

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5123861号
(P5123861)

(45) 発行日 平成25年1月23日(2013.1.23)

(24) 登録日 平成24年11月2日(2012.11.2)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A
C 12 N 9/10	(2006.01)	C 12 N 9/10	
C 12 N 1/19	(2006.01)	C 12 N 1/19	
C 12 P 7/64	(2006.01)	C 12 P 7/64	

請求項の数 9 (全 104 頁)

(21) 出願番号 特願2008-542346 (P2008-542346)
 (86) (22) 出願日 平成18年11月16日 (2006.11.16)
 (65) 公表番号 特表2009-517019 (P2009-517019A)
 (43) 公表日 平成21年4月30日 (2009.4.30)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2006/044480
 (87) 國際公開番号 WO2007/061742
 (87) 國際公開日 平成19年5月31日 (2007.5.31)
 審査請求日 平成21年11月10日 (2009.11.10)
 (31) 優先権主張番号 60/739,989
 (32) 優先日 平成17年11月23日 (2005.11.23)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 390023674
 イ・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、デラウエア州、ウイルミ
 ントン、マーケット・ストリート 100
 7
 (74) 代理人 100127926
 弁理士 結田 純次
 (74) 代理人 100140132
 弁理士 竹林 則幸
 (74) 代理人 100091731
 弁理士 高木 千嘉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Δ 9 エロンガーゼおよびそれらの多価不飽和脂肪酸製造における使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 9 エロンガーゼ活性を有し、クラスタル V 法のアラインメントに基づいて配列番号 2 または配列番号 5 で記載されるアミノ酸配列と比べると少なくとも 95 % のアミノ酸同一性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列を含んでなる単離された核酸配列。

(b) 9 エロンガーゼ活性を有するポリペプチドをコードし、BLASTN 法のアラインメントに基づいて配列番号 1、配列番号 3、配列番号 4 または配列番号 6 で記載されるヌクレオチド配列と比べると少なくとも 95 % の配列同一性を有する、ヌクレオチド配列を含んでなる单離された核酸配列、および

(c) (a) または (b) のヌクレオチド配列と同数のヌクレオチドからなりそれと 100 % 相補的である、前記ヌクレオチド配列の相補体
 よりなる群から選択される单離されたポリヌクレオチド。

【請求項 2】

ポリペプチドのアミノ酸配列が、クラスタル V 法のアラインメントに基づいて配列番号 2 または配列番号 5 と比べると少なくとも 95 % のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列を含む、9 エロンガーゼポリペプチド。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の单離された核酸配列を含んでなる单離された形質転換宿主細胞。

【請求項 4】

10

20

a) i) 9エロンガーゼ活性を有し、クラスタルV法のアライメントに基づいて配列番号2または配列番号5で記載されるアミノ酸配列と比べると少なくとも95%のアミノ酸同一性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列を含んでなる単離された核酸配列、

および

ii) リノール酸および -リノレン酸よりなる群から選択される少なくとも1つの基質脂肪酸の源

を含んでなる単離された形質転換酵母宿主細胞を提供し、

b) ステップ(a)の形質転換酵母宿主細胞を、9エロンガーゼ活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列が発現されそして少なくとも1つの基質脂肪酸がエイコサジエン酸およびエイコサトリエン酸よりなる群から選択される少なくとも1つの生成物脂肪酸に転換される条件下で生育させ、そして

c) 場合によりステップ(b)の少なくとも1つの生成物脂肪酸を回収することを含んでなる多価不飽和脂肪酸の製造方法。

【請求項5】

9エロンガーゼ活性を有するポリペプチドが配列番号2または配列番号5を含む、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

【請求項6】

ヌクレオチド配列が配列番号1、配列番号3、配列番号4または配列番号6を含む、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

【請求項7】

宿主細胞が油性酵母である、請求項3に記載の形質転換宿主細胞。

【請求項8】

油性酵母がヤロウイア(Yarrowia)spである、請求項7に記載の形質転換宿主細胞。

【請求項9】

ポリペプチドのアミノ酸配列が配列番号2または配列番号5を含む、請求項2に記載の9エロンガーゼポリペプチド。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【0001】

本出願は、参照によって全体を本明細書に援用する2005年11月23日に出願された米国仮特許出願第60/739,989号明細書の利益を主張する。

【技術分野】

【0002】

本発明は、生物工学の分野にある。より具体的には、本発明は、9脂肪酸エロンガーゼ酵素をコードする核酸断片の同定、および長鎖多価不飽和脂肪酸(PUFA)の製造におけるこれらのエロンガーゼの使用に関する。

【背景技術】

【0003】

PUFAの重要性には議論の余地がない。例えば特定のPUFAは健康な細胞の重要な生物学的構成要素であり、哺乳類では新規(de novo)合成できず、その代わりに食餌中で得なくてはならず、またはリノール酸(LA、18:2 - 6)または -リノレン酸(ALA、18:3 - 3)のさらなる不飽和化および延長によって送達されなくてはならない「必須」脂肪酸として、リン脂質またはトリアシルグリセロールなどの形態であってもよい細胞の原形質膜の構成物として、(特に発達中の幼児の脳における)適切な発達、組織形成および修復のために必要なものとして、哺乳類における重要ないくつかの生物学的に活性なエイコサノイド前駆物質(例えばプロスタサイクリン、エイコサノイド、ロイコトリエン、プロスタグランジン)として認識される。さらに長鎖-3PUFAの大量摂取は、心臓血管保護効果を有する(非特許文献1、非特許文献2、非特許文献3)。

10

20

30

40

50

文献 3、非特許文献 4)。その他の多数の研究が、-3 および / または -6 P U F A の投与によって得られる、多様な症状および疾患(例えは喘息、乾癬、湿疹、糖尿病、癌)に対する多岐にわたる健康上の利点を実証している。

【0004】

今日、植物、藻類、菌・カビ、および酵母をはじめとする多様な異なる宿主が、商業的 P U F A 生産の手段として調査されている。宿主生物の天然の P U F A 產生能力は所定の技法に特異的な場合もあるが、遺伝子操作もまた、いくつかの宿主の天然の能力(天然には L A および A L A 脂肪酸產生に限定されるものでさえ)を実質的に増強でき、高レベルの様々な長鎖 -3 / -6 P U F A を生成させることが証明されている。この効果が天然の能力の結果、または組み換え技術の結果であるかにかかわらず、アラキドン酸 [A R A ; 20 : 4 - 6]、エイコサペンタエン酸 [E P A ; 20 : 5 - 3]、およびドコサヘキサエン酸 [D H A ; 22 : 6 - 3] の生成は全て 9 エロンガーゼ / 8 デサチュラーゼ経路(ユーチュレナ種などのいくつかの生物中で作動して、エイコサジエン酸 [E D A ; 20 : 2 - 6] および / またはエイコサトリエン酸 [E T r A ; 20 : 3 - 3] の生成によって特徴づけられる)、または 6 デサチュラーゼ / 6 エロンガーゼ経路(主に藻類、コケ、菌・カビ、線形動物、およびヒトに見られ、-リノール酸 [G L A ; 18 : 3 - 6] および / またはステアリドン酸 [S T A ; 18 : 4 - 3] の生成によって特徴づけられる)のどちらかの発現を必要とする(図 1)。

【0005】

ここでの目的では、本出願は、9 エロンガーゼ / 8 デサチュラーゼ経路の使用、より具体的には 9 エロンガーゼ酵素の使用に着目する。これまでに同定されたほとんどの 9 エロンガーゼ酵素は、L A を E D A にそして A L A を E T r A に転換する能力の双方を有する(8 デサチュラーゼによる反応に続いて、D G L A および E T A が引き続いてそれぞれ E D A および E T r A から合成され、5 デサチュラーゼによる反応に続いて、A R A および E P A が引き続いてそれぞれ D G L A および E T A から合成される。D H A 合成は、引き続く追加的な C₂₀ / C₂₂ エロンガーゼおよび 4 デサチュラーゼの発現を必要とする)。

【0006】

A R A、E P A、および D H A の生成のための新しい方法に対する必要にもかかわらず、わずかな 9 エロンガーゼ酵素しか同定されていない。例えば出願人らの本発明に先だって、唯一の 9 エロンガーゼが現在知られている。具体的には特許文献 1、特許文献 2、特許文献 3、および特許文献 4 が、イソクリシス・ガルバナ (I s o c h r y s i s g a l b a n a) からの 9 エロンガーゼおよびその使用について述べる(ジェンバンク登録番号 A A L 3 7 6 2 6 もまた参照されたい)。したがって -3 / -6 脂肪酸の生成で使用するための多様な宿主生物における異種性発現に適した、9 エロンガーゼをコードする追加的遺伝子の同定および単離に対する必要性がある。

【0007】

過去に同定されているエロンガーゼは、それらが作用する基質に関して異なる。それらは動物および植物の双方に存在する。哺乳類に見られるものは、飽和、一不飽和、および多価不飽和脂肪酸に作用できる。しかし植物に見られるものは、飽和および一不飽和脂肪酸に特異的である。したがって植物中で P U F A を生成するための P U F A 特異的エロンガーゼに対する必要がある。

【0008】

植物中の鎖長延長過程は、二酸化炭素分子の放出を伴うマロン酸と脂肪酸の縮合の重要な段階に始まる 4 段階過程を伴う。脂肪酸延長における基質は C o A - チオエステルである。縮合段階は 3 - ケトアシルシンターゼによって媒介され、これは一般に 4 つの反応サイクル全体の律速段階であり、いくつかの基質特異性が提供される。1 つの延長サイクルの生成物は、炭素原子 2 個分延長された脂肪酸を再生する(非特許文献 5、非特許文献 6)。

【0009】

10

20

30

40

50

8 デサチュラーゼと併せて 9 エロンガーゼを発現することの有用性に基づいて、様々な供給源から 8 デサチュラーゼを同定して特性決定するためのかなりの努力がなされている。これまでのほとんどの努力は、ミドリムシ (*Euglena gracilis*) からの 8 デサチュラーゼの単離と特性決定に着目しており、ミドリムシ (*E. gracilis*) 8 デサチュラーゼのいくつかの配列変異が報告されている（例えば非特許文献 7、特許文献 5、特許文献 6、特許文献 4；2005年6月24日に出願された特許文献 7（2006年2月2日公開の特許文献 8 および特許文献 9）を参照されたい）。より最近では、2005年4月22日公開の特許文献 10 が、パブロバ・サリナ (*Pavlova salina*) からの 8 デサチュラーゼ酵素のアミノ酸および核酸配列を開示する。非特許文献 8 は、自由生活土壤アメーバであるアカントアメーバ・カステラーニ (*Acanthamoeba castellanii*) からの cDNA の単離と特性決定について述べ、これはアラビドプシス (*Arabidopsis*) 中で発現させると C₂ 10 8 デサチュラーゼをコードする。また 2006 年 4 月 28 日に出願された同一所有者の同時係属出願である特許文献 11 が、パブロバ・ルセリ (*Pavlova luteola*) (CCMP 459) からの 8 デサチュラーゼ酵素のアミノ酸および核酸配列を開示する一方、2006 年 10 月 23 日に出願された同一所有者の同時係属出願である特許文献 12 は、ユーグレナ属のテトルエトレプチア・ポムクテンシス (*Tetrauretruptia pomquetensis*) CCMP 1491、ユートレプチエラ (*Eutreptiella*) 種 CCMP 389、およびユートレプチエラ・ギムナスチカ近種 (*Eutreptiella cf_gymnastica*) CCMP 1594 からの 8 デサチュラーゼを開示する。 20

【0010】

次の同一所有者の特許出願は油性酵母（すなわちヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*)）中の PUF A の生成に関する。どちらも 2004 年 11 月 25 日に公開された特許文献 13 および特許文献 14、2005 年 11 月 2 日に出願され特許文献 15 に対応する特許文献 16、2005 年 11 月 1 日に出願され特許文献 17 に対応する特許文献 18、および 2005 年 11 月 1 日に出願され特許文献 19 に対応する特許文献 20。

【0011】

さらにどちらも同一所有者の同時係属出願である、2004 年 8 月 26 日に公開された特許文献 21 が、植物中での PUF A の生成に関する一方、2004 年 8 月 26 日に公開された特許文献 22 は、アネキシンプロモーターおよび植物中での導入遺伝子発現におけるそれらの使用に関する。 30

【0012】

【特許文献 1】国際公開第 2002 / 077213 号パンフレット

【特許文献 2】国際公開第 2005 / 083093 号パンフレット

【特許文献 3】国際公開第 2005 / 012316 号パンフレット

【特許文献 4】国際公開第 2004 / 057001 号パンフレット

【特許文献 5】国際公開第 2000 / 34439 号パンフレット

【特許文献 6】米国特許第 6,825,017 号明細書

40

【特許文献 7】米国特許出願第 11 / 166,003 号明細書

【特許文献 8】国際公開第 2006 / 012325 号パンフレット

【特許文献 9】国際公開第 2006 / 012326 号パンフレット

【特許文献 10】国際公開第 2005 / 103253 号パンフレット

【特許文献 11】米国仮特許出願第 60 / 795810 号明細書

【特許文献 12】米国仮特許出願第 60 / 853563 号明細書

【特許文献 13】国際公開第 2004 / 101757 号パンフレット

【特許文献 14】国際公開第 2004 / 101753 号パンフレット

【特許文献 15】国際公開第 2006 / 052870 号パンフレット

【特許文献 16】米国特許出願第 11 / 265,761 号明細書

50

- 【特許文献 17】国際公開第 2006 / 055322 号パンフレット
 【特許文献 18】米国特許出願第 11 / 264,784 号明細書
 【特許文献 19】国際公開第 2006 / 052871 号パンフレット
 【特許文献 20】米国特許出願第 11 / 264,737 号明細書
 【特許文献 21】国際公開第 2004 / 071467 号パンフレット
 【特許文献 22】国際公開第 2004 / 071178 号パンフレット
 【非特許文献 1】ダイヤーバーグ (Dyerberg), J. ら、Amer. J. Clin. Nutr. 28 : 958 ~ 966 頁 (1975 年)
 【非特許文献 2】ダイヤーバーグ (Dyerberg), J. ら、Lancet 2 (8081) : 117 ~ 119 頁 (1978 年 7 月 15 日) 10
 【非特許文献 3】シモカワ (Shimokawa), H. 、World Rev. Nutr. Diet. 88 : 100 ~ 108 頁 (2001 年)
 【非特許文献 4】フォンシャッキー (von Schacky), C. およびダイヤーバーグ (Dyerberg), J. 、World Rev. Nutr. Diet. 88 : 90 ~ 99 頁 (2001 年)
 【非特許文献 5】ブラウズ (Browse) ら、Trends in Biochemical Sciences 27 (9) : 467 ~ 473 頁 (2002 年 9 月)
 【非特許文献 6】ネピア (Napier), Trends in Plant Science 7 (2) : 51 ~ 54 頁 (2002 年 2 月)
 【非特許文献 7】ウォーリス (Wallis) ら、Arch. Biochem. and Biophys. 365 (2) : 307 ~ 316 頁 (1999 年 5 月)
 【非特許文献 8】サヤノバ (Sayanova) ら、FEBS Lett. 580 : 1946 ~ 1952 頁 (2006 年) 20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

出願人らは、ミドリムシ (*Euglena gracilis*) およびユートレプチエラ (*Eutreptiella*) 種 CCP389 から 9 エロンガーゼをコードする遺伝子を単離することで、既述の問題を解決した。

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明は、9 エロンガ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コンストラクト、および PUF A の生成のための植物、藻類、細菌、酵母および菌・カビ中のそれらの使用に関する。

【0015】

したがって本発明は、

(a) 9 エロンガーゼ活性を有し、クラスタル V 法のアラインメントに基づいて配列番号 2 または配列番号 5 で記載されるアミノ酸配列と比べると少なくとも 70 % のアミノ酸同一性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列を含んでなる単離された核酸配列、

(b) 9 エロンガーゼ活性を有するポリペプチドをコードし、BLASTN 法のアラインメントに基づいて配列番号 1、配列番号 3、配列番号 4 または配列番号 6 で記載されるヌクレオチド配列と比べると少なくとも 70 % の配列同一性を有する、ヌクレオチド配列を含んでなる単離された核酸配列、

(c) 9 エロンガーゼ活性を有するポリペプチドをコードし、0.1 × SSC、0.1 % SDS で 65 °C 、そして 2 × SSC、0.1 % SDS で洗浄後、0.1 × SSC、0.1 % SDS というストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下で、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 4 または配列番号 6 で記載されるヌクレオチド配列とハイブリダイズする、ヌクレオチド配列を含んでなる単離された核酸配列、または

(d) (a)、(b) または (c) のヌクレオチド配列と同数のヌクレオチドからなりそ 50

れと 100% 相補的である、前記ヌクレオチド配列の相補体
よりなる群から選択される、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0016】

さらに発明は、本発明の単離された核酸配列によってコードされるポリペプチドを提供する。具体的には、本発明は、ポリペプチドのアミノ酸配列が、

(a) 配列番号 2 または配列番号 5 で記載されるアミノ酸配列、および

(b) 少なくとも 1 つの保存的アミノ酸置換によって (a) のアミノ酸配列と異なるアミノ酸配列

よりなる群から選択される、9 エロンガーゼポリペプチドを提供する。

【0017】

別の実施態様では、本発明は本発明の単離された核酸配列で形質転換された宿主細胞を提供し、好ましい宿主細胞は、例えば藻類、細菌、酵母、卵菌類および菌・カビなどの微生物種である。

【0018】

別の実施態様では、本発明は、

a) i) (1) 9 エロンガーゼ活性を有し、クラスタル V 法のアラインメントに基づいて配列番号 2 または配列番号 5 で記載されるアミノ酸配列と比べると少なくとも 70% のアミノ酸同一性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列を含んでなる単離された核酸配列、

(2) 9 エロンガーゼ活性を有するポリペプチドをコードし、0.1 × SSC、0.1 % SDS で 65% 、そして 2 × SSC、0.1% SDS で洗浄後、0.1 × SSC、0.1% SDS というストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下で、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 4 または配列番号 6 で記載されるヌクレオチドとハイブリダイズする、ヌクレオチド配列を含んでなる単離された核酸配列

よりなる群から選択される、9 エロンガーゼ活性を有す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配列、および

(i) リノール酸源

を含んでなる単離された形質転換酵母宿主細胞を提供し、

b) ステップ (a) の酵母宿主細胞を 9 エロンガーゼポリペプチドをコードする核酸配列が発現されてリノール酸がエイコサジエン酸に転換される条件下で生育させ、そして

c) 場合によりステップ (b) のエイコサジエン酸を回収することを含んでなる、エイコサジエン酸の製造方法を提供する。

【0019】

代案の実施態様では、本発明は、

a) i) (1) 9 エロンガーゼ活性を有し、クラスタル V 法のアラインメントに基づいて配列番号 2 または配列番号 5 で記載されるアミノ酸配列と比べると少なくとも 70% のアミノ酸同一性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列を含んでなる単離された核酸配列、

(2) 9 エロンガーゼ活性を有するポリペプチドをコードし、0.1 × SSC、0.1 % SDS で 65% 、そして 2 × SSC、0.1% SDS で洗浄後、0.1 × SSC、0.1% SDS というストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下で、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 4 または配列番号 6 で記載されるヌクレオチド配列とハイブリダイズする、ヌクレオチド配列を含んでなる単離された核酸配列

よりなる群から選択される、9 エロンガーゼ活性を有す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配列、および

(i) - リノレン酸源

を含んでなる単離された形質転換酵母宿主細胞を提供し、

b) ステップ (a) の宿主細胞を 9 エロンガーゼポリペプチドをコードする核酸配列が発現されて - リノレン酸がエイコサトリエン酸に転換される条件下で生育させ、そして

c) 場合によりステップ (b) のエイコサトリエン酸を回収する

10

20

30

40

50

ことを含んでなるエイコサトリエン酸の製造方法を提供する。

【0020】

別の実施態様では、本発明は、本発明の形質転換宿主によって產生された微生物油を提供する。

【0021】

別の実施態様では、本発明は、本発明の微生物油を含んでなる食品を提供する。

【0022】

別の実施態様では、本発明は、本発明の油を含んでなる動物飼料を提供する。

【0023】

生物学的寄託

10

以下のプラスミドが 10801 ユニバーシティ・ブルヴァード、マナッサス、VA 20110-2209 の米国微生物系統保存機関 (ATCC) に寄託され、以下の称号、登録番号、および寄託日を有する (表 1)。

【0024】

【表 1】

表 1
ATCC 寄託

プラスミド	登録番号	寄託日
pKR72	PTA-6019	2004 年 5 月 28 日
pKR275	PTA-4989	2003 年 1 月 30 日
pKR585	PTA-6279	2004 年 11 月 4 日
pKR578	PTA-6280	2004 年 11 月 4 日

20

【0025】

配列一覧

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図面と配列表によって、発明をより完全に理解できるであろう。

30

【0026】

次の配列は、37C.F.R.1.§ 821~1.825 (「ス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 号および附屬書 C) に一致する。ス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式は、37C.F.R. § 1.822 で述べられる規則に従う。

【0027】

配列一覧説明

40

配列番号 1 ~ 17、21、22、45 ~ 48、51 ~ 61、68 ~ 71、76 ~ 79、81 ~ 93、96 ~ 102、および 118 ~ 129 は、表 2 で同定されるような遺伝子またはタンパク質をコードする ORF (またはその一部)、またはプラスミドである。

【0028】

【表2】

表2
核酸およびタンパク質配列番号の要約

説明および略号	核酸 配列番号	タンパク質 配列番号	
ミドリムシ $\Delta 9$ エロンガーゼ(EgD9e; クローン eeg1c.pk001.n5.f)	1 (777bp)	2 (258AA)	
ヤロウイア・リポリティカ中での発現のためにコドン最適化されたミドリムシ由来の合成 $\Delta 9$ エロンガーゼ(EgD9eS)	3 (777bp)	2 (258AA)	10
ユートレプチエラ種 CCMP389 $\Delta 9$ エロンガーゼ(E389D9e)	4 (792bp)	5 (263AA)	
ヤロウイア・リポリティカ中での発現のためにコドン最適化されたユートレプチエラ種 CCMP389 由来の合成 $\Delta 9$ エロンガーゼ(E389D9eS)	6 (792bp)	5 (263AA)	
イソクリシス・ガルバナ $\Delta 9$ エロンガーゼ(IgD9e; NCBI 登録番号 AAL37626[GI 17226123]、遺伝子座 AAL37626、CDS AF390174; ジェンバンク登録番号 AF390174)(CDS=ヌクレオチド 2~793)	7 (1064bp)	8 (263AA)	20
ヤロウイア・リポリティカ中での発現のためにコドン最適化されたイソクリシス・ガルバナ由来の合成 $\Delta 9$ エロンガーゼ(IgD9eS)(国際公開第 2006/052870 号パンフレットの配列番号 51 および 50 のコード配列に等しい)	9 (792bp)	8 (263AA)	
ミドリムシ EgD9e: クローン eeg1c.pk001.n5.f からの cDNA 挿入断片の 5'配列	10 (757bp)	--	
ミドリムシ EgD9e: クローン eeg1c.pk001.n5.f からの cDNA 挿入断片の 3'配列	11 (774bp)	--	
ミドリムシ EgD9e: 配列番号 10 および配列番号 11(poly A tail を除く完全 cDNA 配列)から整列された配列	12 (1201bp)	--	30
ユートレプチエラ種 CCMP389 E389D9e: 内部 cDNA 断片	13 (200bp)	--	

【0029】

【表3】

ユートレプチエラ種 CCMP389 E389D9e:5'cDNA 断片#1	14 (406bp)	--
ユートレプチエラ種 CCMP389 E389D9e:5'cDNA 断片#2	15 (197bp)	--
ユートレプチエラ種 CCMP389 E389D9e:3'cDNA 断片	16 (920bp)	--
ユートレプチエラ種 CCMP389 E389D9e: 完全にアセンブルされたコンティグ	17 (1504bp)	--
プラスミド pY119	21 (8306bp)	--
プラスミド pDMW263	22 (9472bp)	--
プラスミド pY115	45 (7783bp)	--
プラスミド pDMW237	46 (7879bp)	--
プラスミド pBY1	47 (8704bp)	--
プラスミド pBY2	48 (8145bp)	--
プラスミド pBY1-FAE	51 (7877bp)	--
プラスミド pZuFmEgD9E	52 (7771bp)	--
プラスミド pZuFmEgD9ES	53 (7769bp)	--
プラスミド pY120	54 (7769bp)	--
プラスミド pKR72	55 (7085bp)	--
プラスミド pKR912	56 (7873bp)	--
プラスミド pKS102	57 (2540bp)	--
プラスミド pKR197	58 (4359bp)	--
プラスミド pKR911	59 (5147bp)	--
ミドリムシ Δ 8 デサチュラーゼ(EgD8)(国際公開第 2006/012325 号パンフレットおよび国際公開第 2006/012326 号パンフレット[米国特許出願公開第 2005-0287652-A1 号明細書]の配列番号 1 および 2 のコード配列に等しい)	60 (1266bp)	61 (421AA)
ヤロウイア・リポリティカ中での発現のためにコドン最 適化されたミドリムシ由来の合成 Δ 8 デサチュラーゼ (EgD8S) (国際公開第 2006/012326 号パンフレット の配列番号 112 および 113 に等しい)	68 (1272bp)	69 (422AA)

【表4】

プラスミド pKS121	70 (4826bp)	--
プラスミド pKR457	71 (5252bp)	--
プラスミド pKR680	76 (6559bp)	--
プラスミド pKR913	77 (9014bp)	--
モルティエラ・アルピナ Δ5 デサチュラーゼ	78 (1482bp)	79 (446AA)
プラスミド pKR767	81 (5561bp)	--
プラスミド pKR328	82 (8671bp)	--
プラスミド pKR886	83 (9892bp)	--
プラスミド pKR886r	84 (9892bp)	--
プラスミド pKR271	85 (6021bp)	--
プラスミド pKR226	86 (6524bp)	--
プラスミド pKR275	87 (13,514bp)	--
プラスミド pKR329	88 (12,323bp)	--
プラスミド pKR585	89 (12,456bp)	--
プラスミド pKR578	90 (9088bp)	--
プラスミド pKR667	91 (10,309bp)	--
プラスミド pKR873	92 (12,403bp)	--
プラスミド pKR132	93 (3983bp)	--
プラスミド pKR160	96 (4268bp)	--
プラスミド pKR124	97 (4990bp)	--
プラスミド pKR163	98 (3982bp)	--
プラスミド pY34	99 (8878bp)	--

【0031】

【表5】

プラスミド pKR863	100 (5207bp)	--
プラスミド pKR869	101 (9035bp)	--
プラスミド pKR270	102 (5108bp)	--
プラスミド pFBAIN-MOD-1	118 (7222bp)	--
プラスミド pFBAIN-389Elo	119 (7779bp)	--
プラスミド pE389S	120 (3511bp)	--
プラスミド pZUF17	121 (8165bp)	--
プラスミド pZUFE389S	122 (7879bp)	--
Δ9 エロンガーゼモチーフ#1	--	123
Δ9 エロンガーゼモチーフ#2	--	124
Δ9 エロンガーゼモチーフ#3	--	125
Δ9 エロンガーゼモチーフ#4	--	126
Δ9 エロンガーゼモチーフ#5	--	127
Δ9 エロンガーゼモチーフ#6	--	128
Δ9 エロンガーゼモチーフ#7	--	129

