

(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2011-529689

(P2011-529689A)

(43) 公表日 平成23年12月15日(2011.12.15)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B024
C12N 9/04 (2006.01)	C12N 9/04 Z	4B050
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4B064
C12N 1/13 (2006.01)	C12N 1/13	4B065
C12N 1/21 (2006.01)	C12N 1/21	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 56 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-521335 (P2011-521335)
 (86) (22) 出願日 平成21年7月30日 (2009.7.30)
 (85) 翻訳文提出日 平成23年3月24日 (2011.3.24)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2009/052289
 (87) 国際公開番号 W02010/014835
 (87) 国際公開日 平成22年2月4日 (2010.2.4)
 (31) 優先権主張番号 61/085,482
 (32) 優先日 平成20年8月1日 (2008.8.1)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

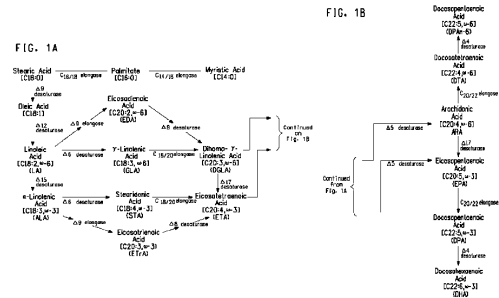
(71) 出願人 390023674
 イー・アイ・デュポン・ドウ・ヌムール・
 アンド・カンパニー
 E. I. DU PONT DE NEMO
 URS AND COMPANY
 アメリカ合衆国、デラウェア州、ウイルミ
 ントン、マーケット・ストリート 100
 7
 (74) 代理人 100092093
 弁理士 辻居 幸一
 (74) 代理人 100082005
 弁理士 熊倉 禎男
 (74) 代理人 100084663
 弁理士 箱田 篤

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Δ6デサチュラーゼおよび多価不飽和脂肪酸生成におけるそれらの使用

(57) 【要約】

本発明は、リノール酸 [「LA」; 18:2 - 6] を - リノレン酸 [「GLA」; 18:3 - 6] におよび/または - リノレン酸 [「ALA」; 18:3 - 3] をステアリドン酸 [「STA」; 18:4 - 3] に転換する能力を有する Δ6デサチュラーゼに関する。 Δ6デサチュラーゼをコードする断片を含んでなる単離された核酸断片および組み換え構築物、ならびにこれらの Δ6デサチュラーゼを油性酵母中で使用して長鎖多価不飽和脂肪酸 [「PUFA」] を生成する方法が開示される。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列をコードする単離された核酸分子；
 (b) 0.1 × SSC、0.1% SDS で 65℃、および 2 × SSC、0.1% SDS で洗浄後、0.1 × SSC、0.1% SDS というハイブリダイゼーション条件下で (a) とハイブリダイズする単離された核酸分子；または
 (a) または (b) と完全に相補的な単離された核酸分子
 からなる群から選択される、6 デサチュラーゼ酵素をコードするヌクレオチド配列を含んでなる単離された核酸分子。

【請求項 2】

少なくとも 227 個のコドンがヤロウイア (*Yarrowia*) 中での発現のためにコドン最適化された、請求項 1 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 3】

配列番号 1 および配列番号 46 からなる群から選択される、請求項 1 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 4】

BLASTP アラインメント法に基づいて配列番号 2 に記載の配列を有するポリペプチドと比較すると、少なくとも 80% の同一性を有する少なくとも 471 個のアミノ酸の 6 デサチュラーゼ酵素をコードする第 1 のヌクレオチド配列；または
 前記第 1 のヌクレオチド配列の相補配列を含んでなる第 2 のヌクレオチド配列
 を含んでなる単離された核酸分子。

【請求項 5】

配列番号 2 に記載の 6 デサチュラーゼ酵素をコードするポリペプチド。

【請求項 6】

少なくとも 1 つの制御配列と作動的に連結する、請求項 1 または 4 のいずれか一項に記載の単離された核酸分子を含んでなるキメラ遺伝子。

【請求項 7】

請求項 1 または請求項 4 に記載の単離された核酸配列を含んでなる微生物宿主細胞。

【請求項 8】

微生物宿主細胞が、酵母、藻類、細菌、ユーグレナ属、ストラメノパイル、卵菌綱、および真菌からなる群から選択される、請求項 7 に記載の微生物宿主細胞。

【請求項 9】

細胞が、モルティエラ (*Mortierella*)、スラウストキトリウム (*Thraustochytrium*)、およびシゾキトリウム (*Schizochytrium*) からなる群から選択される属のメンバーである、請求項 8 に記載の微生物宿主細胞。

【請求項 10】

細胞が油性酵母である、請求項 8 に記載の微生物宿主細胞。

【請求項 11】

油性酵母が、ヤロウイア (*Yarrowia*)、カンジダ (*Candida*)、ロドトルラ (*Rhodotorula*)、ロドスポリジウム (*Rhodospiridium*)、クリプトコッカス (*Cryptococcus*)、トリコスポロン (*Trichosporon*)、およびリポマイセス (*Lipomyces*) からなる群から選択される属のメンバーである、請求項 10 に記載の微生物宿主細胞。

【請求項 12】

a) 請求項 1 または請求項 4 に記載の核酸配列を発現する微生物宿主細胞を提供するステップと、

b) ω -リノレン酸が生成する条件下においてリノール酸源存在下で (a) の宿主細胞を増殖させるステップと
 を含んでなる、 ω -リノレン酸を生成する方法。

【請求項 13】

10

20

30

40

50

a) 請求項 1 または請求項 4 のいずれかに記載の核酸配列発現する微生物宿主細胞を提供するステップと、

b) ステアリドン酸が生成する条件下において、 α -リノレン酸源存在下で (a) の宿主細胞を増殖させるステップと
を含んでなる、ステアリドン酸を生成する方法。

【請求項 1 4】

a) 単離された核酸分子が前記配列番号 1 および配列番号 4 6 からなる群から選択される核酸配列を有し、

b) 宿主細胞がヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) である、

請求項 1 2 または 1 3 のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本明細書は、その開示全体を参照によって本明細書に援用する 2008 年 8 月 1 日に出願された米国仮特許出願第 61/085,482 号明細書の優先権を主張する。

【0002】

本発明は生物学の分野にある。より具体的には本発明は、 α 6 脂肪酸デサチュラーゼをコードするポリヌクレオチド配列の同定、および長鎖多価不飽和脂肪酸 [「PUFA」] 生成におけるこれらのデサチュラーゼの使用に関する。

【背景技術】

【0003】

多価不飽和脂肪酸 [「PUFA」] の商業的な生産手段として、植物、藻類、真菌、ストラメノパイル、および酵母をはじめとする多様な異なる宿主が調査されている。遺伝子操作は、いくつかの宿主の自然の能力を実質的に改変して (天然ではリノール酸 [LA; 18:2 - 6] および α -リノレン酸 [ALA; 18:3 - 3] 脂肪酸産生に限定されるものでさえ)、様々な長鎖 α -3 / α -6 PUFA の高レベル産生をもたらし得ることを実証している。これが自然の能力または組み換え技術の結果であるのかどうかに関わらず、アラキドン酸 [ARA; 20:4 - 6]、エイコサペンタエン酸 [EPA; 20:5 - 3]、およびドコサヘキサエン酸 [DHA; 22:6 - 3] の産生は、全て α 6 デサチュラーゼの発現を要するかもしれない。

【0004】

これまでに同定されたほとんどの α 6 デサチュラーゼ酵素は、LA を α -リノレン酸 [GLA; 18:3 - 6] に転換する主要能力を有し、ALA をステアリドン酸 [STA; 18:4 - 3] に転換する二次的活性がある。例えば ARA、EPA、および DHA の合成において α 6 デサチュラーゼ酵素が果たすかもしれない役割に基づいて、様々な原料からこれらの酵素を同定し特性解析するかなりの努力がなされている。このようであるので、公の文献 (例えば GenBank) および特許文献 (例えば米国特許第 5,968,809 号明細書、米国特許第 7,067,285 号明細書、および米国特許第 7,335,476 号明細書、および米国特許出願公開第 2006-0117414 号明細書) の双方で多数の α 6 デサチュラーゼが開示されている。5、8、および 4 デサチュラーゼと並んで、 α 6 デサチュラーゼは長鎖 PUFA 「フロントエンド」デサチュラーゼ (メチル依存性不飽和化とは対照的に既存の二重結合と脂肪酸のアシル基のカルボキシル末端との間で不飽和化が起きる) として知られている。これらのデサチュラーゼは、3 個のヒスチジンボックス [H(X)₃₋₄H (配列番号 3 および 4)、H(X)₂₋₃HH (配列番号 5 および 6)、および H/Q(X)₂₋₃HH (配列番号 7 および 8)] によって特徴付けられ、電子供与体として機能するそれらの N 末端に融合チトクローム b₅ ドメインを保有することから、チトクローム b₅ 融合スーパーファミリーのメンバーである。

【発明の概要】

10

20

30

40

50

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

6デサチュラーゼをコードする遺伝子は知られているが、 ω -3/ ω -6脂肪酸の生成において使用するための多様な宿主生物中での異種性発現に適した様々な酵素的特性があるこれらの酵素の追加的種類に対する必要性がある。出願人らは、紅藻ポルフィリジウム・クルエンツム (*Porphyridium cruentum*) から6デサチュラーゼをコードする遺伝子を単離することで、既述の必要性に対処した。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、6デサチュラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする新しい遺伝子構築物、およびPUFAを生成するための藻類、細菌、酵母、ユーグレナ属、卵菌綱、ストラメノパイル、および真菌中でのそれらの使用に関する。

10

【0007】

したがって本明細書では、

(a) 配列番号2に記載のアミノ酸配列をコードする単離された核酸分子；

(b) 0.1×SSC、0.1%SDSで65℃、および2×SSC、0.1%SDSで洗浄後、0.1×SSC、0.1%SDSというハイブリダイゼーション条件下で(a)とハイブリダイズする単離された核酸分子；または

(a)または(b)と完全に相補的な単離された核酸分子

からなる群から選択される、6デサチュラーゼ酵素をコードするヌクレオチド配列を含んでなる、単離された核酸分子が提供される。

20

【0008】

第2の実施態様では、本発明は、

BLASTPアラインメント法に基づいて配列番号2に記載の配列を有するポリペプチドと比較すると、少なくとも80%の同一性を有する少なくとも471個のアミノ酸の6デサチュラーゼ酵素をコードする相補物を含んでなる第2のヌクレオチド配列を含んでなる単離された核酸分子を提供する。

【0009】

第3の実施態様では、本発明は、本発明の核酸配列によってコードされるポリペプチド、および同核酸配列を含んでなる微生物宿主細胞を提供する。

30

【0010】

第4の実施態様では、本発明は、

a) 請求項1または請求項4の核酸配列を発現する微生物宿主細胞を提供するステップと、

b) ω -リノレン酸が生成される条件下においてリノール酸源存在下で(a)の宿主細胞を増殖させるステップと

を含んでなる、 ω -リノレン酸を生成する方法を提供する。

【0011】

第5の実施態様では、本発明は、

a) 請求項1または請求項4のどちらかの核酸配列を発現する微生物宿主細胞を提供するステップと、

b) ステアリドン酸が生成する条件下において、 ω -リノレン酸源存在下で(a)の宿主細胞を増殖させるステップと

を含んでなるステアリドン酸を生成する方法を提供する。

40

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1A】 ω -3および ω -6脂肪酸生合成経路を示し、下記のこの経路の説明を検討する際に図1Bと合わせ見るべきである。

【図1B】 ω -3および ω -6脂肪酸生合成経路を示し、下記のこの経路の説明を検討する際に図1Aと合わせ見るべきである。

50

【図2】LASERGENEバイオインフォマティクス演算スイート(DNA STAR Inc., Madison, WI)のMegAlign™ v6.1プログラムを使用した、フェオダクチラム・トリコルナタム(Phaeodactylum tricornutum)(配列番号37)、ヒメツリガネゴケ(Physcomitrella patens)(配列番号38)、ゼニゴケ(Marchantia polymorpha)(配列番号39)、およびモルティエラ・アルピナ(Mortierella alpina)(配列番号40)からの6デサチュラーゼ;およびミドリムシ(Euglena gracilis)からの8デサチュラーゼ(配列番号41)中の2つの保存領域のアラインメントである。3つの枠内領域の保存アミノ酸は、7つの縮重プライマーに対応する。

10

【図3】pY109 #1のプラスミドマップである。

【0013】

本発明は、本明細書の一部を形成する以下の詳細な説明および添付の配列説明からより完全に理解できる。

【0014】

次の配列は、37C.F.R. § 1.821~1.825(「ヌクレオチド配列および/またはアミノ酸配列開示を含む特許出願の要件 - 配列規則」)を満たし、世界知的所有権機関(WIPO)標準ST.25(1998年)、およびEPOおよびPCTの配列表要件(規則5.2および49.5(a)の2)、および実施細則第208号および附属書C)に一致する。ヌクレオチドおよびアミノ酸配列データのために使用される記号および型

20

【0015】

配列一覧

配列番号1~50は、表1で同定されるような遺伝子、タンパク質(またはその一部)、プライマーまたはプラスミドをコードするORFである。

【0016】

表1

核酸およびタンパク質配列番号の要約

【表 1】

説明および略語	核酸配列番号	タンパク質配列番号
ポルフィリジウム・クルエンツム (<i>Porphyridium cruentum</i>) Δ6デサチュラーゼ [「PcD6」]	1 (1416 bp)	2 (471 AA)
Hisに富むモチーフ: H(X) ₃ H	--	3
Hisに富むモチーフ: H(X) ₄ H	--	4
Hisに富むモチーフ: H(X) ₂ HH	--	5
Hisに富むモチーフ: H(X) ₃ HH	--	6
Hisに富むモチーフ: H/Q(X) ₂ HH	--	7
Hisに富むモチーフ: H/Q(X) ₃ HH	--	8
SMART IVオリゴヌクレオチド (BD-Clontech Creator TM Smart TM cDNAライブラリーキットからの)	9	--
CDSIII/3' PCRプライマー (BD-Clontech Creator TM Smart TM cDNAライブラリーキットからの)	10	--
5' -PCRプライマー (BD-Clontech Creator TM Smart TM cDNAライブラリーキットからの)	11	--
プライマー523	12	--
プライマー524	13	--
プライマー525	14	--
保存アミノ酸配列WQQMGWL(S/A)HD	--	15
プライマー526	16	--
プライマー527	17	--
保存アミノ酸配列HHL(W/F)P(T/S)(M/L)PRH N	--	18
プライマー528	19	--
プライマー529	20	--

10

20

30

保存 アミノ酸配列GGL(N/H)YQIEHH	--	21	
プライマーT3	22	--	
プライマーT7	23	--	
モルティエラ・アルピナ(Mortierella alpina) Δ6 デサチュラーゼ (GenBank登録番号AAF08685)	--	24 (457 AA)	
プライマー535	25	--	
プライマー536	26	--	
プライマー533	27	--	
プライマー534	28	--	
プライマー537	29	--	10
プライマーAUAP(Invitrogen 5'RACEキットからの)	30	--	
プライマーAAP(Invitrogen 5'RACEキットからの)	31	--	
プライマー539	32	--	
プライマー540	33	--	
プラスミドpY91M	34 (8423 bp)	--	
プライマー373	35	--	
プライマー507	36	--	
フェオダクチラム・トリコルナタム(Phaeodactylum tricornutum) Δ6デサチュラーゼ (GenBank登録番 号AAL92563)	--	37 (477 AA)	20
ヒメツリガネゴケ(Physcomitrella patens) Δ6デ サチュラーゼ (GenBank登録番号CAA11033)	--	38 (525 AA)	
ゼニゴケ(Marchantia polymorpha) Δ6デサチュラ ーゼ (GenBank登録番号AAT85661)	--	39 (481 AA)	
モルティエラ・アルピナ(Mortierella alpina) Δ6 デサチュラーゼ (GenBank登録番号AAL73947)	--	40 (457 AA)	
ミドリムシ(Euglena gracilis) Δ8デサチュラーゼ (GenBank登録番号AAD45877)	--	41 (419 AA)	
ポルフィリジウム・クルエンツム (Porphyridium cruentum) Δ6デサチュラーゼ[「Pc D6*」]	42 (1416 bp)	43 (471 AA)	30
プラスミドpY109 #1	44 (8502 bp)	--	
プラスミドpY109 #2	45 (8502 bp)	--	
ヤロウイア・リポリティカ(Yarrowia lipolytica) 中での発現のためにコドン最適化されたポルフィ リジウム・クルエンツム(Porphyridium cruentum) に由来する合成Δ6デサチュラーゼ[「PcD6S」]	46 (1426 bp)	47 (471 AA)	
チノリモ(Porphyridium cruentum) Δ6デサチュラ ーゼのHisに富むモチーフHDFLH	--	48	40
ポルフィリジウム・クルエンツム (Porphyridium cruentum) Δ6デサチュラーゼのHis に富むモチーフHNHHH	--	49	

ポルフィリジウム・クルエンツム (Porphyridium cruentum) Δ6デサチュラーゼのHis に富むモチーフQIEHH	--	50
ポルフィリジウム・クルエンツム (Porphyridium cruentum) Δ6デサチュラーゼの内部断片	51 (693 bp)	--
ポルフィリジウム・クルエンツム (Porphyridium cruentum) Δ6デサチュラーゼの3'末端断片	52 (410 bp)	--
ポルフィリジウム・クルエンツム (Porphyridium cruentum) Δ6デサチュラーゼの5'末端断片	53 (822 bp)	--

10

【発明を実施するための形態】

【0017】

健康に良いPUFAの生成のため生化学的経路を操作するために使用されてもよい、新しいポルフィリジウム・クルエンツム (Porphyridium cruentum) Δ6デサチュラーゼ酵素、および同酵素をコードする遺伝子が本明細書で開示される。

【0018】

PUFAまたはその誘導体は、食餌代用物または栄養補給剤として、特に乳児用調製粉乳中で、静脈内栄養補給される患者のために、または栄養失調を予防または治療するために使用される。代案としては、通常の使用において受容者が所望量の食事補給を受け入れるように調合された、料理用油、脂肪またはマーガリン中に、精製されたPUFA（またはその誘導体）を組み込んでもよい。PUFAはまた、乳児用調製粉乳、栄養補給剤またはその他の食品に組み込まれてもよく、抗炎症薬またはコレステロール低下剤としても用途があるかもしれない。組成物はヒト用または獣医学用どちらかの医薬用途のために使用されていてもよい。

20

【0019】

本明細書で言及する全ての特許および非特許文献は、参照によって本明細書に援用する。

30

【0020】

本開示では、いくつかの用語および略語を使用する。以下の定義が提供される。

「オープンリーディングフレーム（読み取り枠）」はORFと略記される。

「ポリメラーゼ連鎖反応」はPCRと略記される。

「アメリカンタイプカルチャーコレクション（米国微生物系統保存機関）」はATCCと略記される。

「多価不飽和脂肪酸」はPUFAと略記される。

「トリアシルグリセロール」はTAGと略記される。

「総脂肪酸」は「TFA」と略記される。

40

【0021】

「発明」または「本発明」という用語は、本明細書での用法では本発明の特定の一実施態様への限定は意図されず、一般に特許請求の範囲および明細書に記載されるあらゆる全ての本発明の実施態様に適用される。

【0022】

「脂肪酸」という用語は、約C₁₂~C₂₂の様々な鎖長の長鎖脂肪酸（アルカン酸）を指すが、より長い、およびより短い鎖長の酸の双方も知られている。優勢な鎖長はC₁₆~C₂₂の間である。脂肪酸の構造は簡易表記体系「X:Y」によって表され、式中Xは特定の脂肪酸中の炭素[「C」]原子の総数であり、Yは二重結合の数である。「飽和脂肪酸」対「不飽和脂肪酸」、「一不飽和脂肪酸」対「多価不飽和脂肪酸」[「PUFA」]、

50

および「 $n-6$ 脂肪酸」[「 $n-6$ 」または「 $n-6$ 」]対 $n-3$ 脂肪酸[「 $n-3$ 」または「 $n-3$ 」]の間の区別に関する追加的詳細は、参照によって本明細書に援用する米国特許第7,238,482号明細書中に提供される。

【0023】

本明細書においてPUFAを既述するのに使用される命名法を下の表2に示す。「略記法」と題された欄では、オメガ-参照システムが使用されて炭素数、二重結合数、およびオメガ炭素(この目的では番号1)から数えて、オメガ炭素に最も近い二重結合の位置を示唆する。表の残りの部分は、 $n-3$ および $n-6$ 脂肪酸およびそれらの前駆物質の一般名、明細書の残りの部分全体を通じて使用される略語、および各化合物の化学名を要約する。

