGCCACTTGCCTCGCTATCGCT
1021 GTTGTGGATCGATTGGTCGACGATGGTTGCTCTTGGAAAGCTTGCATCCAAATGTTCTTA
1081 GCACAGACGGCGATTGCAATTATCCTGGCGCGGATTGAAGGGACCGAGATGCCGGAG
1141 TATCTGGGATGGATCGCGGTGGTATTGATTGCTGTACGTGTCTTCCTTCGCGTGGTCT
1201 TGGGGTCCACTTGGATGGTTGATTCCAAGTGAGATTCCCCTTGGAGACGCGTTCA
1261 GGGCAAGCCATCACGGTGTGACCAACATGGTCTTCACCTCCTCATCGCGCAAGTGTTC
1321 CTGTCAATGTTGCGCGTTCAAGTGGGGCATCTTCCCTTCCGCGCGTGGGTGGT
1381 GTGATGTTCTTTACGTACTTTAATTCCCGAGACGAAGGGCATCCCCATCGAGGAG
1441 ATGGATCTCGTGTGGACCAAGCAGTGGTCTGGAAGCGCTACGTCCCCTACCTGAGACT
1501 CTCGCTCACACCAGCGGCATCCCCATGGGAGATATGAAGGTCAAGCTGGAGAATGGC
1561 TCCGCAAATGGCCACAAACTGTAA

```

20

30

40

【0279】

【化24】

配列番号24 PpHUP1Lの推定されるポリペプチド配列

1 MAGGGVVTAGEIKHYPGRTTFFVIMVCIVAASGLMFGYDVGISGGVTSMD~~EFLAKFFPA~~
 61 VLAKKRAEAASESAYCKYDDQKLQAFTSSLYISALVSTFFSSYTRHYGRKFTMLIAGFA
 121 FCFGVI~~TAAAQEIIIMLIIGRVLLGWGVGFANQAVPLYLSEMAPSKWRGALNILFQLAVT~~
 181 IGI~~LFA~~SLVNYGTEKMARNGWRVSLAIAGLPAIFITLG~~GLLL~~PDT~~PNSL~~VQRGK~~HESARQ~~
 241 VLRRIRGVDNIEEEFD~~DILIASNEAASV~~KHPFRN~~NILKRRNR~~PQLVIS~~MALQFFQQFTGIN~~
 301 AIMFYAPVLFQ~~TLGF~~GSSASLYSAVIVGAVNV~~LATCVAIAV~~VDRFGR~~WLL~~EA~~CIQMFL~~
 361 AQTAIAI~~IILAAGLKGTEMPEYLGWIAVVLICVYVSSFAWSWGPLGWLIPSEIFPLETRSA~~
 421 GQAITV~~STNMVFTFLIAQVFL~~SM~~LCAFKWGIFLFFAAWVVVMFLFTYFLI~~PETKG~~PIE~~
 481 MDLVWTKHWF~~WFKRYVPYPETLAHTSGIPMGDMKVSKLENGSANGHKL-~~

10

【0280】

【化25】

配列番号25 Phaeodactylum tricornutumにおける発現のために最適化された Homo sapiens (ホモ・サピエンス) HsGLUT1 コドン

1 ATGGAGCCCAGCAGCAAGAACGCTGACGGGTCGCCTCATGCTGGCTGTGGGAGGCAGTG
 61 CTTGGCTCCCTGCAGTTGGCTACAACACTGGAGTCATCAATGCC~~CCCC~~CAGAAGGTGATC
 121 GAGGAGTTCTACAACCAGACATGGGTCCACCGCTATGGGGAGAGCATCCTGCCACCACG