【0032】

配列番号18は、ミドリムシ(*Euglena gracilis*)cDNAライブラリ-eeg1cを配列決定するために使用されるM13Fユニバーサルプライマーである。

【0033】

配列番号19および20は、クローンeeg1c.pk001.n5.fからのEgD9eを増幅するために使用されるプライマー-oEugEL1-1およびoEugEL1-2にそれぞれ対応する。

【0034】

配列番号23～38は、IgD9eSの増幅のために使用されるプライマーIL3-1A、IL3-1B、IL3-2A、IL3-2B、IL3-3A、IL3-3B、IL3-4A、IL3-4B、IL3-5A、IL3-5B、IL3-6A、IL3-6B、IL3-7A、IL3-7B、IL3-8A、およびIL3-8Bにそれぞれ対応する。

【0035】

配列番号39～42は、IgD9eS増幅のために使用されるプライマーIL3-1F、IL3-4R、IL3-5F、およびIL3-8Rにそれぞれ対応する。

【0036】

配列番号43は、pT9(1-4)からの417bpのNcoI/PstI断片である。

【0037】

配列番号44は、pT9(5-8)からの377bpのPstI/NotI断片である。

【0038】

配列番号49および50は、ベクターpY115からのIgD9eSを増幅するために

10

20

30

40

50

使用されるプライマー i g - s および i g - a s にそれぞれ対応する。

【 0 0 3 9 】

配列番号 6 2 および 6 3 は、 c D N A からの E g D 8 を増幅するために使用されるプライマー E g 5 - 1 および E g 3 - 3 にそれぞれ対応する。

【 0 0 4 0 】

配列番号 6 4 ~ 6 7 は、 E g D 8 を配列決定するために使用される、プライマー T 7 、 M 1 3 - 2 8 R e v 、 E g 3 - 2 、 および E g 5 - 2 にそれぞれ対応する。

【 0 0 4 1 】

配列番号 7 2 は、 p K R 4 5 7 のための K T i カセット 5 ' 末端多重クローニング部位 (M C S) の配列である。

10

【 0 0 4 2 】

配列番号 7 3 は、ダイズアルブミン転写 3 ' ターミネーターを含む、 p K R 4 5 7 のための K T i カセット 3 ' 末端多重クローニング部位 (M C S) の配列である。

【 0 0 4 3 】

配列番号 7 4 および 7 5 は、ダイズゲノム D N A からのダイズアルブミン転写ターミネーターを増幅するために使用されるプライマー o S a l b - 1 2 および o S a l b - 1 3 にそれぞれ対応する。

【 0 0 4 4 】

配列番号 8 0 は、 p K R 7 6 7 を生成するために p K R 2 8 7 に付加される制限部位に対応する。

20

【 0 0 4 5 】

配列番号 9 4 および 9 5 は、 p K R 1 6 0 生成中に制限部位を作り出すために使用されるプライマー o S A l b - 9 および o S A l b - 2 にそれぞれ対応する。

【 0 0 4 6 】

配列番号 1 0 3 ~ 1 0 5 は、ユートレプチエラ (E u t r e p t i e l l a) 種 C C M P 3 8 9 c D N A 合成のために使用されるスマート (S M A R T) (商標) I V オリゴヌクレオチドプライマー、 C D S I I I / 3 ' P C R プライマーおよび 5 ' - P C R プライマーにそれぞれ対応する。

【 0 0 4 7 】

配列番号 1 0 6 は、配列番号 1 0 7 で記載されるペプチドをコードする縮重プライマー E u E F 3 のヌクレオチド配列である。同様に配列番号 1 0 8 は、配列番号 1 0 9 で記載されるペプチドをコードする縮重プライマー E u E R 3 のヌクレオチド配列である。

30

【 0 0 4 8 】

配列番号 1 1 0 ~ 1 1 3 は、 E 3 8 9 D 9 e をコードする c D N A の 5 ' 末端の P C R 増幅のために使用されるプライマー 3 8 9 E 1 o - 5 - 1 、 3 8 9 E 1 o - 5 - 2 、 D N R C D S 5 ' - 2 、 および 3 8 9 E 1 o - 5 - 4 に、それぞれ対応する。

【 0 0 4 9 】

配列番号 1 1 4 および 1 1 5 は、 E 3 8 9 D 9 e をコードする c D N A の 3 ' 末端の P C R 增幅のために使用されるプライマー 3 8 9 E 1 o - 3 - 1 および 3 8 9 E 1 o - 3 - 2 にそれぞれ対応する。

40

【 0 0 5 0 】

配列番号 1 1 6 および 1 1 7 は、 E 3 8 9 D 9 e をコードする全長 c D N A の増幅のために使用されるプライマー 3 8 9 E L O - F および 3 8 9 E L O - R 1 にそれぞれ対応する。

【 発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 5 1 】

本明細書に引用する全ての特許、特許出願、および公報は、参照によってその全体を本明細書に援用する。これは具体的には、次の同一所有者の同時係属出願を含む。米国特許出願第 1 0 / 8 4 0 4 7 8 号明細書、米国特許出願第 1 0 / 8 4 0 5 7 9 号明細書、および米国特許出願第 1 0 / 8 4 0 3 2 5 号明細書（以上 2 0 0 4 年 5 月 6 日出願）、米国特

50

許出願第10/869630号明細書(2004年6月16日出願)、米国特許出願第10/882760号明細書(2004年7月1日出願)、米国特許出願第10/985109号明細書および米国特許出願第10/985691号明細書(以上2004年11月10日出願)、米国特許出願第10/987548号明細書(2004年11月12日出願)、米国特許出願第11/024545号明細書および米国特許出願第11/024544号明細書(以上2004年12月29日出願)、米国特許出願第11/166993号明細書(2005年6月24日出願)、米国特許出願第11/183664号明細書(2005年7月18日出願)、米国特許出願第11/185301号明細書(2005年7月20日出願)、米国特許出願第11/190750号明細書(2005年7月27日出願)、米国特許出願第11/198975号明細書(2005年8月8日出願)、米国特許出願第11/225354号明細書(2005年9月13日出願)、米国特許出願第11/251466号明細書(2005年10月14日出願)、米国特許出願第11/254173号明細書および米国特許出願第11/253882号明細書(以上2005年10月19日出願)、米国特許出願第11/264784号明細書および米国特許出願第11/264737号明細書(以上2005年11月1日出願)、米国特許出願第11/265761号明細書(2005年11月2日出願)、米国仮特許出願第60/739989号明細書(2005年11月23日出願)、米国仮特許出願第60/795810号明細書(2006年4月28日出願)、米国仮特許出願第60/793575号明細書(2006年5月2日出願)、米国仮特許出願第60/801172号明細書(2006年5月17日出願)、米国仮特許出願第60/801119号明細書(2006年5月17日出願)、米国仮特許出願第60/853563号明細書(2006年10月23日出願)、米国仮特許出願第60/855177号明細書(2006年10月30日出願)。これはさらに次の同一所有者の同時係属出願を含む。植物中のPUFA生成に関する米国特許出願第10/776311号明細書、およびアネキシンプロモーターおよび植物中の導入遺伝子発現におけるそれらの使用に関する米国特許出願第10/776889号明細書。

【0052】

本発明は、新しいミドリムシ(*Euglena gracilis*)およびユートレブチエラ(*Eutreptiella*)種CCMP389 9エロンガーゼ酵素、および同酵素をコードする遺伝子を提供し、それは健康的なPUFA生成のための生化学的経路を操作するために使用されてもよい。

【0053】

ここで開示される方法によって作られるPUFAまたはその誘導体は、食餌代用物、または栄養補給剤および乳児用調製粉乳として、そして静脈内栄養補給を受ける患者のために、または栄養不良を防止または処置するために使用できる。代案としては正常な使用において受容者が所望量の栄養補助を受け入れるように調合された調理油、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んでもよく、抗炎症薬またはコレステロール低下剤としての用途があるかもしれない。場合により組成物を薬学的用途(ヒトまたは獣医学)のために使用してもよい。

【0054】

定義

本開示の文脈では、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。

【0055】

「読み取り枠」はORFと略記される。

【0056】

「ポリメラーゼ連鎖反応」はPCRと略記される。

【0057】

「米国微生物系統保存機関」はATCCと略記される。

【0058】

10

20

30

40

50

「多価不飽和脂肪酸」は P U F A と略記される。

【 0 0 5 9 】

「トリアシルグリセロール」は T A G と略記される。

【 0 0 6 0 】

「発明」または「本発明」という用語は、ここで用法では本発明の特定実施態様のいずれかに限定することは意図されず、一般に、特許請求の範囲および明細書で述べられる全てのあらゆる本発明の実施態様に適用される。

【 0 0 6 1 】

「脂肪酸」という用語は、(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が) 約 C₁₂ ~ C₂₂ の様々な鎖長の長鎖脂肪族酸(アルカン酸)を指す。優勢な鎖長は C₁₆ ~ C₂₂ の間である。「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」(または「P U F A」)、および「オメガ - 6 脂肪酸」(- 6 または n - 6) 対「オメガ - 3 脂肪酸」(- 3 または n - 3) の違いについてさらに詳しくは、国際公開第 2004 / 101757 号パンフレットで規定される。10

【 0 0 6 2 】

ここで脂肪酸は単純な表記体系「X : Y」によって表され、Xは特定の脂肪酸中の炭素(C)原子の数であり、Yは二重結合の数である。脂肪酸名に続く数は脂肪酸のカルボキシル末端からの二重結合の位置を示し、接尾辞「c」は二重結合の c i s - 配置を示す[例えばパルミチン酸(16:0)、ステアリン酸(18:0)、オレイン酸(18:1、9c)、ペトロセリン酸(18:1、6c)、LA(18:2、9c, 12c)、GLA(18:3、6c, 9c, 12c)、およびALA(18:3、9c, 12c, 15c)]。特に断りのない限り 18:1、18:2、および 18:3 は、オレイン酸、LA、および ALA 脂肪酸を指す。特に断りのない限り、二重結合は c i s 配置にあると想定される。例えば 18:2(9, 12) の二重結合は c i s 配置にあると想定される。20

【 0 0 6 3 】

本開示において P U F A を既述するのに使用される命名法を下の表 3 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。表の残りは、 - 3 および - 6 脂肪酸およびそれらの前駆物質の一般名、本明細書の残り全体で使用される略語、および各化合物の化学名を要約する。30

【 0 0 6 4 】

【表6】

表3
多価不飽和脂肪酸および前駆物質の命名法

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	Palmitate	ヘキサデカン酸	16:0
パルミトレイン酸	-	9-ヘキサデセン酸	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-オクタデセン酸	18:1
リノール酸	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
ステアリドン酸	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-エイコサトリエン酸	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-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

【0065】

「必須脂肪酸」という用語は、生物が特定の必須脂肪酸を新規に（de novo）合成できず、生存のために経口摂取しなくてはならならない特定のPUFAを指す。例えば哺乳類は、必須脂肪酸LAを合成できない。その他の必須脂肪酸としては、GLA、DGLA、ARA、EPA、およびDHAが挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0066】

「脂肪」という用語は、25で固形で、通常飽和である脂質物質を指す。

【0067】

10

20

30

40

50

「油」という用語は、25で液体で、通常多価不飽和である脂質物質を指す。P U F Aは、ある種の藻類、油性酵母菌、および糸状菌の油中に見られる。「微生物油」または「単細胞油」とは、微生物がそれらの生涯において天然に産生する油である。

【0068】

「トリアシルグリセロール」、「油」、および「T A G」という用語は、グリセロール分子にエステル化される3個の脂肪酸アシル残基から構成される中性脂質を指す(そしてこのような用語は、本開示の全体を通して区別なく使用される)。このような油は、長鎖P U F A、ならびにより短い飽和および不飽和脂肪酸、および鎖長のより長い飽和脂肪酸を含有できる。したがって「油合成」は、一般に細胞中でのT A G合成を指す。

【0069】

「総脂質および油画分中のパーセント(%)P U F A」とは、これらの画分中の全脂肪酸に対するP U F Aのパーセントを指す。「全脂質画分」または「脂質画分」という用語は、どちらも油性生物中の全脂質(すなわち中性および極性)の合計を指すので、ホスファチジルコリン(P C)画分、ホスファチジルエタノールアミン(P E)画分、およびトリアシルグリセロール(T A Gまたは油)画分内に位置する脂質を含む。しかし「脂質」と「油」という用語は、本明細書全体で同義的に使用される。

【0070】

「変換効率」および「%基質変換」という用語は、それによって特定の酵素(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。変換効率は以下の式に従って評価される。([生成物]/[基質+生成物])×100。式中、「生成物」には、直接生成物およびそれに由来する経路中の全生成物が含まれる。

【0071】

代謝経路または生合成経路は、生化学的意味において、細胞内で起きて酵素によって触媒され、細胞によって使用されまたは保存される代謝産物の形成、または別の代謝経路の開始(流束発生ステップと称される)のどちらかを達成する一連の化学反応と見なすことができる。これらの経路の多くは複雑であり、開始物質を所望の正確な化学構造を有する生成物に成形する段階を伴った変更を伴う。

【0072】

「P U F A生合成経路」という用語は、オレイン酸をL A、E D A、G L A、D G L A、A R A、A L A、S T A、E T r A、E T A、E P A、D P A、およびD H Aに転換する代謝過程を指す。この過程は、文献で詳しく述べられる(例えば国際公開第2005/003322号パンフレット、および国際公開第2006/052870号パンフレットを参照されたい)。簡単に述べると、この過程は、小胞体膜中に存在する一連の特別な不飽和化酵素および延長酵素(すなわち「P U F A生合成経路酵素」)による、炭素原子の添加を通じた炭素鎖延長、および二重結合付加を通じた分子不飽和化を伴う。より具体的には、「P U F A生合成経路酵素」は、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}エロンガーゼをはじめとする、P U F A生合成に関与するいづれかの酵素(および前記酵素をコードする遺伝子)を指す。

【0073】

「-3/-6脂肪酸生合成経路」という用語は、適切な条件下で発現すると、-3および-6脂肪酸の片方または双方の生成を触媒する酵素をコードする一組の遺伝子を指す。典型的に-3/-6脂肪酸生合成経路に関与する遺伝子は、P U F A生合成経路酵素をコードする。代表的な経路を図1に示し、様々な中間体を経由するミリストチン酸のD H Aへの変換を提供して、-3および-6脂肪酸の双方が、共通の原料からどのように生成できるかを実証する。経路は自然に2つの部分に別れ、1つの部分は-3脂肪酸、別の部分は-6脂肪酸のみを発生させる。

【0074】

10

20

30

40

50

「機能性」という用語は、ここで - 3 / - 6 脂肪酸合成経路に関する文脈で、経路中の遺伝子のいくつか（または全て）が、活性酵素を発現し、生体内触媒作用または基質変換をもたらすことを意味する。いくつかの脂肪酸生成物は、この経路の遺伝子のサブセットの発現のみを必要とするので、「 - 3 / - 6 脂肪酸合成経路」または「機能性 - 3 / - 6 脂肪酸合成経路」は、全ての P U F A 生合成経路酵素遺伝子が必要とされることを暗示しないものとする。

【0075】

「9エロンガーゼ / 8デサチュラーゼ経路」という用語は、長鎖 P U F A 生成のための生合成経路を指す。この経路は少なくとも 9エロンガーゼおよび 8デサチュラーゼを含んでなり、それによってそれぞれ L A および A L A からの D G L A および / または E T A の生合成を可能にする。その他のデサチュラーゼおよびエロンガーゼ発現に伴って、A R A、E P A、D P A、および D H A もまた合成されてもよい。この経路は、G L A および / または S T A の生合成が排除されることから、実施態様によっては有利かもしれない。

10

【0076】

「中間体脂肪酸」という用語は、脂肪酸代謝経路中で生成されて、その他の代謝経路酵素の作用によって、この経路中で意図される脂肪酸生成物にさらに転換できるあらゆる脂肪酸を指す。例えば 9エロンガーゼ / 8デサチュラーゼ経路を使用して E P A を生成する場合、E D A、E T r A、D G L A、E T A、および A R A が生成でき、これらの脂肪酸はその他の代謝経路酵素の作用によって E P A にさらに転換されることから、「中間体脂肪酸」と見なされる。

20

【0077】

「副産物脂肪酸」という用語は、脂肪酸代謝経路中で生成する、経路の意図される脂肪酸生成物または経路の「中間体脂肪酸」でないあらゆる脂肪酸を指す。例えば 9エロンガーゼ / 8デサチュラーゼ経路を使用して E P A を生成する場合、それぞれ E D A または E T r A のどちらかに対する 5デサチュラーゼの作用によって、シアドン酸 (S C I) およびジュニペロン酸 (juniperonic acid) (J U P) もまた生成できる。これらはいずれもその他の代謝経路酵素の作用によって E P A にさらに転換されないことから「副産物脂肪酸」と見なされる。

【0078】

30

「デサチュラーゼ」とは、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である。特定の脂肪酸を指すために、本明細書全体を通じた 参照システムの使用にもかかわらず、デルタ・システム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。対象とするデサチュラーゼとしては、(1) 分子のカルボキシル末端から数えて 8 および 9 番めの炭素原子間で脂肪酸を不飽和化し、例えば E D A から D G L A へのおよび / または E T r A から E T A への変換を触媒できる 8デサチュラーゼ、(2) D G L A から A R A へのおよび / または E T A から E P A への変換を触媒する 5デサチュラーゼ、(3) L A から G L A へのおよび / または A L A から S T A への変換を触媒する 6デサチュラーゼ、(4) D P A から D H A への変換を触媒する 4デサチュラーゼ、(5) オレイン酸から L A への変換を触媒する 12デサチュラーゼ、(6) L A から A L A へのおよび / または G L A から S T A への変換を触媒する 15デサチュラーゼ、(7) A R A から E P A へのおよび / または D G L A から E T A への変換を触媒する 17デサチュラーゼ、および(8) パルミチン酸からパルミトレイン酸 (16 : 1) へのおよび / またはステアリン酸からオレイン酸 (18 : 1) への変換を触媒する 9デサチュラーゼが挙げられる。当該技術分野で 15 および 17 デサチュラーゼは、- 6 脂肪酸をそれらの - 3 対応物に転換する（例えば L A を A L A に、A R A を E P A にそれぞれ変換する）それらの能力に基づいて、「オメガ - 3 デサチュラーゼ」、「w - 3 デサチュラーゼ」、および / または「 - 3 デサチュラーゼ」と称されることもある。いくつかの実施態様では、適切な宿主を脂肪酸デサチュラーゼの遺伝子で形質転

40

50

換して、宿主の脂肪酸プロフィールに対するその効果を判定し、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最も望ましい。

【0079】

ここでの目的では、「EgD8」という用語は、ここで配列番号60によってコードされるミドリムシ(*Euglena gracilis*)から単離される8デサチュラーゼ酵素(配列番号61)を指す。EgD8は、国際公開第2006/012325号パンフレットおよび国際公開第2006/012326号パンフレット[米国特許出願公開第2005-0287652-A1号明細書の配列番号2]で述べられるように、「Eg5」と100%同一であり機能的に等しい。

【0080】

同様に「EgD8S」という用語は、ここでヤロウィア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)中の発現のためにコドン最適化されたミドリムシ(*Euglena gracilis*)由来の合成8デサチュラーゼを指す(すなわち配列番号68および69)。EgD8Sは、国際公開第2006/012325号パンフレットおよび国際公開第2006/012326号パンフレットで述べられるように、「D8SF」と100%同一であり機能的に等しい。

【0081】

「エロンガーゼ系」と言う用語は、エロンガーゼ系が作用する脂肪酸基質よりも炭素2個分長い脂肪酸を生成する、脂肪酸炭素鎖の伸長に関する4つの酵素の一挙いを指す。より具体的にはこの延長プロセスは、CoAがアシルキャリアである脂肪酸合成酵素と共同して起きる(ラスナー(*Lassner*)ら、Plant Cell 8:281~292頁(1996年))。基質特異性であり、また律速でもあることが分かった第1のステップでは、マロニル-CoAが長鎖アシル-CoAと縮合して、二酸化炭素(CO₂)および-ケトアシル-CoAを生じる(アシル部分が炭素原子2個分伸長される)。引き続く反応には、-ヒドロキシアシル-CoAへの還元、エノイル-CoAへの脱水、および伸長されたアシル-CoAを生じる第2の還元が含まれる。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への、STAからETAへの、およびEPAからDPAへの変換である。

【0082】

ここでの目的では、第1の縮合反応(すなわちマロニル-CoAの-ケトアシル-CoAへの変換)を触媒する酵素を総称的に「エロンガーゼ」と称する。一般にエロンガーゼの基質選択性はいくぶん幅広いが、鎖長および不飽和の程度の双方によって区別する。したがってエロンガーゼは異なる特異性を有することができる。例えばC₁₄/C₁₆エロンガーゼは、C₁₄基質(例えばミリスチン酸)を利用し、C₁₆/C₁₈エロンガーゼはC₁₆基質(例えばパルミチン酸)を利用し、C₁₈/C₂₀エロンガーゼ(用語が同義的に使用できるように6エロンガーゼとしても知られている)はC₁₈基質(例えばGLA、STA)を利用し、C₂₀/C₂₂エロンガーゼはC₂₀基質(例えばEPA)を利用する。同様にここで特に興味深い「9エロンガーゼ」は、LAおよびALAからEDAおよびETrAへの変換をそれぞれ触媒できる。いくつかのエロンガーゼは幅広い特異性を有するため、単一酵素がいくつかのエロンガーゼ反応を触媒できるかもしれないことに留意することが重要である。したがって例えば9エロンガーゼはまた、C₁₆/C₁₈エロンガーゼ、C₁₈/C₂₀エロンガーゼおよび/またはC₂₀/C₂₂エロンガーゼとして作用してもよく、好ましくはないが、それぞれEPAおよび/またはGLAなどの5および6脂肪酸に対する代案の特異性を有してもよい。好ましい実施態様では、適切な宿主を脂肪酸エロンガーゼの遺伝子で形質転換して、宿主の脂肪酸プロフィールに対するその効果を判定し、脂肪酸エロンガーゼの特異性を経験的に判定することが望ましい。

【0083】

ここでの目的では、「EgD9e」という用語は、配列番号1によってコードされる、ミドリムシ(*Euglena gracilis*)から単離された9エロンガーゼ酵素(配列番号2)を指す。対照的に「EgD9eS」という用語は、ヤロウィア・リポリテ

10

20

30

40

50

イカ (*Yarrowia lipolytica*) 中での発現のためにコドン最適化された、ミドリムシ (*Euglena gracilis*) 由来の合成 9 エロンガーゼを指す(すなわち配列番号 3 および 2)。

【0084】

「E 3 8 9 D 9 e」という用語は、配列番号 4 によってコードされる、ユートレプチエラ (*Eutreptiella*) 種 C C M P 3 8 9 から単離された 9 エロンガーゼ酵素(配列番号 5)を指す。対照的に「E 3 8 9 D 9 e S」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、ユートレプチエラ (*Eutreptiella*) 種 C C M P 3 8 9 由来の合成 9 エロンガーゼを指す(すなわち配列番号 6 および 5)。

10

【0085】

「I g D 9 e」という用語は、配列番号 7 によってコードされる、イソクリシス・ガルバナ (*Isochrysis galbana*) から単離された 9 エロンガーゼ酵素(配列番号 8; N C B I 登録番号 A A L 3 7 6 2 6 [G I 1 7 2 2 6 1 2 3]、遺伝子座 A A L 3 7 6 2 6、C D S A F 3 9 0 1 7 4; ジェンバンク登録番号 A F 3 9 0 1 7 4)を指す。対照的に「I g D 9 e S」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、イソクリシス・ガルバナ (*Isochrysis galbana*) 由来の合成 9 エロンガーゼを指す(すなわち配列番号 9 および 8)。I g D 9 e S の合成および機能解析については、国際公開第 2 0 0 6 / 0 5 2 8 7 0 号パンフレットで述べられる(I g D 9 e S はその中の配列番号 5 1 および 5 0 に等しい)。

20

【0086】

「アミノ酸」という用語は、タンパク質またはポリペプチドの基本的化学構造単位を指す。アミノ酸は、参照によってここに援用する N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h, 1 3 : 3 0 2 1 ~ 3 0 3 0 頁 (1 9 8 5 年) および B i o c h e m i c a l J o u r n a l, 2 1 9 (2) : 3 4 5 ~ 3 7 3 頁 (1 9 8 4 年) で述べられる I U P A C - I Y U B 標準に準拠して定義されるように、アミノ酸のための 1 文字コードまたは 3 文字コードのどちらかによって同定される。

【0087】

「保存的アミノ酸置換」という用語はタンパク質の化学または機能的性質を変更しない、特定タンパク質中のアミノ酸残基の別のアミノ酸による置換を指す。例えば特定部位に化学的に等価なアミノ酸の生成をもたらす(が、コードされる折りたたまれたタンパクの構造的および機能的特性に影響しない)遺伝子の変更が一般的であることは、当該技術分野でよく知られている。本発明の目的で、「保存的アミノ酸置換」は、次の 5 群の 1 つの中の交換と定義される。

30

1. 小型脂肪族、非極性またはわずかに極性の残基: A l a [A]、S e r [S]、T h r [T] (P r o [P]、G l y [G])、
2. 極性、負に帯電した残基およびそれらのアミド: A s p [D]、A s n [N]、G l u [E]、G l n [Q]、
3. 極性、正に帯電した残基: H i s [H]、A r g [R]、L y s [K]、
4. 大型脂肪族、非極性残基: M e t [M]、L e u [L]、I l e [I]、V a l [V] (C y s [C])、および、
5. 大型芳香族残基: P h e [F]、T y r [Y]、T r p [W]。

40

【0088】

保存的アミノ酸置換は、一般に次を維持する。1. 置換領域内のポリペプチド主鎖の構造、2. 標的部位の分子電荷または疎水性、または3. 側鎖の巣。さらに多くの場合、タンパク質分子の N 末端および C 末端部分の変更は、タンパク質活性を変更することが予期されない。

【0089】

「非保存的アミノ酸置換」という用語は、一般にタンパク質特性における最大変化を生

50

じることが予期されるアミノ酸置換を指す。したがって例えば非保存的アミノ酸置換は、1.) 親水性残基が／で疎水性残基で／が置換される（例えばS e r またはT h r が／でL e u 、I l e 、V a l で／が置換される）、2.) C y s またはP r o が／であらゆる他の残基で／が置換される、3.) 陽性電荷側鎖を有する残基が／で陰性電荷を有する残基で／が置換される（例えばL y s 、A r g またはH i s が／でA s p またはG l u で／が置換される）、または4.) 嵩高い側鎖を有する残基が／で嵩高い側鎖を有さないもので／が置換される（例えばP h e が／でG l y で／が置換される）ものである。時に5群の2つの間の非保存的アミノ酸置換は、コードされたタンパク質の活性に影響しない。