【0024】

表2

多価不飽和脂肪酸および前駆物質の命名法

【表 2】

一般名	略語	化学名	略記法
ミリスチン酸	--	テトラデカン酸	14:0
パルミチン酸	PAまたは Palmitate	ヘキサデカン酸	16:0
パルミトレイン酸	--	9-ヘキサデカン酸	16:1
ステアリン酸	--	オクタデカン酸	18:0
オレイン酸	--	シス-9-オクタデカン酸	18:1
リノレン酸	LA	シス-9,12-オクタデカジエン酸	18:2 ω -6
γ -リノレン酸	GLA	シス-6,9,12-オクタデカトリエン酸	18:3 ω -6
エイコサジエン酸	EDA	シス-11,14-エイコサジエン酸	20:2 ω -6
ジホモ- γ -リノレン酸	DGLA	シス-8,11,14-エイコサトリエン酸	20:3 ω -6
シアドン酸	SCI	シス-5,11,14-エイコサトリエン酸	20:3b ω -6
アラキドン酸	ARA	シス-5,8,11,14-エイコサテトラエン酸	20:4 ω -6
α -リノレン酸	ALA	シス-9,12,15-オクタデカトリエン酸	18:3 ω -3
ステアドリン酸	STA	シス-6,9,12,15-オクタデカテトラエン酸	18:4 ω -3
エイコサトリエン酸	ETrA	シス-11,14,17-エイコサトリエン酸	20:3 ω -3
エイコサテトラエン酸	ETA	シス-8,11,14,17-エイコサテトラエン酸	20:4 ω -3
ジュニペロン酸	JUP	シス-5,11,14,17-エイコサテトラエン酸	20:4b ω -3
エイコサ-ペンタエン酸	EPA	シス-5,8,11,14,17-エイコサペンタエン酸	20:5 ω -3
ドコサトリエン酸	DRA	シス-10,13,16-ドコサトリエン酸	22:3 ω -6
ドコサ-テトラエン酸	DTA	シス-7,10,13,16-ドコサテトラエン酸	22:4 ω -6
ドコサ-ペンタエン酸	DPAn-6	シス-4,7,10,13,16-ドコサペンタエン酸	22:5 ω -6
ドコサ-ペンタエン酸	DPA	シス-7,10,13,16,19-ドコサペンタエン酸	22:5 ω -3
ドコサ-ヘキサエン酸	DHA	シス-4,7,10,13,16,19-ドコサヘキサエン酸	22:6 ω -3

10

20

30

40

50

【0025】

表3に列挙する -3 / -6 P U F A は、本明細書に記載される方法を使用して油性酵母の油画分中に蓄積する可能性が最も高いものであるが、この一覧は限定的または完全なものとはみなすべきではない。

【0026】

「油」という用語は、25 で液体であり、通常は多価不飽和である脂質物質を指す。油性の生物中では、油が総脂質の大部分を構成する。「油」は主にトリアシルグリセロール [「TAG」] からなるが、その他の中性脂質、リン脂質、および遊離脂肪酸もまた含有してよい。油中の脂肪酸組成と総脂質の脂肪酸組成は、一般に類似している。したがって総脂質中の P U F A 濃度の増大または減少は、油中の P U F A 濃度の増大または減少に対応し、逆もまた然りである。

【 0 0 2 7 】

「中性脂質」とは貯蔵脂肪としての脂肪体の細胞中に一般に見られる脂質を指し、細胞のpHにおいて、脂質が荷電基を有さないことからこのように称される。一般にそれらは完全に非極性で、水に対する親和性がない。中性脂質とは、一般に脂肪酸によるグリセロールのモノ -、ジ -、および / またはトリエステルを指し、それぞれモノアシルグリセロール、ジアシルグリセロールまたはトリアシルグリセロールとも称され、または集合的にアシルグリセロールと称される。アシルグリセロールから遊離脂肪酸を放出する為には、加水分解反応が起きなくてはならない。

【 0 0 2 8 】

「トリアシルグリセロール」[「TAG」]という用語は、グリセロール分子にエステル化された3つの脂肪酸アシル残基から構成される中性脂質を指す。TAGは、長鎖PUFAおよび飽和脂肪酸、ならびにより短鎖の飽和および不飽和脂肪酸を含有し得る。

10

【 0 0 2 9 】

「総脂肪酸」[「TFA」]という用語は、本明細書では、例えば生物由来資源または油であってもよい特定サンプル中で、(当該技術分野で知られているような)塩基エステル交換法によって脂肪酸メチルエステル[「FAME」]に誘導体化し得る細胞性脂肪酸の総和を指す。したがって総脂肪酸は、中性脂質画分(ジアシルグリセロール、モノアシルグリセロール、およびTAGをはじめとする)からの脂肪酸、および極性脂質画分(PCおよびPE画分をはじめとする)からの脂肪酸を含むが、遊離脂肪酸は含まない。

【 0 0 3 0 】

細胞の「総脂質含量」という用語は、乾燥細胞重量[「DCW」]の%としてのTFA測定値であるが、総脂質含量は、DCWの%としてのFAME測定値[「FAME%DCW」]として近似し得る。したがって総脂質含量[「TFA%DCW」]は、例えば100ミリグラムのDCWあたりの総脂肪酸のミリグラムに相当する。

20

【 0 0 3 1 】

総脂質中の脂肪酸濃度は、本明細書では、例えば100ミリグラムのTFAあたりの特定の脂肪酸のミリグラムのように、TFAの質量%[「%TFA」]として表される。特に断りのない限り本開示では、総脂質を基準とする特定の脂肪酸の%への言及は、%TFAとしての脂肪酸濃度に相当する(例えば総脂質の%EPAはEPA%TFAに相当する)。

30

【 0 0 3 2 】

「脂質プロファイル」および「脂質組成物」という用語は置き替え可能であり、総脂質または油などの特定の脂質画分中に含有される個々の脂肪酸量を指し、量はTFAの質量%として表される。混合物中に存在する個々の各脂肪酸の和は、100になるべきである。

【 0 0 3 3 】

「PUFA生合成経路」という用語は、オレイン酸をLA、EDA、GLA、DGLA、ARA、DRA、DTA、およびDPAn-6などの-6脂肪酸に;およびALA、STA、ETrA、ETA、EPA、DPA、およびDHAなどの-3脂肪酸に転換する代謝過程を指す。この過程については文献で十分に記載されている(例えば米国特許出願公開第2006-0115881-A1号明細書を参照されたい)。簡単に述べるとこの過程は、小胞体膜内に存在する「PUFA生合成経路酵素」と称される一連の特有な延長酵素および不飽和化酵素による、炭素原子の付加を通じた炭素鎖の延長、および二重結合の付加を通じた分子の不飽和化を伴う。より具体的には「PUFA生合成経路酵素」とは、PUFAの生合成と関連付けられている以下の酵素のいずれか(および上記酵素をコードする遺伝子)を指す。4デサチュラーゼ、5デサチュラーゼ、6デサチュラーゼ、12デサチュラーゼ、15デサチュラーゼ、17デサチュラーゼ、9デサチュラーゼ、8デサチュラーゼ、9エロンガーゼ、C_{14/16}エロンガーゼ、C_{16/18}エロンガーゼ、C_{18/20}エロンガーゼおよび / またはC_{20/22}エロンガーゼ。

40

【 0 0 3 4 】

50

「 Δ^6 デサチュラーゼ/ Δ^6 エロンガーゼ経路」という用語は、最低限少なくとも1つの Δ^6 デサチュラーゼおよび少なくとも1つの $C_{18/20}$ エロンガーゼ(同義的に Δ^6 エロンガーゼとも称される)を含むPUFA生合成経路を指し、それによってGLAおよび/またはSTAを中間体脂肪酸として、それぞれLAおよびALAからDGLAおよび/またはETAが生合成できるようになる。その他のデサチュラーゼおよびエロンガーゼの発現により、ARA、EPA、DPA、およびDHAもまた合成されてもよい。

【0035】

「デサチュラーゼ」という用語は、不飽和化できる、すなわち1個もしくはそれ以上の脂肪酸に二重結合を導入して、対象とする脂肪酸または前駆物質を生じさせるポリペプチドを指す。特定の脂肪酸を指すために、本明細書全体を通じて参照システムを使用するが、デルタ系を使用して基質のカルボキシル末端から数えることで、デサチュラーゼの活性を示す方が都合よい。本明細書で特に興味深いのは、分子のカルボキシル末端から数えて6番目と7番目の炭素原子間で脂肪酸を不飽和化する Δ^6 デサチュラーゼであり、それは例えばLAからGLAへおよび/またはALAからSTAへの転換を触媒し得る。その他の脂肪酸デサチュラーゼとしては、例えば Δ^8 デサチュラーゼ、 Δ^5 デサチュラーゼ、 Δ^4 デサチュラーゼ、 Δ^{12} デサチュラーゼ、 Δ^{15} デサチュラーゼ、 Δ^{17} デサチュラーゼ、および Δ^9 デサチュラーゼが挙げられる。当該技術分野では、 Δ^{15} および Δ^{17} デサチュラーゼはまた、時として Δ^6 脂肪酸をそれらの Δ^3 対応物に転換する能力に基づいて、「オメガ-3デサチュラーゼ」、「 ω -3デサチュラーゼ」、および/または「 Δ^3 デサチュラーゼ」と称される(例えばそれぞれLAからALA、およびARAからEPAへの変換)。脂肪酸デサチュラーゼのための遺伝子によって適切な宿主を形質転換し、宿主の脂肪酸プロファイルに対するその影響を判定することで、特定の脂肪酸デサチュラーゼの特異性を経験的に判定することが望ましいであろう。

10

20

【0036】

本明細書の目的では、「PcD6」という用語は、本明細書の配列番号1のヌクレオチド配列によってコードされる、紅藻ポルフィリジウム・クルエンツム(*Porphyridium cruentum*)から単離された Δ^6 デサチュラーゼ酵素(配列番号2)を指す。同様に「PcD6S」という用語は、ヤロウイア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)中での発現のためにコドン最適化されたP・クルエンタム(*P. cruentum*)に由来する合成 Δ^6 デサチュラーゼを指す(すなわち配列番号46および47)。

30

【0037】

「変換効率」および「%基質変換」という用語は、それによって特定酵素(例えばデサチュラーゼ)が基質を生成物に変換できる効率を指す。変換効率は、次の式に従って測定される。 $([生成物]/[基質+生成物]) \times 100$ 。式中、「生成物」は即時の生成物およびそれに由来する経路中の全ての生成物を含む。

【0038】

「エロンガーゼ」という用語は、脂肪酸炭素鎖を延長して、エロンガーゼが作用する脂肪酸基質よりも炭素2個分長い酸を生成し得るポリペプチドを指す。この延長過程は、米国特許出願公開第2005/0132442号明細書に記載されるように、脂肪酸シターゼと共同して多段階機序で起きる。エロンガーゼ系によって触媒される反応の例は、GLAからDGLA、STAからETA、LAからEDA、ARAからETRA、ARAからDTA、およびEPAからDPAへの変換である。

40

【0039】

一般にエロンガーゼの基質選択性はいくぶん広いが、鎖長と不飽和度の双方によって差別される。例えば $C_{14/16}$ エロンガーゼは C_{14} 基質(例えばミリスチン酸)を利用し、 $C_{16/18}$ エロンガーゼは C_{16} 基質(例えばパルミチン酸)を利用し、 $C_{18/20}$ エロンガーゼは C_{18} 基質(例えばLA、ALA、GLA、STA)を利用し、 $C_{20/22}$ エロンガーゼは C_{20} 基質(例えばALA、EPA)を利用する。本明細書の目的では、2つの異なるタイプの $C_{18/20}$ エロンガーゼを定義し得る。 Δ^6 エロンガーゼはそれぞれGLAおよびSTA

50

から D G L A および E T A への転換を触媒する一方、 ϵ エロンガーゼはそれぞれ L A および A L A から E D A および E T r A への転換を触媒し得る。

【0040】

いくつかのエロンガーゼは広い特異性を有し、したがって単一酵素がいくつかのエロンガーゼ反応を触媒できてもよいことに留意することが重要である（例えばそれによって $C_{16/18}$ エロンガーゼおよび $C_{18/20}$ エロンガーゼの双方として機能する）。適切な宿主を脂肪酸エロンガーゼ遺伝子で形質転換して、宿主の脂肪酸プロファイルに対するその効果を判定することにより、脂肪酸エロンガーゼの特異性を経験的に判断することが望ましいかもしれない。

【0041】

「油性の」という用語は、それらのエネルギー源を油の形態で貯蔵する傾向がある生物を指す（Weete, Fungal Lipid Biochemistry, 第2版, Plenum, 1980年）。一般に油性微生物の細胞油分はS字形曲線に従い、脂質濃度は対数後期または定常期初期で最大に達するまで増大し、次に定常期後期および死滅期において徐々に減少する（Yongmanitchai および Ward, Appl. Environ. Microbiol., 57: 419~25 (1991年)）。油性微生物がそれらの乾燥細胞重量の約25%以上を油として蓄積することは珍しくない。

【0042】

「油性酵母」という用語は、油を産生し得る酵母に分類される微生物を指す。油性酵母の例としては、ヤロウシア (Yarrowia) 属、カンジダ (Candida) 属、ロドトルラ (Rhodotorula) 属、ロドスポリジウム (Rhodosporidium) 属、クリプトコッカス (Cryptococcus) 属、トリコスポロン (Trichosporon) 属、およびリポマイセス (Lipomyces) 属が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0043】

「保存ドメイン」または「モチーフ」という用語は、進化的に関連したタンパク質の整合配列に沿った特定位置で保存される一組のアミノ酸を意味する。その他の位置のアミノ酸は相同タンパク質の間で変化し得るのに対し、特定位置の高度に保存されたアミノ酸は、タンパク質の構造、安定性、または活性において必須のアミノ酸を示す。それらはタンパク質相同体ファミリーの整合配列中のそれらの高度な保存によって同定されるので、それらは新しく判定された配列があるタンパク質が、以前同定されたタンパク質ファミリーに属するかどうかを判定する識別子または「シグネチャー」として使用し得る。 ϵ デサチュラーゼ酵素中に普遍的に見られるモチーフ（すなわち動物、植物、および真菌）としては、3つのヒスチジンボックス（すなわち $H(X)_{3-4}H$ （配列番号3および4）、 $H(X)_{2-3}HH$ （配列番号5および6）、および $H/Q(X)_{2-3}HH$ （配列番号7および8））が挙げられる。

【0044】

「ポリヌクレオチド」、「ポリヌクレオチド配列」、「核酸配列」、「核酸断片」、および「単離された核酸断片」という用語は、本明細書で同義的に使用される。これらの用語は、ヌクレオチド配列などを包含する。ポリヌクレオチドは、合成、非天然または改変ヌクレオチド塩基が含有されていてもよい、一本鎖または二本鎖のRNAまたはDNAのポリマーであってもよい。DNAポリマーの形態のポリヌクレオチドは、cDNA、ゲノムDNA、合成DNA、またはそれらの混合物の1つ以上のセグメントを含んでなってもよい。ヌクレオチド（通常それらの5'-リン酸の形態で見られる）は、次のような一文字名によって言及される。「A」はアデニル酸またはデオキシアデニル酸（それぞれRNAまたはDNA）、「C」はシチジル酸またはデオキシシチジル酸、「G」はグアニル酸またはデオキシグアニル酸、「U」はウリジル酸、「T」はデオキシチミジル酸、「R」はプリン（AまたはG）、「Y」はピリミジン（CまたはT）、「K」はGまたはT、「H」はAまたはCまたはT、「I」はイノシン、および「N」はあらゆるヌクレオチドである。

10

20

30

40

50

【0045】

核酸断片は、適切な温度および溶液イオン強度条件下で、核酸断片の一本鎖形態がその他の核酸断片とアニールできる場合、cDNA、ゲノムDNA、またはRNAなどの別の核酸断片と「ハイブリダイズ可能」である。ハイブリダイゼーションおよび洗浄条件は良く知られており、参照によって本明細書に援用する Sambrook, J., Fritsch, E. F. および Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1989年) の特に第11章および表11.1で例示される。温度およびイオン強度条件が、ハイブリダイゼーションの「ストリンジェンシー」を定める。ストリンジェントな条件は、(遠縁の生物からの相同的配列などの) 中程度に類似の断片をスクリーニングするため、そして(近縁の生物からの機能性酵素を複製する遺伝子などの) 高度に類似した断片をスクリーニングするために調節できる。ハイブリダイゼーション後の洗浄が、ストリンジェンシー条件を決定する。1つの好ましい条件のセットは、室温において $6 \times \text{SSC}$ 、 $0.5\% \text{SDS}$ で15分間に始まり、次に 45°C において $2 \times \text{SSC}$ 、 $0.5\% \text{SDS}$ で30分間を反復し、次に 50°C において $0.2 \times \text{SSC}$ 、 $0.5\% \text{SDS}$ を30分間を2回反復する、一連の洗浄を使用する。より好ましいストリンジェントな条件のセットはより高い温度を使用し、そこでは洗浄は、最後の $0.2 \times \text{SSC}$ 、 $0.5\% \text{SDS}$ 中での2回の30分間の洗浄の温度を 60°C に増大させること以外は上述したのと同様である。別の好ましい高度にストリンジェントな条件のセットは、 65°C において $0.1 \times \text{SSC}$ 、 $0.1\% \text{SDS}$ 中での2回の最終洗浄を使用する。さらに別のストリンジェントな条件のセットは、例えば $0.1 \times \text{SSC}$ 、 $0.1\% \text{SDS}$ で 65°C 、そして $2 \times \text{SSC}$ 、 $0.1\% \text{SDS}$ で洗浄後、 $0.1 \times \text{SSC}$ 、 $0.1\% \text{SDS}$ でのハイブリダイゼーションを含む。

【0046】

ハイブリダイゼーションのストリンジェンシー次第で塩基間のミスマッチは可能であるが、ハイブリダイゼーションは、2つの核酸が相補的配列を含有することを必要とする。核酸がハイブリダイゼーションする適切なストリンジェンシーは、当該技術分野で良く知られた変数である核酸の長さおよび相補性の程度に左右される。2つのヌクレオチド配列間の類似性または相同性の程度が高い程、これらの配列を有する核酸ハイブリッドの T_m 値は大きくなる。より高い T_m に対応する、核酸ハイブリダイゼーションの相対安定性は次の順で低下する。RNA:RNA、DNA:RNA、DNA:DNA。長さがヌクレオチド100個を超えるハイブリッドでは、 T_m を計算する式が導かれている (Sambrookら、前出9.50~9.51参照)。より短い核酸、すなわちオリゴヌクレオチドによるハイブリダイゼーションのためにはミスマッチの配置がより重要になり、オリゴヌクレオチドの長さがその特異性を決定する (Sambrookら、前出11.7~11.8参照)。一実施態様では、ハイブリダイズ可能な核酸の長さは少なくともヌクレオチド約10個である。ハイブリダイズ可能な核酸の好ましい最小の長さは少なくともヌクレオチド約15個、より好ましくは少なくともヌクレオチド約20個、そして最も好ましくは長さが少なくともヌクレオチド約30個である。さらに当業者は、プローブの長さなどの要因次第で、温度および洗浄液の塩濃度を必要に応じて調節してもよいことを認識する。

【0047】

アミノ酸またはヌクレオチド配列の「かなりの部分」とは、当業者による配列の手動評価によって、あるいはBLAST(「基礎的局在性配列検索ツール(Basic Local Alignment Search Tool)」、Altschul, S. F. ら、*J. Mol. Biol.* 215: 403~410 (1993年))などのアルゴリズムを使用したコンピュータ自動化アラインメントおよび同定によって、遺伝子またはポリペプチドの推定上の同定を得るのに十分なポリペプチドまたは遺伝子のヌクレオチド配列のアミノ酸配列を含んでなる部分である。一般に推定的にポリペプチドまたは核酸配列が既知のタンパク質または遺伝子に相同的であると同定するためには、10個以上の隣接する

アミノ酸または30個以上のヌクレオチド配列が必要である。さらにヌクレオチド配列に関して、配列依存遺伝子同定法（例えばサザンハイブリダイゼーション）および単離（例えば細菌コロニーまたはバクテリオファージブランクの原位置ハイブリダイゼーション）において、20～30個の隣接するヌクレオチドを含んでなる遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプローブを使用しても良い。さらにプライマーを含んでなる特定の核酸断片を得るために、塩基12～15個の短いオリゴヌクレオチドを増幅プライマーとしてPCRで使用しても良い。したがってヌクレオチド配列の「かなりの部分」は、配列を含んでなる核酸断片を特異的に同定、および/または単離できるようにする十分な配列を含んでなる。本明細書の開示は、特定の真菌タンパク質をコードする完全なアミノ酸およびヌクレオチド配列を教示する。本明細書で報告される配列の便益を有する当業者は、当業者に知られている目的のために、今や開示される配列の全てまたはかなりの部分を使用できる。したがって添付の配列一覧に報告される完全な配列、ならびに上で定義される配列のかなりの部分は本開示に包含される。

10

【0048】

「相補的」という用語は、互いにハイブリダイズできるヌクレオチド塩基間の関係について述べるために使用される。例えばDNAに関して、アデノシンはチミンに相補的であり、シトシンはグアニンに相補的である。したがって添付の配列一覧に報告される完全な配列に相補的な単離された核酸断片、ならびに実質的に同様の核酸配列は本開示に包含される。