 181 CTCACCACGCTCTGGT~~CCCT~~TCAGTGGCCATCTTCTGTTGGGGCATGATTGGCTCC
 241 TTCTCTGTGGGC~~CTTT~~CGTTAACCGCTTGGCCGGGAATTCAATGCTGATGATGAAC
 301 CTGCTGGC~~CTT~~CGTGTCCGCCGTGCTCATGGCTTCTCGAAACTGGCAAGTC~~CTT~~GAG
 361 ATGCTGATCCTGGGCC~~CTT~~CATCATCGGTGTACTGCGGCTGACCACAGGCTCGTG
 421 CCCATGTATGTGGGTGAAGTGT~~CACCC~~ACAGC~~CTT~~CGTGGGCC~~CT~~GGGACCC~~CT~~GCAC
 481 CAGCTGGC~~ATCGTC~~CGTCGGCATCCTCATGCC~~CC~~AGGTGTTGGC~~CT~~GGACTCC~~CAT~~CATG
 541 GGCAACAAGGAC~~CTGT~~GGCC~~CT~~TGCTGAGCATCATCTT~~CATCCC~~GGCC~~CT~~GCTGCAG
 601 TGCATCGT~~GCTG~~CC~~CT~~TGCCCCGAGAGT~~CCCC~~GCTTC~~CCTG~~CTCAACCGCAACGAG
 661 GAGAACCGGGCCAAGAGTGT~~GCTAAAGAAG~~CTGCG~~GGGACAG~~GTGACGTGACCC~~CATGAC~~
 721 CTGCAGGAGATGAAGGAAGAGAGTCGGCAGATGATGCGGGAGAAGAAGGT~~CACCATC~~CTG
 781 GAGCTGTTCCGCT~~CCCC~~GC~~CTACCGCC~~AG~~CCC~~CAT~~CTCATCG~~CTGTGGTGCTG~~CAGCTG~~
 841 TCCCAGCAG~~CTGT~~CTGGCATCAACGCTG~~CTTCTATTACTC~~CACGAGCAT~~CTTC~~GAGAAG
 901 GC~~GGGGGTGC~~AGCAGC~~CTGTGT~~TATGCCACC~~ATTGGCTCCGGT~~ATCGTCAACACGGC~~CTTC~~
 961 ACTGTCGTG~~CTGCTG~~TTGTGGTGGAGCGAGCAGGCCGGGACCC~~CTG~~CACCT~~CATAGGC~~
 1021 CTCGCTGGCATGGCGGGTGTGCC~~ATACTCATGACC~~ATCGCGTAGC~~ACTG~~CTGGAGCAG
 1081 CTACCC~~TGGATGT~~CCTATCTGAGCAT~~CGTGGCC~~AT~~CTTGG~~CTTG~~GGC~~CTT~~CTTG~~GAA
 1141 GTGGGT~~CCTGG~~CCCC~~CATCCC~~AT~~GTT~~CAT~~CGTGG~~CTGA~~ACTCTC~~AG~~CCAGGG~~T~~CCACGT~~
 1201 CCAGCTGCCATTGCC~~GTTGC~~AGG~~CTCTCCA~~ACTGGAC~~CTCAA~~ATT~~TCA~~TTGTGGC~~CATG~~
 1261 TGCTTCCAGTATGTGGAGCA~~ACTGT~~GTGGCC~~CTACGT~~CTTC~~CATCATCTT~~CACTGTG~~CTC~~
 1321 CTGGTTCTGTTCTTC~~CATCTT~~CAC~~CTACTT~~CAAAGT~~TCCTG~~AGACTAAAGGCCGGAC~~CTTC~~