【0090】

10

「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、ここで区別なく使用される。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、非天然または修飾ヌクレオチド塩基を場合により含有する、一本鎖または二本鎖であるR N A またはD N A のポリマーであってもよい。D N A ポリマーの形態のポリヌクレオチドは、c D N A 、ゲノムD N A 、合成D N A 、またはそれらの混合物の1個もしくはそれ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5'一リン酸塩形態で存在する）は、次のような一文字記号によって言及される。アデニレートまたはデオキシアデニレート（それぞれR N A またはD N A ）を示す「A」、シチジレートまたはデオキシシチジレートを示す「C」、グアニレートまたはデオキシグアニレートを示す「G」、ウリジレートを示す「U」、デオキシチミジレートを示す「T」、プリン（A またはG ）を示す「R」、ピリミジン（C またはT ）を示す「Y」、G またはT を示す「K」、A またはC またはT を示す「H」、イノシンの「I」、およびあらゆるヌクレオチドを示す「N」。

【0091】

20

「機能的同等物である細断片」および「機能的同等物細断片」という用語は、ここで区別なく使用される。これらの用語は、その中で断片または細断片が活性酵素をコードするか否かに関わらず、遺伝子発現を変更するまたは特定の表現型を生成する能力が保持される、単離された核酸断片の部分またはサブ配列を指す。例えば断片または細断片をキメラ遺伝子のデザインで使用して、形質転換された植物において所望の表現型を生成できる。それが活性酵素をコードするか否かに関わらず、植物プロモーター配列に対してセンスまたはアンチセンス方向で核酸断片またはその細断片を結合することにより、キメラ遺伝子を抑制において使用するためにデザインできる。

30

【0092】

「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において保存されたアミノ酸の組を意味する。その他の位置のアミノ酸が相同的なタンパク質間で異なることができるのに対し、特定の位置で高度に保存されたアミノ酸は、タンパク質の構造、安定性、または活性に必須のアミノ酸を示唆する。それらはタンパク質相同体ファミリーの整合配列におけるそれらの高度な保存によって同定されるので、それらは新たに判定された配列のタンパク質が、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別するための識別子、または「シグネチャ」として使用できる。ここでの目的のために、次の表で9エロンガーゼ活性を有するタンパク質の指標となる本発明のモチーフについて述べる。

40

【0093】

【表7】

表4
△9 エロンガーゼモチーフの要約

説明	配列	タンパク質 配列番号
△9 エロンガーゼモチーフ#1	YNX(L または F)XXXXSXXSF	123
△9 エロンガーゼモチーフ#2	FYXSKXX(E または D) <u>YXD</u> (T または S)XX <u>L</u>	124
△9 エロンガーゼモチーフ#3	L(Q または H)XFHHXGA	125
△9 エロンガーゼモチーフ#4	MYXYYYYXXXXXX (K または R または N)E	126
△9 エロンガーゼモチーフ#5	KXL(I または L または M)TXXQ	127
△9 エロンガーゼモチーフ#6	<u>WXENYXY</u>	128
△9 エロンガーゼモチーフ#7	YXGXVXXLF	129

10

20

【0094】

「相同性」、「相同的」、「実質的に類似」、および「実質的に相当する」という用語は、ここで区別なく使用される。これらは、その中において1個もしくはそれ以上のヌクレオチド塩基の変化が、遺伝子発現を仲介するまたは特定の表現型を生成する核酸断片の能力に影響しない核酸断片を指す。これらの用語はまた、最初の未変性断片と比べて、得られる核酸断片の機能特性を実質的に変化させない、1個もしくはそれ以上のヌクレオチドの欠失または挿入などの本発明の核酸断片の変更も指す。したがって当業者によって理解されるように、本発明は具体的な例示的配列を超えるものを包含する。

【0095】

さらに当業者は、本発明によって包含される実質的に類似した核酸配列が、中程度にストリンジエントな条件下（例えば0.5×SSC、0.1% SDS、60°C）において、ここで例示される配列と、またはここで開示される核酸配列のいずれかの機能的同等物であるここで開示されるヌクレオチド配列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もまた定義されることを認識する。ストリンジエンシー条件を調節して、遠縁の生物体からの相同的配列などの中程度に類似した断片から、近縁の生物体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までをスクリーンすることができる。ハイブリダイズ後洗浄が、ストリンジエンシー条件を決定する。

30

【0096】

「選択的にハイブリダイズする」という用語は、ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下で、その非標的核酸配列へのハイブリダイゼーションよりも検出可能な程度に大きい（例えば少なくとも背景の2倍）規定の核酸標的配列への核酸配列のハイブリダイゼーション、および非標的核酸の実質的排除を指す。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%までの配列同一性（すなわち完全に相補的）を有する。

40

【0097】

「ストリンジエントな条件」または「ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件」とは、その下でプローブがその標的配列に選択的にハイブリダイズする条件を指す。ストリンジエントな条件は配列依存性であり、異なる状況では異なる。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エンシーを制御することで、プローブに100%相補的な標的配列を同定できる（相同的プロービング）。代案としては、より低い類似

50

性が検出されるように、ストリンジエンシー条件を調節して、配列中のいくつかのミスマッチを許すことができる（異種性プローピング）。一般にプローブは、約1000ヌクレオチド未満の長さであり、場合により500ヌクレオチド未満の長さである。典型的にストリンジエントな条件は、pH 7.0 ~ 8.3において、塩濃度が約1.5MのNaイオン未満、典型的に約0.01 ~ 1.0MのNaイオン（またはその他の塩）濃度のものであり、温度は短いプローブ（例えば10 ~ 50ヌクレオチド）で少なくとも約30°、長いプローブ（例えば50ヌクレオチドを超える）で少なくとも約60°である。ストリンジエントな条件はまた、ホルムアミドなどの不安定化剤の添加によって達成されてもよい。例示的な低ストリンジエンシー条件としては、37°で30 ~ 35%ホルムアミド、1MのNaCl、1%SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）の緩衝液溶液でのハイブリダイゼーション、および50 ~ 55°での $1 \times \sim 2 \times$ SSC ($2.0 \times$ SSC = 3.0MのNaCl / 0.3Mのクエン酸三ナトリウム) 中での洗浄が挙げられる。例示的な中度のストリンジエンシー条件としては、37°で40 ~ 45%ホルムアミド、1MのNaCl、1%SDS 中でのハイブリダイゼーション、および55 ~ 60°での $0.5 \times \sim 1 \times$ SSC 中での洗浄が挙げられる。例示的な高ストリンジエンシー条件としては、37°で50%ホルムアミド、1MのNaCl、1%SDS 中でのハイブリダイゼーション、および60 ~ 65°での $0.1 \times$ SSC 中での洗浄が挙げられる。その他の例示的なストリンジエントなハイブリダイゼーション条件としては、 $0.1 \times$ SSC、 0.1% SDSで65°、そして $2 \times$ SSC、 0.1% SDSで洗浄後、 $0.1 \times$ SSC、 0.1% SDSが挙げられる。

10

20

【0098】

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、メインコス (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シト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。一般にストリンジエントな条件は、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体の熱融点 (T_m) よりも約5°低いように選択される。しかし厳しくストリンジエントな条件は、熱融点 (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、中度にストリンジエントな条件は、熱融点 (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、低ストリンジエンシー条件は、熱融点 (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エンシーの変動が、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、チジュッセン (Tijssen)、「生化学および分子生物学における実験室技法 - 核酸プローブによるハイブリダイゼーション (Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Acid Probes)」、第1部、第2章、「ハイブリダイゼーション原理および

30

40

50

核酸プローブアッセイストラテジーの概説(Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays)」、エルゼビア(Elsevier)、ニューヨーク州(New York)(1993年);およびオースベル(Ausubel)ら編、「分子生物学現代プロトコル(Current Protocols in Molecular Biology)」、第2章、グリーン・パブリッシング・アンド・ウィリー・インターライエンス(Greene Publishing and Wiley-Interscience)による出版、ニューヨーク州(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。10

【0099】

核酸またはポリペプチド配列の文脈において「配列同一性」または「同一性」は、特定の比較ウィンドウ間で最大一致のために整列させると同じになる、2つの配列中の核酸塩基またはアミノ酸残基を指す。

【0100】

したがって「配列同一性百分率」は、比較ウィンドウ間で最適に整列させた2つの配列を比較して判定される値を指し、比較ウィンドウ内のポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の部分は、2配列の最適アラインメントのために、(付加または欠失を含まない)基準配列と比べて付加または欠失(すなわちギャップ)を含んでなってもよい。百分率は、双方の配列内で同一の核酸塩基またはアミノ酸残基が存在する位置数を判定して計算し、一致位置数を得て、一致する位置数を比較ウィンドウ内の総位置数で除して、結果に100を乗じて同一性百分率を得る。有用な%配列同一性の例としては、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%、または50%~100%のあらゆる整数百分率が挙げられるが、これに限定されるものではない。これらの同一性は、ここで述べられるプログラムのいずれかを使用して判定できる。20

【0101】

アラインメントおよび%同一性または類似性計算は、ウィスコンシン州マディソンのDNA STARインコーポレーテッド(DNA STAR Inc. (Madison, WI))からのレーザージーン(LADSERGENE)バイオインフォマティクス計算スイートのメガライン(MegAlign)(商標)プログラムをはじめとするが、これに限定されるものではない、相同意向の配列を検出するようにデザインされた多様な比較法を使用して判定してもよい。本出願の文脈で、配列分析ソフトウェアを分析のために使用する場合、特に断りのない限り分析結果は言及プログラムの「デフォルト値」に基づくものと理解される。ここで用法で「デフォルト値」とは、開始時にソフトウェアにロードされるあらゆる値またはパラメーターの一揃いを意味する。30

【0102】

「クラスタルV法のアラインメント」は、クラスタルVとラベルされるアラインメント法に対応し(ヒギンズ(Higgins)およびシャープ(Sharp)、CABIOS、5:151~153頁(1989年);ヒギンズ(Higgins), D.G.ら、Computer Applic. Biosci., 8:189~191頁(1992年)で述べられる)、レーザージーン(LADSERGENE)バイオインフォマティクス計算スイートのメガライン(MegAlign)(商標)プログラム(前出)にある。多重整列化では、デフォルト値は、GAP PENALTY=10およびGAP LENGTH PENALTY=10に対応する。クラスタル法を使用した、ペアワイズアラインメントおよびタンパク質配列の%同一性計算のためのデフォルトパラメーターは、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ーは、KTUPLE=2、GAP PENALTY=5、WINDOW=4、およびDIAGONALS SAVED=4である。クラスタルVプログラムを使用したアラインメント後、同プログラムの「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。4050

【0103】

「BLASTN法のアラインメント」は、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。

【0104】

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。有用な%同一性の例としては、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%、または50%～100%のあらゆる整数百分率が挙げられるが、これに限定されるものではない。確かに本発明について述べるのに、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%のあらゆる整数のアミノ酸同一性が有用かもしれない。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体も興味深い。10

【0105】

「ゲノム」という用語はそれが、植物細胞に対して適用される場合、核内に見られる染色体DNAだけでなく、細胞の細胞内構成要素（例えばミトコンドリア、色素体）中に見られる細胞小器官DNAを包含する。20

【0106】

「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、コード配列に先行する制御配列（5'非コード配列）およびコード配列に続く制御配列（3'非コード配列）を含む。「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、自然界に一緒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。したがってキメラ遺伝子は、異なる供給源に由来する制御配列およびコード配列、あるいは同一供給源に由来するが、自然界に見られるのとは異なる方法で配列する制御配列およびコード配列を含んでなってもよい。「外来性」遺伝子とは、宿主生物に状態では見られないが、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、非天然生物に挿入された天然遺伝子、また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、形質転換手順によってゲノム中に導入された遺伝子である。30

【0107】

「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。

【0108】

「対立遺伝子」とは、染色体上の特定の遺伝子座を占める遺伝子のいくつかの代案の形態の1つである。染色体上の特定の遺伝子座に存在する全ての対立遺伝子が同じである場合、その植物はその遺伝子座で同型接合性である。染色体上の特定遺伝子座に存在する対立遺伝子が異なる場合、その植物はその遺伝子座で異型接合性である。40

【0109】

「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。制御配列は次を含んでも良いが、これに限定されるものではない。プロモーター、翻訳リーダー配列、イントロン、ポリアデニル化認識配列、RNAプロセッシング部位、エフェクター結合部位、およびシステム・ループ構造。

【0110】

「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50

を指す。プロモーター配列は近位およびより遠位の上流要素からなり、後者の要素はエンハンサーとして言及されることが多い。したがって「エンハンサー」はプロモーター活性を刺激できるDNA配列であり、プロモーターに固有の要素、またはプロモーターのレベルまたは組織特異性を向上させるために挿入される異種の要素であってもよい。プロモーターは全体が天然遺伝子に由来しても良く、あるい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なっても良く、あるいは合成DNAセグメントを含んでなってさえ良い。異なるプロモーターは、異なる組織または細胞タイプ中で、あるいは異なる発育段階で、あるいは異なる環境条件に呼応して、遺伝子の発現を導いても良いことが当業者には理解される。ほとんどの場合、制御配列の正確な境界は完全に画定されていないので、いくつかの変形例がある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もさらに認識される。ほとんどの場合にほとんどの細胞タイプ中で遺伝子の発現を引き起こすプロモーターは、一般に「構造プロモーター」と称される。植物細胞で有用な様々なタイプの新しいプロモーターが、絶えず発見されている。多数の例がオカムロ(O kamuro), J. K. およびゴールドバーグ(Goldberg), R. B. による編纂、「植物生化学(Biochemistry of Plants)」15: 1~82頁(1989年)にある。

【0111】

「翻訳リーダー配列」とは、遺伝子のプロモーター配列とコード配列の間に位置するポリヌクレオチド配列を指す。翻訳リーダー配列は、翻訳開始配列上流の完全にプロセスされたmRNA中に存在する。翻訳リーダー配列は、転写一次産物のmRNAへのプロセッシング、mRNAの安定性または翻訳効率に影響するかもしれない。翻訳リーダー配列の例については、ターナー(Turner), R. およびフォスター(Foster), G. D.、Mol. Biotechnol. 3: 225~236頁(1995年)で述べられている。

【0112】

「3'非翻訳配列」、「転写ターミネーター」または「終結配列」と言う用語は、コード配列下流に位置するDNA配列を指し、これはmRNAプロセッ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を含む。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。異なる3'非コード配列の使用は、インゲルブレヒト(Engelbrecht), I. L. ら、Plant Cell, 1: 671~680頁(1989年)で例示される。

【0113】

「RNA転写物」とは、RNAポリメラーゼが触媒するDNA配列の転写から得られる生成物を指す。RNA転写物がDNA配列の完全な相補的コピーである場合、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ッシングに由来するRNA配列である場合、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、細胞によってタンパク質に翻訳ができるRNAを指す。「cDNA」とは、逆転写酵素を使用してmRNAテンプレートから合成され、それに相補的なDNAを指す。cDNAは一本鎖であり、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転換できる。「センスRNA」とは、mRNAを含み、細胞内または生体外でタンパク質に翻訳ができる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あり、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5,170,065号明細書)。アンチセンスRNAの相補性は、特定遺伝子転写物のあらゆる部分、すなわち5'非コード配列、3'非コード配列、イントロン、またはコード配列にあってもよい。「機能性RNA」とは、翻訳されなくてもよいがそれでもなお細胞プロセスに影響するアンチセンスRNA、リボザイムRNA、またはその他のRNAを指す。「相補体」および「逆相補体」という用語は、mRNA転写物に関してここで同義的に使用され、メッセージのアンチセンスRNAを画定することを意図する。

10

20

30

40

50

【0114】

「作動的に結合した」と言う用語は、1つの機能が他方の機能によって制御されるような、単一核酸断片上の核酸配列のつながりを指す。例えばプロモーターがコード配列の発現を制御できる（すなわちコード配列がプロモーターの転写調節下にある）場合、それはそのコード配列と作動的に結合する。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に作動的に結合できる。別の例では、本発明の相補的RNA領域は、標的mRNAに5'で、または標的mRNAに3'で、または標的mRNA内で、直接または間接的のどちらかで作動的に結合でき、または標的mRNAに対して第1の相補的領域は5'でその相補体は3'である。

【0115】

10

ここで使用される標準組み換え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、サムブルック(Sambrook), J.、フリッチュ(Fritsch), E. F.、およびマニアティス(Maniatis), T.、「分子クローニング：実験室マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」；コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー(Cold Spring Harbor Laboratory)：ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバー(Cold Spring Harbor, NY)(1989年)で述べられている。形質転換法は当業者によく知られており、下述する。

【0116】

20

「PCR」または「ポリメラーゼ連鎖反応」は大量の特定DNAセグメント合成のための技術であり、一連の反復サイクルからなる(コネチカット州ノーウォークのパーキン・エルマー・シータス(Perkin Elmer Cetus Instruments(Norwalk, CT)))。典型的に二本鎖DNAは加熱変性され、標的セグメントの3'境界に相補的な2つのプライマーが低温でアニールされ、次に中温で延長される。これらの3つの連続したステップの一組が「サイクル」と称される。

【0117】

「組み換え」という用語は、例えば化学合成による、または遺伝的工学技術による核酸の単離されたセグメントの操作による、2つのさもなければ分離した配列のセグメントの人工的組み合わせを指す。

【0118】

30

「プラスミド」、「ベクター」、および「カセット」と言う用語は、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DNA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、あらゆる供給源に由来する一本鎖または二本鎖DNAまたはRNAの配列、ゲノム一体化配列、直鎖または環状のファージまたはヌクレオチド配列を自律的に複製するかもしれない、そこではいくつかのヌクレオチド配列が独自の構成に結合または組み換えされ、それは選択された遺伝子産物のために、適切な3'非翻訳配列と共にプロモーター断片およびDNA配列を細胞中に導入することができる。「転換カセット」とは外来遺伝子を含有し、外来遺伝子に加えて、特定の宿主細胞の形質転換を促進する要素を有する特定のベクターを指す。「発現カセット」とは、外来性遺伝子を含有し、外来性遺伝子に加えて外来性宿主におけるその遺伝子の促進された発現を可能にする要素を有する特定のベクターを指す(すなわちその中に核酸配列または断片を転移できる離散した核酸断片)。

【0119】

40

「組み換えコンストラクト」、「発現コンストラクト」、「キメラコンストラクト」、「コンストラクト」、および「組み換えDNAコンストラクト」という用語は、ここで区別なく使用される。組み換えコンストラクトは、例えば自然には一緒に存在しない制御およびコード配列などの核酸断片の人工的組み合わせを含んでなる。例えばキメラコンストラクトは、異なる供給源に由来する制御配列およびコード配列、または同一源に由来するが自然に存在す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。このようなコンストラクトはそれ自体で使用してもよく、またはベクターとの

50

組み合わせで使用してもよい。ベクターが使用される場合、当業者によく知られているように、ベクターの選択は、宿主細胞を形質転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、本発明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転換して選択し増殖させるために、ベクター上に存在すべき遺伝的要素を十分承知している。当業者はまた、異なる独立した形質転換事象が、異なる発現レベルおよびパターンをもたらし(ジョーンズ(Jones)ら、E M B O J . , 4 : 2 4 1 1 ~ 2 4 1 8 頁(1 9 8 5 年) ; デアルメイダ(De Almeida)ら、Mol . Gen . Genetics , 2 1 8 : 7 8 ~ 8 6 頁(1 9 8 9 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列を得るために、複数事象がスクリーンされれば好ましいことも認識する。このようなスクリーニングは、例えばDNAのサザン分析、mRNA発現のノーザン分析、タンパク質発現の免疫プロット法分析、または表現型分析によって達成されてもよい。

【 0 1 2 0 】

「発現」という用語は、ここでの用法では、機能性最終生成物(例えば [前駆または成熟いずれかの] mRNA またはタンパク質) の生成を指す。

【 0 1 2 1 】

「導入する」という用語は、細胞内に核酸(例えば発現コンストラクト) またはタンパク質を提供することを意味する。導入するとは、核酸が細胞のゲノム中に組み込まれてもよい真核生物または原核生物細胞内への核酸の組み込みへの言及を含み、核酸またはタンパク質の細胞への一時的提供への言及を含む。導入するとは、安定したまたは一時的形質転換法、ならびに有性交配への言及を含む。したがって「導入する」とは、細胞内への核酸断片挿入(例えば組み換えDNAコンストラクト / 発現コンストラクト) の文脈において、「形質移入」または「形質転換」または「形質導入」を意味し、真核生物または原核生物細胞中への核酸断片組み込みへの言及を含み、そこでは核酸断片が細胞ゲノム(例えば染色体、プラスミド、色素体またはミトコンドリアDNA) 中に組み込まれて、自律性レプリコンに転換され、または一時的に発現されてもよい(例えば形質移入mRNA) 。

【 0 1 2 2 】

「成熟」タンパク質とは、翻訳後処理されたポリペプチドを指す(すなわち一次翻訳生成物中に存在するあらゆるプレまたはプロペプチドがそれから除去されたもの) 。「前駆」タンパク質とは、mRNAの翻訳の一次生成物を指す(すなわちプレまたはプロペプチドがなおも存在するもの) 。プレまたはプロペプチドは、細胞内局在化シグナルであってもよいが、これに限定されるものではない。

【 0 1 2 3 】

「安定な形質転換」とは、遺伝的に安定な遺伝をもたらす、核およびオルガネラゲノムの双方を含む宿主生物体ゲノム中への核酸断片の転移を指す。対照的に「一過性形質転換」は、組み込みまたは安定な遺伝なしに遺伝子発現をもたらす、宿主生物体の核、またはDNA含有オルガネラ中への核酸断片の転移を指す。形質転換された核酸断片を含有する宿主生物体は、「遺伝子導入」生物体と称される。

【 0 1 2 4 】

ここでの用法では「遺伝子導入」とは、そのゲノム中に異種のポリヌクレオチドを含んでなる植物または細胞を指す。好ましくは、異種のポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドが続く世代に受け継がれるように、ゲノム中に安定して組み込まれる。異種のポリヌクレオチドは、単独で、または発現コンストラクトの一部としてゲノム内に組み込まれてもよい。遺伝子導入はここで、最初にそのように改変された遺伝子導入、ならびに最初の遺伝子導入から有性交配または無性繁殖で作り出されたものを含め、その遺伝子型が異種の核酸の存在によって改変されている、あらゆる細胞、細胞系、カルス、組織、植物部分または植物を含めて使用される。「遺伝子導入」という用語は、ここでの用法では、従来の植物育種法による、またはランダム他家受精、非組み換えウイルス感染、非組み換え細菌性形質転換、非組み換え遺伝子転移、または突然変異などの天然事象によるゲノム改変(染色体または染色体外の) を包含しない。

10

20

30

40

50

【0125】

「アンチセンス阻害」とは、標的タンパク発現を抑制できるアンチセンスRNA転写物の生成を指す。「コサプレッション」とは、同一のまたは実質的に類似の外来性または内在性遺伝子の発現を抑制できるセンスRNA転写物の生成を指す（米国特許第5,231,020号明細書）。植物中のコサプレッションコンストラクトは、センス方向で、内在性mRNAに対する相同性を有する核酸配列の過剰発現に注目することにより、以前にデザインされており、それは過剰発現される配列に対して相同性を有する全てのRNAの減少をもたらす（ヴォーチェール（Vaucheret）ら、Plant J. 16: 651~659頁（1998年）；およびグーラ（Gura）、Nature, 404: 804~808頁（2000年））。この現象の全体的効率は低く、RNA減少の程度は大きく異なる。より最近の研究は、発現されるRNAのための潜在的な「ステム・ループ」構造をもたらす、相補的方向で配列をコードするmRNAの全部または一部を組み込んだ「ヘアピン」構造の使用について述べている（国際公開第99/53050号パンフレット；国際公開第02/00904号パンフレット）。これは回収される遺伝子導入植物中のコサプレッションの頻度を増大させる。別の変形例は、配列をコードする近位mRNAの抑制または「サイレンシング」を制御するための植物ウィルス配列の使用について述べる（国際公開第98/36083号パンフレット）。これらのコサプレッション現象のどちらも機構的には解明されていないが、遺伝的証拠がこの複雑な状況を解き明かし始めた（エルマヤン（Elmayan）ら、Plant Cell 10: 1747~1757頁（1998年））。

10

20

【0126】

「油性」と言う用語は、それらのエネルギー源を脂質の形態で保存する傾向がある生物を指す（ウイーテ（Weete）、「菌・カビ脂質生化学（Fungal Lipid Biochemistry）」、第2版、Plenum（1980年））。油性として同定される植物クラスは、一般に「油料種子」植物と称される。油料種子植物の例としては、ダイズ（グリシン（Glycine）およびソヤ（Soyja）種）、亜麻（リーナス（Linum）種）、アブラナ（ブロッサム（Brassica）種）、トウモロコシ、綿、ベニバナ（カルタマス（Carthamus）種）およびヒマワリ（ヘリアンタス（Helianthus）種）が挙げられるが、これに限定されるものではない。

30

【0127】

これらの油性微生物細胞内で、細胞油またはTAG含量は一般にS字形曲線に従い、対数増殖後期または定常増殖初期において脂質濃度が最大に達するまで増大し、次に定常増殖後期および死滅期において徐々に減少する（ヨンマニットチャイ（Yongmanitchai）およびワード（Ward）、Appl. Environ. Microbiol. 57: 419~25頁（1991年））。

【0128】

「油性酵母菌」と言う用語は、油を生成する酵母菌として分類される微生物を指す。油性微生物が、約25%を超えるその乾燥細胞重量を油として蓄積するのは珍しくない。油性酵母菌の例としては、ヤロウイア（Yarrowia）、カンジダ（Candida）、ロドトルラ（Rhodotorula）、ロドスボリジウム（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）属が挙げられるが、決してこれに限定されるものではない。

40

【0129】

「ミドリムシ綱（Euglenophyceae）」という用語は、淡水、海水、土壤および寄生性環境に生息する、一群の単細胞で無色または光合成鞭毛虫（「ユーグレナ属」）を指す。本綱は単生の単細胞によって特徴づけられ、大多数は自由遊泳性であり、レザバーとして知られている前側陷入から生える2本の鞭毛（その1本は出現していないともよい）を有する。光合成ユーグレナ属は1個から多数の葉緑体を含有し、それはミニディスクから幅広いプレートまたはリボンまで様々である。無色ユーグレナ属は栄養素同化

50

作用のために、浸透栄養または摂食栄養に依存する。約1000種について既述され、約40の属および6の目に分類されている。ミドリムシ綱(*Euglenophyceae*)の例としては、次の属が挙げられるが、これに限定されるものではない。ユートレプチエラ(*Eutreptiella*)、ユーグレナ(*Euglena*)、およびテトルエトレプチア(*Tetruotreptia*)。

【0130】

「植物」という用語は、植物全体、植物器管、植物組織、種子、植物細胞、種子とその子孫を指す。植物細胞としては、種子からの細胞、懸濁液培養、胚芽、成長点領域、カルス組織、葉、根、芽、配偶体、胞子体、花粉、および小胞子が挙げられるが、これに限定されるものではない。