20

【0049】

「相同性」および「相同的な」という用語は、同義的に使用される。それらは1つ以上のヌクレオチド塩基の変化が、核酸断片が遺伝子発現を仲介する能力、または特定のフェノタイプを生じる能力に影響しない核酸断片を指す。これらの用語はまた、最初の無修飾断片と比較して得られる核酸断片の機能特性を実質的に改変しない、1つ以上のヌクレオチドの欠失または挿入などの核酸断片の修飾も指す。

【0050】

さらに当業者は、相同的な核酸配列がまた、例えば0.5×SSC、0.1%SDS、60の中程度にストリンジェントな条件下で、本明細書に例証される配列と、または本明細書で開示されるヌクレオチド配列と機能的に同等のそのあらゆる部分とハイブリダイズする、それらの能力によって定義されることも認識する。ストリンジェンシー条件は、遠縁の生物からの相同的な配列などの中程度に類似した断片、および近縁関係にある生物からの機能性酵素を複製する遺伝子などの類似性の高い断片をスクリーニングするために調節し得る。

30

【0051】

「選択的にハイブリダイズする」という用語は、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下における、非標的核酸配列へのそのハイブリダイゼーションよりも検出可能な程度により高い程度の（例えばバックグラウンドの少なくとも2倍）核酸配列の特定の核酸標的配列へのハイブリダイゼーションへの、および非標的核酸の実質的排除への言及を含む。選択的にハイブリダイズする配列は、典型的に互いに少なくとも約80%の配列同一性、または90%の配列同一性、100%以下の配列同一性（すなわち完全に相補的）を有する。

40

【0052】

「ストリンジェントな条件」または「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」という用語は、その下でプローブがその標的配列と選択的にハイブリダイズする条件への言及を含む。ストリンジェントな条件は配列依存性であり、異なる状況において異なる。ハイブリダイゼーションおよび/または洗浄条件のストリンジェンシーを調節することで、プローブと100%相補的な標的配列を同定し得る（相同プロービング）。代案としては、より低い程度の類似性が検出されるようにストリンジェンシー条件を調節して、配列中のいくらかのミスマッチを許容し得る（非相同プロービング）。一般にプローブは長さが約1000未満のヌクレオチドであり、長さが500未満のヌクレオチドとされてい

50

てもよい。

【0053】

典型的にストリンジェントな条件は、塩濃度がpH 7.0 ~ 8.3において約1.5 MのNaイオン未満、典型的に約0.01 ~ 1.0 MのNaイオン（またはその他の塩）濃度であり、短いプローブ（例えば10 ~ 50個のヌクレオチド）では温度が少なくとも約30、長いプローブ（例えば50個のヌクレオチドを超える）では少なくとも約60であるような条件である。ストリンジェントな条件はまた、ホルムアミドなどの不安定化剤の添加によって達成できる。低ストリンジェンシー条件の具体例としては、37で30 ~ 35%ホルムアミド、1 MのNaCl、1% SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）の緩衝溶液を用いたハイブリダイゼーション、および50 ~ 55で1x ~ 2x SSC（20x SSC = 3.0 M NaCl / 0.3 M クエン酸三ナトリウム）中での洗浄が挙げられる。中程度のストリンジェンシー条件の具体例としては、37で40 ~ 45%ホルムアミド、1 MのNaCl、1% SDS中でのハイブリダイゼーション、および55 ~ 60で0.5x ~ 1x SSC中での洗浄が挙げられる。高ストリンジェンシー条件の具体例としては、37で50%ホルムアミド、1 MのNaCl、1% SDS中でのハイブリダイゼーション、および60 ~ 65で0.1x SSC中での洗浄が挙げられる。追加的なストリンジェントな条件の組としては、例えば0.1x SSC、0.1% SDSで65、および2x SSC、0.1% SDSで洗浄後、0.1x SSC、0.1% SDSというハイブリダイゼーションが挙げられる。

10

【0054】

特異性は典型的にハイブリダイゼーション後洗浄の関数であり、重要な要因は最終洗浄溶液のイオン強度および温度である。DNA - DNAハイブリッドでは、 T_m は、Meinkothら, *Anal. Biochem.*, 138: 267 ~ 284頁（1984年）の式、 $T_m = 81.5 + 16.6 (\log M) + 0.41 (\%GC) - 0.61 (\%form) - 500 / L$ から近似でき、式中、 M は一価のカチオンのモル濃度であり、 $\%GC$ はDNA中のグアノシンおよびトシシンヌクレオチドの百分率であり、 $\%form$ はハイブリダイゼーション溶液中のホルムアミドの百分率であり、 L は塩基対中のハイブリッドの長さである。 T_m は相補的標的配列の50%が、完全にマッチするプローブにハイブリダイズする（規定のイオン強度およびpH下における）温度である。 T_m は1%のミスマッチあたり約1 低下するので、 T_m 、ハイブリダイゼーションおよび/または洗浄条件を調節して、所望の同一性がある配列にハイブリダイズさせることができる。例えば90%同一の配列を求める場合、 T_m を10 低下できる。一般にストリンジェントな条件は、規定のイオン強度およびpHにおいて、特定の配列およびその相補物の熱融点（ T_m ）よりも約5 低いように選択される。しかし厳しいストリンジェントな条件は、 T_m よりも1、2、3または4 低い温度でのハイブリダイゼーションおよび/または洗浄を利用でき、中程度にストリンジェントな条件は、 T_m よりも6、7、8、9または10 低い温度でのハイブリダイゼーションおよび/または洗浄を利用でき、低ストリンジェンシー条件は、 T_m よりも11、12、13、14、15または20 低い温度でのハイブリダイゼーションおよび/または洗浄を利用できる。数式、ハイブリダイゼーションおよび洗浄組成物、および所望の T_m を使用して、当業者は、ハイブリダイゼーションおよび/または洗浄溶液のストリンジェンシーのバリエーションが、固有に述べられることを理解するであろう。所望のミスマッチ程度が、45（水溶液）または32（ホルムアミド溶液）未満の T_m をもたらす場合、より高い温度を使用できるようにSSC濃度を増大させることが好ましい。核酸ハイブリダイゼーションに関する広範な指針は、Tijssen, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Acid Probes*, 第1部, 第2章, 「Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays」, Elsevier, New York (1993年); およびCurrent Proto

20

30

40

50

cols in Molecular Biology, 第2章, Ausubelら, Eds., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1995年)にある。ハイブリダイゼーションおよび/または洗浄条件は、少なくとも10、30、60、90、120または240分間適用できる。

【0055】

「%同一性」という用語は、配列を比較して判定される2つ以上のポリペプチド配列または2つ以上のポリヌクレオチド配列の関係を指す。「%同一性」は、場合によっては、比較される配列間の整合百分率によって判定される、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列間の配列関連性の程度も意味する。「%同一性」および「%類似性」は、1) Computational Molecular Biology (Lesk, A.M., Ed.) Oxford University: NY (1988年); 2) Biocomputing: Informatics and Genome Projects (Smith, D.W., Ed.) Academic: NY (1993年); 3) Computer Analysis of Sequence Data, Part I (Griffin, A.M., および Griffin, H.G., Eds.) Humana: NJ (1994年); 4) Sequence Analysis in Molecular Biology (von Heinje, G., Ed.) Academic (1987年); および 5) Sequence Analysis Primer (Gribskov, M. および Devereux, J., Eds.) Stockton: NY (1991年)に記載されるものをはじめとするが、これに限定されるものではない既知の方法によって容易に計算できる。

10

20

【0056】

%同一性を判定する好ましい方法は、試験される配列間に最良の整合を与えるようにデザインされる。%同一性および%類似性を判定する方法は、一般に入手できるコンピュータプログラムで体系化されている。配列アラインメントおよび%同一性の計算は、LASERGENE バイオインフォマティクス演算スイート (DNASTAR Inc., Madison, WI) の MegAlign™ プログラムを使用して実施してもよい。配列の多重アラインメントは、「アラインメントの Clustal V 法」および「アラインメントの Clustal W 法」をはじめとするアルゴリズムのいくつかの変種を包含する「アラインメントの Clustal 法」を使用して実施される (Higgins および Sharp, CABIOS, 5: 151~153 (1989年); Higgins, D.G.ら, Comput. Appl. Biosci., 8: 189~191 (1992年)により記載され、LASERGENE バイオインフォマティクス演算スイート (DNASTAR Inc.) の MegAlign™ (バージョン 8.0.2) プログラムにある)。どちらかの Clustal V プログラムを使用した配列のアラインメント後、プログラムの「配列距離」表を見ることで「%同一性」を得ることが可能である。

30

【0057】

アラインメントの Clustal V 法を使用した多重アラインメントでは、デフォルト値は GAP PENALTY = 10、GAP LENGTH PENALTY = 10 に相当する。Clustal V 法を使用したタンパク質配列のペアワイズ配列比較および%同一性計算のデフォルトパラメータは、KTUPLE = 1、GAP PENALTY = 3、WINDOW = 5、および DIAGONALS SAVED = 5 である。核酸ではこれらのパラメータは、KTUPLE = 2、GAP PENALTY = 5、WINDOW = 4、および DIAGONALS SAVED = 4 である。アラインメントの Clustal W 法を使用した多重アラインメントのデフォルトパラメータは、GAP PENALTY = 10、GAP LENGTH PENALTY = 0.2、Delay Divergent Seqs (%) = 30、DNA Transition Weight = 0.5、Protein Weight Matrix = Gonnet Series、DNA Weight Matrix = IUB に相当する。

40

50

【0058】

「配列比較のBLASTN法」が、デフォルトパラメーターを使用してヌクレオチド配列を比較する、国立バイオテクノロジー情報センター（NCBI）が提供するアルゴリズムであるのに対し、「BLASTPアラインメント法」は、デフォルトパラメーターを使用してタンパク質配列を比較する、NCBIによって提供されるアルゴリズムである。

【0059】

その他の種から同一または同様の機能または活性を有するポリペプチドを同定する上で、多くのレベルの配列同一性が有用であることを当業者はよく理解している。適切な核酸断片、すなわち本明細書の開示に従った単離されたポリヌクレオチドは、本明細書で報告されるアミノ酸配列と少なくとも約70～85%同一のポリペプチドをコードする一方、より好ましい核酸断片は少なくとも約85～95%同一のアミノ酸配列をコードする。好ましい範囲は上述のようであるが、%同一性の有用な例としては、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%などの50%～100%のあらゆる整数百分率が挙げられる。またこの単離されたヌクレオチド断片のあらゆる全長または部分的相補物も興味深い。

10

【0060】

適切な核酸断片は上述の相同性を有するだけでなく、典型的に少なくとも50個のアミノ酸、好ましくは少なくとも100個のアミノ酸、より好ましくは少なくとも150個のアミノ酸、なおもより好ましくは少なくとも200個のアミノ酸、最も好ましくは少なくとも250個のアミノ酸を有するポリペプチドをコードする。

20

【0061】

「コドン縮重」とは、コードされるポリペプチドのアミノ酸配列に影響しないヌクレオチド配列のバリエーションを可能にする遺伝子コードの性質を指す。したがって本明細書は、実質的に配列番号2に記載の藻類ポリペプチドをコードするアミノ酸配列の全てまたはかなりの部分をコードするあらゆる核酸断片について記載する。当業者は、特定のアミノ酸を特定化するヌクレオチドコドンの使用における、特定の宿主細胞によって示される「コドンバイアス」についてよく知っている。したがって宿主細胞中の改善された発現のために遺伝子を合成する場合、そのコドン使用頻度が、宿主細胞の好むコドン使用頻度に近くなるように遺伝子をデザインすることが望ましい。

30

【0062】

「合成遺伝子」は、当業者に公知の手順を使用して化学的に合成されるオリゴヌクレオチド構成単位からアセンブルできる。これらのオリゴヌクレオチド構成単位はアニールされ、次にライゲートされて遺伝子セグメントを形成し、それは次に酵素的にアセンブリーされて遺伝子全体が構築される。したがって遺伝子をヌクレオチド配列の最適化に基づいて、最適な遺伝子発現のために個別に調整し、宿主細胞のコドンバイアスを反映させることができる。当業者は、コドン利用が宿主によって好まれるコドンに偏っている場合の遺伝子発現成功の可能性を理解する。好ましいコドンの判定は、配列情報が利用できる宿主細胞由来の遺伝子の調査に基づくことができる。例えばヤロウイア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）のコドン使用頻度プロファイルは、米国特許第7,125,672号明細書に提供される。

40

【0063】

「遺伝子」とは特定のタンパク質を発現する核酸断片を指し、それはコード領域のみを指してもよく、またはコード配列に先行する（5'非コード配列）およびそれに続く（3'非コード配列）制御配列を含んでもよい。「天然遺伝子」とは、自然界にそれ自体の制御配列と共に見られる遺伝子を指す。「キメラ遺伝子」とは、自然界に共に見られない制御およびコード配列を含んでなる天然遺伝子でないあらゆる遺伝子を指す。したがってキ

50

メラ遺伝子は、異なる起源由来の制御配列およびコード配列、あるいは同一起源由来であるが、自然界に見られるのとは異なる様式で配列される制御配列およびコード配列を含んでなってもよい。「内在性遺伝子」とは、生物ゲノム中のその天然位置にある天然遺伝子を指す。「外来性」遺伝子とは、遺伝子移入によって宿主生物に導入される遺伝子を指す。外来性遺伝子は、非天然生物中に挿入された天然遺伝子、天然宿主内の新しい位置に導入された天然遺伝子、あるいはキメラ遺伝子を含んでなることができる。「導入遺伝子」とは、形質転換によってゲノム中に導入された遺伝子である。「コドン最適化遺伝子」とは、そのコドン使用頻度が宿主細胞の好むコドン使用頻度を模倣するようにデザインされた遺伝子である。

【0064】

「コード配列」とは、特定のアミノ酸配列をコードするDNA配列を指す。「制御配列」とは、コード配列の上流(5'非コード配列)、配列内、または下流(3'非コード配列)に位置して、転写、RNAプロセシングまたは安定性、または関連コード配列の翻訳に影響を及ぼすヌクレオチド配列を指す。制御配列としては、プロモーター、エンハンサー、サイレンサー、5'非翻訳リーダー配列(例えば転写開始部位と翻訳開始コドンの間)、イントロン、ポリアデニル化認識配列、RNAプロセシング部位、エフェクター結合部位、およびステムループ構造が挙げられる。

【0065】

「プロモーター」とは、コード配列または機能性RNAの発現を調節できるDNA配列を指す。一般にコード配列はプロモーター配列に対して3'に位置する。プロモーターは、その全体を天然遺伝子に由来してもよく、または自然界に見られる異なるプロモーターに由来する異なる要素から構成されてもよく、または合成DNAセグメントを含んでなってもよい。異なるプロモーターが、異なる組織または細胞型において、または発達の異なる段階で、または異なる環境または生理学的条件に応じて、遺伝子発現を誘導してもよいことは当業者によって理解される。ほとんどの場合にほとんどの細胞型中で遺伝子が発現されるようにするプロモーターは、一般に「構成的プロモーター」と称される。ほとんどの場合、制御配列の正確な境界は完全に定義されていないので、異なる長さのDNA断片が同一プロモーター活性を有するかもしれないことがさらに認識されている。

【0066】

「3'非コード配列」および「転写ターミネーター」という用語は、コード配列下流に位置するDNA配列を指す。これとしては、mRNAプロセシングまたは遺伝子発現に影響できる調節シグナルをコードするポリアデニル化認識配列およびその他の配列が挙げられる。ポリアデニル化シグナルは、通常mRNA前駆物質の3'末端へのポリアデニル酸トラクトの付加に影響することで特徴づけられる。3'領域は、随伴コード配列の転写、RNAプロセシングまたは安定性、または翻訳に影響できる。

【0067】

「RNA転写物」は、RNAポリメラーゼが触媒するDNA配列の転写に起因する生成物を指す。RNA転写物がDNA配列の完全な相補的コピーであれば、それは一次転写物と称される。RNA転写物は、それが一次転写物の転写後プロセシングに由来するRNA配列であれば、成熟RNAと称される。「メッセンジャーRNA」または「mRNA」とは、イントロンがなく、細胞がタンパク質に翻訳できるRNAを指す。「cDNA」とは、mRNAテンプレートに対して相補的で、酵素逆転写酵素を使用してそれから合成されるDNAを指す。cDNAは一本鎖であることができ、またはDNAポリメラーゼIのクレノウ(Klenow)断片を使用して二本鎖形態に変換できる。「センス」RNAとは、mRNAを含んで、細胞中または生体外でタンパク質に翻訳できるRNA転写物を指す。「アンチセンスRNA」とは、標的一次転写物またはmRNAの全部または一部に相補的で標的遺伝子の発現をブロックするRNA転写物を指す(米国特許第5,107,065号明細書)。

【0068】

「作動的に連結する」という用語は、一方の機能がもう一方によって影響されるような

10

20

30

40

50

、単一核酸断片上の核酸配列の協合を指す。例えばプロモーターがそのコード配列の発現に影響できる、すなわちコード配列がプロモーターの転写制御下にある場合、それはコード配列と作動的に連結する。コード配列は、センスまたはアンチセンス方向で制御配列と作動的に連結できる。

【 0 0 6 9 】

「組み換え」という用語は、例えば化学合成による、または遺伝子操作技術を通じた核酸の単離セグメントの操作による、2つのさもなければ別々の配列セグメントの人為的組み合わせを指す。

【 0 0 7 0 】

「発現」という用語は、本明細書での用法では、センス (m R N A) またはアンチセンス R N A の転写および安定した蓄積を指す。発現はまた、m R N A のポリペプチドへの翻訳を指してもよい。したがって「発現」という用語は、本明細書での用法ではまた、機能性最終産物 (例えば [前駆または成熟いずれかの] m R N A またはタンパク質) の産生も指す。

10

【 0 0 7 1 】

「形質転換」とは、遺伝的に安定した遺伝形質をもたらす、宿主生物中への核酸分子の転移を指す。核酸分子は、例えば自律的に複製するプラスミドであってもよく、またはそれは宿主生物のゲノムに組み込まれてもよい。形質転換核酸断片を含有する宿主生物は、「組換え生物」または「リコンビナント」または「形質転換」または「形質転換体」生物と称される。

20

【 0 0 7 2 】

「プラスミド」および「ベクター」という用語は、細胞の中心的代謝の一部ではない遺伝子を運ぶことが多く、通常環状二本鎖 D N A 断片の形態である染色体外要素を指す。このような要素は、あらゆる起源に由来する一本鎖または二本鎖の D N A または R N A の直線または環状、自己複製配列、ゲノム組み込み配列、ファージまたはヌクレオチド配列であってもよく、その中にはいくつかのヌクレオチド配列が結合または組み換えされて、細胞に発現カセットを導入できるユニークな構造になる。

【 0 0 7 3 】

「発現カセット」という用語は、外来遺伝子を含有し、外来遺伝子に加えて、異種宿主中での遺伝子の増強された発現ができるようにする要素を有する D N A 断片を指す。一般に発現カセットは、選択された遺伝子のコード配列と、選択された遺伝子産物の発現に必要である、コード配列に先行する (5 ' 非コード配列) およびそれに続く (3 ' 非コード配列) 制御配列とを含んでなる。したがって発現カセットは、典型的に 1) プロモーター配列、2) コード配列 [「 O R F 」]、および 3) 真核生物では通常はポリアデニル化部位を含有する 3 ' 非翻訳領域 (すなわちターミネーター) から構成される。発現カセットは通常はベクターに含まれて、クローニングおよび形質転換を容易にする。各宿主に対して妥当な制御配列を使用しさえすれば、異なる発現カセットを細菌、酵母、植物、および哺乳類細胞をはじめとする異なる生物に形質転換できる。

30

【 0 0 7 4 】

「組み換え構築物」、「発現構築物」、「キメラ構築物」、「構築物」、および「組み換え D N A 構築物」という用語は、本明細書で同義的に使用される。組み換え構築物は、例えば自然界に一緒には見られない、制御配列およびコード配列などの核酸断片の人為的組み合わせを含んでなる。例えば組み換え D N A 構築物は、異なる起源に由来する制御配列およびコード配列、または同一起源に由来する制御配列およびコード配列を含んでなってもよいが、自然界に見られるのとは異なる様式で配列される。このような構築物はそれ自体を使用してもよく、またはベクターと併せて使用してもよい。ベクターを使用する場合、当業者によく知られているように、ベクターの選択は宿主細胞を形質変換するのに使用される方法に左右される。例えばプラスミドベクターが使用できる。当業者は、本明細書に記載の単離された核酸断片のいずれかを含んでなる宿主細胞を成功裏に形質変換し、選択し、増殖するためにベクター上に存在しなくてはならない遺伝的要素について十分承

40

50

知している。当業者はまた、異なる独立した形質転換事象が、異なるレベルおよびパターンの発現をもたらす (Jones ら、EMBO J. 4: 2411~2418 頁 (1985年); De Almeida ら、Mol. Gen. Genetics 218: 78~86 頁 (1989年))、したがって所望の発現レベルおよびパターンを示す系統を得るために多数の事象をスクリーニングしなくてはならないことを認識する。このようなスクリーニングは特に、DNA のサザン分析、mRNA 発現のノーザン分析、タンパク質発現のウエスタン分析または表現型分析によって達成されてもよい。