 1381 GATGAGATCGCTTCCGGCTTCCGGCAGGGGGAGCCAG~~CAAAGT~~GATAAGACACCCGAG
 1441 GAGCTGTTCC~~CATCCC~~CTGGGGCTGATT~~CCC~~AAGTGTGA

20

30

40

【0281】

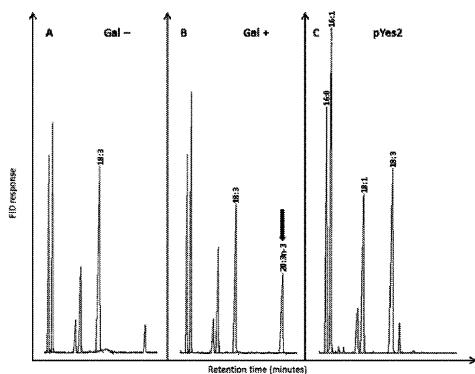
【化26】

配列番号26 HsGLUT1 の推定ポリペプチド配列

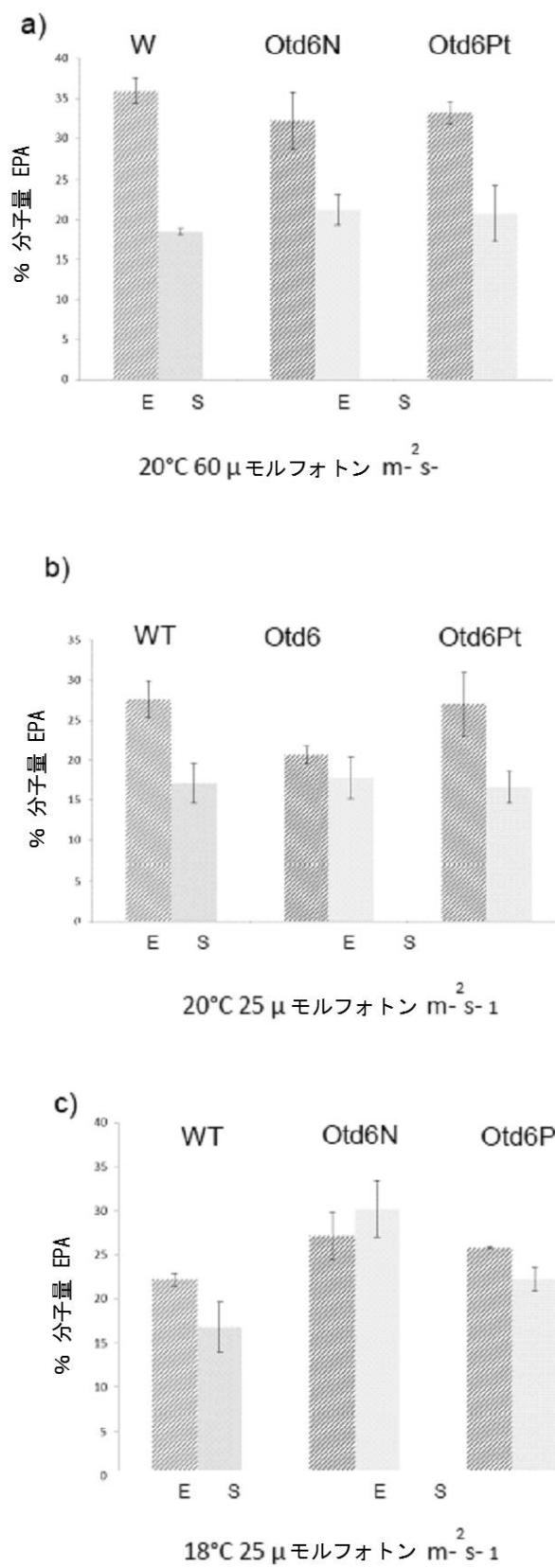
1 MEPSSKKLTGRLMLAVGGAVL GSLQFGYNTGVINAPQKVIEEFYNQTWVHRYGESILPTT
 61 LTTLWSLSVAIFSVGGMIGSFVGLFVNRFGRNSMLMMNLLAFVSAVLMGFSKLGKSFE
 121 MLILGRFIIGVYCGLTGFPVPMYVGEVSPTAFRGALGTLHQLGIVVGILIAQVFGLDSIM
 181 GNKDLWPLLSSIIIFIPALLQCIVLPFCPESPRFLLINRNEENRAKSVLKLRGTADVTHD
 241 LQEMKEESRQMMREKKVTILELFRSPAYRQPILIAVVLQLSQQLSGINAFFYYSTSIFEK
 301 AGVQQPVYATIGSGIVNTAFTVVSLFVVERAGRRTLHLIGLAGMAGCAILMTIALLEQ
 361 LPWMSYLSIVAIFGFVAFFEVGPGPIPWFIVAEFLSQGPRPAIAVAGFSNWTNSNFIVGM
 421 CFQYVEQLCGPYVFIIFTVLLVLFFIFTYFKVPETKGRTFDEIASGFRQGGASQSDKTPE
 481 ELFHPLGADSQV-

10

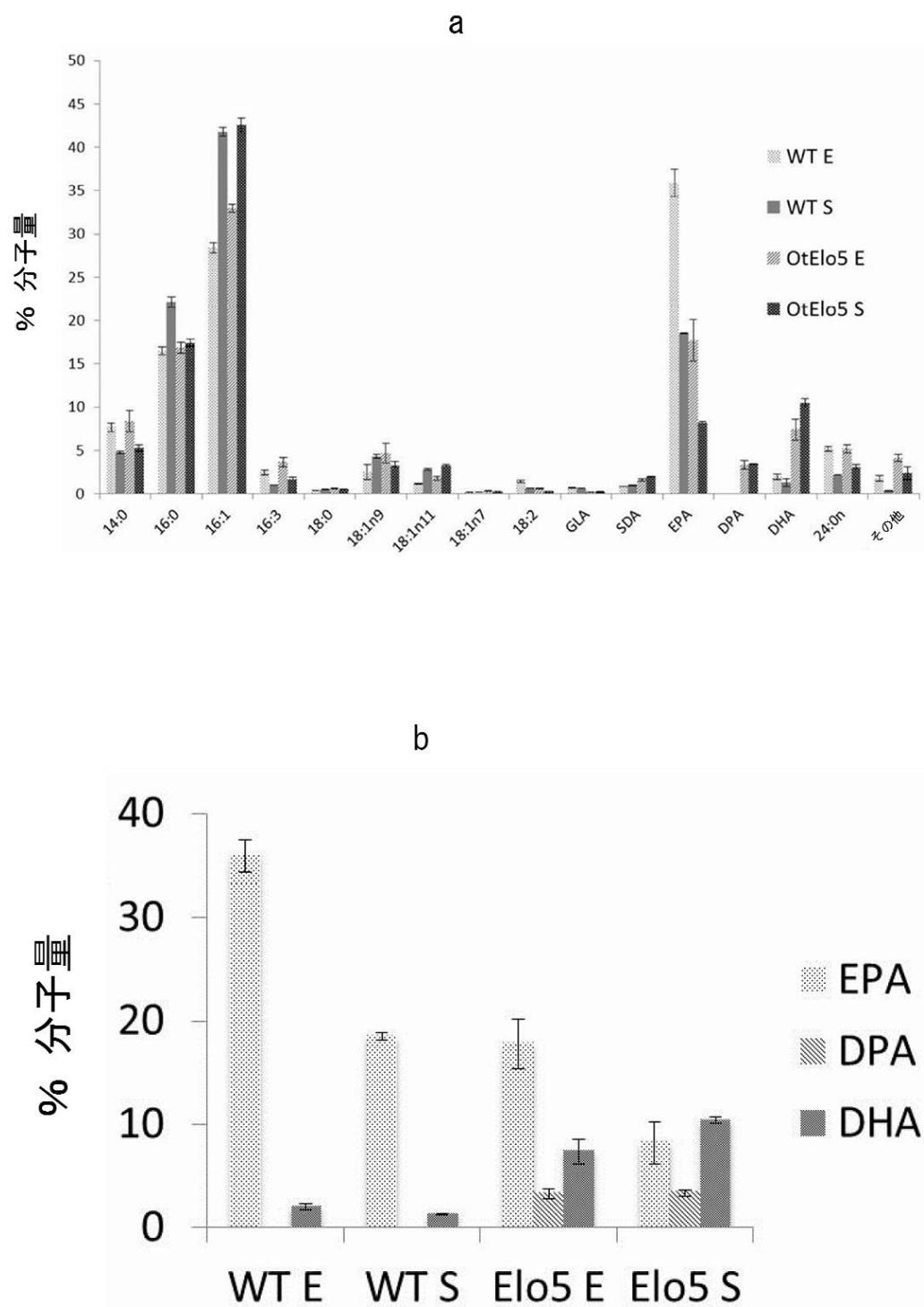
FIGURE 11



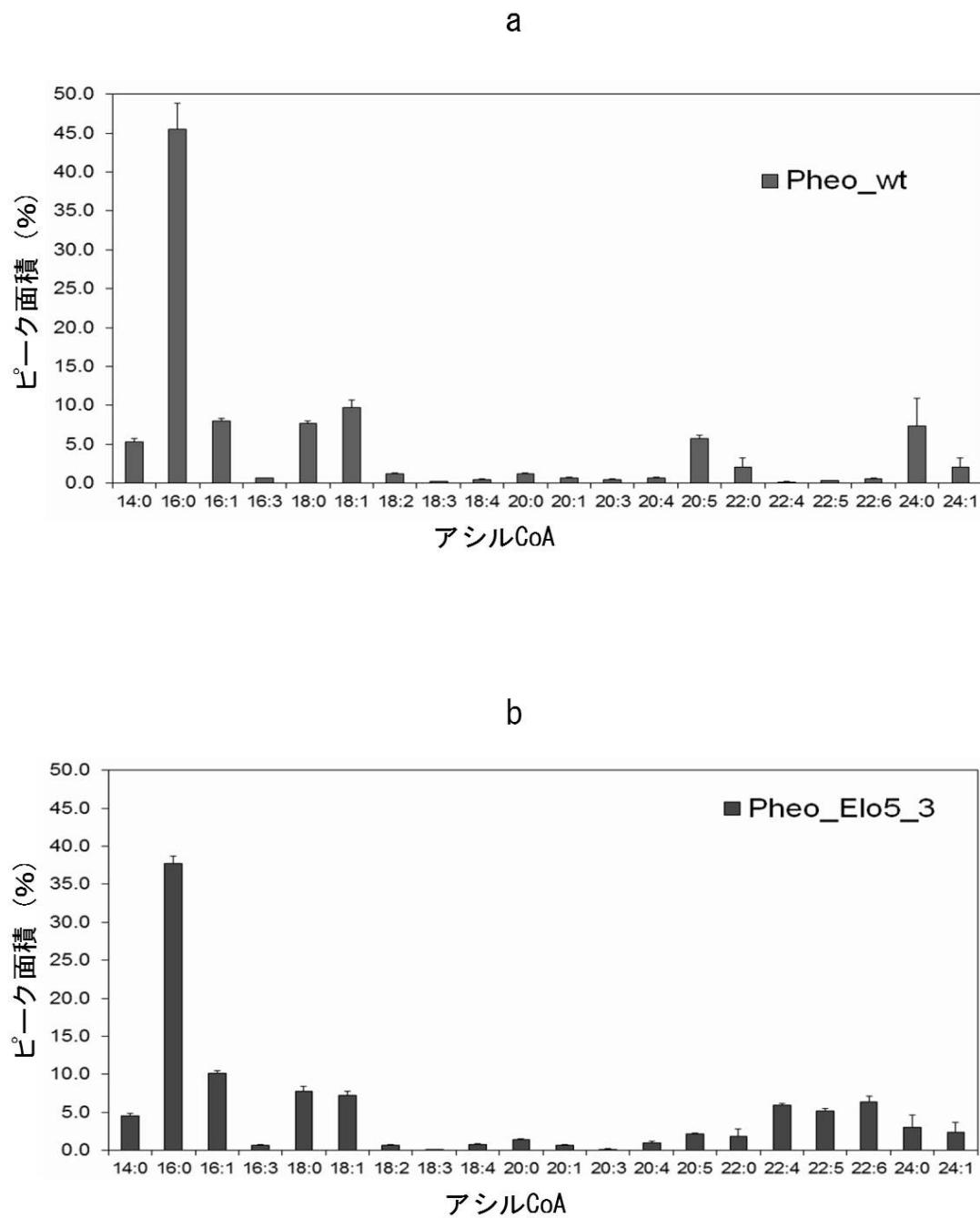
【図1】



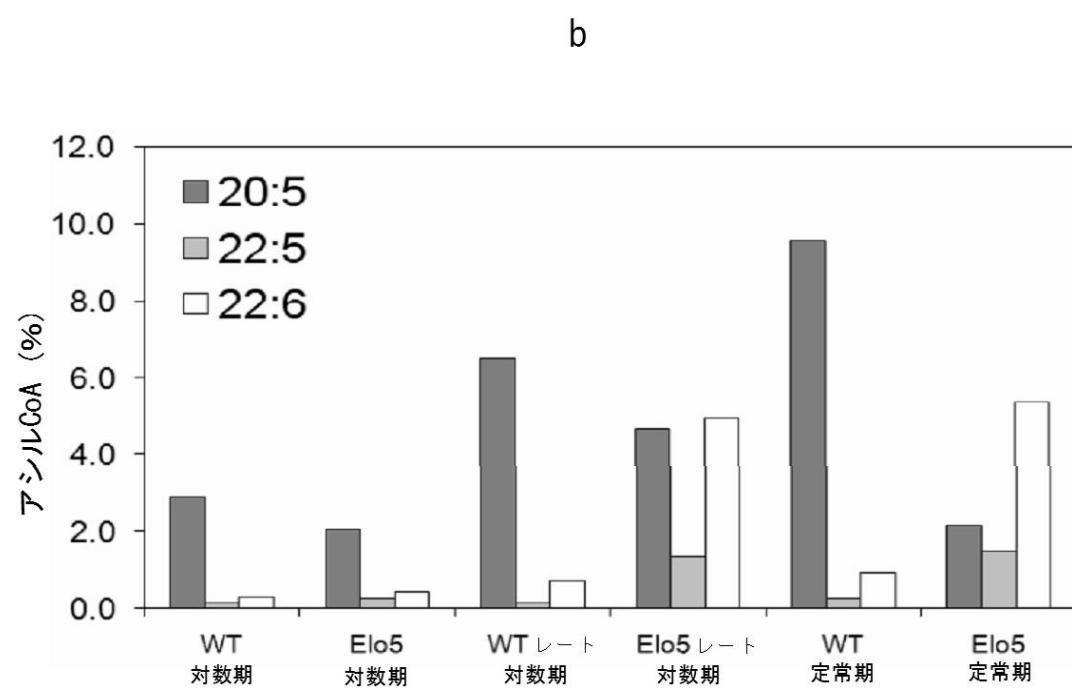
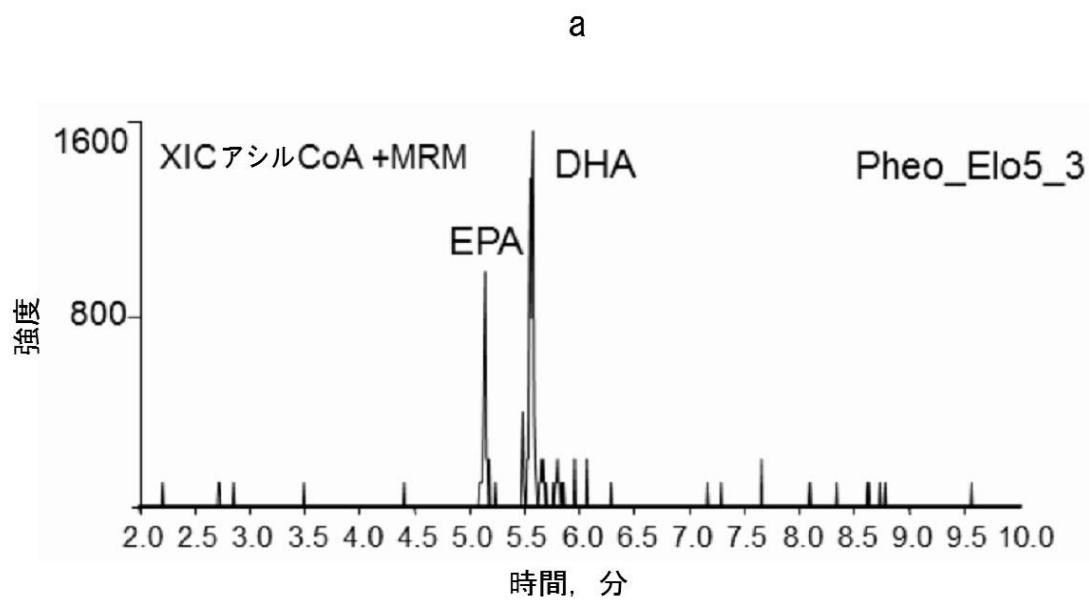
【図2】



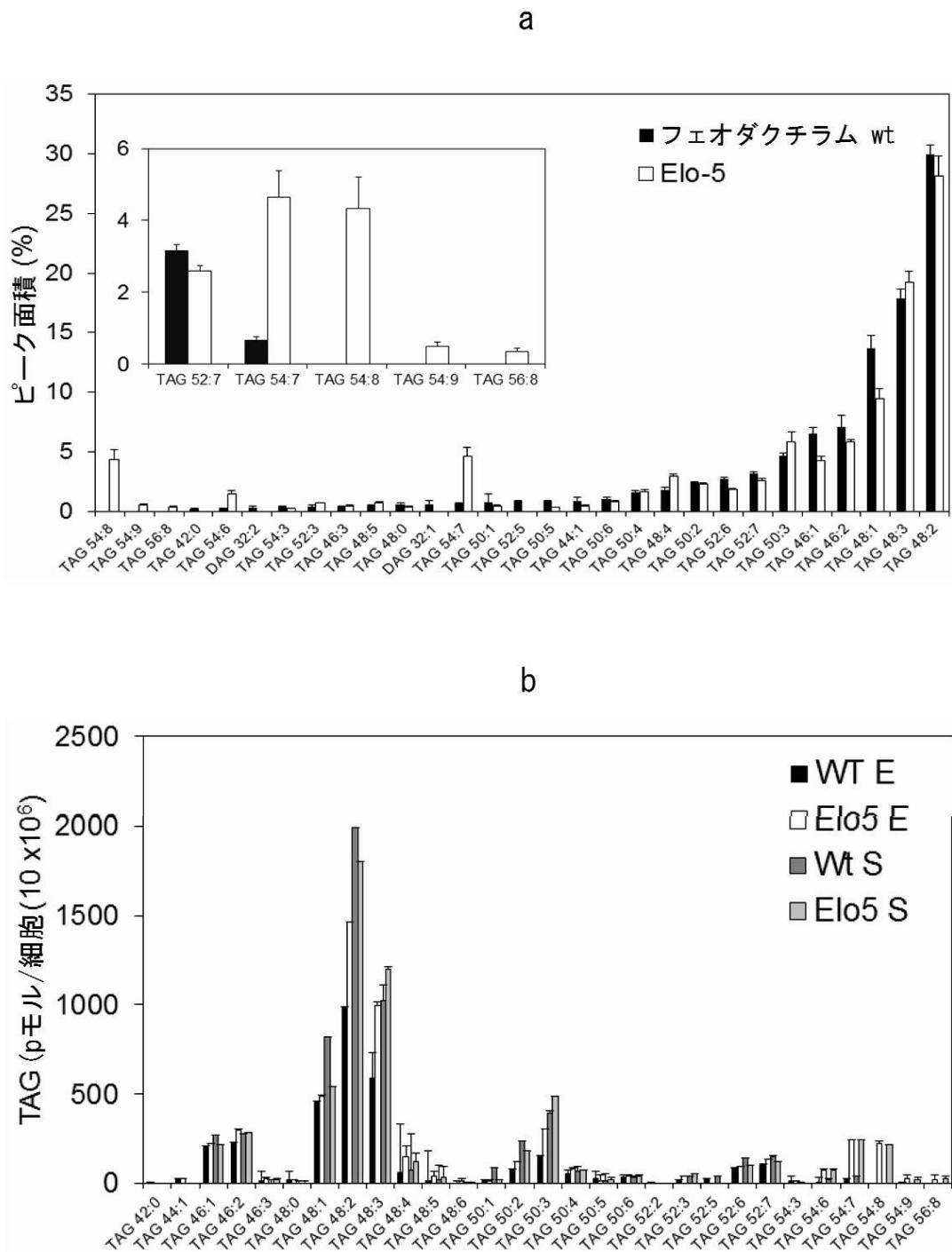
【図3】



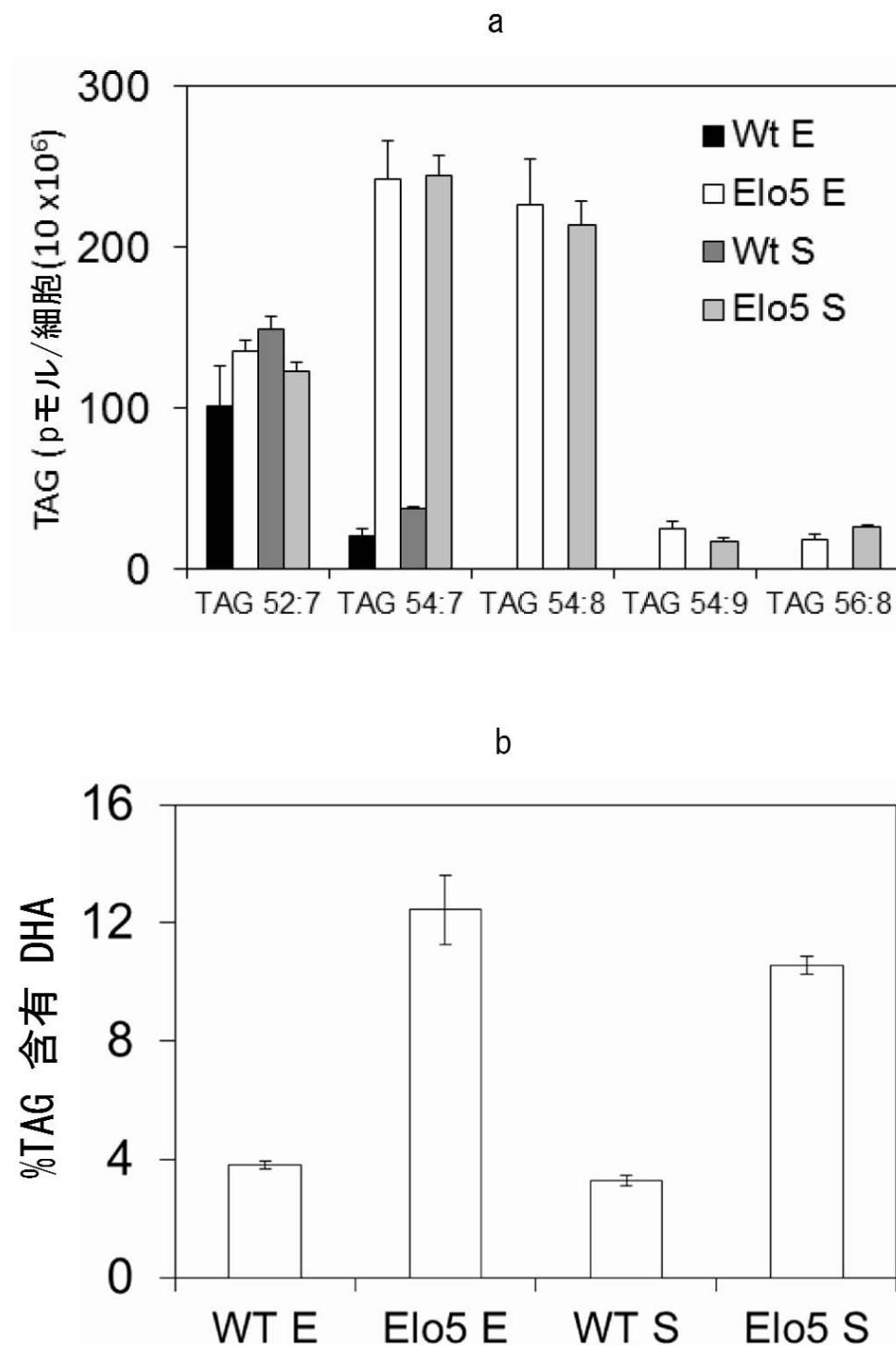
【図4】



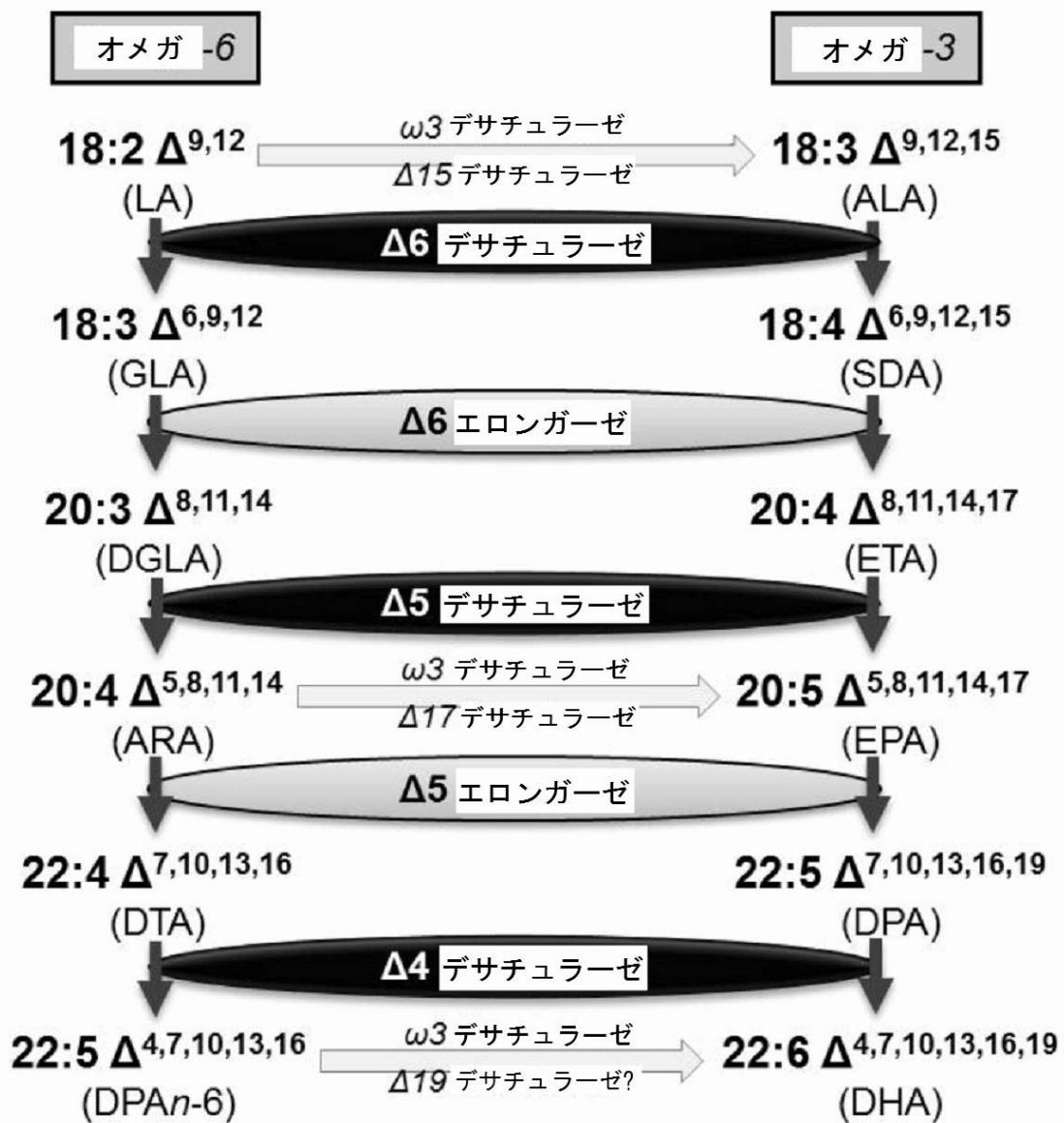
【図5】



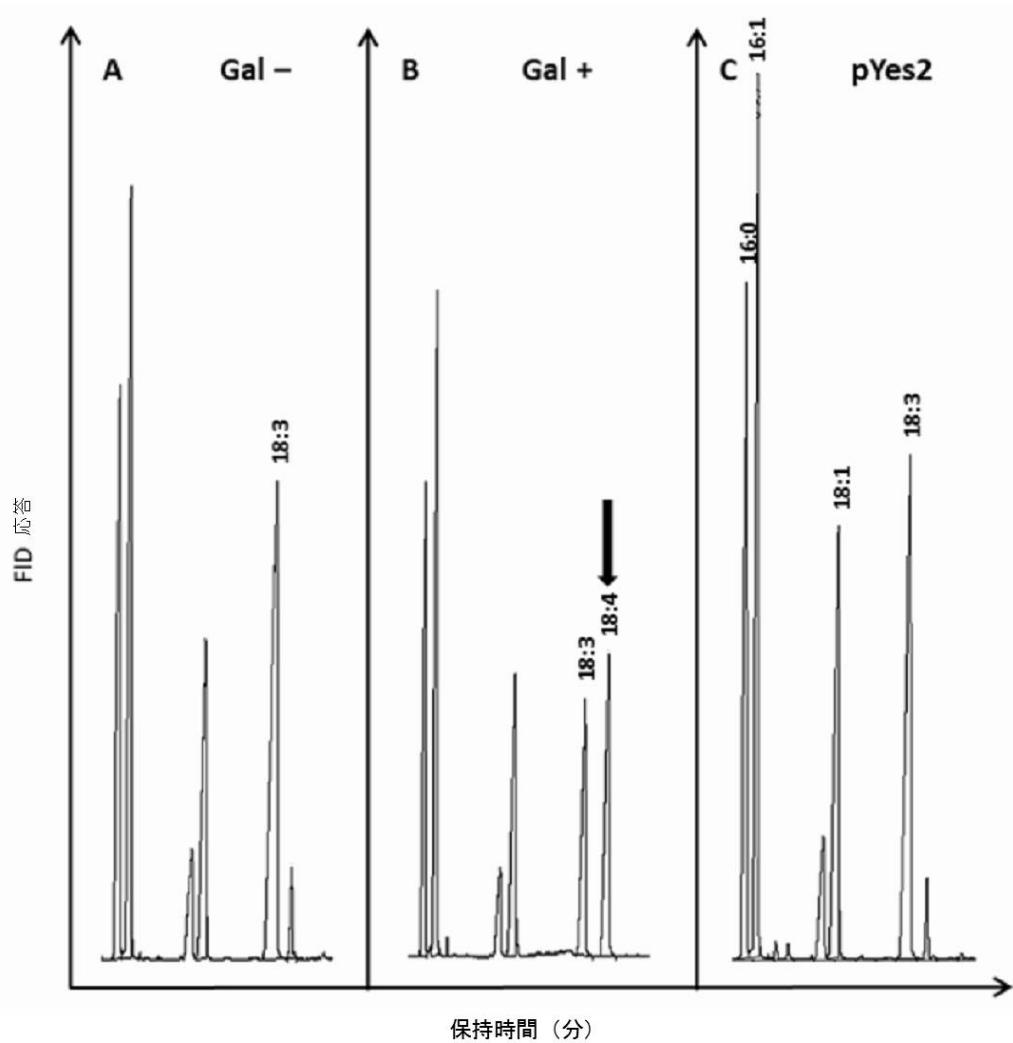
【図6】



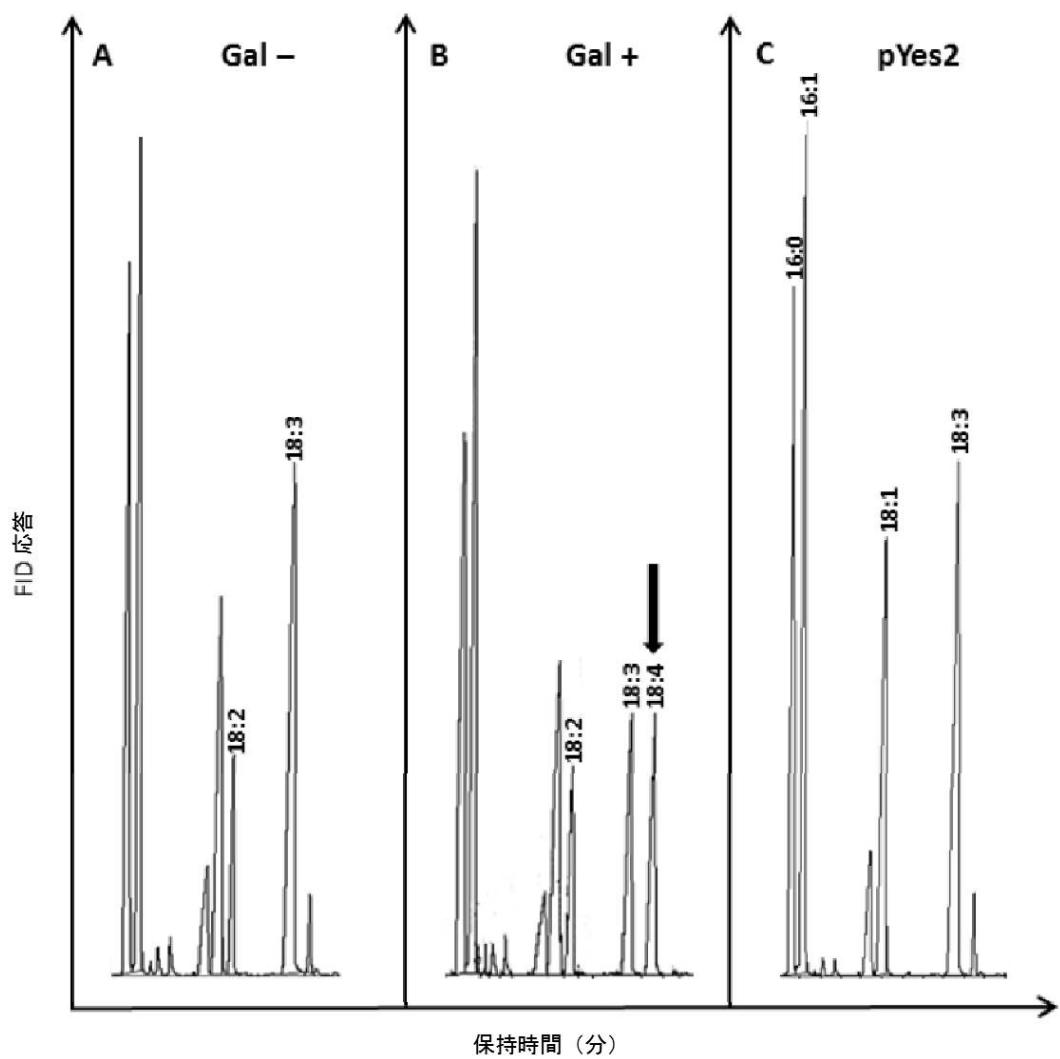
【 図 7 】



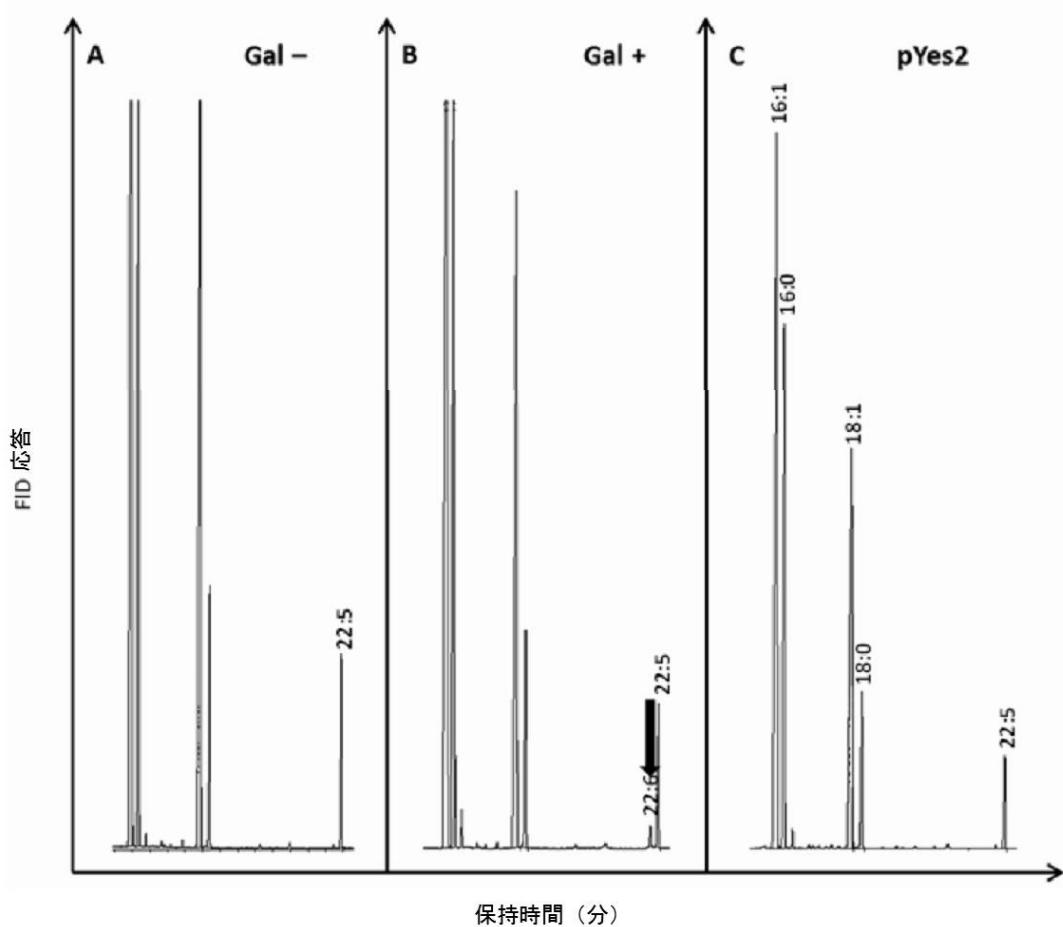
【図8】



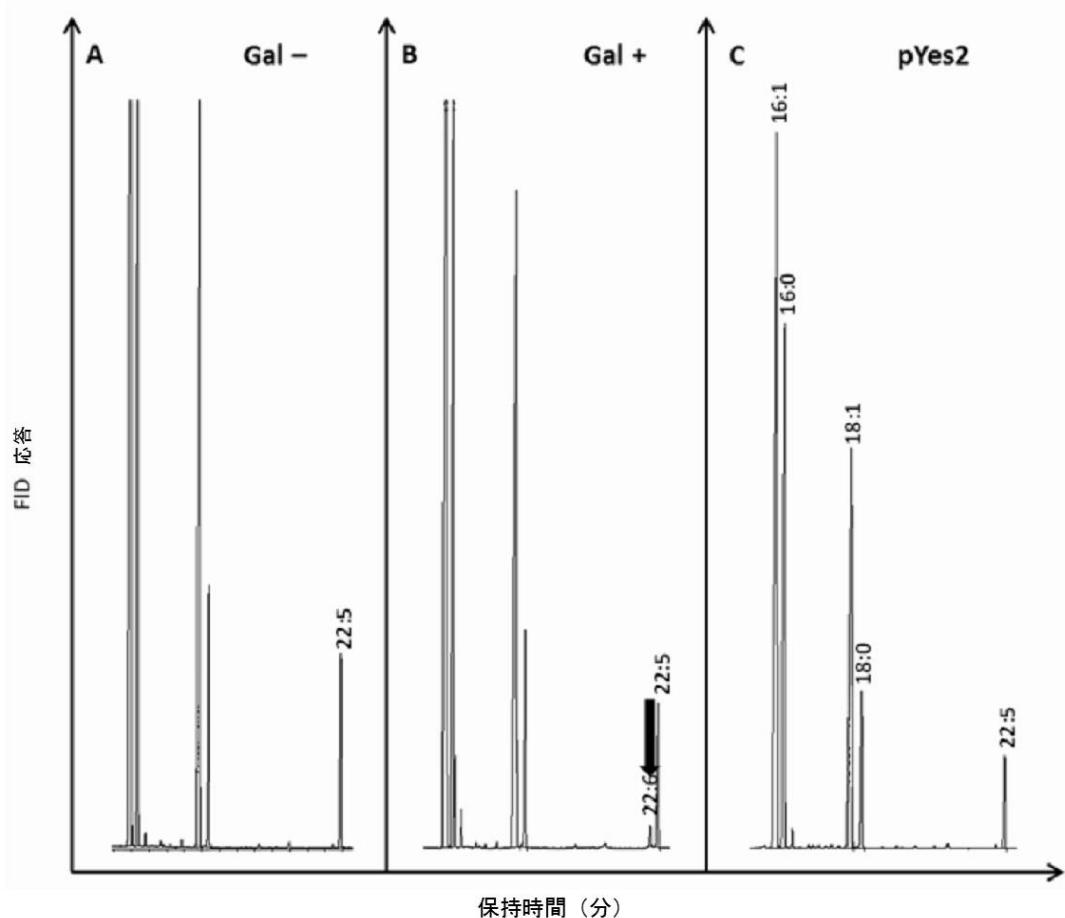
【図9】



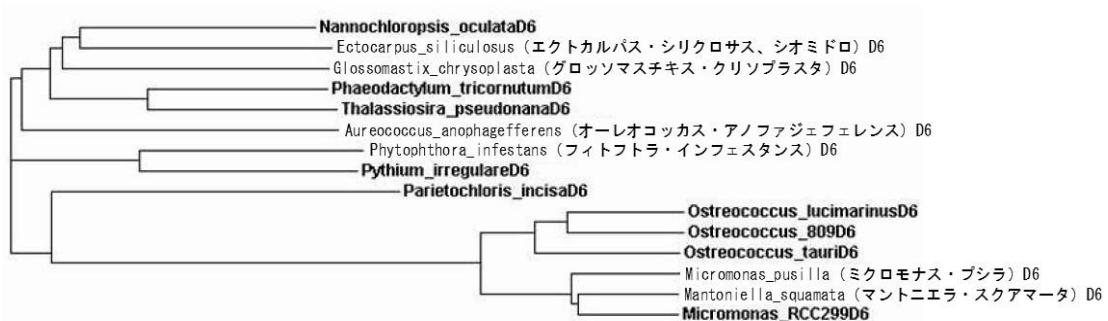
【図10】



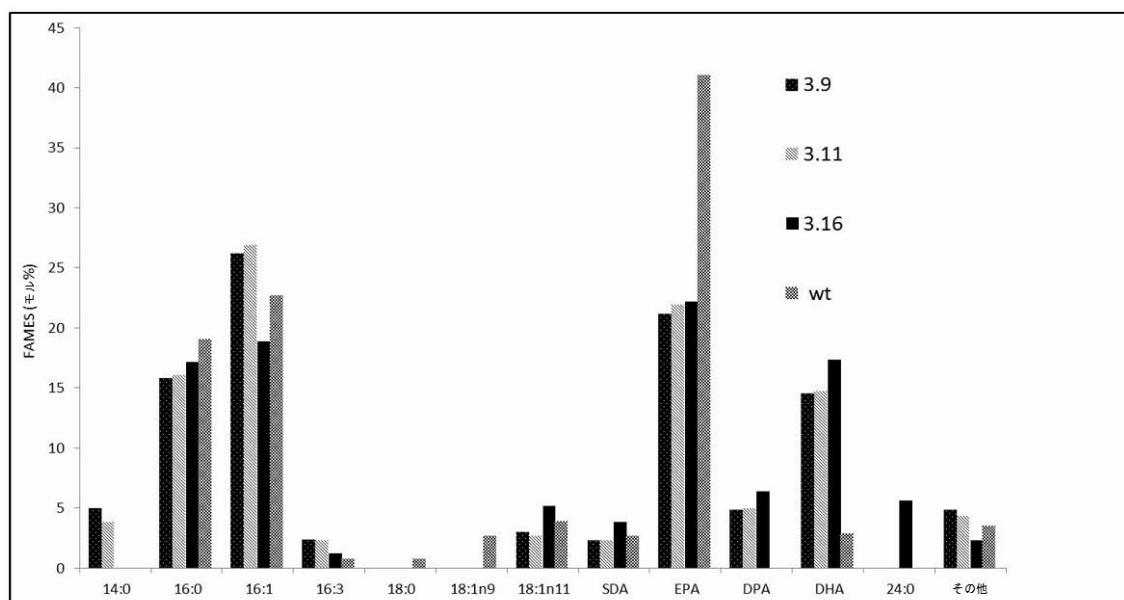
【図 11】



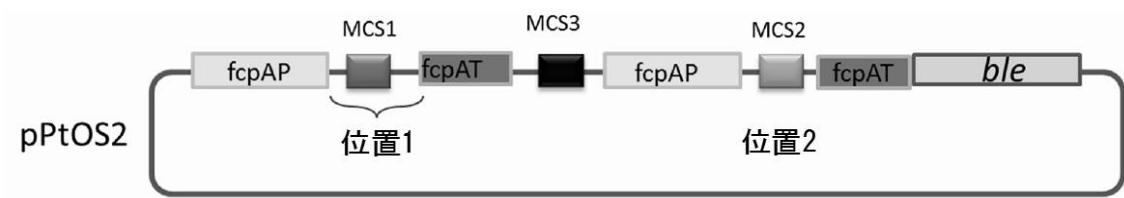
【図 1-2】



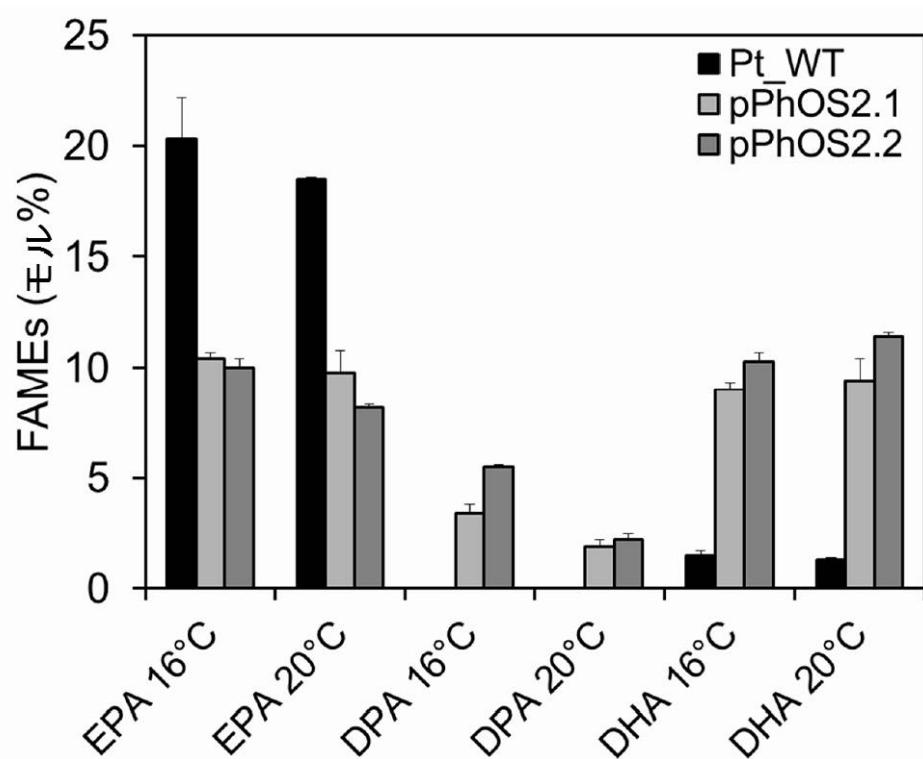
【図 1-3】



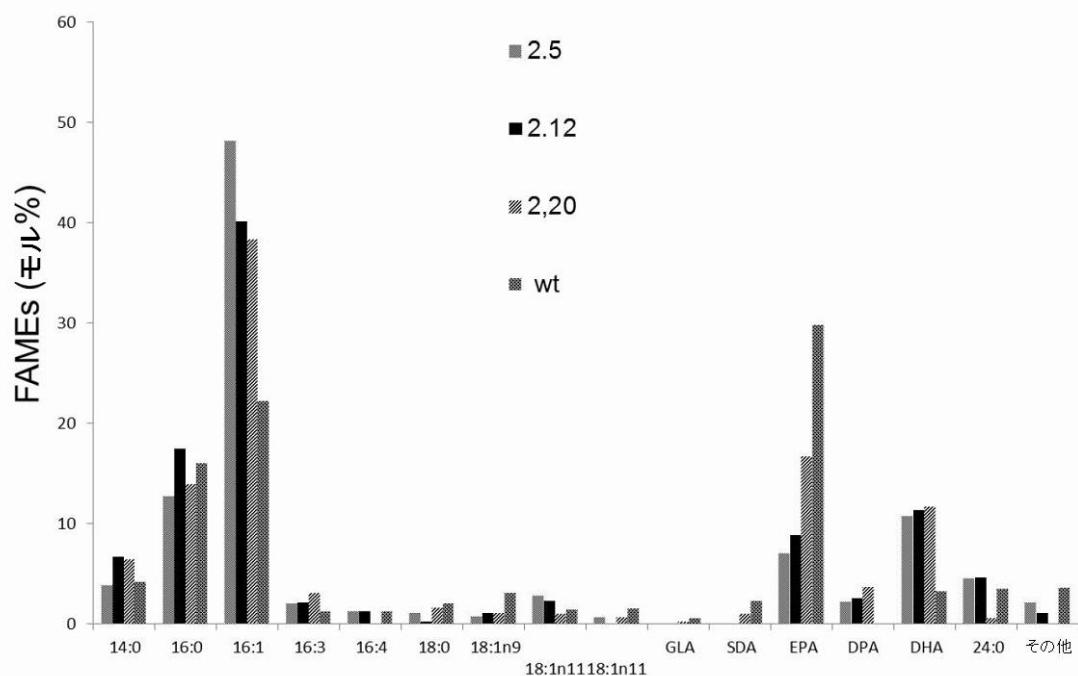
【図 1 4】



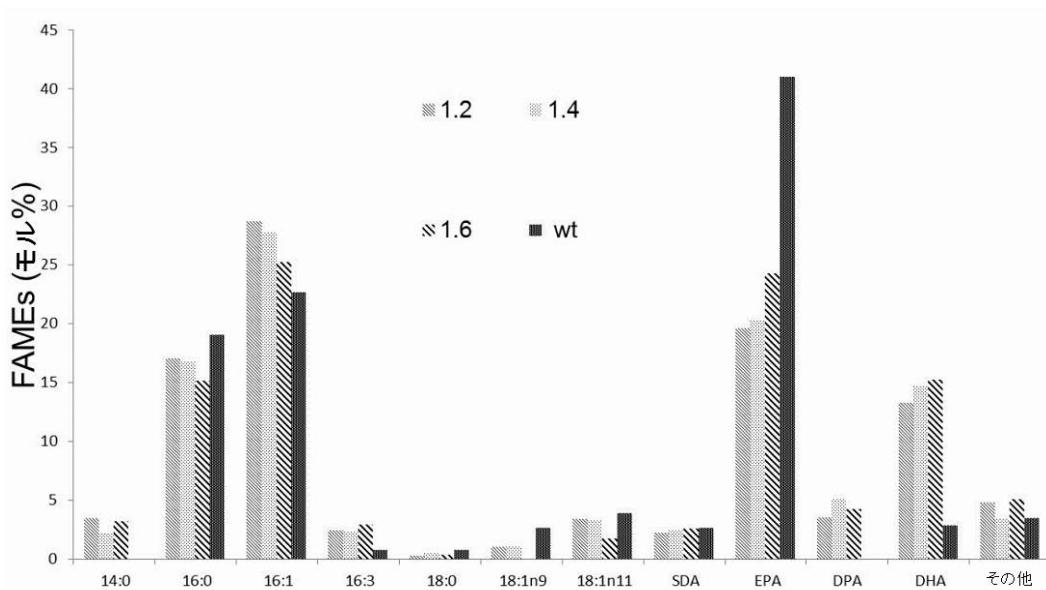