10

【0131】

「子孫」は、植物のあらゆる引き続く世代を含んでなる。

【0132】

概説：脂肪酸およびトリアシルグリセロールの微生物生合成

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全体的な炭素対窒素比に応えて誘発される。油性微生物中に遊離パルミチン酸(16:0)の新規(de novo)合成をもたらすこのプロセスについては、国際公開第2004/101757号パンフレットで詳細に述べられる。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、より長鎖の飽和および不飽和脂肪酸誘導体の前駆物質である(図1)。

20

【0133】

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.)アシルトランスフェラーゼによる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.)アシルトランスフェラーゼによる第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.)アシルトランスフェラーゼの作用による第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。

30

【0134】

オメガ脂肪酸の生合成

オレイン酸が長鎖-3/-6脂肪酸に変換される代謝プロセスは、炭素原子付加を通じた炭素鎖の延長、および二重結合添加を通じた分子の不飽和化を伴う。これは、小胞体膜内に存在する一連の特別な不飽和化酵素および延長酵素を必要とする。しかし図1に示され下で述べられるように、特定-3/-6脂肪酸生成のための複数の代案の経路があることが多い。

【0135】

具体的には、全ての経路は、12デサチュラーゼによる、オレイン酸から第1の-6脂肪酸であるLAへの最初の変換を必要とする。次に「9エロンガーゼ/8デサチュラーゼ経路」を使用して、長鎖-6脂肪酸が次のようにして形成される。(1)9エロンガーゼによってLAがEDAに転換され、(2)8デサチュラーゼによってEDAがDGLAに転換され、(3)5デサチュラーゼによってDGLAがARAに転換される。代案としては次のようにして、長鎖-3脂肪酸形成のために「9エロンガーゼ/8デサチュラーゼ経路」を利用することができる。(1)15デサチュラーゼによってLAが第1の-3脂肪酸であるALFAに転換され、(2)9エロンガーゼによってALFAがETRAに転換され、(3)8デサチュラーゼによってETRAがETAに転換され、(4)5デサチュラーゼによってETAがEPAに転換され、(5)C₂₀/22エロンガーゼによってEPAがDPAに転換され、(6)4デサチュラーゼによってDPAがDHAに転換される。場合により、-6脂肪酸が-3脂肪酸に転換されて

40

50

もよい。例えば 17 デサチュラーゼ活性によって、E T A および E P A がそれぞれ D G L A および A R A から生成される。

【 0 1 3 6 】

- 3 / - 6 脂肪酸合成のための代案の経路は、6 デサチュラーゼおよび C₁₈ / C₂₀ エロンガーゼを利用する（すなわち「6 デサチュラーゼ / 6 エロンガーゼ経路」）。より具体的には、6 デサチュラーゼによって L A および A L A をそれぞれ G L A および S T A に転換し、次に C₁₈ / C₂₀ エロンガーゼによって G L A を D G L A に、および / または S T A を E T A に転換してもよい。

【 0 1 3 7 】

- 3 / - 6 脂肪酸の生成のために特定の宿主生物中に導入することが必要とされる 10 特定の機能性は、宿主細胞（およびその天然 P U F A プロフィールおよび / またはデサチュラーゼ / エロンガーゼプロフィール）、基質の可用性、および所望の最終産物に左右されることが考察される。例えば 9 エロンガーゼ / 8 デサチュラーゼ経路によって生成される P U F A は G L A を欠いているので、いくつかの実施態様では、6 デサチュラーゼ / 6 エロンガーゼ経路の発現とは反対に、9 エロンガーゼ / 8 デサチュラーゼ経路の発現が好ましいかもしれない。

【 0 1 3 8 】

当業者は、- 3 / - 6 脂肪酸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る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、菌・カビ、植物、動物など）から単離され、半合成経路によって生成され、または新規（d e n o v o）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。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 P U F A 合成に必須であるかどうか、および / または 4.) ポリペプチドが必要とする補助因子。発現したポリペプチドは、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したパラメーターを有する（より詳しくは国際公開第 2 0 0 4 / 1 0 1 7 5 7 号パンフレットを参照されたい）。

【 0 1 3 9 】

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ィールは、典型的に所望の - 3 / - 6 脂肪酸、ならびに様々な上流中間 P U F A からなる様々な P U F A の混合物である。したがって所望の脂肪酸合成を最適化するのに際し、各酵素の変換効率の考慮もまた有益であり、生成物の最終所望脂質プロフィールの観点から考慮しなくてはならない。

【 0 1 4 0 】

上のそれぞれの考慮を念頭に、公的に入手可能な文献（例えばジエンバンク）、特許文献、および P U F A 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、C₁₈ / C₂₀ 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、C₁₄ / C₁₆ エロンガーゼ、C₁₆ / C₁₈ 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 C₂₀ / C₂₂ 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 P U F A 合成を可能にしまたは増強するのに適する。

【 0 1 4 1 】

新しい 9 エロンガーゼの配列同定

本発明では、9 エロンガーゼをコードするヌクレオチド配列が、ミドリムシ（E u g l e n a g r a c i l i s）（ここで「E g D 9 e」と称する）、およびユートレブチ

10

20

30

40

50

エラ (*Eutreptiella*) 種 C C M P 3 8 9 (ここで「 E 3 8 9 D 9 e 」と称する) から単離されている。

【 0 1 4 2 】

E g D 9 e 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からは、最も類似した既知の配列 (すなわち I g D 9 e) が、ここで報告されるクラスタル V 分析を使用した 2 5 8 のアミノ酸長にわたる E g D 9 e のアミノ酸配列と、約 3 1 . 8 % 同一であることが明らかにされる。

【 0 1 4 3 】

E 3 8 9 D 9 e 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からは、最も類似した既知の配列 (すなわち I g D 9 e) が、ここで報告されるクラスタル V 分析を使用した 2 6 3 のアミノ酸長にわたる E 3 8 9 D 9 e のアミノ酸配列と、約 3 3 . 1 % 同一であることが明らかにされる。 10

【 0 1 4 4 】

参考までに、クラスタル V 分析を使用したことで配列番号 2 および配列番号 5 で記載される新しい E g D 9 e および E 3 8 9 D 9 e タンパク質配列の比較は、6 5 . 1 % の同一性を示す。

【 0 1 4 5 】

本発明の文脈で、好ましいアミノ酸断片は、ここで E g D 9 e および E 3 8 9 D 9 e 配列と少なくとも約 7 0 % ~ 8 5 % 同一であり、少なくとも約 8 5 % ~ 9 0 % 同一の配列が特に適切であり、少なくとも約 9 0 % ~ 9 5 % 同一の配列が最も好ましい。本 O R F に対応する好ましい E g D 9 e および E 3 8 9 D 9 e 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、それぞれここで報告される E g D 9 e および E 3 8 9 D 9 e 核酸配列と少なくとも約 7 0 % ~ 8 5 % 同一であり、少なくとも 8 5 % ~ 9 0 % 同一の配列が特に適切であり、少なくとも約 9 0 % ~ 9 5 % 同一の配列が最も好ましい。 20

【 0 1 4 6 】

代案の実施態様では、本 E g D 9 e および E 3 8 9 D 9 e 配列は、特定の宿主生物中の発現のためにコドン最適化できる。当該技術分野でよく知られているように、宿主が好むコドンの使用はポリペプチドをコードする異質遺伝子の発現を実質的に増強できるので、これは代案の宿主中の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、タンパク質 (好ましくは最大量で発現するもの) 中でのコドン使用を調べ、どのコドンが最高頻度で使用されるかを判定することにより、対象とする特定の宿主種内で判定できる。次に宿主種で好まれるコドンを使用して、エロンガーゼ作用を有する対象とす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。 D N A の全部 (または一部) はまた、転写 m R N A 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。 D N A の全部 (または一部) 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されるように合成できる。 30

【 0 1 4 7 】

好ましい本発明の一実施態様では、E g D 9 e および E 3 8 9 D 9 e は、ヤロウィア・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、最初に Y . リポリティカ (*lipolytica*) のコドン使用頻度プロフィールを判定し (国際公開第 0 4 / 1 0 1 7 5 7 号パンフレット参照) 、好まれるコドンを同定することで可能であった。さらに「 A T G 」開始コドン周辺の共通配列を判定して、Y . リポリティカ (*lipolytica*) 中での遺伝子発現の最適化を達成した。 40

【 0 1 4 8 】

E g D 9 e の最適化は、7 7 7 b p のコード領域の 1 1 7 b p (1 5 . 1 %) の改変、および 1 0 6 コドンの最適化をもたらした。コドン最適化された遺伝子 (「 E g D 9 e S 」、配列番号 3) のいずれの改変もタンパク質をコードするアミノ酸配列 (配列番号 2) を変化させなかった。実施例 8 で述べられるように、コドン最適化された遺伝子を Y . リポリティカ (*lipolytica*) 中で発現すると、L A の E D A への延長において、 50

野生型 E g D 9 e 遺伝子よりも約 16.2 % 効率的であった。

【 0 1 4 9 】

同様に E 3 8 9 D 9 e の最適化は、792 b p コード領域の 128 b p の改変 (16.2 %) および 113 コドンの最適化をもたらした。コドン最適化された遺伝子 (「E 3 8 9 D 9 e S」、配列番号 6) のいずれの改変もタンパク質をコードするアミノ酸配列 (配列番号 5) を変化させなかった。実施例 24 で述べられるように、コドン最適化された遺伝子を Y . リポリティカ (l i p o l y t i c a) 中で発現すると、野生型遺伝子と同様の効率で L A を E D A に延長した。

【 0 1 5 0 】

したがって本発明は、

10

(a) 9 エロンガーゼ活性を有し、クラスタル V 法のアライメントに基づいて配列番号 2 (E g D 9 e) または配列番号 5 (E 3 8 9 D 9 e) で記載されるアミノ酸配列と比べると少なくとも 70 % のアミノ酸同一性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列を含んでなる単離された核酸配列、

(b) 9 エロンガーゼ活性を有するポリペプチドをコードし、BLASTN 法のアライメントに基づいて配列番号 1 (E g D 9 e)、配列番号 3 (E g D 9 e S)、配列番号 4 (E 3 8 9 D 9 e) または配列番号 6 (E 3 8 9 D 9 e S) で記載されるヌクレオチド配列と比べると少なくとも 70 % の配列同一性を有する、ヌクレオチド配列を含んでなる単離された核酸配列、

(c) 9 エロンガーゼ活性を有するポリペプチドをコードし、0.1 × SSC、0.1 % SDS で 65 °C 、そして 2 × SSC、0.1 % SDS で洗浄後、0.1 × SSC、0.1 % SDS というストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下で、配列番号 1 (E g D 9 e)、配列番号 3 (E g D 9 e S)、配列番号 4 (E 3 8 9 D 9 e) または配列番号 6 (E 3 8 9 D 9 e S) で記載されるヌクレオチド配列とハイブリダイズする、ヌクレオチド配列を含んでなる単離された核酸配列、および

20

(d) (a)、(b) または (c) のヌクレオチド配列と同数のヌクレオチドからなりそれと 100 % 相補的である、前記ヌクレオチド配列の相補体よりなる群から選択される、9 エロンガーゼ活性を有す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配列に関する。

【 0 1 5 1 】

30

当業者はここで教示を使用して、野生型 E g D 9 e および / または E 3 8 9 D 9 e 配列に基づいて、代案の宿主 (すなわちヤロウィア・リポリティカ (Yarrowia l i p o l y t i c a) 以外の) 中での最適発現に適した、様々なその他のコドン最適化 9 エロンガーゼタンパク質を作り出すことができる。この代案の宿主生物としては、植物または植物部分が挙げられるが、これに限定されるものではない。したがって本発明は、野生型 E g D 9 e (すなわち配列番号 2 によってコードされる) または野生型 E 3 8 9 D 9 e (すなわち配列番号 5 によってコードされる) のどちらかに由来する、あらゆるコドン最適化 9 エロンガーゼタンパク質に関する。これとしては、どちらもヤロウィア・リポリティカ (Yarrowia l i p o l y t i c a) 中での発現のためにコドン最適化された、配列番号 3 で記載されるヌクレオチド配列 (合成 9 エロンガーゼタンパク質をコードする (すなわち E g D 9 e S)) および配列番号 6 で記載されるヌクレオチド配列 (合成 9 エロンガーゼタンパク質をコードする (すなわち E 3 8 9 D 9 e S)) が挙げられるが、これに限定されるものではない。

40

【 0 1 5 2 】

別の態様では、本発明は、配列番号 8 (すなわち「I g D 9 e」、イソクリシス・ガルバナ (I s o c h r y s i s g a l b a n a) からの 9 エロンガーゼ (NCBI 登録番号 A A L 3 7 6 2 6 (G I 1 7 2 2 6 1 2 3)) を除く、9 エロンガーゼをコードする核酸配列を含んでなる単離された核酸断片に関し、前記 9 エロンガーゼを含んでなるアミノ酸配列は、次よりなる群から選択される、アミノ酸配列モチーフの少なくとも 1 つを含有する。

50

a) Y N X (L または F) X X X X S X X S F (配列番号 1 2 3)
 、
 b) F Y X S K X X (E または D) Y X D (T または S) X X L (配列番号 1 2 4)、
 c) L (Q または H) X F H H X G A (配列番号 1 2 5)、
 d) M Y X Y Y X X X X X X (K または R または N) F (配列番号 1 2 6)、
 e) K X L (I または L または M) T X X Q (配列番号 1 2 7)、
 f) W X F N Y X Y (配列番号 1 2 8)、および
 g) Y X G X V X X L F (配列番号 1 2 9)。

ここで X は、いかなるアミノ酸でもあることができる。

【 0 1 5 3 】

下線付きアミノ酸は 9 エロンガーゼに特有かもしれない。図 2 は、クラスタル V アライメント (デフォルトパラメーターによる) を使用した、本発明の 9 エロンガーゼとイソクリシス・ガルバナ (Isochrysis galbana) からの 9 エロンガーゼとの比較を記載する。具体的には配列番号 2 (EgD9e) 、配列番号 5 (E389D9e) 、および配列番号 8 (IgD9e) を比較した。本発明のモチーフを含んでなる領域はボックス中に示す。

【 0 1 5 4 】

相同体の同定および単離

配列分析ソフトウェアを使用して、本エロンガーゼ配列 (すなわち EgD9e 、 EgD9eS 、 E389D9e 、 E389D9eS) またはその部分のいずれかを使用して、同一または別の細菌、藻類、菌・カビ、ユーグレナ属または植物種中で、 9 エロンガーゼ相同体を検索してよい。一般には、このようなコンピューターソフトウェアは、様々な置換、欠失、およびその他の改変に相同性の程度を割り当てて同様の配列をマッチする。

【 0 1 5 5 】

代案としては 9 エロンガーゼ相同体の同定のために、本エロンガーゼ配列またはその部分のいずれかをハイブリダイゼーション試薬として用いてもよい。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、対象とす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。本発明のプローブは、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、検出される核酸配列と「ハイブリダイズ可能」である。プローブの長さは、 5 個の塩基から数万個の塩基の間で変動してもよいが、典型的に約 15 個の塩基から約 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、検出され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間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の特定塩基の一部は、適切な相補的塩基と対合形成しない。

【 0 1 5 6 】

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、十分長い時間接触しなくてはならない。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。場合により、カオトロピック剤を添加してもよい (塩化ゲアニジニウム、ゲ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) 。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) 添加できる。

10

20

30

40

50

【0157】

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容量%、好ましくは30容量%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、ファーマシア(Pharmacia Inc.)からのFICOLL(約300～500kda1)、ポリビニルピロリドン(約250～500kda1)、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の非標識の担体核酸、(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、および場合により約0.5～2%重量/体積のグリシンも含まれる。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、(例えば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体積排除剤などの他の添加剤を含めてもよい。

【0158】

核酸ハイブリダイゼーションは多様なアッセイ型式に適合できる。最も適切なもの1つは、サンドイッチアッセイ型式である。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。

【0159】

さらに別の実施態様では、ここで述べられる9エロンガーゼ核酸断片(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、菌・カビ、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、当該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.)核酸增幅技術の様々な使用で例示されるようなDNAおよびRNA增幅法[例えばマリス(Mullis)らに付与された米国特許第4,683,202号明細書のポリメラーゼ連鎖反応(PCR);タボール(Tabor),S.ら、Proc. Acad. Sci. USA, 82, 1074頁(1985年)のリガーゼ連鎖反応(LCR);または(ウォーカー(Walker)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 392頁(1992年)の連鎖置換増幅(SDA)]、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。

【0160】

例えば本明細書で述べる9エロンガ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、本核酸断片の全てまたは一部をDNAハイブリダイゼーションプローブとして使用して、例えばあらゆる所望の酵母菌または菌・カビ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(EDAおよび/またはETRAを产生する生物が好ましい)。本核酸配列に基づく特異的オリゴヌクレオチドプローブは、当該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(マニアティス(Maniatis)、前出)。さらに当業者に既知の方法(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)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、適切なストリングエ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。

【0161】

10

20

30

40

50

典型的に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当該技術分野で一般的であり、よく知られている。(K. E. デービス(Davis)編、「ヒトにおける遺伝病：実際的アプローチ(Human Genetic Diseases: A Practical Approach)」よりティン(Thein)およびウォリス(Wallace)、「遺伝的障害診断における特異的ハイブリダイゼーションプローブとしてのオリゴヌクレオチドの使用(The use of oligonucleotide as specific hybridization probes in the Diagnosis of Genetic Disorders)」(1986年)33~50頁、IRL: Herndon, VA; およびホワイト(White), B. A. 編、「分子生物学における方法(Methods in Molecular Biology)」よりライクリック(Rychlik), W.、「PCRプロトコル：最近の方法と応用(PCR Protocols: Current Methods and Applications)」(1993年)第15巻、31~39頁、ヒューマナ(Humana): ニュージャージー州トトワ(Totowa, NJ))。

【0162】

一般に本配列の2本の短い断片をPCRプロトコルで使用して、DNAまたはRNAからの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。またクローンされた核酸断片ライブラリーに対して、1つのプライマーの配列が本核酸断片に由来し、別のプライマーの配列が真核生物の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、PCRを実施してもよい。

【0163】

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よい。例えば当業者は、RACEプロトコル(フローマン(Frohman)ら、PNAS USA 85: 8998頁(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、本配列からデザインできる。メリーランド州ゲーサーズバーグのギブコ/BRL(Gibco/BRL(Gaithersburg, MD))から市販される3'RACEまたは5'RACEシステムを使用して、特定の3'または5'cDNA断片を単離できる(オハラ(Obara)ら、PNAS USA 86: 5673頁(1989年); ロー(Loh)ら、Science 243: 217頁(1989年))。

【0164】

別の実施態様では、新しい改善された脂肪酸エロンガーゼを作り出すために、ここで述べられるいずれの9エロンガーゼ核酸断片(または同定されるそのいずれの相同体)を使用してもよい。当該技術分野でよく知られているように、生体外変異誘発および選択、化学的突然変異誘発、「遺伝子シャフリング」法またはその他の手段を使用して、天然のエロンガーゼ遺伝子の突然変異を得ることができる(このような突然変異は、欠失、挿入、および点突然変異またはそれらの組み合わせを含んでもよい)。これはそれぞれ、生体内において、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の宿主細胞中の機能に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、エロンガ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、酵素的活性に重要な対象とするポリペプチドの領域(すなわち9エロンガーゼ)は、日常的変異誘発、得られた突然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判定できる。これらの技術の概要については、国際公開第2004/101757号パンフレットで述べられる。EgD9e、EgD9eS、E389D9e、およびE389D9eS由來の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、本発明の範囲内である。

【0165】

10

20

30

40

50

代案としては改善された脂肪酸がドメイン交換によって合成されてもよく、そこではここで述べられる 9 エロンガーゼ核酸断片のいずれかからの機能性ドメインが代案のエロンガーゼ遺伝子中の機能性ドメインと交換され、それによって新しいタンパク質がもたらされる。

【 0 1 6 6 】

様々な - 3 および / または - 6 脂肪酸の生成のための方法

適切なプロモーターの制御下における、ここで述べられる 9 エロンガーゼをコードするキメラ遺伝子（すなわち E g D 9 e 、 E g D 9 e S 、 E 3 8 9 D 9 e 、 E 3 8 9 D 9 e S またはその他の突然変異酵素、コドン最適化酵素またはその相同体）の導入は、それぞれ形質転換された宿主生物中での E D A および / または E T r A 生成の増大をもたらすことが予期される。したがって本発明は、基質が所望の脂肪酸生成物（すなわち E D A および / または E T r A ）に転換されるように、脂肪酸基質（すなわち L A および / または A L A ）をここで述べられるエロンガーゼ酵素（例えば E g D 9 e 、 E g D 9 e S 、 E 3 8 9 D 9 e 、 E 3 8 9 D 9 e S ）に曝露することを含んでなる、 P U F A 生成に向けた方法を包含する。10

【 0 1 6 7 】

より具体的には、本発明の目的は、

a) (1) 9 エロンガーゼ活性を有し、クラスタル V 法のアライメントに基づいて配列番号 2 (E g D 9 e) または配列番号 5 (E 3 8 9 D 9 e) で記載されるアミノ酸配列と比べると少なくとも 70 % のアミノ酸同一性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列を含んでなる単離された核酸配列。20

(2) 9 エロンガーゼ活性を有するポリペプチドをコードし、 0 . 1 × S S C 、 0 . 1 % S D S で 65 、そして 2 × S S C 、 0 . 1 % S D S で洗浄後、 0 . 1 × S S C 、 0 . 1 % S D S というストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下で、配列番号 1 (E g D 9 e) 、配列番号 3 (E g D 9 e S) 、配列番号 4 (E 3 8 9 D 9 e) または配列番号 6 (E 3 8 9 D 9 e S) で記載されるヌクレオチド配列とハイブリダイズする、ヌクレオチド配列を含んでなる単離された核酸配列

よりなる群から選択される、 9 エロンガーゼ活性を有す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配列、および

b) L A 源

を含んでなる、宿主細胞（例えば油性酵母、ダイズ）中での E D A の生成方法を提供することであり、30

宿主細胞は 9 エロンガーゼが発現され、 L A が E D A に転換されるような条件下で生育され、 E D A は場合により回収される。

【 0 1 6 8 】

本発明の代案の実施態様では、 9 エロンガーゼは、 A L A の E T r A への変換のために使用されてもよい。したがって本発明は、 E T r A の生成方法を提供し、宿主細胞は、 a) (1) 9 エロンガーゼ活性を有し、クラスタル V 法のアライメントに基づいて配列番号 2 (E g D 9 e) または配列番号 5 (E 3 8 9 D 9 e) で記載されるアミノ酸配列と比べると少なくとも 70 % のアミノ酸同一性を有するポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列を含んでなる単離された核酸配列。40

(2) 9 エロンガーゼ活性を有するポリペプチドをコードし、 0 . 1 × S S C 、 0 . 1 % S D S で 65 、そして 2 × S S C 、 0 . 1 % S D S で洗浄後、 0 . 1 × S S C 、 0 . 1 % S D S というストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下で配列が配列番号 1 (E g D 9 e) 、配列番号 3 (E g D 9 e S) 、配列番号 4 (E 3 8 9 D 9 e) または配列番号 6 (E 3 8 9 D 9 e S) で記載されるヌクレオチド配列とハイブリダイズする、ヌクレオチド配列を含んでなる単離された核酸配列、

よりなる群から選択される、 9 エロンガーゼ活性を有す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配列、および

b) A L A 源

50

を含んでなり、

宿主細胞は 9 エロンガーゼが発現され、 A L A が E T r A に転換されるような条件下で生育され、 E T r A は場合により回収される。

【 0169 】

代案としては、ここで述べられる各 9 エロンガーゼ遺伝子およびその対応する酵素生成物は、間接的に例えば D G L A 、 E T A 、 A R A 、 E P A 、 D P A および / または D H A をはじめとする様々な - 6 および - 3 P U F A の生成のために使用できる（図 1 、国際公開第 2004 / 101757 号パンフレット参照）。 - 3 / - 6 P U F A の間接的生成は、中間体ステップまたは経路中間体の手段を通じて、脂肪酸基質が間接的に所望の脂肪酸生成物に転換されて起きる。したがってここで述べられる 9 エロンガーゼ（例えば E g D 9 e 、 E g D 9 e S 、 E 389D 9 e 、 E 389D 9 e S またはその他の突然変異酵素、コドン最適化酵素またはそれらの相同体）を P U F A 生合成経路の酵素（例えば 6 デサチュラーゼ、 C₁₈ / ₂₀ エロンガーゼ、 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、 C₁₄ / ₁₆ エロンガーゼ、 C₁₆ / ₁₈ エロンガーゼ、 5 デサチュラーゼ、 8 デサチュラーゼ、 4 デサチュラーゼ、 C₂₀ / 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して、より高いレベルのより鎖長の長い - 3 / - 6 脂肪酸（例えば A R A 、 E P A 、 D P A 、および D H A ）の生成をもたらしてもよいことが考察された。
10

【 0170 】

好ましい実施態様では、本発明の 9 エロンガーゼは、最低限 8 デサチュラーゼ（例えば配列番号 61 で記載される 8 デサチュラーゼ [E g D 8] または配列番号 69 で記載されるコドン最適化 8 デサチュラーゼ [E g D 8 S] ）と併せて発現される。しかし特定の発現力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 P U F A プロフィールおよび / またはデサチュラーゼ / エロンガーゼプロフィール）、基質可用性、および所望の最終産物に左右される。
20

【 0171 】

代案の実施態様では、ここで述べられる完全な配列、これらの完全な配列の相補体、これらの配列のかなりの部分、それに由来するコドン最適化工ロンガーゼ、およびそれらと実質的に相同的な配列に基づいて、宿主生物の天然 9 エロンガーゼを中断することが有用かもしれない。
30

【 0172 】

植物発現系、カセットとベクター、および形質転換

一実施態様では、本発明は、植物中での発現に適した少なくとも 1 つの制御配列と作動的に結合した、本発明の 9 エロンガーゼポリヌクレオチドのいずれか 1 つを含んでなる組み換えコンストラクトに関する。
30

【 0173 】

プロモーターは、プロモーター下流（ 3' ）の近接するコード配列から R N A を生成するように植物細胞機構に指示する D N A 配列である。プロモーター領域は、その中で遺伝子の R N A 転写物が作られる速度、発達段階、および細胞タイプに影響する。 R N A 転写物は処理されて m R N A を生成し、それはコードされたポリペプチドのアミノ酸配列に R N A 配列を翻訳するテンプレートの役割を果たす。 5' 非翻訳リーダー配列は、 m R N A の開始および翻訳で役割を果たしてもよい、タンパク質コード領域上流の m R N A の領域である。 3' 転写終結 / ポリアデニル化シグナルは、植物細胞中で機能して R N A 転写物および R N A 3' 末端へのポリアデニル酸ヌクレオチド付加の終結を引き起こす、タンパク質コード領域下流の非翻訳領域である。
40