【0075】

「配列分析ソフトウェア」という用語は、ヌクレオチドまたはアミノ酸配列の分析のために有用なあらゆるコンピュータアルゴリズムまたはソフトウェアプログラムを指す。「配列分析ソフトウェア」は、市販のものでも、あるいは独立して開発されても良い。典型的な配列分析ソフトウェアとしては、1.) Genetics Computer Group (GCG) (Madison, WI) からの GCG プログラム一式 (Wisconsin Package Version 9.0)、2.) BLASTP、BLASTN、BLASTX (Altschul ら、J. Mol. Biol. 215: 403~410 (1990年))、および 3.) DNASTAR, Inc. (Madison, WI) からの DNASTAR、4.) Gene Codes Corporation (Ann Arbor, MI) からの Sequencher、および 5.) スミス・ウォーターマン・アルゴリズムを組み入れた FASTA プログラム (W. R. Pearson, Comput. Methods Genome Res. [Proc. Int. Symp.] (1994年)、1992年会議、111~20、編集者: Suhai, Sandor, Plenum, New York, NY) が挙げられるが、これに限定されるものではない。本説明中で分析のために配列分析ソフトウェアが使用される場合はいつでも、特に断りのない限り、分析結果は言及されるプログラムの「デフォルト値」に基づく。本明細書の用法では「デフォルト値」とは、ソフトウェアを最初に初期化した際に、初めからロードされる値またはパラメーターのあらゆる組を意味する。

【0076】

ここで使用される標準リコンビナント DNA および分子クローニング技術については当該技術分野で良く知られており、Sambrook, J., Fritsch, E. F., および Maniatis, T., 「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989年); Silhavy, T. J., Bennan, M. L. および Enquist, L. W., 「Experiments with Gene Fusions」Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1984年); および Ausubel, F. M. ら、「Current Protocols in Molecular Biology」Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (Hoboken, NJ) による出版 (1987年) でさらに詳しく述べられている。

【0077】

一般に油性微生物中の脂質蓄積は、増殖培地中に存在する総合的な炭素と窒素との比率に応じて始動する。油性微生物中における遊離パルミチン酸 (16:0) の新規合成をもたらすこの過程は、米国特許第 7, 238, 482 号明細書で詳細に記載される。パルミチン酸は、エロンガーゼおよびデサチュラーゼの作用を通じて形成される長鎖飽和および不飽和脂肪酸誘導体の前駆物質である (図 1)。

【0078】

TAG (脂肪酸の主要な貯蔵単位) は、以下が関与する一連の反応によって形成される。1) アシル基転移酵素による 1 分子のアシル-CoA のグリセロール-3-リン酸塩へのエステル化が リゾホスファチジン酸を生じ、2) アシル基転移酵素による第 2 のアシル-CoA 分子のエステル化が 1, 2-ジアシルグリセロールリン酸塩 (一般にホスファチ

10

20

30

40

50

ジン酸として同定される)を生じ、3)ホスファチジン酸ホスファターゼによるリン酸塩の除去が1,2-ジアシルグリセロール[「DAG」]を生じ、4)アシル基転移酵素の作用による第3の脂肪酸の付加がTAGを形成する。飽和および不飽和脂肪酸および短鎖および長鎖脂肪酸をはじめとする、幅広い脂肪酸をTAGに組み込むことができる。

【0079】

概要： 脂肪酸およびトリアシルグリセロールの生合成

オレイン酸が $n-3$ / $n-6$ 脂肪酸に変換される代謝過程は、炭素原子の付加を通じた炭素鎖の延長、および二重結合の付加を通じた分子の不飽和化を伴う。これには、小胞体膜中に存在する一連の特殊不飽和化およびエロンガーゼが必要である。しかし図1に示されて後述されるように、特定の $n-3$ / $n-6$ 脂肪酸生成のために存在する複数の代案経路があることが多い。

10

【0080】

具体的には図1は下述の経路を描写する。全ての経路は、オレイン酸が12デサチュラーによって、第1の $n-6$ 脂肪酸であるリノール酸[「LA」]に最初に変換されることを要する。次に「 $n-6$ デサチュラーゼ/ $n-6$ エロンガーゼ経路」および基質としてLAを使用して、長鎖 $n-6$ 脂肪酸が次のように形成される。1)LAが $n-6$ デサチュラーゼによって $n-3$ リノレン酸[「GLA」]に変換され、2)GLAが $C_{18/20}$ エロンガーゼによってジホモ $n-3$ リノレン酸[「DGLA」]に変換され、3)DGLAが $n-5$ デサチュラーゼによってアラキドン酸[「ARA」]に変換され、4)ARAが $C_{20/22}$ エロンガーゼによってドコサテトラエン酸[「DTA」]に変換され、5)DTAが $n-4$ デサチュラーゼによってドコサペンタエン酸[「DPA $n-6$ 」]に変換される。代案としては、「 $n-6$ デサチュラーゼ/ $n-6$ エロンガーゼ」は基質として $n-3$ リノレン酸[「ALA」]を使用し、次のように長鎖 $n-3$ 脂肪酸を生成できる。1)LAが $n-15$ デサチュラーゼによって第1の $n-3$ 脂肪酸ALAに変換され、2)ALAが $n-6$ デサチュラーゼによってステアリドン酸[「STA」]に変換され、3)STAが $C_{18/20}$ エロンガーゼによってエイコサテトラエン酸[「ETA」]に変換され、4)ETAが $n-5$ デサチュラーゼによってエイコサペンタエン酸[「EPA」]に変換され、5)EPAが $C_{20/22}$ エロンガーゼによってドコサペンタエン酸[「DPA」]に変換され、6)DPAが $n-4$ デサチュラーゼによってドコサヘキサエン酸[「DHA」]に変換される。場合により $n-6$ 脂肪酸が $n-3$ 脂肪酸に変換されてもよく、例えばETAおよびEPAは、 $n-17$ デサチュラーゼ活性によってそれぞれDGLAおよびARAから生成される。

20

30

【0081】

$n-3$ / $n-6$ 脂肪酸の生合成のための別の経路は、 $n-9$ エロンガーゼおよび $n-8$ デサチュラーゼ(すなわち「 $n-9$ エロンガーゼ/ $n-8$ デサチュラーゼ経路」)を利用する。より具体的には $n-9$ エロンガーゼによって、LAおよびALAがそれぞれエイコサジエン酸[「EDA」]およびエイコサトリエン酸[「ETRA」]に変換されてもよい。次に $n-8$ デサチュラーゼは、EDAをDGLAにおよび/またはETRAをETAに変換する。下流PUFAが、上述のように引き続いて形成される。

【0082】

$n-3$ / $n-6$ 脂肪酸を生成するために特定の宿主生物中に導入される必要がある特定の機能性は、宿主細胞(およびその天然PUFAプロファイルおよび/またはデサチュラーゼ/エロンガーゼプロファイル)、基質可用性、および所望の最終産物に左右されることが考察される。 $n-6$ デサチュラーゼ/ $n-6$ エロンガーゼ経路を通じて生じるPUFAはGLAおよび/またはSTAを欠いていないので、 $n-9$ エロンガーゼ/ $n-8$ デサチュラーゼ経路の発現に対立するものとして、例えば $n-6$ デサチュラーゼ/ $n-6$ エロンガーゼ経路の発現は、いくつかの実施態様では好ましいかもしれない。

40

【0083】

当業者は、 $n-3$ / $n-6$ 脂肪酸生合成のために所望される各酵素をコードする、様々な候補遺伝子を同定できるであろう。有用なデサチュラーゼおよびエロンガーゼ配列はあらゆる供給源に由来してもよく、例えば天然供給源(細菌、藻類、真菌、植物、動物など

50

）から単離され、半合成経路によって生成され、または新規（*de novo*）合成される。宿主中に導入されるデサチュラーゼおよびエロンガーゼ遺伝子の特定の供給源は重大でないが、デサチュラーゼまたはエロンガーゼ活性を有する特異的ポリペプチド選択のための考慮事項としては以下が挙げられる。宿主中に導入されるデサチュラーゼおよびエロンガーゼ遺伝子の特定の供給源は重大でないが、デサチュラーゼまたはエロンガーゼ活性を有する特異的ポリペプチド選択のための配慮としては以下が挙げられる。1) ポリペプチドの基質特異性、2) ポリペプチドまたはその構成要素が律速酵素であるかどうか、3) デサチュラーゼまたはエロンガーゼが所望のPUFA合成に必須であるかどうか、4) ポリペプチドが必要とする補助因子および/または5) その導入後にポリペプチドが（例えばキナーゼまたはプレニルトランスフェラーゼによって）修飾されるかどうか。発現されるポリペプチドは、好ましくは宿主細胞中のその位置の生化学的環境に適合するパラメーターを有する（追加的詳細については米国特許第7,238,482号明細書を参照されたい）。

10

【0084】

追加的実施態様では、特定の各デサチュラーゼおよび/またはエロンガーゼの変換効率を考慮することもまた有用であろう。より具体的には、各酵素が基質を生成物に変換するのに100%の効率で機能することは稀なので、宿主細胞中に生成される未精製油の最終脂質プロファイルは、典型的に所望の - 3 / - 6 脂肪酸、ならびに様々な上流中間PUFAからなる様々なPUFAの混合物である。したがって所望の脂肪酸生合成を最適化する場合、各酵素の転換効率もまた考慮すべき変数である。

20

【0085】

上述のそれぞれの考慮を念頭に、公的に入手可能な文献（例えばGenBank）、特許文献、およびPUFA生成能力を有する生物の実験的分析に従って、適切なデサチュラーゼおよびエロンガーゼ活性（例えば6デサチュラーゼ、 $C_{18/20}$ エロンガーゼ、5デサチュラーゼ、17デサチュラーゼ、15デサチュラーゼ、9デサチュラーゼ、12デサチュラーゼ、 $C_{14/16}$ エロンガーゼ、 $C_{16/18}$ エロンガーゼ、9エロンガーゼ、8デサチュラーゼ、4デサチュラーゼ、および $C_{20/22}$ エロンガーゼ）を有する候補遺伝子を同定できる。これらの遺伝子は、特定宿主生物に導入して、生物のPUFA合成を可能にしたりは増強するのに適する。

30

【0086】

本開示は、ポルフィリジウム・クルエンツム（*Porphyridium cruentum*）から単離され、下の表3に要約される6デサチュラーゼをコードするヌクレオチド配列に関する。

【0087】

表3

ポルフィリジウム・クルエンツム（*Porphyridium cruentum*）6デサチュラーゼの要約

【表3】

略語	ヌクレオチド配列番号	アミノ酸配列番号
PcD6	1	2
PcD6S	46	47

40

*注記：配列番号47は配列番号2の配列と同一である。

【0088】

したがって本明細書に記載されるのは、BLASTPアラインメント法に基づいて、配列番号2に記載の配列を有するポリペプチドとの比較で少なくとも80%の同一性を有する少なくとも471個のアミノ酸の6デサチュラーゼ酵素をコードする第1のヌクレオチド配列；または第1のヌクレオチドの相補配列を含んでなる第2のヌクレオチド配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチドである。

50

【0089】

B L A S Tアルゴリズムを使用したP・クルエンタム(P・cruentum) 6デサチュラーゼヌクレオチド塩基および推定アミノ酸配列と、公共データベースとの比較(Altschul, S.F., Nucleic Acids Res. 25:3389~3402(1997年)およびFEBS J., 272:5101~5109(2005年); 国立バイオテクノロジー情報センター[「NCBI」]によって提供される)からは、最も類似した既知の配列が、471個のアミノ酸長にわたり本6デサチュラーゼのアミノ酸配列と約40%同一であることが明らかにされる。

【0090】

より好ましいアミノ酸断片は、本明細書の配列と少なくとも約70%~80%同一であり、少なくとも80%~90%同一の配列が特に適切であり、少なくとも約90%~95%同一の配列が最も好ましい。同様に当該ORFに対応する好ましい6デサチュラーゼをコードする核酸配列は活性タンパク質をコードするものであり、本明細書で報告される6デサチュラーゼをコードする核酸配列と少なくとも約70%~80%と同一であり、少なくとも約80%~90%同一の配列が特に適切であり、少なくとも約90%~95%同一の配列が最も好ましい。

【0091】

別の実施態様では、当該PcD6配列は特定宿主生物中での発現のためにコドン最適化し得る。当該技術分野でよく知られているように、ポリペプチドをコードする外来遺伝子の発現を実質的に増強できるので、コドン最適化は、別の宿主中で酵素発現をさらに最適化する有用な手段であることができる。一般に宿主が好むコドンは、好ましくは最大量で発現するタンパク質中でのコドン使用を調べ、いずれのコドンが最高頻度で使用されるかを判定することで、関心のある特定の宿主種内で判定し得る。次に宿主種中で好まれるコドンを使用して、例えばデサチュラーゼ活性を有する関心のあるポリペプチドのコード配列を全部または部分的に合成できる。DNAの全部(または部分)はまた、転写mRNA中に存在するあらゆる不安定化配列または二次構造領域を除去するように合成できる。DNAの全部(または部分)はまた、塩基組成を所望の宿主細胞中でより好まれるものに改変するように合成できる。

【0092】

したがってPcD6(配列番号1)はヤロウシア・リポリティカ(Yarrowia lipolytica)中での発現のためにコドン最適化された。これは以前のY・リポリティカ(Y.lipolytica)コドン使用頻度プロファイル判定、好ましいコドンの同定、および「ATG」開始コドン周辺の共通配列の判定に基づいて可能であった(米国特許7,238,482号明細書および米国特許第7,125,672号明細書を参照されたい)。得られた合成遺伝子はPcD6S(配列番号46)と称される。コドン最適化6デサチュラーゼ遺伝子(すなわち配列番号47)によってコードされるタンパク質配列は、野生型タンパク質配列(すなわち配列番号2)と同一である。

【0093】

当業者はここでの教示を使用して、野生型PcD6配列に記載のその変異型に基づいて、別の宿主(すなわちヤロウシア・リポリティカ(Yarrowia lipolytica)以外)中での最適発現に適した、その他のコドン最適化された様々な6デサチュラーゼタンパク質を作り出すことができるであろう。したがって本開示は、野生型配列PcD6(すなわち配列番号2によってコードされる)に由来するあらゆるコドン最適化された6デサチュラーゼタンパク質に関する。これとしては、ヤロウシア・リポリティカ(Yarrowia lipolytica)中での発現のためにコドン最適化された合成6デサチュラーゼタンパク質をコードする配列番号46に記載のヌクレオチド配列(すなわちPcD6S)が挙げられるが、これに限定されるものではない。別の実施態様では、PcD6をコードするコドンの一部を修飾して、植物または植物部位、藻類、細菌、代案の酵母、ユーグレナ属、卵菌綱、ストラメノパイルまたは真菌をはじめとするが、これに限定されるものではない、宿主生物中での遺伝子の発現を増強することが望ましいか

10

20

30

40

50

もしれない。

【0094】

当該デサチュラーゼ配列（すなわち P c D 6 または P c D 6 S ）のいずれかまたはそのあらゆる一部を使用して、配列分析ソフトウェアを使用し、同一または別の細菌、藻類、真菌、卵菌類、酵母、ストラメノパイル、ユーグレナ属または植物種中で 6 デサチュラーゼ相同体を検索してもよい。一般にこのようなコンピュータソフトウェアは、様々な置換、欠失、およびその他の修飾に相同性の程度を割り当てることで、類似した配列をマッチさせる。

【0095】

低複雑性フィルターと、次のパラメーター：期待値 = 10、マトリックス = B l o s u m 6 2 (A l t s c h u l r , N u c l e i c A c i d s R e s . 2 5 : 3 3 8 9 ~ 3 4 0 2 (1 9 9 7 年)) での B L A S T P アラインメント法などのソフトウェアアルゴリズムの使用は、あらゆる 6 デサチュラーゼタンパク質を核またはタンパク質配列のデータベースと比較し、それによって好ましい宿主生物中の類似した既知の配列を同定するために良く知られている。

10

【0096】

既知の配列のデータベースを綿密にチェックするためのソフトウェアアルゴリズムの使用は、特に配列番号 2 で記載されるものなどの公的に入手可能な 6 デサチュラーゼ配列と比較的低い%同一性を有する相同体の単離に適する。公的に入手可能なデサチュラーゼ配列と少なくとも約 70% ~ 85% 同一性の 6 デサチュラーゼ相同体について、単離が比較的容易であろうことは予測可能である。さらに少なくとも約 85% ~ 90% 同一の配列は特に単離に適し、少なくとも約 90% ~ 95% 同一の配列は最も容易に単離されるであろう。

20

【0097】

デサチュラーゼ相同体はまた、デサチュラーゼ酵素にユニークなモチーフの使用によって同定し得る。これらのモチーフはおそらくタンパク質の構造、安定性または活性に必須であるデサチュラーゼタンパク質の領域を表し、これらのモチーフは新しいデサチュラーゼ遺伝子を迅速に同定するための診断用ツールとして有用である。6 デサチュラーゼ酵素（すなわち動物、植物、および真菌）中に普遍的に見られるモチーフとしては、3 個のヒスチジンボックス（すなわち H (X) ₃₋₄ H (配列番号 3 および 4)、H (X) ₂₋₃ H H (配列番号 5 および 6)、および H / Q (X) ₂₋₃ H H (配列番号 7 および 8)) が挙げられる。これらの 3 つのモチーフは全て P c D 6 (配列番号 2) 中に存在し、P c D 6 が 6 デサチュラーゼ活性を有することが予測されるさらなる証拠を提供する。

30

【0098】

代案としては、6 デサチュラーゼ相同体同定のためのハイブリダイゼーション試薬として、当該デサチュラーゼ配列のいずれかまたはその一部を用いてもよい。核酸ハイブリダイゼーション試験の基本的構成要素には、プローブ、関心のある遺伝子または遺伝子断片を含有することが疑われるサンプル、および特定のハイブリダイゼーション法が含まれる。適切なプローブは典型的に、検出される核酸配列に相補的な一本鎖核酸配列である。プローブは、検出する核酸配列と「ハイブリダイズ可能」である。プローブ長は 5 個の塩基から数万個の塩基の間で変動し得るが、典型的に約 15 個の塩基 ~ 約 30 個の塩基のプローブ長が適切である。プローブ分子の一部のみが、検出する核酸配列に相補的であればよい。さらにプローブと標的配列との相補性は完璧でなくてもよい。ハイブリダイゼーションは不完全に相補的な分子間でも生じ、その結果、ハイブリダイズした領域内の特定の塩基の一部は、適切な相補的塩基と対合形成しない。

40

【0099】

ハイブリダイゼーション法については、良く定義されている。典型的にはプローブおよびサンプルは、核酸ハイブリダイゼーションを可能にする条件下で混合されなくてはならない。これは適切な濃度および温度条件下において、無機または有機塩存在下で、プローブとサンプルを接触させることを伴う。プローブとサンプル核酸の間であらゆる可能な八

50

ハイブリダイゼーションが起きるように、プローブおよびサンプル核酸は、十分長い時間接触させなくてはならない。混合物中のプローブまたは標的濃度が、ハイブリダイゼーションが生じるのに必要な時間を決定する。プローブまたは標的濃度が高いほど、必要なハイブリダイゼーションインキュベーション時間は短くなる。塩化グアニジニウム、グアニジニウムチオシアネート、ナトリウムチオシアネート、テトラクロロ酢酸リチウム、過塩素酸ナトリウム、テトラクロロ酢酸ルビジウム、ヨウ化カリウム、およびトリフルオロ酢酸セシウムなどのカオトロピック剤が添加されていてもよい。所望するならば、ハイブリダイゼーション混合物にホルムアミドを典型的に30~50% (v/v) [「容積基準」] 添加できる。

【0100】

様々なハイブリダイゼーション溶液を用いることができる。それらは典型的に約20~60容積%、好ましくは30容積%の極性有機溶剤からなる。一般的なハイブリダイゼーション溶液は、約30~50% v/vのホルムアミドと、約0.15~1Mの塩化ナトリウムと、(例えばクエン酸ナトリウム、トリス-HCl、PIPESまたはHEPES (pH範囲約6~9)などの)約0.05~0.1Mの緩衝液と、(例えばドデシル硫酸ナトリウムなどの)約0.05~0.2%の洗剤、または0.5~20mMのEDTA、Pharmacia Inc.からのFICOLL (約300~500kD)、ポリビニルピロリドン (約250~500kD)、および血清アルブミンを用いる。また典型的なハイブリダイゼーション溶液には、約0.1~5mg/mLの非標識担体核酸、(例えば仔ウシ胸腺またはサケ精子DNA、または酵母菌RNAなどの)核酸DNA断片が含まれ、約0.5~2%重量/容積 [「容積基準」] のグリシンが含まれていてもよい。様々な(例えばポリエチレングリコールなどの)極性水溶性または水性膨張剤、(例えばポリアクリレートまたはポリメチルアクリレートなどの)陰イオンポリマー、硫酸デキストランなどの陰イオン糖類ポリマーをはじめとする容積排除剤などのその他の添加剤が含まれてもよい。

【0101】

核酸ハイブリダイゼーションは多様なアッセイ形式に適合できる。最も適切なものの1つは、サンドイッチアッセイ形式である。サンドイッチアッセイは、特に非変性条件下でのハイブリダイゼーションに適合できる。サンドイッチタイプのアッセイの主要構成要素は、固体担体である。固体担体は、未標識で配列の一部と相補的である固定化核酸プローブをそれに吸着し、またはそれと共有結合する。