【図 1 5】



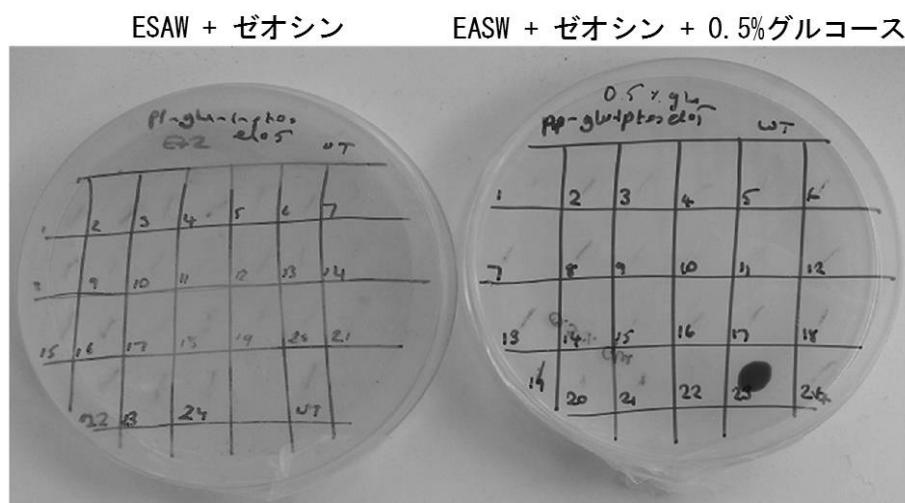
【図16】



【図17】



【図 18】



暗所増殖プレート+/-グルコース 単一コロニーをプレート上にストロークした10日後
WT細胞は暗所において増殖することができない（プレートの上部）

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2013/052553

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N1/00 ADD. | | | | | | | | | | |
|--|--|-----------------------|--|-----------------------|---|---|------|---|--|-------------|
| 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) C12N | | | | | | | | | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | | | | | | | | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE | | | | | | | | | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category^a</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">WO 2010/057246 A1 (COMMW SCIENT IND RES ORGANISAT [AU]; PETRIE JAMES ROBERTSON [AU]; MACK) 27 May 2010 (2010-05-27) page 1 - page 170; claims 1-175 -----</td> <td style="padding: 2px;">1-44</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">WO 2011/161678 A2 (UNIV BEN GURION [IL]; HACOHEN ZVI [IL]; KHOZIN GOLDBERG INNA [IL]; UMI) 29 December 2011 (2011-12-29) page 1 - page 53; claims 1-21 -----</td> <td style="padding: 2px;">1-44 -/-</td> </tr> </tbody> </table> | | Category ^a | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. | X | WO 2010/057246 A1 (COMMW SCIENT IND RES ORGANISAT [AU]; PETRIE JAMES ROBERTSON [AU]; MACK) 27 May 2010 (2010-05-27) page 1 - page 170; claims 1-175 ----- | 1-44 | X | WO 2011/161678 A2 (UNIV BEN GURION [IL]; HACOHEN ZVI [IL]; KHOZIN GOLDBERG INNA [IL]; UMI) 29 December 2011 (2011-12-29) page 1 - page 53; claims 1-21 ----- | 1-44 -/- |