【 0174 】

適切な時点で所望の宿主組織において所望の核酸断片をコードする翻訳可能 m R N A を発現することで、本発明を達成するのに十分な転写活性を有しさえすれば、 9 エロンガーゼコード配列の発現を進めるために選択されるプロモーターの起源は重要でない。異種のまたは非異種の（すなわち内在性）プロモーターのいずれかが本発明を実施するのに使
50

用できる。例えば適切なプロモーターとしては、- コングリシニンプロモーターの - プライムサブユニット、クニッツ (Kunitz) トリプシン阻害剤 3 プロモーター、アネキシンプロモーター、Gly1 プロモーター、- コングリシニンプロモーターの - サブユニット、P34/GlyBd m 30K プロモーター、アルブミンプロモーター、Leg A1 プロモーターおよび Leg A2 プロモーターが挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0175】

アネキシンまたは P34 プロモーターについては、国際公開第 2004 / 071178 号パンフレット (2004 年 8 月 26 日公開) で述べられる。アネキシンプロモーターの活性レベルは、次のような多くの既知の強力なプロモーターに匹敵する。
 (1) CaM V35S プロモーター (アタナソバ (Atanassova) ら、Plant Mol. Biol. 37 : 275 ~ 285 頁 (1998 年)) ; バトロー (Batt raw) およびホール (Hall) 、Plant Mol. Biol. 15 : 527 ~ 538 頁 (1990 年) ; ホルトロフ (Holtorf) ら、Plant Mol. Biol. 29 : 637 ~ 646 頁 (1995 年) ; ジェファーソン (Jefferson) ら、EMBO J. 6 : 3901 ~ 3907 頁 (1987 年) ; ウィルミンク (Wilminck) ら、Plant Mol. Biol. 28 : 949 ~ 955 頁 (1995 年) 、
 (2) アラビドブシス (Arabidopsis) オレオシンプロモーター (プラント (Plant) ら、Plant Mol. Biol. 25 : 193 ~ 205 頁 (1994 年)) ; リ (Li) 、テキサス A & M 大学博士論文、107 ~ 128 頁 (1997 年)) 、
 (3) アラビドブシス (Arabidopsis) ユピキチン延長タンパク質プロモーター (カリス (Callis) ら、J. Biol. Chem. 265 (21) : 12486 ~ 93 頁 (1990 年)) 、
 (4) トマトユピキチン遺伝子プロモーター (ロールフィンケ (Röllfinke) ら、Gene 211 (2) : 267 ~ 76 頁 (1998 年)) 、
 (5) ダイズ熱ショックタンパク質プロモーター (ショフル (Schoffl) ら、Mol. Gen. Genet. 217 (2 - 3) : 246 ~ 53 頁 (1989 年)) 、および
 (6) トウモロコシ H3 ヒストン遺伝子プロモーター (アタナソバ (Atanassova) ら、Plant Mol. Biol. 37 (2) : 275 ~ 85 頁 (1998 年)) 。

【0176】

アネキシンプロモーターの別の有用な特色は、発達中の種子におけるその発現プロファイルである。本発明のアネキシンプロモーターは、初期段階 (受粉の 10 日後以前) の発達中の種子において最も活性であり、後期にはほとんど静止する。アネキシンプロモーターの発現プロファイルは、例えば発達後期に最高活性を提供することが多い種子貯蔵タンパク質プロモーターなどの多くの種子特異的プロモーターのそれとは異なる (ヘン (Hen) ら、Dev. Genet. 10 : 112 ~ 122 頁 (1989 年) ; エルマーソン (Ellerstrom) ら、Plant Mol. Biol. 32 : 1019 ~ 1027 頁 (1996 年) ; ケディ (Keddie) ら、Plant Mol. Biol. 24 : 327 ~ 340 頁 (1994 年) ; プラント (Plant) ら、前出) ; リ (Li) 、前出) 。アネキシンプロモーターはより従来型の発現プロファイルを有するが、他の知られている種子特異的プロモーターとは、なおも相異なる。したがってアネキシンプロモーターは、初期発達段階において胚芽中の遺伝子の過剰発現または抑制が所望される場合、非常に魅力的な候補であろう。例えば初期胚芽発達を制御する遺伝子、または種子成熟に先だって代謝に関与する遺伝子を過剰発現することが望ましいかもしれない。

【0177】

特定の 9 エロンガーゼコード配列の発現に適した適切なプロモーターの同定に続いて、次にプロモーターは当業者によく知られている従来の手段を使用して、センス方向で作動的に結合される。

【0178】

実施例で使用される標準組み換え DNA および分子クローニング技術は当該技術分野で良く知られておりサムブルック (Sambrook) , J. ら、「分子クローニング : 実

10

20

30

40

50

験室マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」; 第2版; コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス (Cold Spring Harbor Laboratory Press): ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバー (Cold Spring Harbor, New York)、(1989年) (以下「サムブルック (Sambrook) ら、(1989年)」); またはオースベル (Ausubel), F. M.、ブレント (Brent), R.、キングストン (Kingston), R. E.、ムーア (Moore), D. D.、シードマン (Seidman), J. G.、スマス (Smith), J. A.、およびスツール (Struhl), K. 編、「分子生物学現代プロトコル (Current Protocols in Molecular Biology)」; ジョン・ Wiley & Sons: ニューヨーク州 (New York)、(1990年) (以下「オースベル (Ausubel) ら、(1990年)」) でより詳しく述べられている。
10

【0179】

ひとたび組み換えコンストラクトが生成すると、次にそれを当業者によく知られている方法 (例えば形質移入、形質転換、および電気穿孔) によって、選択された植物細胞に導入してもよい。油料種子植物細胞が好ましい植物細胞である。次に形質転換された植物細胞を長鎖 P U F A の発現を可能にする適切な条件下で培養して再生し、次にそれを場合により回収して精製する。

【0180】

本発明の組み換えコンストラクトを 1 個の植物細胞中に導入してもよく、または代案としては各コンストラクトを別々の植物細胞に導入してもよい。

【0181】

植物細胞中における発現は、上述のように一過性または安定な様式で達成してもよい。

【0182】

所望の長鎖 P U F A は種子内で発現できる。またこのような形質転換された植物から得られる種子または植物部分も本発明の範囲内である。

【0183】

植物部分は、次をはじめとするが、これに限定されるものではない分化および未分化組織を含む。根、茎、芽、葉、花粉、種子、腫瘍組織、および様々な形態の細胞および培養物 (単細胞、プロトプラスト、胚芽、および、カルス組織など)。植物組織は、植物中、または植物器官、組織または細胞培養物中にあってもよい。

【0184】

「植物器官」という用語は、形態学的および機能的に特徴的な部分を構成する、植物組織または一群の組織を指す。「ゲノム」という用語は、次を指す。1.) 生物の各細胞、またはウイルスまたは細胞小器官中に存在する遺伝物質の相補体全体 (遺伝子および非コード配列)、および / または 2.) 一方の親の (半数体) 単位として遺伝する染色体の完全な組。

【0185】

したがって本発明はまた、細胞を本発明の組み換えコンストラクトで形質転換し、前記組み換えコンストラクトで形質転換細胞を選択することを含んでなる、細胞を形質転換する方法に関する。

【0186】

また植物細胞を本発明の 9 エロンガーゼポリヌクレオチドで形質転換し、そして形質転換された植物細胞から植物を再生させることを含んでなる、形質転換された植物を作成する方法も興味深い。

【0187】

(主としてアグロバクテリウム・ツメファシエンス (Agrobacterium tumefaciens) の使用によって) 双子葉植物を形質転換して遺伝子導入植物を得る方法は、例えば綿 (米国特許第 5,004,863 号明細書、米国特許第 5,159,

10

20

30

40

50

135号明細書)、ダイズ(米国特許第5,569,834号明細書、米国特許第5,416,011号明細書)、アブラナ属(*Brassica*)(米国特許第5,463,174号明細書)、ピーナツ(チェン(*Cheng*)ら、*Plant Cell Rep.* 15:653~657頁(1996年);マッケントリー(*McKenty*)ら、*Plant Cell Rep.* 14:699~703頁(1995年))、パパイア(リング(*Ling*)、K.ら、*Bio/technology*、9:752~758頁(1991年))、およびエンドウマメ(グラント(*Grant*)ら、*Plant Cell Rep.* 15:254~258頁(1995年))について公開されている。その他的一般に使用される植物形質転換法のレビューについては、ニューウェル(*Newell*)、C.A.、*Mol. Biotechnol.* 16:53~65頁(2000年)を参照されたい。これらの形質転換法の1つは、アグロバクテリウム・リゾゲネス(*Agrobacterium rhizogenes*)(テフラー(*Tepfler*)、M.およびケース・デルバート(*Casse-Delbart*)、F.)、*Microbiol. Sci.* 4:24~28頁(1987年))を使用する。PEG融合(国際公開第92/17598号パンフレット)、電気穿孔(チョウリラ(*Chowrirai*)、G.M.ら、*Mol. Biotechnol.* 3:17~23頁(1995年);クリストウ(*Christou*)、P.ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*、84:3962~3966頁(1987年))、微量注入、または粒子衝撃(マッカーブ(*McCabe*)、D.E.ら、*Bio/technology*、6:923頁(1988年);クリストウ(*Christou*)ら、*Plant Physiol.* 87:671~674頁(1988年))を使用した、DNAの直接デリバリを使用したダイズの形質転換が公開されている。10 20

【0188】

植物組織からの植物再生のための多様な方法がある。特定の再生方法は、開始植物組織および再生する特定の植物種に左右される。単一植物プロトプラスト形質転換体から、または様々な形質転換外植片からの植物の再生、発達、および培養については当該技術分野でよく知られている(ワイスバハ(*Weissbach*)およびワイスバハ(*Weissbach*)編、「植物分子生物学法(*Methods for Plant Molecular Biology*)」、アカデミック(*Academic*):カリフォルニア州サンディエゴ(*San Diego, CA*)(1988年))。この再生および生育過程は、典型的に形質転換細胞を選択し、そして根付いた小植物段階を経る通常の胚芽発達段階を通じてそれらの個別化細胞を培養するステップを含む。遺伝子導入胚芽および種子も同様に再生させる。得られた遺伝子導入根付き芽をその後、土壤などの適切な植物成長培地に定植する。好ましくは再生した植物は自己受粉して、同型接合性遺伝子導入植物を提供する。さもなければ、再生植物から得られる花粉を農業経済学的に重要な系統の種子から成長させた植物に交配する。反対にこれらの重要な系統の植物からの花粉を使用して、再生植物を受粉させる。所望のポリペプチドを含有する本発明の遺伝子導入植物は、当業者によく知られている方法を使用して栽培される。30

【0189】

上で考察した手順に加えて、当業者は、巨大分子(例えばDNA分子、プラスミドなど)の構築、操作および単離のための特異的条件および手順、組み換えDNA断片および組み換え発現コンストラクトの產生、およびクローンのスクリーニングおよび単離について述べる標準的リソース材料を熟知している。例えばサムブルック(*Sambrook*)ら、「分子クローニング:実験室マニュアル(*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*)」、ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバー(*Cold Spring Harbor: NY*)(1989年);マリガ(*Maliga*)ら、「植物分子生物学法(*Methods in Plant Molecular Biology*)」、ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバー(*Cold Spring Harbor: NY*)(1995年);ビレン(*Birren*)ら、「ゲノム分析:遺伝子検出(*Genome Analysis: Detecting Ge*40 50

nes)」、第1巻、ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバー(Cold Spring Harbor: NY)(1998年); ビレン(Birren)ら、「ゲノム分析: DNA分析(Genome Analysis: Analyzing DNA)」、第2巻、ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバー(Cold Spring Harbor: NY)(1998年); クラーク(Clark)編、「植物分子生物学: 実験室マニュアル(Plant Molecular Biology: A Laboratory Manual)」、スプリンガー(Springer): ニューヨーク州(NY)(1997年)、を参照されたい。

【0190】

油料種子植物の例としては、次が挙げられるが、これに限定されるものではない。ダイズ、アブラナ(*Brassica*)種、ヒマワリ、トウモロコシ、綿、亜麻、およびベニバナ。10

【0191】

少なくとも20個の炭素原子および5個以上の炭素-炭素二重結合を有するPUFAの例としては、EPA、DPA、およびDHAなどの-3脂肪酸が挙げられるが、これに限定されるものではない。このような植物から得られる種子、ならびにこのような植物から得られる油もまた、本発明の範囲内である。

【0192】

したがって一実施態様では、本発明は、

a) 少なくとも1つの制御配列と作動的に結合して9エロンガ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コンストラクト、および20

b) 少なくとも1つの制御配列と作動的に結合して4デサチュラーゼ、5デサチュラーゼ、6デサチュラーゼ、8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、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C_{20/22}エロンガーゼより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コンストラクトを含んでなる、油料種子植物に関する。

【0193】

このような追加的デサチュラーゼは、例えば米国特許第6,075,183号明細書、米国特許第5,968,809号明細書、米国特許第6,136,574号明細書、米国特許第5,972,664号明細書、米国特許第6,051,754号明細書、米国特許第6,410,288号明細書、および国際公開第98/46763号パンフレット、国際公開第98/46764号パンフレット、国際公開第00/12720号パンフレット、および国際公開第00/40705号パンフレットで開示されている。30

【0194】

使用するカセットの組み合わせの選択は、形質転換される油料種子植物細胞のPUFAプロフィールおよび/またはデサチュラーゼ/エロンガーゼプロフィール、および発現される長鎖PUFAにある程度左右される。40

【0195】

別の態様では、本発明は、

(a) 細胞を本発明の組み換えコンストラクトで形質転換し、そして

(b) 長鎖PUFAを作る形質転換細胞を選択する

ことを含んでなる、植物細胞中で長鎖PUFAを作る方法に関する。

【0196】

なおも別の態様では、本発明は、

(a) ダイズ細胞を

(i) 少なくとも1つの制御配列と作動的に結合して9エロンガ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コンストラク50

ト、および

(i i) 少なくとも 1 つの制御配列と作動的に結合して 4 デサチュラーゼ、 5 デサチユラーゼ、 6 デサチュラーゼ、 8 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、 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 C_{20 / 22} エロンガーゼより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 コンストラクト

で形質転換し、

(b) ステップ (a) の形質転換細胞からダイズ植物を再生させ、そして

(c) 非形質転換ダイズ植物から得られた種子中のレベルと比べて、改変されたレベルの P U F A を有する、ステップ (b) の植物から得られた種子を選択する

ことを含んでなる、ダイズ細胞中で少なくとも 1 つの P U F A を生成する方法に関する。

【 0197 】

特に好ましい実施態様では、少なくとも 1 つの追加的組み換え DNA コンストラクトは、例えはミドリムシ (*Euglena gracilis*) から単離されたおよび / またはそれに由来する配列番号 61 および 69 で記載される 8 デサチュラーゼなどの 8 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。

【 0198 】

微生物発現系、カセットとベクター、および形質転換

ここで述べられる 9 エロンガーゼ遺伝子および遺伝子産物 (すなわち E g D 9 e 、 E g D 9 e S 、 E 3 8 9 D 9 e 、 E 3 8 9 D 9 e S 、 またはその他の突然変異酵素、コドン最適化酵素またはそれらの相同体) はまた、異種の微生物宿主細胞中、特に油性酵母 (例えはヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*)) 細胞中で產生されてもよい。組み換え微生物宿主中の発現は、今までに宿主を使用して可能でなかつた新しい生成物合成のために、様々な P U F A 経路中間体を生成し、または宿主中に既在の P U F A 経路を調節するのに有用かもしだれない。

【 0199 】

外来タンパク質の高レベル発現を導く制御配列を含有する、微生物発現システムおよび発現ベクターは、当業者によく知られている。これらのいずれも本配列の遺伝子生成物のいずれかを生成するためのキメラ遺伝子を構築するのに使用できる。次に形質転換を通じてこれらのキメラ遺伝子を適切な微生物に導入して、コードされた酵素の高レベル発現を提供できる。

【 0200 】

適切な微生物宿主細胞の形質転換に有用なベクターまたは DNA カセットは、当該技術分野でよく知られている。コンストラクト中に存在する配列の特定の選択は、所望の発現生成物 (上述) 、宿主細胞の性質、および提案される形質転換細胞と非形質転換細胞とを分離する手段に左右される。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 (例えはプロモーター) 、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。双方の制御領域が形質転換された微生物宿主細胞の遺伝子由来であることが最も好ましいが、このような制御領域は、必ずしも生成宿主として選択された特定種に天然の遺伝子に由来しなくてよいものと理解される。

【 0201 】

所望の微生物宿主細胞中で、本 9 エロンガーゼ O R F の発現を推進するのに有用な開始制御領域またはプロモーターは多数あり、当業者には周知である。選択された宿主細胞中でこれらの遺伝子の発現を導くことができる、実質的にあらゆるプロモーターが本発明に適する。微生物宿主細胞中での発現は、一時的または安定様式で達成できる。一時的発現は、対象とする遺伝子に作動的に結合された、調節可能プロモーターの活性を誘導することで達成できる。安定発現は、対象とする遺伝子に作動的に結合された構成的プロモー

10

20

30

40

50

ターの使用によって達成できる。一例として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2004/101757号パンフレット [米国特許出願公開第2005-0136519-A1号明細書] および国際公開第2006/052870号パンフレット [米国特許出願公開第2006-0115881-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。

【0202】

10

翻訳開始コドン「ATG」を取り囲むヌクレオチド配列が、酵母菌細胞中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の酵母菌中の発現が不良であれば、外来性遺伝子のヌクレオチド配列を改変して効率的な酵母菌翻訳開始配列を含めさせ、最適の遺伝子発現を得ることができる。酵母菌中の発現のために、これは非効率的に発現する遺伝子を内在性酵母菌遺伝子、好ましくは高度に発現する遺伝子にインフレームで融合させることによる、部位特異的変異誘発によって実施できる。代案としては宿主中の共通翻訳開始配列を判定して、対象とする宿主中のそれらの最適発現のために、この配列を異種性遺伝子内に組み換えることができる。

【0203】

20

終結領域は、それから開始領域が得られた遺伝子の3'領域に、または異なる遺伝子に由来することができる。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一および異なる属および種の双方で使用した際に）多様な宿主において満足に機能する。終結領域は、通常特定の特性のためと言うよりも便宜的に選択される。好ましくは微生物宿主が酵母細胞である場合、終結領域は、酵母菌遺伝子（特にサッカロミセス (*Saccharomyces*)、分裂酵母 (*Schizosaccharomyces*)、カンジダ (*Candida*)、ヤロウィア (*Yarrowia*) またはクリヴェロミセス (*Kluyveromyces*)）に由来する。-1インターフェロンおよび-2インターフェロンをコードする哺乳類遺伝子の3'領域もまた、酵母菌中で機能することが知られている。終結制御領域もまた、好ましい宿主に天然の様々な遺伝子に由来してもよい。場合により終結部位は不必要かもしれないが、含まれることが最も好ましい。制限は意図しないが、ここで開示で有用な終結領域としては以下が挙げられる。ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 細胞外プロテアーゼ (XPR、ジェンバンク登録番号M17741) の約100bpの3'領域と、アシル-coAオキシダーゼ (AcO3、ジェンバンク登録番号AJ001301およびCAA04661; Pox3:ジェンバンク登録番号XP_503244) ターミネーターと、Pex20 (ジェンバンク登録番号AF054613) ターミネーターと、Pex16 (ジェンバンク登録番号U75433) ターミネーター；Lip1 (ジェンバンク登録番号Z50020) ターミネーターと、Lip2 (ジェンバンク登録番号AJ012632) ターミネーターと、3'-オキソアシル-coAチオラーゼ (OCT、ジェンバンク登録番号X69988) ターミネーター。

30

【0204】

40

当業者は認識しているように、遺伝子をクローニングベクターに単に挿入するだけでは、それが必要なレベルで成功裏に発現することは確証されない。高発現率の必要性に答えて、転写、翻訳、タンパク質安定性、酸素限界、および微生物宿主細胞からの分泌の側面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で、多くの特殊化した発現ベクターが作り出されている。より具体的には、遺伝子発現を制御するように操作される分子の特徴のいくつかとして以下が挙げられる。1.) 関連転写プロモーターおよびターミネーター配列の性質、2.) クローンされる遺伝子のコピー数、および遺伝子がプラスミド上有るかまたは宿主細胞のゲノム内に組み込まれるかどうか、3.) 合成された外来タンパク質の最終的細胞内位置、4.) 宿主生物体中の翻訳効率およびタンパク質の正しい折

50

りたたみ、5.)宿主細胞内のmRNAおよびクローン遺伝子タンパク質の本質的な安定性、および6.)頻度が宿主細胞の好むコドン使用頻度に近づくようなクローン遺伝子内のコドン使用。これらの各タイプの改変は、ここで述べられる9エロンガーゼの発現をさらに最適化する手段として、本発明中に包含される。

【0205】

適切な微生物宿主細胞(例えば油性酵母)中での発現に適したポリペプチドをコードするDNA(例えばプロモーター、ORF、およびターミネーターを含んでなるキメラ遺伝子)がひとたび得られたら、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、またはそれを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、宿主ゲノム中で無作為に起きることができ、または宿主遺伝子座内における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コンストラクトの使用を通じて、標的を定めることができる。コンストラクトが内在性遺伝子座に標的を定めれば、全てまたはいくつかの転写および翻訳調節領域を内在性遺伝子座によって提供できる。10

【0206】

本発明では、ヤロウイア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)中で遺伝子を発現する好ましい方法は、宿主ゲノム中への直鎖DNA組み込みによるものである。そしてゲノム内の複数位置への組み込みは、遺伝子の高レベル発現が所望される場合に特に有用であることができる。このような目的に向けて、複数コピー中に存在するゲノム内の配列を同定することが望ましい。

【0207】

シュミット-ベルガー(*Schmid-Berger*)らは、*J. Bact.*、176(9):2477~2482頁(1994年)で、ヤロウイア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)中に第1のレトロトランスポゾン様要素 Y_{1t1} を発見した。このレトロトランスポゾンは、ゼータ領域と称される長い末端反復(LTR、それぞれおよそ700bpの長さ)の存在によって特徴づけられる。 Y_{1t1} および単独ゼータ要素は、それぞれ少なくとも35コピー/ゲノムおよび50~60コピー/ゲノムで、ゲノム内に分散様式で存在し、どちらの要素も相同的組換え部位として機能すると判定された。さらにユーレットツェック(*Juretzek*)らは、*Yeast*、18:97~113頁(2001年)の研究で、(両端にLTRゼータ領域がある直鎖DNAを使用して)酵母ゲノムの反復領域をプラスミドの標的にすることで、低コピープラスミド形質転換体を使用して得られた発現と比べて、遺伝子発現が劇的に増大できることを実証した。したがってゼータ誘導組み込みは、ヤロウイア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)へのプラスミドDNAの複数組み込みを確実にする手段として理想的であることができ、それによって高レベル遺伝子発現を可能にする。しかし残念なことに、ヤロウイア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)の全株がゼータ領域を有するわけではない(例えばATCC登録番号#20362として同定された株)。株がこのような領域を欠く場合、発現カセットを含んでなるプラスミドDNAを代案の遺伝子座に組み込んで、発現カセットの所望コピー数に達するようにすることもまた可能である。例えば好ましい代案の遺伝子座としては、Ura3遺伝子座(ジェンバンク登録番号AJ306421)、Leu2遺伝子遺伝子座(ジェンバンク登録番号AF260230)、Lys5遺伝子(ジェンバンク登録番号M34929)、Aco2遺伝子遺伝子座(ジェンバンク登録番号AJ001300)、Pox3遺伝子遺伝子座(Pox3:ジェンバンク登録番号XP_503244;またはAco3:ジェンバンク登録番号AJ001301)、12デサチュラーゼ遺伝子遺伝子座(国際公開第2004/104167号パンフレット)、Lip1遺伝子遺伝子座(ジェンバンク登録番号Z50020)および/またはLip2遺伝子遺伝子座(ジェンバンク登録番号AJ012632)が挙げられる。3040

【0208】

有利なことに、Ura3遺伝子は、5'-フルオロオロト酸(5'-フルオロウラシル-6-カルボン酸-水和物、「5'-FOA」)選択(前出)と組み合わせて繰り返し使うこと50

ができる、遺伝子改変をヤロウイア (Yarrowia) ゲノムにたやすく組み込むめる。

【0209】

別々の複製ベクターから 2 つ以上の遺伝子が発現する場合、各ベクターは異なる選択手段を有することが望ましく、他のコンストラクトに対する相同性を欠いて、安定した発現を維持し、コンストラクト中の要素の再集合を防止すべきである。調節領域、選択手段、および導入コンストラクト増殖方法の思慮深い選択は、全ての導入された遺伝子が必要なレベルで発現して、所望の生成物の合成を提供するように実験的に判定できる。

【0210】

対象とする遺伝子を含んでなるコンストラクトは、あらゆる標準的技術によって微生物宿主細胞に導入してもよい。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)]）、プロトプラスト融合、微粒子銃衝撃、電気穿孔、マイクロインジェクション、または宿主細胞中に対象とす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。油性酵母（すなわち、ヤロウイア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica)）に適用できるより具体的な教示としては、米国特許第 4,880,741 号明細書、米国特許第 5,071,764 号明細書、および Chen, D. C. ら、Appl Microbiol Biotechnol. 48 (2): 232 ~ 235 頁 (1997 年) が挙げられる。

10

【0211】

便宜上、DNA 配列（例えば発現カセット）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「組み換え」とここで称する。形質転換された宿主は、遺伝子がゲノム中に組み込まれるか、増幅されるか、または複数のコピー数を有する染色体外要素上に存在するかどうか次第で、発現コンストラクトの少なくとも 1 つのコピーを有し、2 つ以上を有してもよい。

20

【0212】

形質転換宿主細胞は、国際公開第 2004 / 101757 号パンフレット [米国特許出願公開第 2005 - 0136519 - A1 号明細書] および国際公開第 2006 / 052870 号パンフレット [米国特許出願公開第 2006 - 0115881 - A1 号明細書] で述べられるようにして、様々な選択技術によって同定できる。ここで使用するための好みの選択方法は、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 G 418 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を欠く培地に生育する能力である。代案の実施態様では、5 - FOA が、酵母 Ura - 突然変異体の選択のために使用される。化合物は、オロチジン 5' - リン酸デカルボキシラーゼ (OMP デカルボキシラーゼ) をコードする機能性 URA3 遺伝子を有する酵母細胞に対して有毒である。したがってこの毒性に基づいて、5 - FOA は Ura - 突然変異酵母株の選択および同定のために特に有用である（バーテル (Bartel), P. L. およびフィールズ (Fields), S. 、「酵母 2 - ハイブリッド・システム (Yeast 2 - Hybrid System)」、オックスフォード大学 (Oxford University) : ニューヨーク州 (New York)、第 7 卷、109 ~ 147 頁 (1997 年)）。より具体的には最初に天然 URA3 遺伝子をノックアウトして、Ura - 表現型を有する株を生成でき、そこで選択は 5 - FOA 抵抗性に基づいて生じる。次に複数のキメラ遺伝子クラスターおよび新しい URA3 遺伝子をヤロウイア (Yarrowia) ゲノムの異なる遺伝子座に組み込み、それによって Ura + 表現型を有する新しい株を生成することができる。引き続く組み込みは、導入された URA3 遺伝子がノックアウトされると、新しい Ura3 - 株（これも 5 - FOA 選択を使用して同定される）を生成する。したがって URA3 遺伝子 (5 - FOA 選択と組み合わさった) は、形質転換の複数サイクル中で選択マーカーとして使用できる。