【0102】

6デサチュラーゼ核酸断片または同定されたそのあらゆる相同体のいずれかを使用して、同一または別の細菌、藻類、真菌、卵菌類、酵母、ストラメノパイル、ユーグレナ属または植物種から、相同的なタンパク質をコードする遺伝子を単離してもよい。配列依存プロトコルを使用した相同的遺伝子の単離は、技術分野で周知である。配列依存プロトコルの例としては以下が挙げられるが、これに限定されるものではない。1)核酸ハイブリダイゼーション法、2)ポリメラーゼ連鎖反応 [「PCR」] (米国特許第4,683,202号明細書); リガーゼ連鎖反応 [「LCR」] (Tabor, S.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:1074 (1985年)); または鎖置換増幅 [「SDA」] (Walkerら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89:392 (1992年))などの核酸増幅技術の様々な使用で例証されるDNAおよびRNA増幅法、および3)相補性によるライブラリー構築およびスクリーニング法。

【0103】

例えば本明細書に記載される6デサチュラーゼに類似したタンパク質またはポリペプチドをコードする遺伝子は、当業者によく知られている方法を使用して、核酸断片の全部または一部をDNAハイブリダイゼーションプローブとして使用して、あらゆる所望の酵母菌または真菌からライブラリーをスクリーニングして直接単離できる (GLAおよび/またはSTAを産生する生物が好ましい)。核酸配列に基づく特異的オリゴヌクレオチド

10

20

30

40

50

プローブは、技術分野で既知の方法によってデザインおよび合成できる (Maniatis、前出)。さらに例えばランダムプライマー-DNA標識、ニック翻訳または末端標識技術などの当業者に既知の方法によって、配列全体を直接使用してDNAプローブを合成でき、または利用できる生体外転写システムを使用してRNAプローブを合成できる。さらに特異的プライマーをデザインして使用し、本配列の一部または全長を増幅できる。得られた増幅生成物を増幅反応中に直接標識し、または増幅反応後に標識して、適切なストリンジェンシー条件下でプローブとして使用し、完全長DNA断片を単離できる。

【0104】

典型的には、PCR-タイプ増幅技術では、プライマーは異なる配列を有し、互いに相補的でない。所望の試験条件次第で、プライマーの配列は、標的核酸の効率的かつ忠実な複製を提供するようにデザインされるべきである。PCRプライマーデザインの方法は技術分野で一般的であり、よく知られている。(TheinおよびWallace, 「The use of oligonucleotide as specific hybridization probes in the Diagnosis of Genetic Disorders」, in Human Genetic Diseases: A Practical Approach, K. E. Davis Ed., (1986年) pp33~50, IRL: Herndon, VA; および Rychlik, W., In Methods in Molecular Biology, White, B. A. Ed., (1993年) Vol. 15, pp31~39, PCR Protocols: Current Methods and Applications. Humania: Totowa, NJ)。

10

20

【0105】

一般に6デサチュラーゼ配列の2本の短い断片をPCRプロトコルで使用して、DNAまたはRNAから相同遺伝子をコードするより長い核酸断片を増幅してもよい。PCRはまたクローンされた核酸断片ライブラリーに対して実施してもよく、1つのプライマーの配列は開示される核酸断片に由来する。別のプライマーの配列は、真核生物遺伝子をコードするmRNA前駆物質の3'末端のポリアデニル酸トラクトの存在を利用する。

【0106】

代案としては第2のプライマー配列は、クローニングベクターに由来する配列に基づいてもよい。例えば当業者は、RACEプロトコル(Frohmanら, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 85: 8998 (1988年))に従って、PCRを使用して転写物の一点と3'または5'末端との間の領域のコピーを増幅し、cDNAを作り出すことができる。3'および5'方向を向いたプライマーは、開示される配列からデザインできる。市販される3'RACEまたは5'RACEシステム(例えばGibco/BRL, Gaithersburg, MD)を使用して、特定の3'または5'cDNA断片を単離できる(Oharaら, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 86: 5673 (1989年); Lohら, Science, 243: 217 (1989年))。

30

【0107】

代案としては、本明細書に記載される6デサチュラーゼ核酸断片のいずれか(または同定されるそのあらゆる相同体)を使用して、新しいおよび/または改善された脂肪酸デサチュラーゼを作り出してもよい。当該技術分野で良く知られているように、生体外変異誘発および選択、化学的変異誘発、「遺伝子シャフリング」法またはその他の手段を用いて、天然デサチュラーゼ遺伝子の突然変異が得られる(このような突然変異としては、欠失、挿入、および点突然変異、またはそれらの組み合わせが挙げられる)。これは生体内で、それぞれ所望のPUFAのより長い半減期またはより高い生成速度など、宿主細胞中で機能するためのより望ましい物理的および動力学的パラメーターがある、デサチュラーゼ活性を有するポリペプチドの生成を可能にする。または必要に応じて、通例の変異誘発、得られた変異ポリペプチドの発現、およびそれらの活性の判定を通じて、対象のポリペプチド(すなわち6デサチュラーゼ)の酵素活性に重要な領域を判定できる。これらの

40

50

技術の概要は、米国特許第 7, 238, 482 号明細書に記載される。P c D 6 に由来するこのような全ての突然変異タンパク質およびそれらをコードするヌクレオチド配列は、本開示の範囲内である。

【0108】

改善された脂肪酸はまたドメイン交換によって合成されてもよく、本明細書に記載される 6 デサチュラーゼ核酸断片のいずれかからの機能ドメインが、別のデサチュラーゼ遺伝子中の機能ドメインと交換されて、それによって新しいタンパク質がもたらされる。本明細書での用法では、「ドメイン」または「機能ドメイン」とは微生物中で生物学的応答を引き起こせる核酸配列を指す。

【0109】

生化学的経路を操作する有用な方法は、当業者に良く知られている。適切なプロモーター制御下における、本明細書に記載される 6 デサチュラーゼ（すなわち P c D 6、P c D 6 S またはその他の変異酵素、コドン最適化酵素またはその相同体）をコードするキメラ遺伝子の導入は、形質転換宿主生物中でそれぞれ G L A および / または S T A の産生増大をもたらすことが予測される。したがって本明細書では、脂肪酸基質（すなわち L A および / または A L A）が所望の脂肪酸生成物（すなわちそれぞれ G L A および / または S T A）に変換されるように、基質を本明細書に記載されるデサチュラーゼ酵素（例えば P c D 6 または P c D 6 S）に暴露するステップを含んでなる、P U F A を直接生産する方法が開示される。

【0110】

より具体的には本明細書では微生物宿主細胞（例えば酵母、藻類、細菌、ユーグレナ属、卵菌綱、ストラモノパイル、および真菌）中で G L A を生成する方法が提供され；微生物宿主細胞は、

a) B L A S T P アラインメント法に基づいて、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドとの比較で少なくとも 80% のアミノ酸同一性を有する 6 デサチュラーゼポリペプチドをコードする組み換えヌクレオチド分子、および

b) L A 源

を含んでなり； 6 デサチュラーゼをコードする核酸断片が発現して L A が G L A に変換される条件下で微生物宿主細胞を増殖させ、G L A は回収されていてもよい。

【0111】

別の実施態様では、6 デサチュラーゼを使用して A L A を S T A に転換してもよい。したがって本明細書では S T A を生成する方法が提供され；微生物宿主細胞は、

a) B L A S T P アラインメント法に基づいて、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドとの比較で少なくとも 80% のアミノ酸同一性を有する 6 デサチュラーゼポリペプチドをコードする組み換えヌクレオチド分子、および

b) A L A 源

を含んでなり； 6 デサチュラーゼをコードする核酸断片が発現して A L A が S T A に変換される条件下で微生物宿主細胞を増殖させ、S T A は回収されていてもよい。

【0112】

代案としては、様々な - 6 および - 3 P U F A を生成するために、本明細書に記載される各 6 デサチュラーゼ遺伝子およびその対応する酵素生成物を間接的に使用し得る（図 1 および米国特許第 7, 238, 482 号明細書を参照されたい）。- 3 / - 6 P U F A の間接的生成は、脂肪酸基質が、中間体ステップまたは経路中間体の手段を通じて、所望の脂肪酸生成物に間接的に変換されて起きる。したがって本明細書に記載される

6 デサチュラーゼ（すなわち P c D 6、P c D 6 S またはその他の変異酵素、コドン最適化酵素またはその相同体）を P U F A 生合成経路の酵素（例えば 6 デサチュラーゼ、C_{18/20} エロンガーゼ、17 デサチュラーゼ、8 デサチュラーゼ、15 デサチュラーゼ、9 デサチュラーゼ、12 デサチュラーゼ、C_{14/16} エロンガーゼ、C_{16/18} エロンガーゼ、9 エロンガーゼ、5 デサチュラーゼ、4 デサチュラーゼ、C_{20/22} エロンガーゼ）をコードする追加的遺伝子と併せて発現させ、例えば A R A、E P A、D T A

10

20

30

40

50

、DPA_n-6、DPAおよび/またはDHAなどのより鎖長の長い - 3 / - 6 脂肪酸のより高レベルの生成をもたらしてもよいことが考察される。

【0113】

好ましい実施態様では、開示される 6 デサチュラーゼは最低限 C_{18/20} エロンガーゼと併せて発現される。しかし特定の発現カセット内に含まれる特定の遺伝子は、宿主細胞（およびそのPUFAプロファイルおよび/またはデサチュラーゼ/エロンガーゼプロファイル）、基質の利用可能性、および所望の最終産物に左右される。

【0114】

代案としては、本明細書に記載される完全な配列、それらの完全な配列の相補物、それらの配列のかなりの部分、それらから誘導されるコドン最適化されたデサチュラーゼ、およびそれらに実質的に相同的な配列に基づいて、宿主生物体の天然 15 デサチュラーゼを中断することが有用かもしれない。

10

【0115】

6 デサチュラーゼをコードする読み取り枠を含んでなる組み換え構築物（すなわち Pcd6、Pcd6S またはその他の変異酵素、コドン最適化酵素またはその相同体）を作り出して、適切な宿主細胞に導入する必要がある。当業者は、1) DNA 分子、プラスミドなどの巨大分子の構築、操作、および単離のための特定の条件および手順；2) 組み換え DNA 断片および組み換え発現構築物の作成；および3) クローンのスクリーニングおよび単離について記載する標準的資料を知っている。Sambrook, J., Fritsch, E. F. および Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1989年) (以下「Maniatis」)；by Silhavy, T. J., Brennan, M. L. および Enquist, L. W., *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1984年)；および Ausubel, F. M. ら, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, Hoboken, NJ による出版 (1987年) を参照されたい。

20

30

【0116】

一般に構築物に含まれる配列の選択は、所望の発現産物、宿主細胞の性質、および形質転換細胞と非形質転換細胞とを分離する提案される手段に左右される。当業者は、キメラ遺伝子を含有する宿主細胞を成功裏に形質転換させ、選択し、増殖させるために、プラスミドベクター上に存在しなくてはならない遺伝的要素を知っている。しかし典型的にベクターまたはカセットは、関連遺伝子の転写および翻訳を導く配列、選択性標識、および自律性複製または染色体組み込みを可能にする配列を含有する。適切なベクターは、転写開始を制御する遺伝子の 5' 領域、すなわちプロモーター、遺伝子コード配列および転写終結を制御する DNA 断片の 3' 領域、すなわちターミネーターを含んでなる。双方の制御領域は必ずしも生産宿主に天然の遺伝子に由来しなくてもよいが、それらが形質転換宿主細胞からの遺伝子に由来することが最も好ましい。

40

【0117】

所望の微生物宿主細胞中で本 6 デサチュラーゼ ORF の発現を促進するのに有用な転写開始制御領域（また開始制御領域またはプロモーターも）は良く知られている。これらの制御領域は、プロモーター、エンハンサー、サイレンサー、イントロン配列、3' UTR および/または 5' UTR 領域、およびタンパク質および/または RNA 安定化要素を含んでもよい。このような要素はそれらの強度および特異性が異なってもよい。宿主種からの転写および翻訳領域が特に有用であるが、実質的に、選択された宿主細胞中でこれらの遺伝子の発現を指示できるあらゆるプロモーター、すなわち天然、合成、またはキメラが適切である。宿主細胞中の発現は、誘導的または構成的様式で達成できる。誘導的

50

発現が関心のある遺伝子と作動的に連結する調節可能なプロモーターの活性を誘導することで起きるのに対し、構成的発現は構成的プロモーターの使用によって起きる。

【0118】

宿主細胞が酵母菌の場合、酵母菌細胞中で機能する転写および翻訳領域は、特に宿主種から提供される（例えばヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）中で使用するための好ましい転写開始調節領域については、国際公開第2006/052870号パンフレットに対応する、米国特許出願公開第2006-00115881-A1号明細書を参照されたい）。構成的または誘導的転写が所望されるかどうか、対象とするORFを発現する上でのプロモーター効率、構築の容易さなど次第で、いくつかの調節配列のいずれか1つを使用できる。

10

【0119】

翻訳開始コドン「ATG」周囲のヌクレオチド配列は、酵母細胞中での発現に影響することが分かっている。所望のポリペプチドが酵母中で不十分に発現される場合、外来性遺伝子のヌクレオチド配列を修正して効率的な酵母翻訳開始配列を含め、最適の遺伝子発現を得ることができる。酵母中での発現のためには、これは、内在性酵母遺伝子、好ましくは高度に発現される遺伝子に、非効率的に発現される遺伝子をインフレームで融合させることで、それを部位特異的変異誘発させて実行できる。代案としては、宿主中のコンセンサス翻訳開始配列を判定して、対象の宿主中における異種遺伝子の最適発現のために、この配列を異種遺伝子中に遺伝子操作できる。

20

【0120】

転写終結領域をコードする3'非コード配列が組み換え構築物中で提供されてもよく、それから開始領域が得られた遺伝子の3'領域からのもの、または異なる遺伝子からのものであってもよい。多数の終結領域が知られており、それらが由来するのと同じおよび異なる属と種のどちらで利用する場合も多様な宿主中で満足に機能する。終結領域は通常、特定の特質のためでなく、むしろ便宜上から選択される。終結領域はまた、好ましい宿主に天然の様々な遺伝子に由来してもよい。終結領域は、通常、特定の特質のためというよりむしろ便宜的に選択される。当業者は利用できる情報を使用して、転写ターミネーターとして機能する3'領域配列をデザインおよび合成し得るので、別の実施態様では3'領域はまた合成し得る。終結領域は不必要かもしれないが、高度に好ましい。

30

【0121】

遺伝子をクローニングベクターに単に挿入することは、所望の速度、濃度、量、その他でのその発現を保証しない。高発現率に対する必要に応じて、転写、RNA安定性、翻訳、タンパク質安定性および位置、酸素制限、および微生物宿主細胞からの分泌を制御する、いくつかの異なる遺伝的要素を操作することにより、多数の特殊発現ベクターが作り出されている。操作される特徴のいくつかとしては、次が挙げられる。関連する転写プロモーターおよびターミネーター配列の性質；クローン遺伝子コピー数（単一発現構築物中で追加的コピーをクローンしてもよく、および/またはプラスミドコピー数を増大させることで、またはゲノム中へのクローン遺伝子の複数の組み込みにより、追加的コピーを宿主細胞中に導入してもよい）；遺伝子がプラスミド由来であるかまたは宿主細胞のゲノム中に組み込まれているかどうか；合成外来性タンパク質の最終的細胞内所在；宿主生物中のタンパク質翻訳および正しい折りたたみの効率；宿主細胞中のクローン遺伝子のmRNAおよびタンパク質の固有の安定性；およびその使用頻度が宿主細胞の好ましいコドン使用頻度に近くなるようなクローン遺伝子中のコドン使用頻度。これらのそれぞれを本明細書に記載される方法および宿主細胞中で使用して、6デサチュラーゼの発現をさらに最適化してもよい。

40

【0122】

例えば6デサチュラーゼの発現は、mRNAまたはコードされたタンパク質のどちらかから不安定配列を除去/消去して、またはmRNAに安定化配列を付加して（米国特許第4,910,141号明細書）、より強力なプロモーター（調節または構成のどちらか）の使用を通じて発現増大を引き起こし、転写レベルで増大できる。代案としては、単一

50

発現構築物中で追加的コピーをクローニングすることによって；またはプラスミドコピー数を増大させることにより、またはゲノム中へのクローン遺伝子の複数の組み込みにより追加的コピーを宿主細胞中に導入することによって、6 デサチュラーゼ遺伝子の追加的コピーを組み換え宿主細胞中に導入し、それによって P U F A 産生と蓄積を増大させてもよい。

【 0 1 2 3 】

プロモーター、6 デサチュラーゼ読み取り枠 [「 O R F 」]、およびターミネーターを含んでなる、少なくとも1つのキメラ遺伝子を含んでなる組み換え構築物を作り出した後、それを宿主細胞中で自律複製できるプラスミドベクターに入れ、または宿主細胞のゲノムに直接組み込む。発現カセットの組み込みは宿主ゲノム内で無作為に起きることができ、または宿主遺伝子座内の遺伝子組み換えを標的とするのに十分な宿主ゲノムとの相同性領域を含有する構築物の使用を通じて標的を定めることができる。構築物が内在性遺伝子座を標的とする場合、全てまたはいくつかの転写および翻訳調節領域が、内在性遺伝子座によって提供できる。

10

【 0 1 2 4 】

2つ以上の遺伝子が別個の複製ベクターから発現される場合、各ベクターが異なる選択手段を有し、その他の構築物との相同性を欠いて、安定した発現を保ち、構築物間の要素の再集合を妨げる。全ての導入された遺伝子が、所望の生成物の合成を提供するのに必要なレベルで発現されるように、調節領域の賢明な選択、導入された構築物の選択手段および増殖法は、実験的に判定できる。

20

【 0 1 2 5 】

対象の遺伝子を含んでなる構築物は、あらゆる標準技術によって微生物宿主細胞に導入されてもよい。これらの技術としては、形質転換（例えば酢酸リチウム形質転換（*Methods in Enzymology*, 194: 186~187頁（1991年）））、微粒子銃衝撃、電気穿孔、マイクロインジェクション、真空濾過または宿主細胞中に關心のある遺伝子を導入するその他のあらゆる方法が挙げられる。

【 0 1 2 6 】

便宜上、例えば発現カセット中に D N A 配列を取り込むようにあらゆる方法によって操作されている宿主細胞を「形質転換された」または「形質転換体」または「組み換え」と本明細書で称する。形質転換された宿主は発現構築物の少なくとも1つのコピーを有して、遺伝子がゲノム中に組み込まれるか、増幅されるか、または複数コピーを有する染色体外要素上に存在するかどうか次第で、2つ以上を有するかもしれない。

30

【 0 1 2 7 】

形質転換された宿主細胞は、導入された構築物上に含有されるマーカーの選択によって同定できる。代案としては、多くの形質転換技術が多くの D N A 分子を宿主細胞中に導入する場合、所望の構築物と共に別個のマーカー構築物を同時形質転換してもよい。

【 0 1 2 8 】

典型的には、形質転換された宿主は、選択的培地上で増殖するそれらの能力について選択され、選択培地には抗生物質が組み込まれていてもよく、または栄養素または成長因子などの非形質転換宿主の増殖に必要な要素が欠如していてもよい。導入されたマーカー遺伝子は、形質転換された宿主中で発現すると抗生物質抵抗性を与え、または必須成長因子または酵素をコードしてもよく、それによって選択培地上での増殖を可能にしてもよい。発現したマーカータンパク質を直接または間接に検出し得る場合にもまた、形質転換された宿主を選択し得る。追加的選択技術は、米国特許第7, 238, 482号明細書、米国特許第7, 259, 255号明細書、および国際公開第2006/052870号パンフレットに記載される。

40

【 0 1 2 9 】

形質転換に続いて、本6 デサチュラーゼ（場合により宿主細胞内で同時発現されるその他の P U F A 酵素）に適した基質が、宿主によって天然にまたは遺伝子導入的に生成されてもよく、またはそれらは外来的に提供されてもよい。

50

【0130】

選択される宿主または発現構築物が何であれ、複数の形質転換体をスクリーニングして所望の発現レベル、制御、およびパターンを示す株を得なくてはならない。例えば Jur et zekら (Yeast, 18:97~113 (2001年)) は、ヤロウシア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 中の組み込まれた DNA 断片の安定性が、使用される個々の形質転換体、受容者株、および標的プラットフォームに左右されると述べた。このようなスクリーニングは、DNA プロットのサザン分析 (Southern, J. Mol. Biol., 98:503 (1975年))、mRNA 発現のノーザン分析 (Kroczek, J. Chromatogr. Biomed. Appl., 618 (1~2):133~145 (1993年))、タンパク質発現のウェスタン分析、PUFA 生成物の表現型分析または GC 分析によって達成されてもよい。