| Category ^a | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. | | | | | | | | |
| X | WO 2010/057246 A1 (COMMW SCIENT IND RES ORGANISAT [AU]; PETRIE JAMES ROBERTSON [AU]; MACK) 27 May 2010 (2010-05-27) page 1 - page 170; claims 1-175 ----- | 1-44 | | | | | | | | |
| X | WO 2011/161678 A2 (UNIV BEN GURION [IL]; HACOHEN ZVI [IL]; KHOZIN GOLDBERG INNA [IL]; UMI) 29 December 2011 (2011-12-29) page 1 - page 53; claims 1-21 ----- | 1-44 -/- | | | | | | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 | Date of mailing of the international search report | | | | | | | | | |
| 13 November 2013 | 28/11/2013 | | | | | | | | | |
| Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5518 Patentaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016 | Authorized officer Brochado Garganta, M | | | | | | | | | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|------------------------------|
| International application No |
| PCT/GB2013/052553 |

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | HUANG Y-S ET AL: "Enzymes for transgenic biosynthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids", BIOCHIMIE, MASSON, PARIS, FR, vol. 86, no. 11, 1 November 2004 (2004-11-01), pages 793-798, XP004689088, ISSN: 0300-9084, DOI: 10.1016/J.BIOCHI.2004.09.019 page 793 - page 796 ----- | 1-44 |
| X | MEYER A ET AL: "NOVEL FATTY ACID ELONGASES AND THEIR USE FOR THE RECONSTITUTION OF DOCOSAHEXAENOIC ACID BIOSYNTHESIS", JOURNAL OF LIPID RESEARCH, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, INC, US, vol. 45, no. 10, 1 October 2004 (2004-10-01), pages 1899-1909, XP009046591, ISSN: 0022-2275, DOI: 10.1194/JLR.M400181-JLR200 page 1899 - page 1908 ----- | 1-44 |