30

【0213】

形質転換に続いて、本 9 エロンガーゼ（そして場合により、宿主細胞内で同時発現するその他の PUF A 酵素）に適した基質が、宿主によって自然にまたは遺伝子導入的に生

40

50

成されてもよく、またはそれらは外来性に提供されてもよい。

【0214】

本遺伝子および核酸断片の発現のための微生物宿主細胞としては、広範な温度およびpHで、単純または複合炭水化物、脂肪酸、有機酸、油、およびアルコール、および／または炭化水素をはじめとする多様な原材料上で生育する宿主が挙げられる。本発明で述べられる遺伝子は、油性酵母菌における（および特にヤロウイア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）における）発現のために単離されている。しかし転写、翻訳、およびタンパク質合成器官は高度に保存されているので、あらゆる細菌、酵母菌、藻類および／または糸状菌が、本核酸断片の発現のための適切な微生物宿主になることが考察される。

10

【0215】

しかし好ましい微生物宿主は油性生物体である。これらの生物体は自然に油の合成および蓄積ができ、油は細胞乾燥重量の約25%を超える、より好ましくは細胞乾燥重量の約30%を超える、最も好ましくは細胞乾燥重量の約40%を超える量を構成できる。油性酵母菌として典型的に同定されている属としては、ヤロウイア（*Yarrowia*）、カンジダ（*Candida*）、ロドトルラ（*Rhodotorula*）、ロドスボリジウム（*Rhodosporidium*）、クリプトコッカス（*Cryptococcus*）、トリコスボロン（*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。より具体的には例示的な油合成酵母菌として、ロドスボリジウム・トルイデス（*Rhodosporidium toruloides*）、リポマイセス・スタークエイ（*Lipomyces starkeyii*）、L. リポフェラス（*L. lipoferrus*）、カンジダ・レブカウフィ（*Candida revkaufi*）、C. プルケリマ（*C. pulcherrima*）、C. トロピカリス（*C. tropicalis*）、C. ユチリス（*C. utilis*）、トリコスボロン・プランス（*Trichosporon pullans*）、T. クタネウム（*T. cutaneum*）、ロドトルラ・グルティナス（*Rhodotorula glutinosa*）、R. グラミニス（*R. graminis*）、およびヤロウイア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）（以前はカンジダ・リポリティカ（*Candida lipolytica*）として分類された）が挙げられる。

20

【0216】

最も好ましいのは油性酵母菌ヤロウイア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）であり、さらに別の実施態様で最も好ましいのは、ATCC # 20362、ATCC # 8862、ATCC # 18944、ATCC # 76982および／またはL G A M S (7) 1と称されるY. リポリティカ（*lipolytica*）株である（パパニコラオウ（*Papanikolaou*）S.、およびアゲリス（*Aggelis*）G.、*Biore sour. Technol.* 82 (1) : 43~9頁(2002年)）。

30

【0217】

歴史的に、Y. リポリティカ（*lipolytica*）の様々な株が、イソシトレートリアーゼ、リバーゼ、ポリヒドロキシアルカノエート、クエン酸、エリトリトール、2-オキソグルタル酸、-デカラクトン、-ドデカラトン、およびピルビン酸の製造と生成のために使用されている。Y. リポリティカ（*lipolytica*）中のARA、EPA、およびDHA生成を設計するために応用できる特定教示は、それぞれ米国特許出願第11/264784号明細書（国際公開第2006/055322号パンフレット）、米国特許出願第11/265761号明細書（国際公開第2006/052870号パンフレット）、および米国特許出願第11/264737号明細書（国際公開第2006/052871号パンフレット）で提供される。

40

【0218】

その他的好ましい微生物宿主としては、油性の細菌、藻類、およびその他の菌・カビが挙げられ、この幅広い微生物宿主群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

50

レヴィシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) などの他の酵母]) である。したがって例えば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 9 エロンガーゼ遺伝子のいずれかによる、(商業的に A R A の生成のために使用される) モルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) の形質転換は、さらに多量の E D A を合成できる形質転換生物を生じることができ、これは 8 デサチュラーゼ遺伝子が同時発現されれば、さらに多量の D G L A に転換できる。M. アルピナ (*alpina*) の形質転換法は、マッケンジー (*Mackenzie*) ら、*App 1. Environment. Microbiol.*、66 : 4655 頁 (2000 年) で述べられる。同様に、ヤブレツボカビ目 (*Thraustochytriales*) 微生物の形質転換法が米国特許第 7,001,772 号明細書で開示される。

10

【0219】

上述の教示に基づいて、一実施態様では、本発明は、

a) (i) 少なくとも 1 つの制御配列と作動的に結合して 9 エロンガ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 コンストラクト、および

(ii) それぞれ L A または A L A のどちらかからなるエロンガーゼ基質源を含んでなる、油性酵母を提供し、

b) ステップ (a) の酵母を適切な発酵性炭素源の存在下で発育させ、9 エロンガーゼポリペプチドをコードする遺伝子が発現され、L A が E D A にまたは A L A が E T r A にそれぞれ転換され、そして

c) 場合によりステップ (b) の E D A または E T r A をそれぞれ回収することを含んでなる、E D A または E T r A のどちらかをそれぞれ生成する方法に向けたものである。基質供給が必要とされるかもしれない。

20

【0220】

いくつかの好ましい実施態様では、9 エロンガーゼをコードする遺伝子のヌクレオチド配列は、配列番号 1 および配列番号 4 よりなる群から選択される。代案の好ましい実施態様では、9 エロンガ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 3 で記載される (配列番号 1 と比べて少なくとも 106 コドンが、ヤロウイア (*Yarrowia*) 中での発現のために最適化されている)。そして別の好ましい実施態様では、9 エロンガ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 6 で記載される (配列番号 4 と比べて少なくとも 113 コドンが、ヤロウイア (*Yarrowia*) 中での発現のために最適化されている)。

30

【0221】

もちろん油性酵母中で天然に産生される P U F A は、18 : 2 脂肪酸 (すなわち L A) 、そしてもっと稀には 18 : 3 脂肪酸 (すなわち A L A) に限定されるので、本発明のより好ましい実施態様では、油性酵母は遺伝子改変され、ここで述べられる 9 エロンガーゼに加えて長鎖 P U F A 生合成に必要な多重酵素を発現する (それによって例えば A R A 、E P A 、D P A 、および D H A の生成を可能にする)。

【0222】

具体的には一実施態様で、本発明は、

40

a) 少なくとも 1 つの制御配列と作動的に結合して 9 エロンガ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 コンストラクト、および

b) 少なくとも 1 つの制御配列と作動的に結合して 4 デサチュラーゼ、5 デサチュラーゼ、6 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、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 C_{20 / 22} エロンガーゼより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 コンストラクト

を含んでなる油性酵母に関する。

50

【0223】

特に好ましい実施態様では、少なくとも1つの追加的組み換えDNAコンストラクトは、例えばミドリムシ(*Euglena gracilis*)から単離されおよび/またはそれに由来して配列番号61および69で記載される8デサチュラーゼなどの、8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。

【0224】

微生物 - 3および/または - 6脂肪酸合成の代謝エンジニアリング

生化学的経路の操作法は当業者によく知られており、油性酵母、特にヤロウイア・リボリティカ(*Yarrowia lipolytica*)中で - 3および/または - 6脂肪酸合成を最大化するのに、多数の操作が可能であることが予期される。これはPUFA生合成経路内の直接的代謝エンジニアリング、または様々なその他の代謝経路の追加的協調操作を必要とするかもしれない。
10

【0225】

PUFA生合成経路内の操作の場合、LAの生成を増大させて、- 6および/または - 3脂肪酸の生成増大を可能にすることが望ましいかもしれない。9デサチュラーゼおよび/または12デサチュラーゼをコードする遺伝子の導入および/または增幅が、これを達成するかもしれない。- 6不飽和脂肪酸の生成を最大化するために、実質的にALAを含まない宿主微生物中で生成が優先されることが当業者によく知られている。したがって好ましくは宿主は、選択され、またはLAからALAへの変換を可能にする15または - 3タイプデサチュラーゼ活性を除去または阻害して得られる。例えば(1)
20

15デサチュラーゼ転写生成物へのアンチセンス配列の転写のためのカセットを提供して、(2)標的遺伝子の全部または一部の挿入、置換および/または欠失を通じて15デサチュラーゼ遺伝子を中断して、または(3)自然に低いまたは皆無の15デサチュラーゼ活性を有する[または有するように変異導入されている]宿主細胞を使用して、内在性デサチュラーゼ活性を低下または排除できる。望まれないデサチュラーゼ経路の阻害はまた、米国特許第4,778,630号明細書で述べられるものなどの特定デサチュラーゼ阻害剤の使用を通じて達成できる。

【0226】

代案としては、- 3脂肪酸生成を最大化する(そして - 6脂肪酸合成を最小化する)ことが望ましいかもしれない。この例ではオレイン酸のLAへの変換を可能にする12デサチュラーゼ活性が除去または阻害されている宿主微生物が利用でき、引き続いてALAの - 3脂肪酸誘導体(例えばSTA、ETrA、ETA、EPA、DPA、DHA)への変換のために適切な基質(例えばALA)と共に、適切な発現カセットを宿主中に導入する。
30

【0227】

代案の実施態様では、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生合成経路酵素を遺伝子中断によって排除し、またはその他の手段(例えばアンチセンスマRNA)によってダウンレギュレートしてもよい。

【0228】

ARA、EPAまたはDHAを増大させる手段としてのPUFA生合成経路内の操作の詳細な考察(およびその関連技術)は、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2006/052870号パンフレット[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]でそれぞれ示され、TAG生合成経路およびTAG分解経路中の望ましい操作(およびその関連技術)についても同様である。
40

【0229】

本発明の文脈で、上述の戦略のいずれか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であるかもしれない。例えば本発明は、- 3および/または - 6脂肪
50

酸の生成のために、9エロンガーゼ / 8デサチュラーゼ生合成経路中の鍵酵素をコードする遺伝子を油性酵母内に導入する方法を提供する。-3および/または-6脂肪酸生合成経路を自然に有さない油性酵母中で本9エロンガーゼ遺伝子を発現し、宿主生物の代謝エンジニアリングのための様々な手段を使用して、これらの遺伝子の発現を協調させ、好ましいPUFA生成物の生成を最大化することが特に有用であろう。

【0230】

PUFA合成のための微生物の発酵プロセス

形質転換された微生物宿主細胞は、キメラデサチュラーゼおよびエロンガーゼ遺伝子の発現を最適化する条件下で生育させて、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、酸素レベル、生育温度、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。油性酵母などの対象とする微生物（例えば、ヤロウイア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*））は、一般に複合培地（例えば酵母抽出物-ペプトン-デキストロース液体培地（YPD））で、または生育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（例えばミシガン州デトロイトのディフコ・ラボラトリーズ（DIFCO Laboratories（Detroit, MI））からの酵母菌窒素ベース）上で生育させる。

【0231】

本発明における発酵培地は、適切な炭素源を含有しなくてはならない。適切な炭素源としては、単糖類（例えばグルコース、フルクトース）、二糖類（例えばラクトース、スクロース）、少糖類、多糖類（例えばデンプン、セルロースまたはそれらの混合物）、糖アルコール（例えばグリセロール）または再生可能原材料からの混合物（例えば乳清透過液、コーンスティーブリーカー、甜菜モラセス、大麦の麦芽）が挙げられるが、これに限定されるものではない。さらに炭素源としては、アルカン、脂肪酸、脂肪酸エステル、モノグリセリド、ジグリセリド、トリグリセリド、リン脂質と、植物油（例えばダイズ油）および動物脂肪をはじめとする脂肪酸の様々な商業的供給源とが挙げられる。炭素源としては、重要な生化学的中間体への代謝変換が実証されている一炭素源（例えば二酸化炭素、メタノール、ホルムアルデヒド、ホルメート、および炭素含有アミン）が挙げられる。したがって本発明で使用される炭素源は、多種多様な炭素含有源を包含することが考察され、宿主生物の選択によってのみ制限される。好ましい炭素源は糖、グリセロール、および/または脂肪酸である。最も好ましいのは、10~22個の炭素を含有するグルコースおよび/または脂肪酸である。

【0232】

窒素は、無機（例えば(NH_4)₂ SO_4 ）または有機（例えば尿素またはグルタミン酸）源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、適切なミネラル、塩、補助因子、緩衝液、ビタミン、および油性宿主の生育と、PUFA生成に必須の酵素的経路の促進とに適した、当業者に既知である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Mn⁺²、Co⁺²、Zn⁺²、Mg⁺²）が注目されている（D.J.カイル（Kytle）およびR.コリン（Colin）編、「単細胞油の工業的応用（Ind. Appl. Single Cell Oil）」より、ナカハラ（Nakahara）T.ら、61~97頁（1992年）。

【0233】

本発明における好ましい増殖培地は、ミシガン州デトロイトのディフコ・ラボラトリーズ（DIFCO Laboratories（Detroit, MI））からの酵母菌窒素ベースなどの一般的な市販の調製培地である。その他の合成または人工増殖培地もまた使用されてもよく、形質転換宿主細胞の生育に適する培地は、微生物学または発酵科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pH 4.0~pH 8.0の間であり、pH 5.5~pH 7.5が初期生育条件の範囲として好ましい。発酵は好気性

10

20

30

40

50

または好気性条件下で実施されてもよく、微好気条件が好ましい。

【0234】

典型的に油性酵母細胞中の P U F A の高レベルの蓄積は、代謝状態が生育と脂肪合成／貯蔵との間で「平衡状態」でなくてはならないので、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*）における P U F A 生成には、二段階発酵過程が必要である。このアプローチについては国際公開第 2004 / 101757 号パンフレットで述べられ、様々な適切な発酵過程デザイン（すなわちバッチ、供給バッチ、および連続）および成育中の考察事項についても同様に述べられる。

【0235】

P U F A 油の精製および加工

P U F A は、遊離脂肪酸として、またはアシルグリセロール、リン脂質、スルホリピドまたは糖脂質などのエステル化形態で、宿主微生物および植物中に見いだすことができ、当該技術分野でよ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、および許容性基準についての 1 つのレビューは、Z. ジェーコブス（*Jacobs*）、Critical Reviews in Biotechnology 12 (5/6) : 463 ~ 491 頁（1992 年）である。下流プロセスに関する簡潔なレビューはまた、A. シン（*Singh*）および O. ワード（*Ward*）、Adv. Appl. Microbiol. 45 : 271 ~ 312 頁（1997 年）にもある。

【0236】

一般に P U F A の精製手段は、有機溶剤、超音波処理、（例えば二酸化炭素を使用した）超臨界流体抽出による抽出と、鹼化と、圧搾などの物理的手段またはそれらの組み合わせを含んでもよい。追加的詳細については、国際公開第 2004 / 101757 号パンフレットの教示を参照されたい。

【0237】

種子油を単離する方法は当該技術分野でよく知られている（ガンストーン（*Guns tone*）ら編、「脂質ハンドブック（The Lipid Handbook）」から（ヤング（*Young*）ら、「脂肪および油の加工（Processing of Fats and Oils）」、第 5 章、253 ~ 257；チャップマン＆ホール（*Chapman & Hall*）：ロンドン（London）（1994 年））。例えばダイズ油は、油含有種子からの食用油製品の抽出および精製を伴う一連のステップを使用して製造される。ダイズ油およびダイズ副産物は、下の表に示す全般的ステップを使用して生産される。

【0238】

10

20

30

【表8】

表5
ダイズ油および副産物生成のための全般的ステップ

処理段階	処理	除去される不純物 および／または 得られる副産物
#1	ダイズ種子	
#2	油抽出	荒粉
#3	脱ガム	レシチン
#4	アルカリまたは物理的精製	ガム、遊離脂肪酸、色素
#5	水洗	石鹼
#6	漂白	染料、石鹼、金属
#7	(水素化)	
#8	(脱ろう)	ステアリン
#9	脱臭	遊離脂肪酸、トコフェロール、 ステロール、揮発物
#10	油生成物	

10

20

30

40

【0239】

より具体的には、ダイズ種子を清潔にし、テンパー、脱皮して、薄片にすることで油抽出効率を高める。油抽出は、通常溶剤（例えばヘキサン）抽出によって達成されるが、物理的圧力、および／または溶剤抽出の組み合わせによっても達成される。得られる油は粗製油と称される。リン脂質およびその他の極性および中性脂質複合体を水和させて、非水和トリグリセリド画分（ダイズ油）からの分離を容易にすることで、粗製油を脱ガムしてもよい。得られるレシチンガムをさらに加工して、乳化および剥離（抗粘着）剤として多様な食物および工業製品で使用される、商業的に重要なレシチン製品を製造してもよい。不純物（主に遊離脂肪酸、顔料、および残留ガムなど）除去のために、脱ガム油をさらに精製してもよい。精製は、遊離脂肪酸と反応して、粗製油中に石鹼およびホスファチド水和物およびタンパク質を形成する苛性剤の添加によって達成される。水を使用して、精製中に形成された微量の石鹼を洗い流す。石鹼ストック副産物を動物飼料中で直接に使用してもよく、または酸性にして遊離脂肪酸を回収してもよい。色は、クロロフィルおよびカロテノイド化合物のほとんどを除去する漂白土による吸着を通じて除去される。精製油は水素化でき、それによって様々な融解特性およびテクスチャの脂肪が得られる。脱ろう（分画）を使用して、注意深く制御される冷却条件下での結晶化を通じて、水素化された油からステアリンを除去してもよい。脱臭（主に真空下の蒸気蒸留を通じた）は最終ステップであり、油に臭いまたは風味を与える化合物を除去するようにデザインされている。脱臭プロセス中に、トコフェロールおよびステロールなどのその他の価値ある副産物を除去してもよい。これらの副産物を含有する脱臭された蒸留物は、天然ビタミンEおよび他の高価値医薬品製品生産のために販売されてもよい。精製され、漂白され（水素化され、分画され）、脱臭された油および脂肪を包装して直接販売してもよく、またはより特殊な製品にさらに加工してもよい。ダイズ種子加工、ダイズ油生成および副産物利用に関するより詳細な参考文献はエリクソン（Erickson）、「ダイズ加工および利用の実用的ハンドブック（Practical Handbook of Soybean Processing and Utilization）」、米国油化学会および米国大

50

豆協議会（1995年）にある。ダイズ油は、ココナツ、ヤシ、パーム核、およびココアバターなどの油と比較すると飽和脂肪酸が比較的少ないので、室温で液体である。

【0240】

精製および／または純化されたPUFA含有植物および微生物油に水素化して、それによって様々な融解特性およびテクスチャがある脂肪をもたらすことができる。（スプレッド、製菓用脂肪、硬質バター、マーガリン、ベーキングショートニングなどをはじめとする）多くの加工脂肪は、室温で様々な程度の硬さを必要とし、原料油の物理特性の改変を通じてのみ製造できる。これは最も一般的に、接触水素化を通じて達成される。

【0241】

水素化は、ニッケルなどの触媒を用いて不飽和脂肪酸二重結合に水素が付加される化学反応である。例えば不飽和オレイン酸、LA、およびリノレン酸脂肪酸、そしてこれらのそれぞれを含有する高オレイン酸ダイズ油が水素化できる。水素化は2つの主な効果を有する。第1に不飽和脂肪酸含量減少の結果として、油の酸化安定性が増大する。第2に脂肪酸変化が融点を上昇させるため、油の物理特性が変化して室温で半液体または固形の脂肪が得られる。

【0242】

水素化反応に影響する多くの变数があり、それは次に最終生成物の組成を改変する。圧力、温度、触媒タイプおよび濃度、攪拌および反応器デザインをはじめとする操作条件は、制御できるより重要なパラメーターである。選択的水素化条件を使用して、不飽和性がより低いものに優先して、より不飽和性が高い脂肪酸に水素化できる。非常に軽いまたはブラシ水素化（brush hydrogenation）がしばしば用いられて、液体油の安定性を増大させる。さらに水素化は、液体油を物理的に固形の脂肪に転換する。水素化の程度は、特定の最終製品のためにデザインされた所望の性能および融解特性に左右される。液体ショートニング（ベーキング製品、固形脂肪、および商業的揚げ物と焙焼操作のために使用されるショートニングの製造で使用される）およびマーガリン製造のためのベースストックが、水素化を通じて得られる無数の可能な油および脂肪製品の例である。水素化および水素化された製品のより詳細な説明は、パターソン（Patterson），H.B.W.、「脂肪および油の水素化：理論と実践（Hydrogenation of Fats and Oils: Theory and Practice）」、米国油化学会（1994年）にある。

【0243】

水素化された油はまた、水素化プロセスから帰結するトランス脂肪酸異性体の存在のためにいくぶんかの物議を醸している。トランス異性体の大量摂取は、血漿中の低密度-対-高密度リポタンパク質の比率の増大、および冠動脈心疾患リスク増大をはじめとする健康に対する悪影響と関連づけられている。

【0244】

食料品中で使用するためのPUFA含有油

現在、市場は、-3および／または-6脂肪酸（特にARA、EPA、およびDHA）を組み込んだ、多岐にわたる食物および食品をサポートする。PUFAを含んでなる本発明の植物／種子油、改変種子および微生物油は、食物および食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。その他の植物油と比較して、本発明の油は物理的観点から、食物用途においてその他の油と同様に機能すると考えられる（例えばダイズ油などの部分的に水素化された油は、ソフトスプレッド、マーガリン、およびベーキングおよび揚げ物のためのショートニングの成分として広く使用される）。

【0245】

ここで述べられる-3および／または-6脂肪酸を含有する植物／種子油、改変種子および微生物油は、次をはじめとするが、これに限定されるものではない、多様な食物および飼料製品で使用するのに適している。食物類似物、肉製品、穀物製品、スナック食品、ベーカリー食品、および乳製品。さらに本植物／種子油、改変種子および微生物油を調合物中で使用して、医学的栄養物、栄養補助食品、乳児用調製粉乳をはじめとするメ

10

20

30

40

50

イカルフード、ならびに医薬品に健康上の利点を与えてよい。食品加工および食品配合の当業者は、特定量と組成の植物および微生物油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。このような量はここで「有効」量と称され、食品または飼料製品、製品が栄養補給を意図する食餌、またはメディカルフードまたは医学的栄養物が矯正または処置を意図する疾患に左右される。

【0246】

食物類似物は、当業者によく知られているプロセスを使用して作り出すことができる。肉類似物、チーズ類似物、ミルク類似物などが挙げられる。ダイズからできた肉類似物は、共に混合されて様々な種類の肉をシミュレートするダイズタンパク質または豆腐およびその他の成分を含有する。これらの肉代用品は、冷凍、缶詰または乾燥食品として販売される。通常、それらはそれらが置き換える食品と同じように使用できる。ダイズから作られる肉代替物は、優れたタンパク質、鉄、およびビタミン供給源である。肉類似物の例としては、ハム類似物、ソーセージ類似物、ベーコン類似物などが挙げられるが、これに限定されるものではない。

10

【0247】

食物類似物は、それらの機能性および組成特性次第で模造品または代用品として分類できる。例えば模造チーズは、それが置き換えるようデザインされたチーズに似てさえいればよい。しかし製品は一般に、それが置き換えるチーズと栄養的に同等であり、そのチーズに対する最小組成要求量を満たす場合にのみ代用チーズと称することができる。したがって代用チーズは模造チーズよりも高いタンパク質レベルを有するが多く、ビタミンおよびミネラルで強化される。

20

【0248】

ミルク類似物または非乳製品食品としては、模造ミルクおよび非乳製品冷菓（例えばダイズおよび／またはダイズタンパク質製品からできたもの）が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0249】

肉製品は、幅広い製品を包含する。米国では「肉」は、牛、豚、および羊から産する「赤身肉」を含む。赤身肉に加えて、鶏、七面鳥、ガチョウ、ホロホロチョウ、カモを含む家禽品目、および魚および貝類がある。生、塩蔵、および揚げ物、および塩蔵され調理された幅広い種類の調味および加工肉製品がある。ソーセージおよびホットドッグは、加工肉製品の例である。したがって「肉製品」という用語は、ここでの用法では加工肉製品を含むが、これに限定されるものではない。

30

【0250】

シリアル食品は、シリアル穀物の加工に由来する食品である。シリアル穀物としては、可食穀物（種子）を産するイネ科のあらゆる植物が挙げられる。最も普及している穀物は、大麦、コーン、雑穀、オート麦、キノア、米、ライ麦、モロコシ、ライ小麦、小麦、およびワイルドライスである。シリアル食品の例としては、全粒、破碎粒、挽き割り、穀粉、ふすま、胚芽、朝食用シリアル、押し出し食品、パスタなどが挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0251】

40

ベーカリー製品は、ベーキングに匹敵する様式で天火焼または加工された、すなわち熱に曝することで乾燥または硬化された、上述のあらゆるシリアル食品を含んでなる。ベーカリー製品の例としては、パン、ケーキ、ドーナツ、バー、パスタ、パン粉、ベーカードナック、ミニビスケット、ミニクラッカー、ミニクッキー、およびミニ・ブレッツェルが挙げられるが、これに限定されるものではない。上述されるように、成分として本発明の油を使用できる。

【0252】

スナック食品は、上または下で述べられる食品のいずれかを含んでなる。

【0253】

揚げ物食品は、油で揚げた上または下で述べられる食品のいずれかを含んでなる。

50

【0254】

健康食品は、健康上の利点を与えるあらゆる食品である。多くの油料種子由来食品は、健康食物と見なしてもよい。

【0255】

飲料は、液体または乾燥粉末形態であることができる。

【0256】

例えば非炭酸飲料と、生、冷凍、缶詰または濃縮果汁と、フレーバーミルクまたはブレンミルク飲料などが挙げられる。成人および幼児栄養フォーミュラについては当該技術分野でよく知られ、市販されている（例えばアボット・ラボラトリーズのロス製品部門（Ross Products Division, Abbott Laboratories）からのシミラック（Similac）（登録商標）、エンシア（Ensure）（登録商標）、ジュビディ（Jevity）（登録商標）、およびアリメンタム（Alimentum）（登録商標））。

【0257】

乳児用調製粉乳は、幼児および小児に与えられる液体または戻した粉末である。「乳児用調製粉乳」とは、ここで幼児の哺乳において人乳に置き換えることができ、典型的に水溶液中で所望の百分率の炭水化物およびタンパク質と混合された、所望の百分率の脂肪から構成される経腸栄養製品と定義される（例えば米国特許第4,670,285号明細書を参照されたい）。世界的組成研究ならびに専門家グループによって規定されるレベルに基づいて、平均的人乳は典型的に約0.20%～0.40%の全脂肪酸（脂肪からの熱量が約50%と仮定すれば）を含有し、一般にDHAとARAの比率は約1:1～1:2の範囲である（例えばミード・ジョンソン・アンド・カンパニー（Mead Johnson & Company）からのエンファミル（Enfamil）LIPIL（商標）およびアボット・ラボラトリーズのロス製品部門（Ross Products Division, Abbott Laboratories）からのシミラック・アドバンス（Similac Advance）（商標）の配合を参照されたい）。乳児用調製粉乳は幼児にとって唯一の栄養源であることが多いので、幼児の食餌において特別な役割を有し、母乳が幼児にとってなおも最良の栄養であるが、乳児用調製粉乳は、乳児が生育するだけでなく生長できる十分近い次善の策である。