10

【0131】

細菌、酵母、藻類、ストラメノパイル、卵菌類、ユーグレナ属およびノまたは真菌をはじめとする多様な真核生物が、それによって本明細書に記載される 6 デサチュラーゼを含んでなる形質転換体を生じる宿主として適切である。これは転写、翻訳、およびタンパク質合成装置が高度に保存されていることから考察される。したがって適切な宿主は、広い温度および pH 値範囲にわたり、単純または複合糖質、脂肪酸、有機酸、油、グリセロール、およびアルコール、およびノまたは炭化水素をはじめとする多様な原材料上で増殖するものを含んでもよい。

20

【0132】

好ましい微生物宿主は、油性生物である。これらの油性生物は自然に油を合成および蓄積でき、総油分は乾燥細胞重量の約 25% を超え、より好ましくは乾燥細胞重量の約 30% を超え、最も好ましくは乾燥細胞重量の約 40% を超え得る。様々な細菌、藻類、ユーグレナ属、コケ、真菌、酵母、およびストラメノパイルが自然に油性に分類される。別の実施態様では、例えば サッカロミセス・セレヴィシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) などの酵母非油性生物を遺伝子改変して、油性にし得る。

【0133】

より好ましい実施態様では、微生物宿主細胞は油性酵母である。油性酵母として典型的に同定される属としては、ヤロウシア (*Yarrowia*)、カンジダ (*Candida*)、ロドトルラ (*Rhodotorula*)、ロドスポリジウム (*Rhodosporidium*)、クリプトコッカス (*Cryptococcus*)、トリコスポロン (*Trichosporon*)、およびリポマイセス (*Lipomyces*) が挙げられるが、これに限定されるものではない。より具体的には例証的な油合成酵母としては、ロドスポリジウム・トルロイデス (*Rhodosporidium torulooides*)、リポマイセス・スターケイ (*Lipomyces starkeyi*)、L. リポフェラス (*lipoferus*)、カンジダ・レブカウフィ (*Candida revkaufi*)、C. プリケリーマ (*pulcherrima*)、C. トロピカリス (*tropicalis*)、C. ユチリス (*utilis*)、トリコスポロン・プランズ (*Trichosporon pullans*)、T. クタネウム (*cutaneum*)、ロドトルラ・グルチヌス (*Rhodotorula glutinus*)、R. グラミニス (*graminis*)、およびヤロウシア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) (以前カンジダ・リポリチカ (*Candida lipolytica*) に分類された) が挙げられる。最も好ましいのは油性酵母ヤロウシア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) であり、さらなる実施態様で最も好ましいのは ATCC # 20362、ATCC # 8862、ATCC # 18944、ATCC # 76982 およびノまたは LGAMS (7) 1 と称される Y. リポリティカ (*lipolytica*) 株である (Papanikolaou S., および Aggelis G., Bioresour. Technol. 82 (1):43~9頁 (2002年))。

30

40

【0134】

油性酵母 (すなわちヤロウシア・リポリティカ (*Yarrowia lipolyti*

50

c a)) の形質転換に応用できる特定の教示としては、米国特許第 4 , 8 8 0 , 7 4 1 号明細書および米国特許第 5 , 0 7 1 , 7 6 4 号明細書、および Chen , D . C . ら (Appl . Microbiol . Biotechnol . , 4 8 (2) : 2 3 2 ~ 2 3 5 (1 9 9 7 年)) が挙げられる。Y . リポリティカ (Y . lipolytica) 中で GLA、ARA、EPA および DHA 産生を導くのに応用できる特定の教示は、それぞれ米国特許出願第 1 1 / 1 9 8 9 7 5 号明細書 (国際公開第 2 0 0 6 / 0 3 3 7 2 3 号パンフレット)、米国特許出願第 1 1 / 2 6 4 7 8 4 号明細書 (国際公開第 2 0 0 6 / 0 5 5 3 2 2 号パンフレット)、米国特許出願第 1 1 / 2 6 5 7 6 1 号明細書 (国際公開第 2 0 0 6 / 0 5 2 8 7 0 号パンフレット)、および米国特許出願第 1 1 / 2 6 4 7 3 7 号明細書 (国際公開第 2 0 0 6 / 0 5 2 8 7 1 号パンフレット) に提供される。

10

【 0 1 3 5 】

この酵母中で遺伝子を発現する好ましい方法は、宿主ゲノム中への線状 DNA 組み込みによるものであり；遺伝子の高レベル発現が所望される場合、ゲノム中の複数位置への組み込みが特に有用であり得る [例えば Ura3 遺伝子座 (GenBank 登録番号 AJ306421)、Leu2 遺伝子座 (GenBank 登録番号 AF260230)、Lys5 遺伝子座 (GenBank 登録番号 M34929)、Aco2 遺伝子座 (GenBank 登録番号 AJ001300)、Pox3 遺伝子座 (Pox3 : GenBank 登録番号 XP_503244 ; または Aco3 : GenBank 登録番号 AJ001301)、12 デサチュラーゼ遺伝子座 (米国特許第 7 , 2 1 4 , 4 9 1 号明細書)、Lip1 遺伝子座 (GenBank 登録番号 Z50020)、Lip2 遺伝子座 (GenBank 登録番号 AJ012632)、SCP2 遺伝子座 (GenBank 登録番号 AJ431362)、Pex3 遺伝子座 (GenBank 登録番号 CAG78565)、Pex16 遺伝子座 (GenBank 登録番号 CAG79622) および / または Pex10 遺伝子座 (GenBank 登録番号 CAG81606)]。

20

【 0 1 3 6 】

ヤロウシア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) で使用される好ましい選択方法は、カナマイシン、ハイグロマイシン、およびアミノグリコシド G418 に対する抵抗性、ならびにウラシル、ロイシン、リジン、トリプトファンまたはヒスチジンが欠如している培地上で増殖する能力である。別の実施態様では、酵母 Ura⁻ 突然変異体を選択するために 5 - フルオロオロト酸 (5 - フルオロウラシル - 6 - カルボン酸一水和物 ; 「 5 - FOA 」) が使用され (米国特許出願公開第 2 0 0 9 - 0 0 9 3 5 4 3 - A 1 号明細書)、または形質転換体を選択するためにスルホニル尿素除草剤抵抗性を与える天然アセトヒドロキシ酸シンターゼ (またはアセト乳酸シンターゼ ; E . C . 4 . 1 . 3 . 1 8) が利用される (国際公開第 2 0 0 6 / 0 5 2 8 7 0 号パンフレット)。部位特異的リコンビナーゼシステムの使用によって、複数逐次形質転換で使用するために好ましい選択マーカーのペアを「再利用する」ユニークな方法もまた、米国特許出願公開第 2 0 0 9 - 0 0 9 3 5 4 3 - A 1 号明細書で教示される。

30

【 0 1 3 7 】

上記に基づいて、本明細書では、

40

(a)

(i) 少なくとも 1 つの制御配列と作動的に連結した、6 デサチュラーゼポリペプチドをコードする第 1 の組み換えヌクレオチド分子、および

(ii) LA および / または ALA からそれぞれ構成されるデサチュラーゼ基質源を含んでなる油性酵母 (例えばヤロウシア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica)) を提供するステップと；

(b) 適切な発酵性炭素源の存在下でステップ (a) の酵母を増殖させて、6 デサチュラーゼポリペプチドをコードする遺伝子が発現し、それぞれ LA が GLA に変換されおよび / または ALA が STA に変換されるステップと；

(c) ステップ (b) の GLA および / または STA がそれぞれ回収されていてもよい

50

ステップ

を含んでなる、G L AまたはS T Aのどちらかをそれぞれ生成する方法が開示される。

【0138】

基質供給が必要とされるかもしれない。好ましい実施態様では、6デサチュラーゼポリペプチドは配列番号2で記載されてもよい。したがって例えば6デサチュラーゼポリペプチドをコードする遺伝子のヌクレオチド配列は、配列番号1または配列番号46（配列番号1と比較して少なくとも227個のコドンがヤロウィア（*Yarrowia*）中での発現のために最適化される）で記載されてもよい。

【0139】

天然では油性酵母中で生成されるP U F Aは、18：2脂肪酸（すなわちL A）と、一般的ではないが18：3脂肪酸（すなわちA L A）に限定されるので、油性酵母を遺伝子改変し、本明細書に記載される6デサチュラーゼに加えて長鎖P U F A生合成に必要な複数酵素を発現させて（それによって例えばA R A、E P A、D P A、およびD H Aを生成できるようにして）もよい。

【0140】

具体的には本明細書では、

(a) 少なくとも1つの制御配列と作動的に連結した、6デサチュラーゼポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドを含んでなる第1の組み換えDNA構築物；および

(b) 少なくとも1つの制御配列と作動的に連結した、4デサチュラーゼ、5デサチュラーゼ、9デサチュラーゼ、12デサチュラーゼ、15デサチュラーゼ、17デサチュラーゼ、8デサチュラーゼ、9エロンガーゼ、C_{14/16}エロンガーゼ、C_{6/18}エロンガーゼ、C_{18/20}エロンガーゼ、およびC_{20/22}エロンガーゼからなる群から選択されるポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドを含んでなる少なくとも1つの追加的組み換えDNA構築物を含んでなる油性酵母が考察される。

【0141】

その他の好適な微生物宿主としては、油性細菌、藻類、鞭毛生物、ストラメノパイル（*Stramenopiles*）、卵菌綱（*Oomycetes*）、およびその他の真菌が挙げられ、この広範な微生物宿主群の中で特に興味深いのは、-3/-6脂肪酸を合成する微生物（またはこの目的のために遺伝子改変できるもの〔例えばサッカロミセス・セレヴィシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）などのその他の酵母〕）である。したがって例えば（A R A生産のために商業利用される）モルティエラ・アルピナ（*Mortierella alpina*）を誘導性プロモーターまたは調節プロモーター制御下にある本6デサチュラーゼ遺伝子のいずれかによって形質転換し、G L A合成量が増大した形質転換体生物を生じることができ、G L AはC_{18/20}エロンガーゼおよび5デサチュラーゼの同時発現によってA R Aにさらに変換できる。M・アルピナ（*M. alpina*）の形質転換法は、Mackenzieら（*Appl. Environ. Microbiol.*, 66:4655（2000年））に記載される。同様にヤブレッツボカビ目（*Thraustochytriales*）微生物（例えばスラウストキトリウム（*Thraustochytrium*）、シゾキトリウム（*Schizochytrium*））の形質転換法は、米国特許第7,001,772号明細書で開示される。

【0142】

本明細書に記載される6デサチュラーゼ発現のために選択される宿主に関わりなく、所望の発現レベルおよびパターンを示す株を得るために複数形質転換体をスクリーニングしなくてはならない。このようなスクリーニングは、DNAプロットのサザン分析（*Southern, J. Mol. Biol.*, 98:503（1975年））、mRNA発現のノーザン分析（*Kroczyk, J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 618（1-2）:133-145（1993年））、タンパク質発現のウェスタンおよび/またはE l i s a分析、P U F A生成物の表現型分析またはG C分析によって達

10

20

30

40

50

成されてもよい。

【0143】

本 6 デサチュラーゼの配列知識は、様々な宿主細胞中で - 3 および / または - 6 脂肪酸合成を操作する上で有用であろう。生化学的経路を操作する方法は当業者によく知られており、油性酵母中、特にヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 中において、- 3 および / または - 6 脂肪酸合成を最大化するために、多数の操作が可能であることが予期される。この操作は、PUFA 合成経路中の代謝エンジニアリング、または炭素から PUFA への合成経路に寄与する経路の追加的操作を必要とするかもしれない。望ましい生化学的経路のアップレギュレート、および望ましくない生化学的経路のダウンレギュレートに有用な方法は、当業者に良く知られている。

10

【0144】

例えばエネルギーまたは炭素について - 3 および / または - 6 脂肪酸合成経路と競合する生化学的経路、または特定の PUFA 最終産物の生成を妨げる天然 PUFA 合成経路酵素を遺伝子破壊によって排除し、またはその他の手段により (例えばアンチセンス mRNA) ダウンレギュレートしてもよい。

【0145】

GLA、ARA、EPA または DHA を増大させる手段としての PUFA 合成経路中の操作 (およびその関連技術) の詳細な考察は、それぞれ国際公開第 2006/033723 号パンフレット、国際公開第 2006/055322 号パンフレット [米国特許出願公開第 2006-0094092-A1 号明細書]、国際公開第号パンフレット 2006/052870 [米国特許出願公開第 2006-0115881-A1 号明細書]、および国際公開第 2006/052871 号パンフレット [米国特許出願公開第 2006-0110806-A1 号明細書] にあり、TAG 合成経路および TAG 分解経路 (およびその関連技術) において望ましい操作についても同様である。

20

【0146】

上述の戦略いずれか 1 つによって、脂肪酸合成経路の発現を調節することが有用かもしれない。例えば本明細書では - 3 および / または - 6 脂肪酸を生成するために、6 デサチュラーゼ / 6 エロンガーゼ合成経路中の鍵酵素をコードする遺伝子を油性酵母中に導入する方法が提供される。本 6 デサチュラーゼ遺伝子を - 3 および / または - 6 脂肪酸合成経路を天然に有さない油性酵母中で発現して、これらの遺伝子の発現を連係させることは、宿主生物の代謝工学のための様々な手段を使用して、好ましい PUFA 生成物の生成最大化するために特に有用である。

30

【0147】

形質転換された微生物宿主細胞は、キメラ遺伝子の発現 (例えばデサチュラーゼ、エロンガーゼ) を最適化する条件下で増殖させて、最大かつ最も経済的な所望の PUFA 収率を生じさせる。一般に最適化されてもよい培地条件としては、炭素源のタイプおよび量、窒素源のタイプおよび量、炭素対窒素比、異なる無機イオン量、酸素レベル、増殖温度、pH、バイオマス生成相の長さ、油蓄積相の長さ、および細胞収穫時間および方法が挙げられる。油性酵母 (例えばヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*)) などの関心のある微生物は、一般に複合培地 (例えば酵母菌抽出物 - ペプトン - デキストロス液体培地 (YPD)) で、または増殖に必要な構成要素が欠如することで所望の発現カセットの選択を強要する合成最少培地 (例えば DIFCO Laboratories, Detroit, MI) からの酵母菌窒素ベース) 上で増殖させる。

40

【0148】

本発明中の発酵培地は、適切な炭素源を含有しなくてはならない。適切な炭素源については米国特許第 7,238,482 号明細書で教示される。本明細書の方法で利用される炭素源は、多種多様な炭素含有源を包含してもよいことが考察されるが、好ましい炭素源は、糖 (例えば、グルコース)、グリセロール、および / または脂肪酸である。

【0149】

50

窒素は、無機（例えば $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ）または有機（例えば尿素またはグルタミン酸）原料から供給されてもよい。適切な炭素および窒素源に加えて、発酵培地はまた、油性宿主の増殖と、PUFA産生に必須の酵素的経路の促進とに適することが当業者に知られている、適切なミネラル、塩、補助因子、緩衝液、ビタミン、およびその他の構成要素を含有しなくてはならない。脂質およびPUFAの合成を促進するいくつかの金属イオン（例えば Fe^{+2} 、 Cu^{+2} 、 Mn^{+2} 、 Co^{+2} 、 Zn^{+2} 、 Mg^{+2} ）が注目されている（Nakahara, T.ら, *Ind. Appl. Single Cell Oils*, D. J. KyleおよびR. Colin, eds. pp 61~97 (1992年)）。

【0150】

好ましい増殖培地は、一般的な酵母窒素ベース（DIFCO Laboratories, Detroit, MI）などの商業的調製培地である。その他の合成（defined）または合成（synthetic）増殖培地もまた使用してもよく、形質転換宿主細胞の増殖に適した培地は、微生物学または発酵化学の当業者に知られている。発酵に適したpH範囲は典型的に約pH4.0~pH8.0の間であり、初期増殖条件のための範囲としてpH5.5~pH7.5が好ましい。発酵は好気性または嫌気性条件下で実施してもよく、微好気条件が好ましい。

10

【0151】

代謝状態は増殖と脂肪の合成/保存との間で「平衡状態」でなくてはならないので、典型的に油性酵母細胞中のPUFAの高レベルの蓄積は、二段階過程を必要とする。したがって最も好ましくは、油性酵母（例えばヤロウイア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*））中でのPUFA生成のために二段階発酵過程が必要である。このアプローチは米国特許第7,238,482号明細書に記載され、様々な適切な発酵過程デザイン（すなわちバッチ、流加、および連続）および増殖中の配慮についても同様である。

20

【0152】

PUFAは、宿主微生物中に遊離脂肪酸として、またはアシルグリセロール、リン脂質、スルホ脂質または糖脂質などのエステル化形態として存在してもよく、当該技術分野で良く知られている多様な手段を通じて宿主細胞から抽出されてもよい。酵母脂質の抽出技術、品質分析、および合格基準の1つの総説は、Z. Jacobs (*Critical Reviews in Biotechnology*, 12 (5/6): 463~491頁 (1992年)) によるものであるA. SinghおよびO. Ward (*Adv. Appl. Microbiol.*, 45: 271~312頁 (1997年)) による後処理プロセスに関する簡潔な概要もまた入手できる。

30

【0153】

一般にPUFA精製のための手段としては、有機溶剤による抽出（例えば米国特許第6,797,303号明細書、および米国特許第5,648,564号明細書）、超音波処理、超臨界流体抽出（例えば二酸化炭素を使用する）、鹼化、および圧搾などの物理的手段、またはそれらの組み合わせが挙げられる。追加的詳細については、米国特許第7,238,482号明細書の教示を参照されたい。

【0154】

- 3および/または - 6脂肪酸、特に例えばALA、GLA、ARA、EPA、DPA、およびDHAが組み込まれた多数の食品および飼料製品がある。

40

【0155】

長鎖PUFAを含んでなる微生物バイオマス、PUFAを含んでなる部分的に精製された微生物バイオマス、PUFAおよび/または精製PUFAを含んでなる精製微生物油は、食品および飼料製品中で機能して、現行の調合物に健康上の利点を与えることが考察される。より具体的には - 3および/または - 6脂肪酸を含有する油は、類似食品、肉製品、穀物製品、ベーカリー食品、スナック食品、および乳製品をはじめとするが、これに限定されるものではない、多様な食品および飼料製品中での使用に適する（より詳しくは米国特許出願公開第2006-0094092号明細書を参照されたい）。

50

【0156】

さらに調合物中で本組成物を使用して、医療栄養物、健康補助食品、乳児用調製粉乳ならびに医薬品をはじめとするメディカルフードに健康上の利点を与えてもよい。食品加工および食品調合の当業者は、本油の一定量および組成物をどのように食品または飼料製品に添加してもよいかを理解するであろう。このような量は本明細書で「有効」量と称され、食品または飼料製品、栄養補給することが意図される食餌、またはメディカルフードまたは医療栄養物が矯正または治療することが意図される疾患によって決まる。

【実施例】

【0157】

本発明が具体的に完成することを例証するがその可能なバリエーションの全てを完全に定義するものではない、以下の実施例において本発明についてさらに詳述する。

10

【0158】

一般方法

実施例で使用する標準組み換えDNAおよび分子クローニング技術は、当該技術分野でよく知られており、1.) Sambrook, J., Fritsch, E. F. および Maniatis, T., 「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1989年) (Maniatis); 2.) T. J. Silhavy, M. L. Bannan, および L. W. Enquist, 「Experiments with Gene Fusions」、Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1984年); および 3.) Ausubel, F. M. ら, 「Current Protocols in Molecular Biology」、Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (Hoboken, NJ) による出版 (1987年) で述べられる。

20

【0159】

微生物培養の維持および増殖に適した材料および方法は、当該技術分野でよく知られている。以下の実施例で使用するのに適した技術については、次で述べられている。Phillipp Gerhardt, R. G. E. Murray, Ralph N. Costilow, Eugene W. Nester, Willis A. Wood, Noel R. Krieg, および G. Briggs Phillips 編, 「Manual of Methods for General Bacteriology」、American Society for Microbiology, Washington, D. C. (1994年)、または Thomas, D. Brock, 「Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology」、第2版、Sinauer Associates: Sunderland, MA (1989年)。微生物細胞の増殖および維持のために使用される全ての試薬制限酵素および材料は、特に断りのない限り、Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI)、DIFCO Laboratories (Detroit, MI)、GIBCO/BRL (Gaithersburg, MD)、または Sigma Chemical Company (St. Louis, MO) から得た。大腸菌 (E. coli) XL-2 細胞 (カタログ番号 200150) は Stratagene (San Diego, CA) から購入され; 大腸菌 (E. coli) 株は典型的にルリア・ベルターニ (LB) プレート上で 37 で増殖させた。

30

40

【0160】

一般分子クローニングは、標準法に従って実施された (Sambrook ら、前出)。オリゴヌクレオチドは、Sigma-Genosys (Spring, TX) によって合成された。DNA 配列は、ベクターおよび挿入断片特異的プライマーの組み合わせを使用して、染料ターミネーター技術 (米国特許第 5, 366, 860 号明細書; 欧州特許第 272, 007 号明細書) を使用して、ABI 自動配列決定装置上で作り出された。配列編

50

集はシーケンチャー (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI) 内で実施された。全ての配列は、双方向に少なくとも2回のカバレッジに相当する。遺伝子配列の比較は、DNASTARソフトウェア (DNASTAR Inc.、Madison, WI) を使用して達成された。