| X | ZHOU ET AL: "Isolation and characterization of genes from the marine microalga Pavlova salina encoding three front-end desaturases involved in docosahexaenoic acid biosynthesis", PHYTOCHEMISTRY, PERGAMON PRESS, GB, vol. 68, no. 6, 3 March 2007 (2007-03-03), pages 785-796, XP005912642, ISSN: 0031-9422, DOI: 10.1016/J.PHYTOCHEM.2006.12.016 page 785 - page 795 ----- | 1-44 |
| A | WARD O P ET AL: "Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production", PROCESS BIOCHEMISTRY, ELSEVIER, NL, vol. 40, no. 12, 1 December 2005 (2005-12-01), pages 3627-3652, XP027794053, ISSN: 1359-5113 [retrieved on 2005-12-01] the whole document ----- -/- | 1-44 |
| 1 | | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|------------------------------|
| International application No |
| PCT/GB2013/052553 |

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | HARWOOD J L ET AL: "The versatility of algae and their lipid metabolism", BIOCHIMIE, MASSON, PARIS, FR, vol. 91, no. 6, 1 June 2009 (2009-06-01), pages 679-684, XP026119774, ISSN: 0300-9084, DOI: 10.1016/J.BIOCHI.2008.11.004 [retrieved on 2008-11-27] the whole document ----- A RUBIO-RODRIGUEZ N ET AL: "Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review", INNOVATIVE FOOD SCIENCE AND EMERGING TECHNOLOGIES, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 11, no. 1, 1 January 2010 (2010-01-01), pages 1-12, XP026825026, ISSN: 1466-8564 [retrieved on 2010-01-05] the whole document ----- A WO 2011/054800 A1 (DSM IP ASSETS BV [NL]; VERKOEIJEN DANIEL [US]; BIJL HENDRIK LOUIS [NL]) 12 May 2011 (2011-05-12) the whole document ----- | 1-44 1-44 1-44 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