【0258】

乳製品はミルク由来製品である。ミルク類似物または非乳製品は、例えば上述した豆乳のようなミルク以外の供給源に由来する。これらの製品としては、全乳、スキムミルク、ヨーグルトまたはサワーミルクなどの発酵ミルク製品、クリーム、バター、練乳、粉ミルク、コーヒーホワイトナー、コーヒークリーマー、アイスクリーム、チーズなどが挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0259】

その中に本発明のPUFA含有油を含めることができる追加的食品としては、例えばチュインガム、糖菓およびフロスティング、ゼラチンおよびプディング、ハードおよびソフトキャンディ、ジャムおよびゼリー、白色グラニュー糖、糖代用品、甘みソース、トッピングおよびシロップ、および乾燥ブレンド粉末ミックスが挙げられる。

【0260】

健康食品および医薬品で使用するためのPUFA含有油

健康食品は健康上の利点を与えるあらゆる食品であり、機能性食品、メディカルフード、医学的栄養剤、乳児用調製粉乳、および栄養補助食品が含まれる。さらに本発明の植物／種子油、改変種子および微生物油を標準医薬組成物で使用してもよい。例えば本発明の油を上述のあらゆる食品中に容易に組み込んで、それによって例えば機能性食品またはメディカルフードを生成できる。PUFAを含んでなるより濃縮された調合物としては、ヒトまたはヒト以外の動物において栄養補助食品として使用できる、カプセル、粉末、錠剤、ソフトジェル、ジェルキャップ、濃縮液、およびエマルジョンが挙げられる。

【0261】

10

20

30

40

50

動物飼料で使用するための P U F A 含有油

動物飼料は、ここで総称的にヒト以外の動物飼料としての使用または飼料への混合が意図される製品と定義される。本発明の植物 / 種子油、改変種子および微生物油は、様々な動物飼料中の成分として使用できる。

【 0 2 6 2 】

より具体的には、これに限定されるものではないが、本発明の油は、ペットフード、反芻動物および家禽飼料製品、および水産養殖飼料製品で使用できる。ペットフードはペット [例えば犬、猫、鳥、爬虫類、齧歯類] に食べさせることが意図される製品であり、これらの製品は上のシリアルおよび健康食品、ならびに肉および肉副産物、ダイズタンパク質製品、および牧草および干し草産物 (例えばアルファルファ、チモシー、カラスマギまたはスズメノチャヒキ、野菜) を含むことができる。反芻動物および家禽食品は、例えば七面鳥、鶏、牛、および豚に食べさせることが意図される製品である。上のペットフードと同様に、これらの製品は、上に列挙したシリアルおよび健康食品、ダイズタンパク質製品、肉および肉副産物、および牧草および干し草製品を含むことができる。水産養殖飼料 (または「アクアフィード」) は、淡水または海水中での水生生物、動物、および / または植物の繁殖、養殖または飼育に関わる養殖で使用されることが意図される製品である。

【 実施例 】

【 0 2 6 3 】

特に断りのない限り部および百分率が重量を基準とし、温度が摂氏である以下の実施例で、本発明をさらに定義する。これらの実施例は、発明の好ましい実施態様を示しながら、あくまで例示のために提供されるものとする。上の考察およびこれらの実施例から、当業者は本発明の必須特性を把握でき、その趣旨と範囲を逸脱することなく、本発明の様々な変更および改変を行って、それを様々な使用法および条件に適合できる。したがってここで示され述べられたものに加えて、本発明の様々な改変は前述の説明から当業者には明らかである。このような改変はまた、添付の特許請求の範囲内に入ることが意図される。

【 0 2 6 4 】

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.) サムブルック (Sambrook) , J. 、フリッチュ (Fritsch) , E. F. およびマニアティス (Maniatis) , T. 、「分子クローニング : 実験室マニュアル (Molecular Cloning : A Laboratory Manual) 」、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリ (Cold Spring Harbor Laboratory) : ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバー (Cold Spring Harbor, NY) (1989 年) (マニアティス (Maniatis)) ; 2.) T. J. シルハビー (Silhavy) 、 M. L. ベンナン (Bennan) 、および L. W. エンクイスト (Enquist) 、「遺伝子融合実験 (Experiments with Gene Fusions) 」、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリ (Cold Spring Harbor Laboratory) : ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバー (Cold Spring Harbor, NY) (1984 年) ; および 3.) オースベル (Ausubel) , F. M. ら、「分子生物学現代プロトコル (Current Protocols in Molecular Biology) 」、グリーン・パブリッシング・アソシエーツ・アンド・ウィリー - インターサイエンス (Greene Publishing Association and Wiley - Interscience) による出版 (1987 年) で述べられる。

【 0 2 6 5 】

微生物培養の維持および生育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は、次で述べられる。フィリップス・ゲアハルト (Philipp Gerhardt) 、 R. G. E. マレー (Murray) 、ラルフ N. コスティロウ (Ralph N. Costilow) 、ユージーン W. ネス

10

20

30

40

50

ター(Eugene W. Nester)、ウィリスA. ウッド(Willis A. Wood)、ノエルR. クリーグ(Noel R. Krieg)、およびG. ブリッグス・フィリップス(G. Briggs Phillips)編、「一般微生物学方法マニュアル(Manual of Methods for General Bacteriology 」、米国微生物学会、ワシントンD.C.(Washington, D.C.) (1994年)、またはトーマス(Thomas), D. ブロック(Brock)、「バイオテクノロジー：工業的微生物学テキストブック(Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology)」、第2版、シナウアー・アソシエーツ(Sinauer Associates)：マサチューセッツ州サンダーランド(Sunderland, MA) (1989年)。微生物細胞の生育および維持のために使用される全ての試薬および材料は、特に断りのない限り、ウィスコンシン州ミルウォーキーのアルドリッチ・ケミカルズ(Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI))、ミシガン州デトロイトのディフコ・ラボラトリーズ(DIFCO Laboratories (Detroit, MI))、メリーランド州ゲーサーズバーグのギブコ/ BRL (GIBCO/BRL (Gaithersburg, MD))、またはミズーリ州セントルイスのシグマケミカル(Sigma Chemical Company (St. Louis, MO))から得た。大腸菌(E. coli)株は、典型的にルリア・ベルタニ(Luria Bertani) (LB)プレート上で37℃で生育させた。

【0266】

10

一般分子クローニングは、標準法に従って実施した(サムブルック(Sambrook)ら、前出)。DNA配列は、ベクターとインサート特異的プライマーと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自動シーケンサー上で生成した。ミシガン州アンアーバーのジーン・コード社(Gene Codes Corporation (Ann Arbor, MI))からのシーケンチャー(Sequencher)中で配列編集を実施した。全配列は、双方向で少なくとも2回のカバレッジを表す。遺伝的配列の比較は、DNASTAR(DNASTAR Inc.)からのDNASTARソフトウェアを使用して達成された。

【0267】

20

略語の意味は以下の通り。「sec」は秒を意味し、「min」は分を意味し、「h」は時間を意味し、「d」は日を意味し、「μL」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、「μM」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、「μmol」はマイクロモルを意味し、「g」はグラムを意味し、「μg」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」はキロベースを意味する。

【0268】

ヤロウィア・リポリティカ(Yarrowia lipolytica)の形質転換および培養

30

ATCC登録番号#20362、#76982、および#90812を有するヤロウィア・リポリティカ(Yarrowia lipolytica)株は、メリーランド州ロックビルの米国微生物系保存機関から購入した。Y.リポリティカ(Y. lipolytica)株は、典型的にYPD寒天(1%酵母菌抽出物、2%バクトペプトン、2%グルコース、2%寒天)上で28℃で生育させた。

【0269】

Y.リポリティカ(Yarrowia lipolytica)の形質転換は、特に断りのない限りチェン(Chen), D. C. ら、Appl Microbiol Biotechnol. 48 (2) : 232 ~ 235 頁(1997年)の方法に従って実施した。簡単に述べると、ヤロウィア(Yarrowia)をYPDプレート上に画線培養し、30℃でおよそ18

40

時間生育させた。いくつかの大型白金耳を満たす細胞をプレートからこすり取り、平均分子量3350の2.25mLの50%PEG、pH6.0の0.125mLの2M酢酸Li、0.125mLの2MDTT、および50μgの剪断サケ精子DNAを含有する1mLの形質転換緩衝液に再懸濁した。次に約500ngの直線化プラスミドDNAを100μLの再懸濁細胞内でインキュベートし、15分間隔でボルテックス混合しながら39に1時間保った。細胞を選択培地プレートに蒔いて、30に2~3日間保った。

【0270】

形質転換体の選択のためには、一般に最少培地(「MM」)を使用した。MMの組成は以下のとおり。ミシガン州デトロイトのディフコ・ラボラトリーズ(DIFCO Laboratories(Detroit, MI))からの硫酸アンモニウムまたはアミノ酸を含まない0.17%酵母菌素ベース、2%グルコース、0.1%プロリン、pH6.1。適切ならばウラシルのサプリメントを最終濃度0.01%に添加した(それによって20g/Lの寒天で調製される「MMU」選択培地を生成した)。

【0271】

代案としては、次を含んでなる5-フルオロオロチニ酸(「FOA」、また5-フルオロウラシル-6-カルボン酸一水和物とも)選択培地上で、形質転換体を選択した。ミシガン州デトロイトのディフコ・ラボラトリーズ(DIFCO Laboratories(Detroit, MI))からの硫酸アンモニウムまたはアミノ酸を含まない0.17%酵母菌素ベース、2%グルコース、0.1%プロリン、75mg/Lのウラシル、75mg/Lのウリジン、カリフォルニア州オレンジのザイモリサーチ社(Zymo Research Corp.(Orange, CA))からの900mg/L FOA、および20g/Lの寒天。

【0272】

ヤロウイア・リポリティカ(Yarrowia lipolytica)の脂肪酸分析

脂肪酸分析のために、ブライ(Blight), E. G. およびダイヤー(Dyer), W. J. 、Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911~917頁(1959年)で述べられるように、細胞を遠心分離して収集し、脂質を抽出した。ナトリウムメトキシドでの脂質抽出物のエステル交換反応によって、脂肪酸メチルエステルを調製し(ローガン(Roughan), G. およびニシダ(Nishida), I. 、Arch Biochem Biophys. 276(1): 38~46頁(1990年))、引き続きヒューレットパッカード(Hewlett-Packard)からの30mx0.25mm(内径)HP-INNOWAXカラムを装着したヒューレットパッカード(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。

【0273】

直接塩基エステル交換のために、ヤロウイア(Yarrowia)培養物(3mL)を収集し、蒸留水で1回洗浄し、スピードバック(Speed-Vac)内で真空下において5~10分乾燥させた。ナトリウムメトキシド(100μLの1%)をサンプルに添加して、次にサンプルをボルテックスし20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心分離した。上層を除去して上述のようにGCで分析した。

【0274】

実施例1

ミドリムシ(Euglena gracilis)の生育条件、脂質プロフィール、およびmRNA単離

本実施例は、ミドリムシ(Euglena gracilis)の生育、培養脂質分析、およびmRNA単離について述べる。

【0275】

生育および脂質分析

ミシガン州イーストランシングのミシガン州立大学のリチャード・トリーマー(Ric

hard Triemer) 博士の研究室からミドリムシ (*Euglena gracilis*) を得た。10 mL の活発に生育する培養から、1 mL のアリコートを 500 mL ガラスびん中の 250 mL のミドリムシ (*Euglena gracilis*) (Eg) 培地に移した。970 mL の水中で 1 g の酢酸ナトリウム、ミシガン州デトロイトのディフコ・ラボラトリーズ (DIFCO Laboratories (Detroit, MI)) からの 1 g の牛肉エキス (カタログ番号 U126-01)、ディフコ・ラボラトリーズ (DIFCO Laboratories) からの 2 g の Bacto (登録商標) トリプトン (カタログ番号 0123-17-3)、およびディフコ・ラボラトリーズ (DIFCO Laboratories) からの 2 g のバクト (Bacto) (登録商標) 酵母抽出物 (カタログ番号 0127-17-9) を合わせて Eg 培地を作製した。フィルター滅菌後、ノースカロライナ州バーリントンのカロライナ・バイオロジカル・サプライ・カンパニー (Carolina Biological Supply Company (Burlington, NC)) からの 30 mL の土壤上清 (Soil-Water Supernatant) (カタログ番号 15-3790) を無菌的に添加して最終的な Eg 培地を生成した。ミドリムシ (*Euglena gracilis*) 培養物を 23 で 16 時間の照明、8 時間の暗黒サイクルで搅拌せずに 2 週間生育させた。

【0276】

2 週間後、脂質分析のために 10 mL の培養を取り除いて 1,800 × g で 5 分間遠心分離した。ペレットを水で 1 度洗浄し、再遠心分離した。得られたペレットを真空下で 5 分間乾燥させ、100 μL の水酸化トリメチルスルホニウム (TMSH) に再懸濁し、振盪しながら室温で 15 分間インキュベートした。その後、0.5 mL のヘキサンを添加して、バイアルを振盪しながら室温で 15 分間インキュベートした。脂肪酸メチルエステル (ヘキサン層から注入された 5 μL) を分離して、スペルコ (Supelco Inc.) からのオメガワックス (Omega wax) 320 融解石英キャピラリーカラム (カタログ番号 24152) を装着した (Hewlett-Packard) 6890 ガスクロマトグラフを使用して定量化した。オープン温度をプログラムして 220 に 2.7 分間保ち、20 / 分で 240 に上昇させて、次にさらに 2.3 分間保った。ワットマン (Whatman) 水素発生器によってキャリアガスを供給した。又チェック・プレップ・インコーポレーテッド (Nu-Chek Prep, Inc.) から市販される標準メチルエステル (カタログ番号 U-99-A) と滞留時間を比較して、得られたクロマトグラムを図 3 に示す。

【0277】

ミドリムシ (*Euglena gracilis*) からの mRNA 調製

残った 2 週間培養物 (240 mL) を 1,800 × g で 10 分間の遠心分離によってペレット化し、水で 1 度洗浄して再遠心分離した。テキサス州フレンズウッドのテル - テスト (TEL-TEST, Inc. (Friendswood, TX)) からの RNA STAT-60 (商標) 試薬を使用して、提供された製造業者のプロトコルに従って (5 mL の試薬を使用して RNA を 0.5 mL の水に溶解)、得られたペレットから全 RNA を抽出した。このようにしてペレットから 1 mg の全 RNA (2 mg / mL) を得た。ニュージャージー州ピスカタウェイのアマシャム・バイオサイエンス (アマシャム・バイオサイエンシズ (Amersham Biosciences (Piscataway, NJ))) からの mRNA 精製キットを使用して、提供された製造業者のプロトコルに従って、1 mg の全 RNA から mRNA を単離した。このようにして 85 μg の mRNA を得た。

【0278】

実施例 2

ミドリムシ (*Euglena gracilis*) の cDNA 合成、ライブラリー構築、および配列決定

(カリフォルニア州カールスバッドのインビトロジェン・コーポレーション (Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA)) からのクロンマイナー (Cloneminer) (商標) cDNA ライブラリー構築キット (カタログ番号

18249-029)を使用して、提供された製造業者のプロトコルに従って(バージョンB、25-0608)、cDNAライブラリーを生成した。非放射標識法を使用し、Biotin-attB2-オリゴ(dT)プライマーを使用して、cDNAを3.2μgのmRNA(実施例1)から合成した。第1および第2のストランド合成後、attB1アダプターを添加してライゲートし、カラムクロマトグラフィーを使用してcDNAをサイズ分画した。画分7および8からのDNA(約800~1500bpのサイズ範囲)を濃縮し、pDONR(商標)222に遺伝子組み換えして、インビトロジエン・コーポレーション(Invitrogen Corporation)からの大腸菌(E.coli)エレクトロマックス(ElectroMAX)(商標)DH10B(商標)T1ファージ抵抗性細胞に形質転換した。ミドリムシ(Euglena gracilis)ライブラリーを「eeg1c」と命名した。
10

【0279】

配列決定のために、クローンを最初に、384ウェル凍結培地プレート内で生育/凍結した保存グリセロール培養から回収し、LB+75μg/mLカナマイシン(複製されたプレート)を含有する384ウェルマイクロタイタープレート内の(マサチューセッツ州ボストンのジェネティクス(Genetix(Boston, MA))からの無菌384ピンレプリケーターで複製した。次に製造業者のプロトコルに従って、アマシャム・バイオサイエンシズ(Amersham Biosciences)からのテンプリフィ(テンプリフィ(Templichi)DNA配列決定テンプレート増幅キット法を使用して、プラスミドを単離した。簡単に述べると、テンプリフィ(Templichi)法は、等温ローリングサークル増幅(ディーン(Dean)ら、Genome Res.、11:1095~1099頁(2001年);ネルソン(Nelson)ら、Biotechniques、32:S44~S47頁(2002年))により、バクテリオファージ29DNAポリメラーゼを使用して、環状一本鎖または二本鎖DNAを増幅する。37で20時間生育後、複製されたプレートからの細胞を5μLの希釈緩衝液に添加して、95で3分間変性させて部分的に細胞を溶解して変性テンプレートを放出する。次にテンプリフィ(Templichi)プレミックス(5μL)を各サンプルに添加して、得られた反応混合物を30で16時間、次に65で10分間インキュベートして、29DNAポリメラーゼ活性を不活性化した。増幅されたサンプルを蒸留水で1:3に希釈した後に、ピコグリーン(Picogreen)(登録商標)dsDNA定量化試薬(分子プローブ)によるDNA定量化を実施した
20
30

【0280】

次にM13Fユニバーサルプライマー(配列番号18)およびABIビッグダイ(BigDye)バージョン3.1プリズム(Prism)配列決定キットを使用して、増幅産物を384ウェルプレート内で95で10分間変性して末端配列決定した。配列決定反応では、100~200ngのテンプレートおよび6.4pmolのプライマーを使用して、次の反応条件を25回反復した。96で10秒間、50で5秒間、および60で4分間。エタノールベースのクリーンアップ後、パーキン・エルマー(Perkin-Elmer)ABI 3730×1自動配列決定装置上でサイクル配列決定反応生成物を分解し、検出した。
40

【0281】

実施例3

ミドリムシ(Euglena gracilis)cDNAライブラリーeeg1cからの9エロンガーゼ酵素相同体の同定

BLAST「nr」データベース(全ての非重複性のジェンバンク番号CDS翻訳、三次元構造ブルックヘブン(Brookhaven)タンパク質データバンク由来配列、SWISS-PROTタンパク質配列データベースの最新主要公開、EMBL、およびDDJBデータベースを含んでなる)中に含まれる配列との類似性に対する、BLAST(「基礎的局在性配列検索ツール(Basic Local Alignment Search Tool)」;アルトシュール(Altshul)ら、J.Mol.Biol.
50

215 : 403 ~ 410 頁 (1993 年)) 検索を行って、長鎖多価不飽和脂肪酸延長酵素相同体 (すなわち L C - P U F A E L O 相同体または 9 エロンガーゼ) をコードする c D N A クローンを同定した。国立バイオテクノロジー情報センター (N C B I) が提供する B L A S T N アルゴリズムを使用して、実施例 2 で得られた c D N A 配列を「 n r 」データベース中に含まれる全ての公的に入手可能な D N A 配列との類似性について分析した。D N A 配列を全ての読み枠に翻訳し、N C B I が提供する B L A S T X アルゴリズム (ギッシュ (G i s h) およびステーツ (S t a t e s) 、N a t . G e n e t . 、3 : 266 ~ 272 頁 (1993 年)) を使用して、「 n r 」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比較した。便宜上、B L A S T による計算で、単なる偶然により検索するデータベース中に含まれる配列と c D N A 配列との一致を観察することの P 値 (確率) は、報告された P 値の対数の負の値を表す「 p L o g 」値としてここで報告され、したがって p L o g 値が大きいほど、c D N A 配列および B L A S T の「ヒット」が、相同意向的なタンパク質を表す可能性は大きくなる。
10

【0282】

クローン e e g 1 c . p k 0 0 1 . n 5 . f からのヌクレオチド配列を使用した B L A S T X 検索は、c D N A によってコードされるタンパク質と I g D 9 との類似性を明らかにした (すなわちここで配列番号 8 として記載されるイソクリシス・ガルバナ (I s o c h r y s i s g a l b a n a) からの長鎖 P U F A 延長酵素 ; N C B I 登録番号 A A L 3 7 6 2 6 (G I 1 7 2 2 6 1 2 3) 、遺伝子座 A A L 3 7 6 2 6 、C D S A F 3 9 0 1 7 4 ; キ (Q i) ら、F E B S L e t t . 5 1 0 (3) : 1 5 9 ~ 1 6 5 頁 (2002 年)) 。クローン e e g 1 c . p k 0 0 1 . n 5 . f からの c D N A 挿入断片の一部の配列を配列番号 10 で示す (c D N A 挿入断片の 5' 末端)。
20

【0283】

上述のようにして、しかし p o l y (A) t a i l - プライムウォブル (W o b b l e) T オリゴヌクレオチドを使用して、e e g 1 c . p k 0 0 1 . n 5 . 1 の c D N A 挿入断片の 3' 末端から追加的配列を得た。簡単に述べると、ウォブル (W o b b l e) T プライマーは、c D N A クローンの 3' 末端を配列決定するのに使用される、21 塩基長の p o l y (T) A 、p o l y (T) C 、および p o l y (T) G の等モル混合物である。3' 末端配列を配列番号 11 で示す。
30

【0284】

5' および 3' 配列の双方をミシガン州アンアーバーのジーン・コーズ社 (G e n e C o d e s C o r p o r a t i o n (A n n A r b o r , M I)) からのシーケンチャ (S e q u e n c h e r) (商標) (バージョン 4.2) を使用してアラインメントし、c D N A から得られた配列を配列番号 12 で示す。e e g 1 c . p k 0 0 1 . n 5 . f 中の c D N A からのコード配列の配列決定、および対応する推定アミノ酸配列をそれぞれ配列番号 1 および配列番号 2 で示す。上で報告された相同性に基づいて、e e g 1 c . p k 0 0 1 . n 5 . 1 の c D N A 挿入断片のミドリムシ (E u g l e n a g r a c i l i s) 遺伝子産物が 9 エロンガーゼをコードすると仮定し、したがって「 E g D 9 e 」と命名した。
40

【0285】

配列番号 2 (すなわち E g D 9 e) で記載されるアミノ酸配列を B L A S T P によって評価し、I g D 9 e (配列番号 8) に対する p L o g 値 3 8 . 7 0 (2 e - 3 9 の E 値) を得た。ヨトゥン・ハイン (J o t u n H e i n) 法を使用して、E g D 9 e は I g D 9 e と 3 9 . 4 % 同一である。ヨトゥン・ハイン (J o t u n H e i n) 法 (ハイン (H e i n) 、J . J . 、M e t h . E n z . 、1 8 3 : 6 2 6 ~ 6 4 5 頁 (1 9 9 0 年)) によって実施された配列 % 同一性計算は、ウィスコンシン州マディソンの D N A S T A R インコーポレーテッド (D N A S T A R I n c . (M a d i s o n , W I)) からのレザージーン (L A D S E R G E N E) バイオインフォマティクス計算スイートのメガライイン (M e g A l i g n) (商標) v 6 . 1 プログラムを使用して、ペアワイズアラインメントのためのデフォルトパラメーター (K T U P L E = 2) で実施した。クラスタル
50

V法(図4)を使用して、EgD9e(配列番号2)はIgD9e(配列番号8)と31.8%同一である。クラスタルV法(ヒギンズ(Higgins), D.G.およびシャープ(Sharp), P.M.、Comput.Appl.Biosci., 5:151~153頁(1989年);ヒギンズ(Higgins)ら、Comput.Appl.Biosci., 8:189~191頁(1992年)によって実施された配列%同一性計算は、レーザージーン(LADSERGENE)バイオインフォマティクス計算スイートのメガライン(MegAlign)(商標)v6.1プログラムを使用して、ペアワイズアライメントのためのデフォルトパラメーター(KTUPLE=1、GAP PENALTЫ=3、WINDOW=5、DIAGONALS SAVED=5、およびGAP LENGTH PENALTY=10)で実施した。

10

【0286】

BLASTスコアおよび確率は、本核酸断片(配列番号12)が、ミドリムシ(Euglena gracilis)9エロンガーゼ全体をコードすることを示唆した。

【0287】

実施例4

サッカロミセス・セレヴィシエ(Saccharomyces cerevisiae)中のミドリムシ(Euglena gracilis)9エロンガーゼ(EgD9e)の機能解析

本実施例は、サッカロミセス・セレヴィシエ(Saccharomyces cerevisiae)中のEgD9eの機能解析について述べる。これには、(1)pY119を生成するためのEgD9eの酵母発現ベクターpY-75中のクローニング、(2)基質供給後のpY-75およびpY119を含んでなる形質転換生物中の脂質プロフィールの比較、および(3)基質非供給後のpY-75およびpY119を含んでなる形質転換生物中の脂質プロフィールの比較が必要であった。

20

【0288】

プラスミドpY-75(対照)とEgD9eを含んでなるpY119との構築

酵母エピソームのプラスミド(YEp)-タイプベクターpRS425(クリスチャンソン(Christianson)ら、Gene, 110:119~122頁(1992年))はサッカロミセス・セレヴィシエ(Saccharomyces cerevisiae)2μ内在性プラスミドからの配列、LEU2選択可能マークー、および多機能性ファージミドpBluescript II SK(+)の主鎖に基づく配列を含有する。ジア(Jia)ら、Physiol.Genomics, 3:83~92頁(2000年)で述べられるのと同様にして、サッカロミセス・セレヴィシエ(Saccharomyces cerevisiae)強力構成的グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GPD)プロモーターをpRS425のSacIIおよびSpeI部位間でクローンして、pGPD-425生成した。NotI部位をpGPD-425のBamHI部位中に導入し、このようにしてBamHI部位で挟まれたNotI部位を生成して、このプラスミドをpY-75と称した。

30

【0289】

マサチューセッツ州ベバリーのニュー・イングランド・バイオラブズ・インコーポレーテッド(New England Biolabs Inc.(Beverly, MA))からのベント(Vent)R(登録商標)DNAポリメラーゼ(カタログ番号M0254S)を使用して、製造業者のプロトコルに従って、オリゴヌクレオチドプライマー-oEugEL1-1(配列番号19)およびoEugEL1-2(配列番号20)で、eeg1c.pk001.n5.fからEgD9eを増殖した。インビトロジェン・コーポレーション(Invitrogen Corporation)からのゼロ(Zero)Blunt(登録商標)PCRクローニングキットを使用して、製造業者のプロトコルに従って、得られたDNA断片をpCR-Blunt(登録商標)クローニングベクター中にクローンして、pKRR906を生成した。NotIでの消化によってEgD9eをpKR906から放出し、pY-75のNotI部位にクローンして、pY119(配列番号2