【0161】

略語の意味は次のとおり。「sec」は秒を意味し、「min」は分を意味し、「h」または「hr」は時間を意味し、「d」は日を意味し、「 μ L」はマイクロリットルを意味し、「mL」はミリリットルを意味し、「L」はリットルを意味し、「 μ M」はマイクロモル濃度を意味し、「mM」はミリモル濃度を意味し、「M」はモル濃度を意味し、「mmol」はミリモルを意味し、「 μ mole」マイクロモルを意味し、「g」はグラムを意味し、「 μ g」はマイクログラムを意味し、「ng」はナノグラムを意味し、「U」は単位を意味し、「bp」は塩基対を意味し、「kB」はキロ塩基を意味する。

10

【0162】

発現カセット命名法

発現カセットの構造は簡易表記体系「X::Y::Z」で表され、Xはプロモーター断片を表し、Yは遺伝子断片を表し、Zはターミネーター断片を表し、それらは全て互いに作動的に連結している。

【0163】

ヤロウシア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) の形質転換および培養：

20

ATCC登録番号#20362、#76982、および#90812のヤロウシア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 株は、American Type Culture Collection (Rockville, MD) から購入された。ヤロウシア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 株は、典型的に下に示すレシピに従ったいくつかの培地中で28~30 で増殖させた。寒天プレートは必要に応じて、標準法に従って各液体培地に20g/Lの寒天を添加して調製した。

【0164】

YPD寒天培地 (1Lあたり) : 10gの酵母抽出物 [Difco] ; 20gのBactoペプトン [Difco] ; および20gのグルコース。

30

【0165】

基本最少培地 (MM) (1Lあたり) : 20gグルコース ; 1.7gアミノ酸非含有酵母窒素ベース ; 1.0gプロリン ; およびpH6.1 (調節なし)。

【0166】

最少培地 + ターゲットール (MMT) (1Lあたり) : MM培地を上記のように調製して0.2% (wt/vol) ターゲットールを添加する。

【0167】

最少培地 + 5 - フルオロオロト酸 (MM + 5 - FOA) (1Lあたり) : 20gグルコース ; 6.7g酵母窒素ベース ; 75mgウラシル ; 75mgウリジンおよび100mg/L ~ 1000mg/Lの様々な濃度範囲に対するFOA活性試験に基づく適量のFOA (Zymo Research Corp., Orange, CA) (供給元から受領された各パッチには変動があるため)。

40

【0168】

Y・リポリティカ (*Y. lipolytica*) の形質転換は、参照によって本明細書に援用する米国特許出願公開第2009-0093543-A1号明細書に記載されるように実施した。

【0169】

ヤロウシア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) の脂肪酸分析：脂肪酸分析のために、Bligh, E.G. およびDyer, W.J. (Can. J. Biochem. Physiol., 37: 911~917頁 (1959年)) で述べら

50

れているように、遠心分離によって細胞を収集して脂質を抽出した。ナトリウムメトキシドによる脂質抽出物のエステル交換によって脂肪酸メチルエステル〔「FAMES」〕を調製し(Roughan, G., およびNishida, I., Arch. Biochem. Biophys., 276(1): 38~46頁(1990年)), 引き続いて30mm×0.25mm(内径)HP-INNOWAX(Hewlett-Packard)カラムを装着したHewlett-Packard 6890 GCで分析した。オープン温度は、3.5 /分で170 (25分間保持)から185 であった。

【0170】

直接塩基エステル交換のために、ヤロウイア(Yarrowia)細胞(0.5mL培養物)を収集して蒸留水で1回洗浄し、Speed-Vac内で5~10分間真空乾燥させた。ナトリウムメトキシド(100μLの1%)および既知量のC15:0トリアシルグリセロール(C15:0TAG; カタログ番号T-145, Nu-CheckPrep, Elysian, MN)をサンプルに添加し、次にサンプルをボルテックスして50で30分間振盪した。3滴の1M NaClおよび400μLのヘキサンを添加した後、サンプルをボルテックスして遠沈した。上層を除去して、GCによって分析した。

【0171】

GC分析を通じて記録されたFAMEピークは、既知の脂肪酸との比較でそれらの滞留時間によって同定され、FAMEピーク面積を既知量の内部基準(C15:0TAG)と比較することで定量化された。したがってあらゆる脂肪酸FAME〔「μg FAME」〕の近似量(μg)は、式、(特定の脂肪酸のFAMEピーク面積/標準FAMEピーク面積)^{*}(標準C15:0 TAGのμg)に従って計算され、1μgのC15:0 TAGは0.9503μgの脂肪酸に等しいので、あらゆる脂肪酸の量(μg)〔「μg FA」〕は、式、(特定の脂肪酸のFAMEピーク面積/標準FAMEピーク面積)* (標準C15:0 TAGのμg)*0.9503に従って計算される。換算係数0.9503はほとんどの脂肪酸について測定された値の近似であり、それは0.95~0.96の範囲にわたることに留意されたい。

【0172】

TFAの重量%として個々の各脂肪酸量を要約する脂質プロファイルは、個々のFAMEピーク面積を全てのFAMEピーク面積の和で除して100を乗じて判定される。

【0173】

実施例1

ポルフィリジウム・クルエンツム(Porphyridium cruentum)cDNAライブラリーの構築

本実施例は、全RNAの調製およびポリ(A)+RNAの単離に続く、BD-Clontech CreatorTM SmartTM cDNAライブラリーキット(カタログ番号K1053-1, Mississauga, ON, Canada)を使用した、ポルフィリジウム・クルエンツム(Porphyridium cruentum)のcDNAライブラリーの構築について記載する。

【0174】

具体的にはP.クルエンツム(P. cruentum)CCMP 1328株の培養物をThe Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton(Boothbay Harbor, Maine)から購入した。細胞をBeckman GH3.8ローター内で3750rpmで10分間遠心分離してペレット化した、2×0.6mLのTrizol試薬(Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA)に再懸濁した。再懸濁された細胞をそれぞれ0.6mLの0.5mmガラスビーズを含有する2本の2mLスクリーキャップ管に移した。Biospecミニビーズピーター(Bartlesville, OK)の均質化設定で、細胞を2分間均質化した。管を短時間遠心分離してビーズを沈降させた。液体を2本の新しい1.5mL微量遠心管に移し、各管に0.2mLクロロホルム/イソアミルアルコール(24:1)を添加し

10

20

30

40

50

た。管を1分間手で振って3分間静置した。次に管を4 および14, 000 rpmで10分間遠心分離した。上層を2本の新しい管に移した。イソプロピルアルコール(0.5 mL)を各管に添加した。管を室温で15分間インキュベートし、14, 000 rpmおよび4 で10分間の遠心分離がそれに続いた。ペレットを各1 mLの(RNase非含有水で作った)75%エタノールで洗浄して風乾した。次に全RNAサンプルを500 µlのRNase非含有水に再溶解した。

【0175】

Qiagen oligoTex mRNAミニキット(カタログ番号70022; Valencia, CA)を使用して、製造業者のプロトコルに従って全RNAサンプルからポリ(A)+RNAを単離した。全RNAサンプルを500 µlの緩衝液OBBおよび55 µlのoligoTex懸濁液と混合した。混合物を70 で3分間インキュベートし、室温で10分間放冷した。次にそれをエッペンドルフ微量遠心管内で14, 000 rpmで2分間遠心分離した。上清を廃棄した。ペレットを400 µl緩衝液OW2に再懸濁して、キットで提供されるスピンカラムにロードした。カラムを1.5 mL微量遠心管に入れ、エッペンドルフ微量遠心管内で14, 000 rpmで1分間遠心分離した。カラムを新しい1.5 mL微量遠心管に移して、400 µLの緩衝液OW2をカラムに入れた。再度14, 000 rpmで1分間遠心分離した後、カラムを新しいRNaseフリー1.5 mL微量遠心管に移した。70 に予熱した20 µl緩衝液OEBを添加してポリ(A)+RNAをカラムから溶出させ、14, 000 rpmで1分間の遠心分離がそれに続いた。溶出ステップを1回繰り返し2つの溶出サンプルを合わせた。

10

20

【0176】

BD-Clontech Creator™ Smart™ cDNAライブラリーキット(以前のカタログ番号K1053-1; カタログ番号634903とも示される)中のLD-PCR法、および0.1 µgのpoly A(+)RNAサンプルを使用してcDNAを作り出した。具体的には第一鎖cDNA合成のために、2本の1.5 mL微量遠心管中で、1 µlのポリ(A)+RNAサンプルと、1 µlのSMART IVオリゴヌクレオチド(配列番号9)および1 µlのCDS I I I / 3' PCRプライマー(配列番号10)とを混合した。混合物を72 で2分間加熱して、氷上で2分間冷却した。各管に以下を添加した。2 µlの第一鎖緩衝液、1 µlの20 mM DTT、1 µlの10 mM dNTPミックス、および1 µlのPowerscript逆転写酵素。混合物を42 で1時間インキュベートして、氷上で冷却した。

30

【0177】

第一鎖cDNA合成混合物をPCR反応のためのテンプレートとして使用した。具体的には反応混合物は以下を含有した。2 µlの第一鎖cDNA混合物、2 µlの5'-PCRプライマー(配列番号11)、2 µlのCDS I I I / 3'-PCRプライマー(配列番号10)、80 µlの水、10 µlの10x Advantage 2 PCR緩衝液、2 µlの50x dNTPミックス、および2 µlの50x Advantage 2 ポリメラーゼミックス。2つの反応混合物を調製した。サーモサイクラー条件をGenAmp 9600装置上で95 で20秒間、続いて15サイクルの95 で5秒間および68 で6分間に設定した。アガロースゲル電気泳動法および臭化エチジウム染色によってPCR産物を定量した。

40

【0178】

Qiagen PCR精製キットでPCR産物を精製した。各反応混合物で、PCR産物と500 µlの緩衝液PBとを混合した。混合物をスピンカラムにロードして、14, 000 rpmで1分間遠心分離した。カラムを0.75 mLの緩衝液PEで洗浄し、14, 000 rpmで1分間遠心分離した。次にカラムをもう一度14, 000 rpmで1分間遠心分離した。カラムに50 µlの水を添加してcDNAサンプルを溶出し、カラムを室温で1分間静置して、カラムを14, 000 rpmで1分間遠心分離した。2つのサンプルを合わせた。

【0179】

50

引き続き精製されたcDNAをSfiIで消化した(79µlのcDNAを10µlの10×SfiI緩衝液、10µlのSfiI酵素、および1µlの100×BSAと混合し、混合物を50℃で2時間インキュベートした)。キシレンシアノール染料(2µlの1%)を添加した。次に製造業者の手順に正確に従って、Creator™Smart™cDNAライブラリーキットで提供されるChroma Spin-400カラム上で混合物を分画した。カラムから収集された画分をアガロースゲル電気泳動法によって分析した。cDNAを含有する最初の3つの画分をプールして、cDNAをエタノールで沈殿させた。沈殿したcDNAを7µlの水に再溶解し、Creator™Smart™cDNAライブラリーキットで提供されるpDNR-LIBにライゲートした。

【0180】

10

実施例 2

ポルフィリジウム・クルエンツム(*Porphyridium cruentum*) 6
デサチュラーゼのクローニング

紅藻、ポルフィリジウム・クルエンツム(*Porphyridium cruentum*)の脂肪酸プロファイルは、EDAおよびGLAの双方の存在を示し(Siran, D.ら, *Lipids*, 31(12):1277(1996年))、この藻類中のEPAの生合成が、6デサチュラーゼ/6エロンガーゼ経路および/または9エロンガーゼ/8デサチュラーゼ経路のどちらか、または双方を利用するかもしれないことを示唆する。本生物から8デサチュラーゼをクローンする目的で、縮重プライマーを使用してデサチュラーゼ様タンパク質の内部部分を単離した。

20

【0181】

ポルフィリジウム・クルエンツム(*Porphyridium cruentum*)デサ
チュラーゼ様タンパク質の内部部分をコードするPCR産物のクローニングおよび配列決定

既知の6および8デサチュラーゼ中の高度に保存されたアミノ酸領域に対して作成された縮重PCRプライマーを使用して、デサチュラーゼの内部断片をクローンした。このためにLASERGENEバイオインフォマティクス演算スイート(DNA STAR Inc., Madison, WI)のMegAlign™v6.1プログラムを使用して、フェオダクナム・トリコルナタム(*Phaeodactylum tricorntum*) (GenBank登録番号AAL92563 [gi_19879689]; 配列番号37)、ヒメツリガネゴケ(*Physcomitrella patens*) (GenBank登録番号CAA11033 [gi_3790209]; 配列番号38)、ゼニゴケ(*Marchantia polymorpha*) (GenBank登録番号AAT85661 [gi_50882491]; 配列番号39)、およびモルティエラ・アルピナ(*Mortierella alpina*) (GenBank登録番号AAL73947 [gi_18483175]; 配列番号40)からの6デサチュラーゼ、およびミドリムシ(*Euglena gracilis*) (GenBank登録番号AAD45877 [gi_5639724]; 配列番号41)からの8デサチュラーゼを配列比較した。このアラインメントの比較の一部を図2に示し; 縮重プライマーは、図2に示す保存アミノ酸配列の枠線内領域とアニールするようにデザインされた。具体的には上流縮重プライマー523(配列番号12)、524(配列番号13)、および525(配列番号14)が、保存アミノ酸配列WQQMGWL(S/A)HD(配列番号15)に対して作成された。下流縮重プライマー526(配列番号16)および527(配列番号17)が保存アミノ酸配列HHL(W/F)P(T/S)(M/L)PRHN(配列番号18)に対して作成されたのに対し、下流縮重プライマー528(配列番号19)および529(配列番号20)は保存アミノ酸配列GGL(N/H)YQIEHH(配列番号21)に対して作成された。

30

40

【0182】

ポルフィリジウム・クルエンツム(*Porphyridium cruentum*) c
DNAライブラリー(実施例1)をテンプレートとして、表4に記載される上流および下

50

流縮重プライマーの様々な組み合わせを使用して、4つの個々のPCR反応を実施した。

【0183】

表4

推定上のデサチュラーゼを単離するために実施される縮重PCR反応

【表4】

PCR反応	上流縮重プライマー	下流縮重プライマー	予期されるPCR産物のサイズ
#1	523および524 (プール)	526および527 (プール)	約700bp
#2	523および524 (プール)	528および529 (プール)	約700bp
#3	525	526および527 (プール)	約700bp
#4	525	528および529 (プール)	約700bp

10

【0184】

LA TaqTM DNAポリメラーゼ (〒520-2193 滋賀県大津市タカラバイオ株式会社; カタログ番号TAK_RR002M) を使用して、製造業者の使用説明書のとおりPCRを実施した。サーモサイクラー条件は、95 で1分間、続いて30サイクルの95 で1分間、55 で1分間、72 で1分間、続いて72 で10分間の最終延長であった。PCR産物をアガロースゲルで分離し、全反応で観察された予測される約700bpのPCR断片を切り出して、GeneCleanキット (Qbiogene, Carlsbad, CA; カタログ番号1001-600) を使用して精製し、TOPO-TAクローニングキット (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA; カタログ番号K4530-20) で提供されるpCR4-TOPOベクターにクローンした。ライゲーションを大腸菌 (*E. coli*) XL-2細胞 (Stratagene) に形質転換した。

20

【0185】

T3 (配列番号22) およびT7 (配列番号23) プライマーを使用して、6つの形質転換体からのプラスミドDNA中のクローンされたPCR産物を配列決定した。6つの全ての内部配列、すなわち縮重上流および下流プライマー領域を含まない配列は互いに類似していた。より具体的には6つの全ての内部配列の比較からは、それらが合計17の異なる残基で異なることが明らかにされた (その内サイレント突然変異は5つのみ)。いずれの2つのクローンも同一の変異残基を有さず、変異型の多くがおそらくPCRの誤りに起因することが示唆された。ポルフィリジウム・クルエンツム (*Porphyridium cruentum*) クローンの1つの693bpの配列は、配列番号51で示される。

30

【0186】

翻訳配列を使用してBLAST「nr」タンパク質データベース中に含有される配列との類似性を検索する、National Center for Biotechnology Information [「NCBI」] BLASTP 2.2.18 (protein-protein Basic Local Alignment Search Tool; Altschulら, *Nucleic Acids Res.*, 25: 3389~3402 (1997年); およびAltschulら, *FEBS J.*, 272: 5101~5109 (2005年)) を実施することで、配列番号51のアイデンティティを判定した。「nr」データベース中に含有される全ての公的に入手可能なタンパク質配列との類似性について、配列を分析した。クローンされたP・クルエンツム (*P. cruentum*) 配列との (相同性に基づく) 最良のヒットは、モルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) 6デサチュラーゼ (Genbank登録番号AAF08685.1; 配列番号24) であった。

40

【0187】

推定上のデサチュラーゼの3'末端のクローニング

推定上のデサチュラーゼの3'末端をクローンするために、上でクローンされたPCR

50

産物の内部配列を使用して、3' 入れ子PCRのためにPCRプライマー（すなわちプライマー535 [配列番号25] およびプライマー536 [配列番号26]）に特異的な順方向遺伝子をデザインした。

【0188】

このようにして、実施例1からのポルフィリジウム・クルエンツム (*Porphyridium cruentum*) cDNAライブラリーをテンプレートとして、遺伝子特異的プライマー535 (配列番号25) およびCDS I I I / 3' PCRプライマー (配列番号10; 配列5' - ATTCTAGAGGCCGAGGCCGGCCGACATG - d(T)₃₀ (A/G/C)N - 3' を有するCDS I I I / 3' PCRプライマーはBD - Clontech Creator™ Smart™ cDNAライブラリーキット (カタログ番号K1053-1; Mississauga, ON, Canada) 中で提供される) を含んでなるプライマーペアを使用して、PCRを上述のように実施した。次に遺伝子特異的プライマー536 (配列番号26) およびCDS I I I / 3' PCRプライマー (配列番号10) を含んでなるプライマーペアを使用して、PCR反応生成物に第2のネステッドPCR反応を施した。PCR反応は1%アガロースゲル上で実施した。

10

【0189】

予測されたサイズ (およそ500bp) のPCR産物を切り出してGeneCleanキット (Qbiogene) を使用して精製し、TOPO TAクローニングキット (Invitrogen) 中で提供されるpCR4-TOPOベクターにライゲートした。ライゲートしたDNAを大腸菌 (*E. coli*) XL-2細胞 (Stratagene) に形質転換した。6つの個々の形質転換体のプラスミドDNAから、クローンされたPCR産物を配列決定した。1つのクローンからの410bp配列を配列番号52として示す。

20

【0190】

全ての配列のアラインメントからは、おそらくはPCRの誤りに起因する5位の変異型ヌクレオチド残基が明らかにされた。

【0191】

推定上のデサチュラーゼの5'末端のクローニング

5' RACEキット (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA; カタログ番号18374-058) を使用して、製造業者の使用説明書のとおり推定上のデサチュラーゼcDNA 5'末端をクローンした。このために上でクローンされたPCR産物の内部配列を使用して、逆方向遺伝子特異的PCRプライマー (すなわちプライマー533 [配列番号27]、プライマー534 [配列番号28]、およびプライマー537 [配列番号29]) をデザインした。後者は5' RACEキット中のAUAAPプライマー (配列番号30) と共に機能するようにデザインされた。

30

【0192】

遺伝子特異的プライマー533 (配列番号27) およびポルフィリジウム・クルエンツム (*Porphyridium cruentum*) 全RNA (実施例1) をテンプレートとして使用し、キットを使用して第一鎖cDNAを合成した。製造業者の使用説明書のとおり、第一鎖cDNAをRNaseで処理してS.N.A.P. カラムによって精製し、TdTでtailを付加した。

40

【0193】

キットで提供される順方向AAPプライマー (配列番号31、配列5' - GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIIGGGIIIGGGIIIG - 3' を有する、式中I = デオキシイノシン) および逆方向遺伝子特異的プライマー534 (配列番号28) を使用して、tailを付加したcDNAをテンプレートとして使用してcDNAの5'末端を増幅した。PCR反応は1%アガロースゲル上で実施した。

【0194】

予測されるサイズ (約800bp) に対応する薄いバンドが観察された。キットの説明書のとおり、500~1000bpの全ての断片を切り出してGeneCleanキット (Qbiogene) を使用して精製し、順方向AUAAPプライマー (配列番号30)

50

および逆方向遺伝子特異的プライマー537（配列番号29）を使用した、第2の入れ子5' RACEのためのテンプレートとして使用した。PCR反応は1%アガロースゲル上で実施した。

【0195】

全てのPCR産物を切り出してGeneCleanキット（Qbiogene）を使用して精製し、TOPO TAクローニングキット（Invitrogen）で提供されるpCR4-TOPOベクターにライゲートした。ライゲートを大腸菌（E. coli）XL-2細胞（Stratagene）に形質転換した。5つの個々の形質転換体からのプラスミドDNAから、クローンPCR産物を配列決定した。配列のアラインメントから5つの配列の内4つが同一であることが明らかにされた。この822bpの配列を配列番号53として示す。