| |
|---|
| International application No PCT/GB2013/052553 |
|---|

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|----|------------------|
| WO 2010057246 | A1 27-05-2010 | AR 074364 | A1 | 12-01-2011 |
| | | AU 2009317860 | A1 | 27-05-2010 |
| | | CA 2743880 | A1 | 27-05-2010 |
| | | CN 102317459 | A | 11-01-2012 |
| | | EP 2358882 | A1 | 24-08-2011 |
| | | JP 2012509059 | A | 19-04-2012 |
| | | NZ 593097 | A | 22-02-2013 |
| | | US 2012016144 | A1 | 19-01-2012 |
| | | WO 2010057246 | A1 | 27-05-2010 |
| WO 2011161678 | A2 29-12-2011 | NONE | | |
| WO 2011054800 | A1 12-05-2011 | AU 2010317139 | A1 | 24-05-2012 |
| | | CA 2779551 | A1 | 12-05-2011 |
| | | CN 102665431 | A | 12-09-2012 |
| | | JP 2013509860 | A | 21-03-2013 |
| | | KR 20120092145 | A | 20-08-2012 |
| | | US 2013129902 | A1 | 23-05-2013 |
| | | WO 2011054800 | A1 | 12-05-2011 |

フロントページの続き

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード(参考) |
|--------------------------|----------------------|------------|
| A 6 1 Q 19/00 (2006.01) | A 6 1 Q 19/00 | 4 C 0 8 3 |
| A 6 1 P 9/10 (2006.01) | A 6 1 P 9/10 | 4 C 0 8 8 |
| A 6 1 P 9/12 (2006.01) | A 6 1 P 9/12 | 4 C 2 0 6 |
| A 6 1 P 7/02 (2006.01) | A 6 1 P 7/02 | |
| A 6 1 P 9/00 (2006.01) | A 6 1 P 9/00 | |
| A 6 1 P 29/00 (2006.01) | A 6 1 P 29/00 | |
| A 6 1 P 25/24 (2006.01) | A 6 1 P 25/24 | |
| A 6 1 P 25/28 (2006.01) | A 6 1 P 25/28 | |