10

【0196】

第5の配列は、配列番号53との比較で3個のミスマッチ（すなわちA441G、C653T、およびG722A；H125GおよびL196F突然変異をもたらす）を有した；しかし配列中のこの矛盾もまたおそらくPCRの誤りに起因することが推測された。

【0197】

推定上のデサチュラーゼの5'末端（配列番号53）、内部（配列番号51）、および3'末端（配列番号52）配列を電子的にアセンブルして、完全長DNA配列（配列番号1）を作り出した。

【0198】

全長デサチュラーゼcDNAのクローニング

推定上のデサチュラーゼの5'末端、内部、および3'末端は、誤り耐性でないLATAaqTTMDNAポリメラーゼ（タカラバイオ株式会社）を使用して得られたので、全長デサチュラーゼは、誤り耐性PfuUltraTMHigh-Fidelity DNAポリメラーゼ（Stratagene, San Diego, CA；カタログ番号600380）を使用してPCRによってクローンした。このためには、製造業者の使用説明書のとおり、上述の推定上のデサチュラーゼクローンの5'および3'末端配列に基づいてデザインされた上流プライマー539（配列番号32）および下流プライマー540（配列番号33）を使用して、テンプレートとしての実施例1からのポルフィリジウム・クルエンツム（*Porphyridium cruentum*）cDNAライブラリー上でPCRを実施した。予測されるサイズ（約1470bp）のPCR産物を切り出して、GeneCleanキット（Qbiogene）を使用して精製した。

20

30

【0199】

ヤロウシア（*Yarrowia*）発現プラスミドpY91は、NcoI-NotI消化によるキメラゼブラフィッシュ（*Danio rerio*）6デサチュラーゼ[「DrD6」]遺伝子の切除に続いて、プラスミドpY91M（配列番号34；米国特許出願公開第2006-0115881-A1号明細書に記載される）から誘導される。次にクローンされたORFが、ヤロウシア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）FBAINプロモーター（米国特許公開第7,202,356号明細書）およびヤロウシア（*Yarrowia*）Pex20遺伝子のPex20ターミネーター配列（GenBank登録番号AF054613）と作動的に連結するように、in-fusionクローニングによって、推定上の全長ポルフィリジウム・クルエンツム（*Porphyridium cruentum*）デサチュラーゼを含んでなる1470bpのPCR産物をpY91のNcoIおよびNotI部位の間にライゲートする（In-FusionTMPCRクローニングキット、カタログ番号631774；Clontech, Mountain View, CA）。

40

【0200】

ライゲートしたDNAを大腸菌（E. coli）XL-2細胞（Stratagene）に形質転換した。プラスミドDNAの制限分析からは、7つの形質転換体の内6つが予測されたSalI/BglII断片を有することが明らかにされた。これらのプラスミド

50

の内3つ(すなわちミニブレップ#1、#2、および#4)の中のクローンされたcDNA ORF挿入断片を集合的にpY109と命名した。上流および下流配列決定プライマー373(配列番号35)および507(配列番号36)をそれぞれ使用して、ORFを配列決定した。

【0201】

3つのcDNA配列のアラインメントからは、pY109 #1とpY109 #4が同一である一方、pY109 #2が6ヌクレオチド残基の違いを有し、その内5個はアミノ酸置換をもたらすことが明らかにされた。変異残基A591Tがサイレント突然変異であったのに対し、変異残基C494T、T785C、T980C、C1052T、およびA1118Gは、S165L、L262S、I327T、A351V、およびH373Rアミノ酸変異型をもたらした。(列挙される各置換[例えばA591T]では、第1の文字はpY109 #1中のヌクレオチドまたはアミノ酸残基に相当する一方、第2の文字はpY109 #2中の同一位置に見られるヌクレオチドまたはアミノ酸残基に相当し、すなわちA591Tが591位におけるpY109 #1中のアデニンからpY109 #2中のチミンへの変化を示す一方で、S165Lは165位におけるpY109 #1中のセリンからのpY109 #2中のロイシンへの変化を示す)。H373R変異は高度に保存された残基である。

10

【0202】

プラスミドpY109 #1中のポルフィリジウム・クルエンツム(Porphyrindium cruentum) 6デサチュラーゼORF(「PcD6」と称する)の1416個のヌクレオチド配列を配列番号1に示す一方、配列番号1に対応する471個の推定アミノ酸配列は配列番号2として示す。キメラFBAIN::PcD6::Pex20遺伝子、ならびにColE1プラスミド複製起点、大腸菌(E. coli)中での選択のためのアンピシリン-抵抗性遺伝子(Amp^R)、大腸菌(E. coli)f1複製起点、ヤロウシア(Yarrowia)自律複製配列(ARS18; GenBank登録番号A17608)、およびヤロウシア(Yarrowia)Ura3遺伝子(GenBank登録番号AJ306421)を含んでなるプラスミドpY109 #1(配列番号4)を図3に示す。

20

【0203】

プラスミドpY109 #2中のポルフィリジウム・クルエンツム(Porphyrindium cruentum) 6デサチュラーゼORF(「PcD6*」と称する)中の1416個のヌクレオチド配列を配列番号42に示す一方、配列番号42に相当する推定471個のアミノ酸配列は配列番号43として示す。pY109 #2のヌクレオチド配列は、配列番号45として提供される。

30

【0204】

デフォルトパラメーター(expect threshold=10; word size=3; scoring parameters matrix=BLOSUM62; gap costs: existence=11; extension=1)を使用して、BLAST「nr」タンパク質配列データベース中に含有される配列との類似性に対するNCBIのBLASTP 2.2.18検索(全ての非重複性GenBankCDS翻訳、Brookhavenタンパク質データベース(PDB)からの三次元構造から誘導される配列、SWISS-PROTタンパク質配列データベースの最新の主要公開に含まれる配列、WGSプロジェクトからの環境サンプルを除いたPIRおよびPRFを含んでなる)によって、PcD6(配列番号2)のアミノ酸配列を評価した。それに対して配列番号2が最大の類似性を有する配列を要約するBLASTP比較の結果を%同一性、%類似性、および期待値に準じて報告する。「%同一性」は、2つのタンパク質間で同一であるアミノ酸の百分率と定義される。「%類似性」は、2つのタンパク質間で同一であるまたは保存されているアミノ酸の百分率と定義される。「期待値」は、完全に偶発的にこの大きさのデータベース検索において期待される特定スコアを有するマッチ数を規定して、マッチの統計学的有意さを推定する。

40

50

【0205】

したがってクエリー配列としてPcD6（すなわち配列番号2）の全長アミノ酸配列を使用したBLASTP検索の結果は、それがモルティエラ・アルピナ（*Mortierella alpina*）6脂肪酸デサチュラーゼ（GenBank登録番号AAF08685.1）と期待値5e-91で40%の同一性および57%の類似性を共有することを示した。さらにPcD6は、モルティエラ・イザベリナ（*Mortierella isabellina*）の6デサチュラーゼ（GenBank登録番号AAL73948.1）と39%の同一性および57%の類似性を共有する。

【0206】

6デサチュラーゼ酵素に普遍的に見られる3個のヒスチジンボックス（すなわちH(X)₃₋₄H（配列番号3および4）、H(X)₂₋₃HH（配列番号5および6）、およびH/Q(X)₂₋₃HH（配列番号7および8））は、配列番号2中に存在することが確認された。具体的には配列番号2のアミノ酸残基198~202はHis-Asp-Phe-Leu-His [またはHDFLH；配列番号48]であり；アミノ酸残基235~239はHis-Asn-His-His-His [またはHNHHH；配列番号49]であり；アミノ酸残基416~420はGln-Ile-Glu-His-His [またはQIEHH；配列番号50]である。

10

【0207】

実施例3

推定上のポルフィリジウム・クルエンツム（*Porphyridium cruentum*）6デサチュラーゼORFの特性解析

20

それぞれキメラFBAIN：：ポルフィリジウム・クルエンツム（*Porphyridium cruentum*）6デサチュラーゼ：：Pex20遺伝子を含んでなるプラスミドpY109 #1（配列番号44）およびpY109 #2（配列番号45）を様々なヤロウシア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）株に形質転換した。GC分析は、pY109 #1中のPcD6（配列番号1および2）が発現時にLAをGLAに能動的に不飽和化できることを実証した。

【0208】

ヤロウシア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）Y2224株およびL103株の単離

30

米国特許出願公開第2007-0292924-A1号明細書の実施例13に記載されるようにして、Y2224株（野生型ヤロウシア（*Yarrowia*）ATCC#20362株のUra3遺伝子の自律突然変異からのFOA抵抗性突然変異体）を単離した。

【0209】

米国特許出願公開第2006-0115881-A1号明細書の実施例18に記載されるようにして、総脂肪酸[「TFA」]の百分率として47%のALAを産生するL103株を作り出した。この株遺伝子型は、野生型ヤロウシア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）ATCC#20362との比較で次のとおりであった。Ura3-、3コピーのキメラFBAIN：：FmD15：Lip2遺伝子（FmD15はフザリウム・モニリフォルメ（*Fusarium moniliforme*）15デサチュラーゼ遺伝子である；米国特許出願公開第2005-0132442-A1号明細書もまた参照されたい）、2コピーのキメラGPD：：FmD15：XPR遺伝子および1コピーのキメラFBAIN：：FmD12：：Lip2遺伝子（FmD12はF・モニリフォルメ（*F. moniliforme*）12デサチュラーゼ遺伝子である；米国特許第7,504,259号明細書もまた参照されたい）。

40

【0210】

形質転換および増殖

標準酢酸リチウム法によって、プラスミドpY109 #1およびpY109 #2（実施例2から、それぞれPcD6およびPcD6*を含んでなる）をヤロウシア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）Y2224株およびヤロウシア・リ

50

ポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) L103株に形質転換する。

【0211】

MMプレート上で3日間増殖させることで、URA原栄養株を選択した。各株の4つの個々の形質転換体を新鮮なMMプレート上に画線塗抹して30℃で一晩インキュベートし、3mL MMに接種するのに使用した。Y2224およびL103対照株の四連の培養物を同様に調製した。30℃の振盪機内で一晩の増殖後、細胞を収集し、各0.5mMの最終脂肪酸濃度でEDAとETRAとの混合物を含有するMMT (MM+ターゲット) に再懸濁した。増殖を24時間継続させた。細胞を収集してNP-40 (カタログ番号127087-87-0; Sigma, St. Louis, MO) および蒸留水で洗浄した。総脂質を抽出してエステル交換した。FAMEを一般方法に記載されるようにGCによって分析した。

10

【0212】

各株の4つの形質転換体の脂肪酸組成、ならびに平均脂肪酸組成を下の表に示す。脂肪酸は16:0、18:0、18:1 (n-9)、18:2 (n-6)、GLA (18:3 n-6)、ALA (18:3 n-3)、STA (18:4 n-3)、EDA (20:2 n-6)、DGLA (20:3 n-6)、ARA (20:4 n-6)、ETRA (20:3 n-3)、ETA (20:4 n-3)、およびEPA (20:5 n-3)と同定された。転換効率(「CE」と略記する)は([生成物]/[基盤+生成物])*100と計算される。したがって「6CE」はGLA/(LA+GLA)*100と計算され、対照的に「8CE」は、DGLA/(EDA+DGLA)*100と計算される。

20

【0213】

表5

ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 形質転換体中の脂肪酸組成 (%総脂肪酸)

【 表 5 】

表 5 ヤロウイア・リポリライカ (Yarrowia lipolytica) 形質転換体中の脂肪酸組成 (%総脂肪酸)

宿主	アラスミド	形質 転換#	16:0	16:1 n-11	18:0	18:1 n-9	18:2 n-6	GLA 18:3 n-6	ALAI 8:3 n-3	17:1	STAI 8:4 n-3	EDA 20:2 n-6	DGLA 20:3 n-6	ARA 20:4 n-6	ETrA 20:3 n-3	ETA 20:4 n-3	EPA2 0:5 n-3	Δ6 CE	Δ8 CE
Y2224		1	16.5	13.4	4.5	47.0	9.6	3.3	0.0	0.7	0.0	2.2	0.3	0.0	2.7	0.0	0.0	25.4	12.3
		2	15.9	12.7	4.5	48.1	9.6	3.0	0.0	0.7	0.0	2.2	0.2	0.0	3.1	0.0	0.0	23.7	8.5
		3	17.0	12.9	4.9	47.3	9.4	3.3	0.0	0.6	0.0	1.9	0.3	0.0	2.5	0.0	0.0	25.7	12.2
		4	17.0	13.2	4.8	47.4	9.1	3.1	0.0	0.7	0.0	1.9	0.2	0.0	2.8	0.0	0.0	25.2	11.1
		平均	16.6	13.0	4.7	47.4	9.4	3.1	0.0	0.7	0.0	2.1	0.3	0.0	2.7	0.0	0.0	25.0	11.0
L103		5	11.8	7.5	4.6	31.6	14.5	0.0	24.1	0.4	0.0	1.9	0.2	0.0	3.4	0.0	0.0	0.2	8.5
		6	12.0	7.8	4.0	26.5	15.2	0.0	28.0	0.4	0.0	2.1	0.2	0.0	3.9	0.0	0.0	0.0	9.9
		7	12.0	7.7	4.2	30.9	15.3	0.0	24.4	0.3	0.0	1.9	0.2	0.0	3.1	0.0	0.0	0.1	8.2
		8	12.0	7.5	4.3	29.5	16.4	0.0	24.1	0.4	0.0	2.1	0.2	0.0	3.4	0.0	0.0	0.1	9.6
		平均	12.0	7.6	4.3	29.6	15.3	0.0	25.1	0.4	0.0	2.0	0.2	0.0	3.4	0.0	0.0	0.1	9.1

10

20

30

40

【 0 2 1 4 】

50

比較のために、さらにYPD中で1日間、それに続きMMT中で1日間増殖させた野性型ヤロウシア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) ATCC # 20362株の脂肪酸組成 (TFAの%として) は、7.9%の16:0、14.2%の16:1 (n-11)、1.2%の18:0、50.0%の18:1 (n-9)、および25.1%の18:2 (n-6) である。GLAは野性型ATCC # 20362中で不在である。

【0215】

ヤロウシア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) Y2224株のpY109 #1形質転換体中のGLAの存在は、Y109 #1中のPcD6 ORF (配列番号1) によってコードされる6デサチラーゼ活性の徴候である。より具体的にはpY109 #1 (配列番号44) 形質転換体は、Y・リポリティカ (*Y. lipolytica*) Y2224株中で発現すると25%の6デサチラーゼ転換効率を有する。この転換効率は、コドン最適化および導入遺伝子の染色体組み込みによって改善されることが予測される。

10

【0216】

対照的に、Y・リポリティカ (*Y. lipolytica*) L103株 (Y2224株の誘導体) のpY109 #2形質転換体中のGLAの不在は、Y109 #2 (配列番号45) 中のPcD6*ORF (配列番号42) によってコードされる6デサチラーゼ活性の欠如の徴候である。これはpY109 #1中で発現されるPcD6配列と比較した、PcD6*中の5個のアミノ酸残基の違いに起因する見込みが高い。

20

【0217】

pY109 #1およびpY109 #2形質転換体双方の中の痕跡量のDGLAの存在は、双方が痕跡量の8デサチラーゼ活性を有することを示唆する。しかし外来性脂肪酸混合物中の痕跡量のDGLA汚染のために、それが本物なのか、またはバックグラウンドレベルのDGLAに起因する人工産物であるのかは明白でない。

【0218】

要約すれば、この実験データは、ルフィリジウム・クルエンツム (*Porphyridium cruentum*) 6デサチラーゼ (すなわちPcD6、配列番号1および2に記載される) が、ヤロウシア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 中で発現すると、LAをGLAに能動的に不飽和化することを実証する。

30

【0219】

実施例4

ヤロウシア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) のためにコドン最適化された6デサチラーゼ遺伝子 (PcD6S) の合成

国際公開第2004/101753号パンフレットおよび米国特許第7,125,672号明細書に記載されるのと同様の方法で、ヤロウシア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 中での発現のために、ポルフィリジウム・クルエンツム (*Porphyridium cruentum*) の6デサチラーゼ遺伝子 [「PcD6」] のコドン使用頻度を最適化する。具体的にはヤロウシア (*Yarrowia*) コドン使用頻度パターン (米国特許第7,125,672号明細書)、「ATG」翻訳開始コドン周辺の共通配列、およびRNA安定性原則 (Guhaniyogi, G. および J. Brewer, Gene, 265 (1~2): 11~23 (2001年)) に従って、コドン最適化6デサチラーゼ遺伝子 (「PcD6S」と称される) がPcD6 (配列番号1) のコード配列に基づいてデザインされる。翻訳開始部位の修飾に加えて、1416bpのコード領域の248bp (17.5%) が修飾され227コドン (48.1%) が最適化される。NcoI部位およびNotI部位は、翻訳開始コドン周囲、およびPcD6S (配列番号46) 停止コドンの後ろにそれぞれ組み込まれるであろう。コドン最適化遺伝子によってコードされるタンパク質配列は、野生型タンパク質配列 (すなわち配列番号2) と同一であろう。デザインされたPcD6S遺伝子はGenScript Corporation (Piscataway, NJ) によって合成され、pUC57 (Gen

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2009/052289

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
INV.	C12N15/53	C12N9/02 C12N15/81 C12P7/64		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, FSTA, Sequence Search				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
Y	WO 2004/101753 A (DU PONT [US]; PICATAGGIO STEPHEN K [US]; ZHU QUINN QUN [US]) 25 November 2004 (2004-11-25) page 53 - page 55; example 4 page 59 - page 61; examples 7,8 claims page 2, paragraph 2	1-14		
X	WO 02/081668 A (ABBOTT LAB [US]) 17 October 2002 (2002-10-17) sequences 13,14	1		
	-/--			
<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 : <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="vertical-align: top;"> *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document 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 </td> <td style="vertical-align: top;"> *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 </td> </tr> </table>			*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document 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
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document 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		
1 October 2009		14/10/2009		
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Le Cornec, Nadine		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/052289

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>COHEN ZVI ET AL: "Fatty acid unsaturation in the red alga Porphyridium cruentum: Is the methylene interrupted nature of polyunsaturated fatty acids an intrinsic property of the desaturases?" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol: 1344, no. 1, 1997, pages 59-64, XP002548096 ISSN: 0006-3002 page 60, right-hand column, paragraph 3. page 61; table 1 page 62; figure 1</p>	1-14
Y	<p>KHOZIN INNA ET AL: "Elucidation of the biosynthesis of eicosapentaenoic acid in the microalga Porphyridium cruentum: II. Studies with radiolabeled precursors" PLANT PHYSIOLOGY (ROCKVILLE), vol. 114, no. 1, 1997, pages 223-230, XP002334259 ISSN: 0032-0889 the whole document</p>	1-14
A	<p>WO 2007/136671 A (DU PONT [US]; DAMUDE HOWARD GLENN [US]; POLLAK DANA M WALTERS [US]; XU) 29 November 2007 (2007-11-29) claims; examples</p>	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2009/052289

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. type of material
- a sequence listing
- table(s) related to the sequence listing
- b. format of material
- on paper
- in electronic form
- c. time of filing/furnishing
- contained in the international application as filed
- filed together with the international application in electronic form
- furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2009/052289

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004101753 A	25-11-2004	BR PI0410510 A	20-06-2006
		CA 2522692 A1	25-11-2004
		EP 1620542 A2	01-02-2006
		JP 2007504838 T	08-03-2007
		KR 20060018833 A	02-03-2006
WO 02081668 A	17-10-2002	AU 2002309482 A2	21-10-2002
		BR 0205508 A	03-05-2005
		CA 2435685 A1	17-10-2002
		EP 1392823 A2	03-03-2004
		JP 2005503770 T	10-02-2005
		MX PA03006663 A	31-05-2004
WO 2007136671 A	29-11-2007	CA 2647215 A1	29-11-2007
		CN 101448947 A	03-06-2009
		EP 2021478 A2	11-02-2009
		EP 2035560 A2	18-03-2009
		US 2007292924 A1	20-12-2007
		US 2007277266 A1	29-11-2007
		WO 2007136877 A2	29-11-2007

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I			テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 1	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19		
C 1 2 P 7/64 (2006.01)	C 1 2 P	7/64		

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100093300

弁理士 浅井 賢治

(74)代理人 100119013

弁理士 山崎 一夫

(74)代理人 100123777

弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100111501

弁理士 滝澤 敏雄

(72)発明者 ヤダフ ナレンドラ エス

アメリカ合衆国 デラウェア州 1 9 8 0 3 ウィルミントン タックアウェイ ドライヴ 1 2 6

(72)発明者 シュー ジーション

アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 1 9 3 1 7 - 9 7 2 8 チャッツ フォード ハーヴェイ レーン 1 1 1

(72)発明者 ズー クン

アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 1 9 3 8 2 ウェスト チェスター リヴィア ロード 5 4 4

(72)発明者 ザン ホンシャン

アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 1 9 3 1 7 チャッツ フォード ロザーフィールド レーン 3 8 0 8

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA05 BA08 CA04 CA20 DA06 GA11

4B050 CC03 DD13 LL05

4B064 AD89 CA02 CA19 CC24 DA01 DA10

4B065 AA26X AA88Y AB01 AC14 CA13 CA41 CA44