| A 6 1 P 19/02 (2006.01) | A 6 1 P 19/02 | |
| A 6 1 P 17/00 (2006.01) | A 6 1 P 17/00 | |
| A 6 1 P 3/00 (2006.01) | A 6 1 P 3/00 | |
| A 6 1 P 3/10 (2006.01) | A 6 1 P 3/10 | |
| A 6 1 K 36/02 (2006.01) | A 6 1 K 36/02 | |
| A 6 1 K 31/202 (2006.01) | A 6 1 K 31/202 | |
| A 2 3 K 20/00 (2016.01) | A 2 3 K 1/16 3 0 1 F | |
| | A 2 3 K 1/16 3 0 4 C | |

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(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,R,S,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,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,H,R,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,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,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ

(72)発明者 ジョナサン エイ ネーピア
イギリス国 ハートフォードシャー エイエル5 2ジェイキュー ハーベンデン ロザムステッド リサーチ デパートメント オブ バイオロジカル ケミストリー
(72)発明者 オルガ サヤノヴァ
イギリス国 ハートフォードシャー エイエル5 2ジェイキュー ハーベンデン ロザムステッド リサーチ デパートメント オブ バイオロジカル ケミストリー
(72)発明者 メリー ハミルトン
イギリス国 ハートフォードシャー エイエル5 2ジェイキュー ハーベンデン ロザムステッド リサーチ デパートメント オブ バイオロジカル ケミストリー
(72)発明者 ロイヤ ヴァーエズィー
イギリス国 ハートフォードシャー エイエル5 2ジェイキュー ハーベンデン ロザムステッド リサーチ デパートメント オブ バイオロジカル ケミストリー

F ターム(参考) 2B150 AA01 AB10 AB20 AC37 DA58 DD47 DD56 DD59

4B018 MD11 MD12 ME02 MF02
4B024 AA01 AA05 BA07 BA77 BA80 CA04 DA01 DA20 EA04 GA11
HA08
4B064 AD88 AD90 CA06 CA08 CA11 CA19 CB14 CB28 CB30 CC24
4B065 AA83X AA83Y AB01 BA02 BA24 CA13 CA41 CA43 CA44
4C083 AA121 AC251 EE12
4C088 AA12 AC01 BA18 MA52 NA14 ZA12 ZA16 ZA36 ZA42 ZA54
ZA89 ZA96 ZB11 ZC21 ZC35
4C206 AA01 AA02 AA04 DA05 MA01 MA04 MA72 NA14 ZA12 ZA16

(88)

JP 2016-500514 A 2016.1.14

ZA42 ZA54 ZA89 ZA96 ZB11 ZC21 ZC35