40

50

1、図5)を生成した。EgD9eを図5で「eug e11」と標識する。

【0290】

基質供給によるEgD9eエロンガーゼ活性の機能解析

標準酢酸リチウム形質転換手順を使用して、プラスミドpY119およびpY-75をインビトロジエン・コーポレーション(Invitrogen Corporation)からのサッカロミセス・セレヴィシエ(Saccharomyces cerevisiae)INVSC1に形質転換した。形質転換体をカリフォルニア州カールズバッドのキュビオジーン(Qbiogene(Carlsbad, CA))からのCSM-1euを添加したDOB A培地上で選択した。各プレートからの形質転換体をCSM-1eu(キュビオジーン(Qbiogene))と0.2%タージトールを添加した2mLのDOB培地に接種した。細胞を30℃で1日間生育させた後、LA[18:2(9,12)]、ALA[18:3(9,12,15)]、GLA[18:3(6,9,12)]、STA[18:4(6,9,12,15)]、ARA[20:4(5,8,11,14)]またはEPA[20:5(5,8,11,14,17)]のいずれかを0.175mMに添加した3mLの同じ培地に、0.1mLを移した。これらを30℃、250rpmで16時間インキュベートして、次に遠心分離によってペレットを得た。細胞を水で一度洗浄し、遠心分離によってペレット化して風乾した。ペレットを50℃で30分間500μLの1%ナトリウムメトキシドでエステル交換し(ローガン(Roughan), G.およびニシダ(Nishida), I.、Arch Biochem Biophys. 276(1):38~46頁(1990年))、その後500μLの1M塩化ナトリウムおよび100μLのヘプタンを添加した。完全な混合と遠心分離後、実施例1で述べられるように脂肪酸メチルエステル(FAME)をGCで分析した。

【0291】

pY75(ベクター対照)またはpY119を含有する細胞(pY119-5、pY119-6、およびpY119-8と命名される3つの独立した形質転換体)に基質供給した結果を図6に示す。脂肪酸は、16:0(パルミチン酸)、16:1(9)(パルミトレイン酸)、18:0、18:1(9)(オレイン酸)、LA、GLA、ALA、STA、EDA、DGLA、ARA、ETrA、ETA、EPA、22:2(13,16)(ドコサジエン酸)、22:4(7,10,13,16)(アドレン酸)、DPAおよび24:1(ネルボン酸)と同定された。供給した各脂肪酸(「FA」)について延長効率(「%Elo」)を次のように計算した。 $[\% \text{ FA 生成物} / (\% \text{ FA 生成物} + \% \text{ FA 基質}) * 100]$

【0292】

図6のデータは、クローンされたEgD9eが、LAおよびALAをそれぞれEDAおよびETrAに効率的に延長したことを実証した。

【0293】

基質供給なしのEgD9eエロンガーゼ活性の機能解析

さらにオレイン酸[OA-18:1(9)]と、パルミトレイン酸[PA-16:1(9)]延長生成物であるバクセン酸[VA-18:1(11)]との分離を達成するため、わずかに異なる温度プロフィールを使用して、脂肪酸が供給されない細胞からのFAMEをGCによって分析した。スペルコ・インコーポレーテッド(Supelco Inc.)からのオメガワックス(Omegawax)320溶融石英キャピラリーカラム(カタログ番号24152)を装着したヒューレットパッカード(Hewlett-Packard)6890ガスクロマトグラフを使用して、脂肪酸メチルエステル(ヘキサン層から注入された3μL)を分離して定量化した。オープン温度は200℃を2.7分間保ち、20℃/分で240℃に上昇させて、次にさらに2.3分間保つようにプログラムした。結果を表6に示す。

【0294】

【表9】

表6
外来性脂肪酸添加なしの脂質プロフィール

サンプル名	16:0	16:1 (9)	18:0	18:1 (9)	18:1 (11)	%Elo 16:0	%Elo 16:1
pY75	13.1	54.7	3.5	27.6	1.2	20.9	2.1
pY119-5	12.9	55.6	3.6	26.0	1.8	21.6	3.2
pY119-6	13.4	54.0	3.6	27.3	1.6	21.2	3.0
pY119-8	12.7	53.3	3.5	29.0	1.5	21.7	2.8

10

【0295】

上に示す結果に基づいて、EgD9eは、LAおよびALAからそれぞれEDAおよびETrAへの延長を触媒できる9エロンガーゼとしてのその主な役割に加えて、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かもしれない。

【0296】

実施例5

20

ヤロウィア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)中の発現のためにコドン最適化された(IgD9eS)合成9エロンガーゼ遺伝子(イソクリシス・ガルバナ(*Isochrysis galbana*)由来)を含んでなるヤロウィア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)発現ベクター-pY115の構築

本実施例は、キメラのFBAINm::IgD9eS::Pex20遺伝子を含んでなるヤロウィア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)発現ベクター-pY115の構築について述べ、ここでIgD9eSはイソクリシス・ガルバナ(*Isochrysis galbana*)由来の合成9エロンガーゼであり、ヤロウィア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)中の発現のためにコドン最適化されている。プラスミドpY115は、下記の実施例6および7で述べられるように、EgD9eの9エロンガーゼ活性と比べるために、間接的にIgD9eSの9エロンガーゼ活性を可能にする。

30

【0297】

プラスミドpY115(配列番号45、図8)の構築は、(1)pDMW263の構築、(2)IgD9eSの合成およびプラスミドpDMW237の創出、および(3)プラスミドpDMW263およびpDMW237からの断片のライゲーションを必要とした。

【0298】

pDMW263の構築

プラスミドpY5-30(図7A、その内容を参照によって本明細書に援用する国際公開第05/003310号パンフレットで以前述べられている)は、大腸菌(*E. coli*)およびヤロウィア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)のどちらの中でも複製できるシャトルプラスミドである。プラスミドpY5-30は、ヤロウィア(*Yarrowia*)自律複製配列(ARS18)、ColE1プラスミド複製起点、大腸菌(*E. coli*)中の選択のためのアンピシリン抵抗性遺伝子(Amp^R)、ヤロウィア(*Yarrowia*)中の選択のためのヤロウィア(*Yarrowia*)LEU2遺伝子、およびキメラのTEF::GUS::XPR遺伝子を含有する。

40

【0299】

当業者によく知られている技術を使用してTEFプロモーターをヤロウィア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)FBAINmプロモーター(国際公開第05/049805号パンフレット)で置換して、プラスミドpDMW263(配列番

50

号 22、図 7B) を p Y 5 - 30 から作り出した。簡単に述べると、このプロモーターは、fba1 遺伝子によってコードされて発現に必要なフルクトース - ニリン酸アルドラーーゼ酵素 (E.C.4.1.2.13) の「ATG」翻訳開始コドン前の 5' 上流非翻訳領域中に位置する変性プロモーターに加えて、イントロンを有する 5' コード領域の一部を指し、その内で FBAINm は、ATG 翻訳開始コドンと FBAIN プロモーターのイントロンの間の 52bp の欠失を有し(それによって N 末端の 22 個のアミノ酸のみを含む)、およびイントロンの後の新しい翻訳コンセンサスモチーフを有する。表 7 は pDMW263 の構成要素を要約する。

【0300】

【表 10】

10

表 7
プラスミド pDMW263(配列番号 22)の構成要素

配列番号 22 中の断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明	
RE 部位および ヌクレオチド	
4992~4296	ARS18 配列(ジェンバンク登録番号 A17608)
Sall/SacII (8505~2014)	<p>次を含んでなる FBAINm::GUS::XPR</p> <ul style="list-style-type: none"> FBAINm: FBAINm プロモーター(国際公開第 2005/049805 号パンフレット、図 7B で「Fba1+イントロン」と標識される) GUS: β-グルクロニダーゼをコードする大腸菌遺伝子(ジェファーソン、R.A.Nature.14:342:837~838 頁(1989 年)) XPR: ヤロウイア Xpr 遺伝子(ジェンバンク登録番号 M17741) の約 100bp の 3'領域
6303~8505	ヤロウイア Leu2 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AF260230)

20

30

【0301】

IgD9eS の生体外合成

ここでそれぞれその全体を参照によって援用する、国際公開第 2004 / 101753 号パンフレット(米国特許出願公開第 2004 - 0253621 - A1 号明細書)で述べられるのと類似した様式で、および国際公開第 2006 / 052870 号パンフレット(米国特許出願公開第 2006 - 0115881 - A1 号明細書)で述べられるように、イソクリシス・ガルバナ(Isochrysis galbana)の 9 エロンガーゼ遺伝子(IgD9e、配列番号 7 および 8)のコドン使用頻度をヤロウイア・リポリティカ(Yarrowia lipolytica) 中での発現のために最適化した。具体的には、ヤロウイア(Yarrowia) コドン使用頻度パターン、ATG 翻訳開始コドン周囲の共通配列、および RNA 安定性の一般方法則(グハニヨギ(Guhaniyogi), G. および J. ブルーアー(Brewer)、Gene 265(1~2):11~23 頁(2001 年))に従って、IgD9e(配列番号 7) のコード配列に基づいて、コドン最適化 9 エロンガーゼ遺伝子(「IgD9eS」と称する、配列番号 9) をデザインした。翻訳開始部位の改変に加えて 792bp のコード領域の 127bp を改変し(16.0%)、122 コドンを最適化した。コドン最適化遺伝子中のいずれの改変も、コードされるタンパク質のアミノ酸配列(配列番号 8) を変化させなかった。

40

50

【0302】

より具体的には、*IgD9eS*の全長を延長するように、8組のオリゴヌクレオチド(例えばIL3-1A、IL3-1B、IL3-2A、IL3-2B、IL3-3A、IL3-3B、IL3-4A、IL3-4B、IL3-5A、IL3-5B、IL3-6A、IL3-6B、IL3-7A、IL3-7B、IL3-8A、およびIL3-8B、配列番号23～38に対応する)をデザインした。各5'末端の4bpのオーバーハングを除いて、センス(A)およびアンチセンス(B)オリゴヌクレオチドの各対は相補的であった。さらに引き続くサブクローニングのために、プライマー-IL3-1F、IL3-4R、IL3-5F、およびIL3-8R(配列番号39～42)には、NcoI、PstI、PstI、およびNotI制限部位もまた導入した。

10

【0303】

50mMのトリス-HCl(pH7.5)、10mMのMgCl₂、10mMのDTT、0.5mMのスペルミジン、0.5mMのATP、および10UのT4ポリヌクレオチドキナーゼを含有する20μLの体積中で、各オリゴヌクレオチド(100ng)を37度1時間リン酸化した。以下のパラメーターを使用して、サーモサイクラー内でセンスおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドの各対を混合しアニールした。95(2分間)、85(2分間)、65(15分間)、37(15分間)、24(15分間)、および4(15分間)。このようにIL3-1A(配列番号23)をIL3-1B(配列番号24)にアニールし、二本鎖生成物「IL3-1AB」を生成した。同様にIL3-2A(配列番号25)をIL3-2B(配列番号26)にアニールして、二本鎖生成物「IL3-2AB」などを生成した。

20

【0304】

次に下に示すように、アニールされた二本鎖オリゴヌクレオチドの2つの別々のプールを共にライゲートした。プール1(IL3-1AB、IL3-2AB、IL3-3AB、およびIL3-4ABを含んでなる)、およびプール2(IL3-5AB、IL3-6AB、IL3-7AB、およびIL3-8ABを含んでなる)。アニールされたオリゴヌクレオチドの各プールを20μLの体積中で、10UのT4DNAリガーゼと共に混合し、ライゲーション反応を16度一晩インキュベートした。

【0305】

次に各ライゲーション反応の生成物をテンプレートとして使用し、デザインされたDNA断片をPCRによって増幅した。具体的には、ライゲートした「プール1」混合物(すなわちIL3-1AB、IL3-2AB、IL3-3AB、およびIL3-4AB)をテンプレートとして、オリゴヌクレオチドIL3-1FおよびIL3-4R(配列番号39および40)をプライマーとして使用し、*IgD9eS*の第1の部分をPCRによって増幅した。417bpのPCR断片をプロメガ(Promega)からのpGEM-Tイージベクター(easy vector)中にサブクローンして、pT9(1-4)(配列番号43)を発生させた。

30

【0306】

ライゲートした「プール2」混合物(例えばIL3-5AB、IL3-6AB、IL3-7AB、およびIL3-8AB)をテンプレートとして、オリゴヌクレオチドIL3-5FおよびIL3-8R(配列番号41および42)をプライマーとして使用して、*IgD9eS*の第2の部分を同様にPCRによって増幅し、pGEM-Tイージベクター(easy vector)中にクローンして、pT9(5-8)(配列番号44)を発生させた。

40

【0307】

大腸菌(E.Coli)をpT9(1-4)(配列番号43)およびpT9(5-8)(配列番号44)で別々に形質転換し、プラスミドDNAをアンピシリン抵抗性形質転換体から単離した。プラスミドDNAを精製し、適切な制限エンドヌクレアーゼで消化して、pT9(1-4)の417bpのNcoI/PstI断片、およびpT9(5-8)の377bpのPstI/NotI断片を遊離した。次にこれらの2つの断片を組み合わせ

50

て、NcoI/NotIで消化したpZUF17（配列番号121、図7C）と共に一方向性にライゲートして、pDMW237（配列番号46）を発生させた。したがって合成的に生成されたIgD9eS遺伝子は、発現ベクターpDMW237中でFBAINプロモーターおよびヤロウィア（Yarrowia）Pex20ターミネーターに挟まれていた。

【0308】

ヤロウィア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）発現ベクターpY115の最終構築

pDMW263（ヤロウィア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）FBAINmプロモーターを含有する）からのNcoI/SalIDNA断片をpDMW237（IgD9eSを含有する）のNcoI/SalIDNA断片中にクローンして、キメラのFBAINm：：IgD9eS：：Pex20遺伝子を含んでなるpY115（配列番号45、図8）を生成した。図8でFBAINmを「Fba1+イントロン」と標識し、IgD9eSを「I galbana synth D9 elongas」と標識する。

【0309】

実施例6

ヤロウィア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）発現ベクターpBY2（EgD9eを含んでなる）およびpBY1-FAE（IgD9eSを含んでなる）の構築

本実施例は、ヤロウィア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）発現ベクターpBY2（キメラのFBAINm：：EgD9e：：Pex20遺伝子を含んでなる）およびpBY1-FAE（キメラのFBAINm：：IgD9eS：：Pex20遺伝子を含んでなる）の合成について述べる。実施例7（下記）で述べられるように、ヤロウィア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）中で発現した際のIgD9eSの9エロンガーゼ活性をEgD9eのそれと比較した。

【0310】

ヤロウィア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）発現ベクターpBY2の構築

プラスミドpY115（配列番号45、実施例5）をNcoI/NotIで消化して、得られたDNA末端をクレノウ（Klenow）を使用して充填した。充填して平滑末端を形成した後、DNA断片を仔ウシ腸管アルカリホスファターゼで処理し、アガロースゲル電気泳動法を使用して分離した。ヤロウィア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）FBAINmプロモーターを含有する6989bpの断片をアガロースゲルから切除して、カリフォルニア州バレンシアのキアゲン・インコーポレーテッド（Qiagen Inc.（Valencia, CA））からのキアクイック（QIAquick）（登録商標）ゲル抽出キットを使用して、製造業者のプロトコルに従って精製した。インビトロジエン・コーポレーション（Invitrogen Corporation）からのゲートウェイ（Gateway）ベクター変換システム（カタログ番号11823-029）を使用して、製造業者のプロトコルに従って、精製した6989bpの断片をカセットrfAとライゲートし、ヤロウィア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）ゲートウェイ（Gateway）（登録商標）目的ベクターpBY1（配列番号47、図9A）を形成した。

【0311】

カリフォルニア州バレンシアのキアゲン・インコーポレーテッド（Qiagen Inc.（Valencia, CA））からのキアプレップ（QIAprep）（登録商標）スピン・ミニプレッップ（Spin Miniprep）キットを使用して製造業者のプロトコルに従って、ミドリムシ（Euglena gracilis）クローンeeg1c.pk001.n5.f（実施例2および3）からプラスミドを精製した。インビトロジエン・コーポレーション（Invitrogen Corporation）からのゲー

10

20

30

40

50

トウェイ (Gateway) (登録商標) LRクロナーゼ (Clonase) (商標) II 酵素ミックス (カタログ番号 11791 - 020) を使用して、製造業者のプロトコルに従って、eeg1c.pk001.n5.f からの cDNA を pBY1 に転移して pBY2 (配列番号 48、図 9B) を形成した。ウォブル (Wobble) T プライマーで配列決定を実施したため、eeg1c.pk001.n5.f (すなわち polyA tail を含有する) の 3' 末端の全配列は未知であった。制限酵素消化およびアガロースゲル分析に基づいて、polyA tail は 100 bp 未満の長さであるように見えた。

【0312】

ヤロウィア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) 発現ベクター pBY1 - FAE の構築

インビトロジエン・コーポレーション (Invitrogen Corporation) からのアキュプライム (AccuPrime) (商標) Taq ポリメラーゼハイファイディリティ (High Fidelity) (カタログ番号 12346 - 086) を使用して、製造業者のプロトコルに従って、オリゴヌクレオチドプライマー ig-s (配列番号 49) および ig-a (配列番号 50) で、IgD9eS を pY115 (配列番号 45、実施例 5) から増殖した。インビトロジエン・コーポレーション (Invitrogen Corporation) からの pENTR (商標) ディレクショナル (Directional) TOPO (登録商標) クローニングキットを使用して、製造業者のプロトコルに従って、得られた DNA 断片を pENTR (商標) / D - TOPO (登録商標) 中にクローンして pENTR - FAE を生成した。カリフォルニア州バレンシアのキアゲン・インコーポレーテッド (Qiagen Inc. (Valencia, CA)) からのキアプレップ (QIAprep) (登録商標) スピンミニプレップ (Spin Miniprep) キットを使用して、上記のように製造業者のプロトコルに従って、プラスミド pENTR - FAE を精製した。インビトロジエン・コーポレーション (Invitrogen Corporation) からのゲートウェイ (Gateway) (登録商標) LRクロナーゼ (Clonase) (商標) II 酵素ミックス (カタログ番号 11791 - 020) を使用して、製造業者のプロトコルに従って、IgD9eS のための CDS を pBY1 に転移して pBY1 - FAE を形成した (配列番号 51、図 9C)。

【0313】

大腸菌 (Escherichia coli) へのベクター形質転換

pBY2 および pBY1 - FAE の創出に続いて、各ベクターをインビトロジエン・コーポレーション (Invitrogen Corporation) からの大腸菌 (E. coli) DH10B (商標) 細胞に形質転換した。形質転換細胞を生育させ、カリフォルニア州バレンシアのキアゲン・インコーポレーテッド (Qiagen Inc. (Valencia, CA)) からのキアプレップ (QIAprep) (登録商標) スpinミニプレップ (Spin Miniprep) キットを使用して、pBY2 および pBY1 - FAE を単離した。

【0314】

実施例 7

ヤロウィア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) Y2224 株中の EgD9e の機能解析

本実施例は、ヤロウィア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) Y2224 株中の EgD9e の機能解析について述べる。これは、(1) Y2224 株 (すなわち野生型ヤロウィア (Yarrowia) ATCC # 20362 株の Ura3 遺伝子の自立的突然変異からの FOA 抵抗性突然変異体) の構築、および (2) pBY2 (EgD9e を発現する) または pBY1 - FAE (IgD9eS を発現する) のどちらかを含んでなるヤロウィア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) Y2224 株の形質転換生物中の脂質プロフィールの比較を必要とした。

【0315】

ヤロウィア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) Y2224 株の

10

20

30

40

50

発生

Y 2 2 2 4 株を次のようにして単離した。YPD 塙天プレートからのヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) ATCC # 2 0 3 6 2 細胞をザイモ・リサーチ (Zymo Research) からの 2 5 0 mg / L の 5 - FOA を含有する最少培地プレート (各 7 5 mg / L の YNB、アミノ酸なし、2 0 g / L のグルコース) 上に画線培養した。プレートを 2 8 ℃ でインキュベートし、得られたコロニーの内 4 つを 2 0 0 mg / mL の 5 - FOA を含有する最少培地プレート上、およびウラシルおよびウリジンを欠く最少培地プレート上に別々にパッチしてウラシル U r a 3 栄養要求性を確認した。引き続いてヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) Y 2 2 2 4 株を 10 YPD 塙天上で 2 8 ℃ で生育させた。

【 0 3 1 6 】

p B Y 1 - F A E および p B Y 2 を含んでなるヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 形質転換体の機能解析

p B Y 1 - F A E (キメラの F B A I N m : : I g D 9 e S : : P e x 2 0 遺伝子を含んでなる) および p B Y 2 (キメラの F B A I N m : : E g D 9 e : : P e x 2 0 遺伝子を含んでなる) を一般方法で述べられるようにヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) Y 2 2 2 4 株に形質転換した。細胞をウラシルを欠く最少培地プレート上に播種して、3 0 ℃ に 2 ~ 3 日間保った。

【 0 3 1 7 】

次に形質転換体の單一コロニーをウラシルを欠く 3 mL の最少培地中で 3 0 ℃ で約 1.0 の O D _{6 0 0} に生育させた。対照として、Y 2 2 2 4 をウラシルを添加した最少培地上でもまた同様に生育させた。細胞を引き続いて水で洗浄し、遠心分離によって収集して、脂質を前出のようにしてエステル交換した。実施例 4 で述べられる方法 (すなわち p Y 1 1 9 含有 S . セレヴィシエ (*cerevisiae*) 細胞のための) を使用して、p B Y 1 - F A E 、 p B Y 2 、または皆無の発現ベクターを含有する細胞からの F A M E を G C によって分析した。それぞれ 3 つの複製の平均の結果を表 8 に示す。脂肪酸は、1 6 : 0 (パルミチン酸) 、1 6 : 1 (9) (パルミトレン酸) 、1 7 : 1 (9) 、1 8 : 0 、1 8 : 1 (9) (オレイン酸) 、L A 、および E D A と同定された。実施例 4 で述べられるようにして、延長効率 (「% E l o n g A 」) を計算した。

【 0 3 1 8 】

10

20

30

【表11】

表8
EgD9e および IgD9eS を発現するヤロウイアの脂質プロフィールの比較

サンプル名	Δ9 エロンガーゼ	16: 0	16: (9)	17: (9)	18: 0	18: (9)	LA	ED A	%EI o LA
Y2224-1	なし	13.4	12.6	0.8	2.8	43.1	27.2	0.1	0.2
Y2224-2	なし	12.2	12.3	0.8	2.3	46.1	26.2	0.1	0.2
Y2224-3	なし	11.7	10.8	1.1	2.8	48.4	25.0	0.1	0.2
pBY1-FAE-1	IgD9eS	11.9	11.9	0.8	3.1	50.6	20.2	1.6	7.5
pBY1-FAE-2	IgD9eS	12.9	11.4	0.9	3.6	46.7	23.0	1.4	5.9
pBY1-FAE-3	IgD9eS	12.1	12.5	0.8	3.2	50.0	19.8	1.6	7.4
pBY2-1	EgD9e	12.3	11.7	0.8	3.4	48.4	21.1	2.2	9.5
pBY2-2	EgD9e	12.1	12.5	0.8	3.2	50.1	19.1	2.3	10.6
pBY2-3	EgD9e	12.1	12.2	0.8	3.3	50.0	19.4	2.1	9.9

10

20

【0319】

表8に示すように、結果は、LAをEDAに転換する際に、EgD9eがIgD9eSよりも大きい基質変換効率で機能することを実証した。

【0320】

実施例8

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 (EgD9eS) 合成 9エロンガーゼ遺伝子 (ミドリムシ (*Euglena gracilis*) 由来) を含んでなるヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 発現ベクター-pZuFmEgD9ES の構築および機能解析

30

本実施例は、キメラのFBAINm::EgD9ES::Pex20遺伝子を含んでなるヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) ベクター-pZuFmEgD9ES の発現について述べ、ここでEgD9eSは、ミドリムシ (*Euglena gracilis*) 由来の合成 9エロンガーゼであり、ヤロウイア (*Yarrowia*) 中での発現のためにコドン最適化されている。したがってこの分析は、(1) EgD9eS の合成、(2) pZuFmEgD9ES の構築およびヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) Y2224 株への形質転換、および(3) pZuFmEgD9ES (EgD9eS を発現する) を含んでなるヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) Y2224 株の形質転換生物中の脂質プロフィール分析を必要とした。

40

【0321】

EgD9eS の合成

実施例5および国際公開第2004/101753号パンフレットで述べられるのと類似した様式で、ミドリムシ (*Euglena gracilis*) 9エロンガーゼ遺伝子 (EgD9e、配列番号1および2) のコドン使用頻度をヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 中での発現のために最適化した。具体的にはヤロウイア (*Yarrowia*) コドン使用頻度パターン (国際公開第2004/101753号パンフレット)、「ATG」翻訳開始コドン周囲の共通配列、およびRNA安定性の一般方法則 (グハニヨギ (Guhaniyogi), G. およびJ. ブルーアー (B

50

rewer)、Gene 265(1~2):11~23頁(2001年)に従って、EgD9e(すなわちクローンeeg1c.pk001.n5.fから)のコード配列に基づき、コドン最適化Δ9エロンガーゼ遺伝子(「EgD9eS」と称する、配列番号3)をデザインした。翻訳開始部位の改変に加えて777bpのコード領域の117bp(15.1%)を改変し、106コドンを最適化した。図10はEgD9eおよびEgD9eSのヌクレオチド配列の比較を示す。コドン最適化遺伝子中のいずれの改変も、コードされるタンパク質のアミノ酸配列(配列番号2)を変化させなかつた。デザインされたEgD9eS遺伝子は、ニュージャージー州ピスカタウェイのジェンスクリプト・コーポレーション(GenScript Corporation (Piscataway, NJ))によって合成され、pUC57(ジェンバンク登録番号Y14837)中にクローンされて、pEgD9Sを生成した。

【0322】

コンストラクトpZuFmEgD9E(EgD9Eを含んでなる)およびpZuFmEgD9ES(EgD9ESを含んでなる)の発生

pZUF17(図7C、配列番号121)のNcoI/NotI断片をEgD9eSを含んでなるpEgD9SからのNcoI/NotI断片で置換して、キメラのFBAINm::EgD9ES::Pex20遺伝子を含んでなるプラスミドpZuFmEgD9ES(配列番号53)を構築した。このライゲーション生成物は、自己複製する発現ベクターpZuFmEgD9ESであり、したがってそれは次の構成要素を含有した。

【0323】

【表12】

10

20

表9
プラスミドpZuFmEgD9ES(配列番号53)の構成要素

配列番号53中のRE部位およびヌクレオチド	断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明
Swal/BsiWI (6067~318)	次を含んでなるFBAINm::EgD9eS::Pex20 <ul style="list-style-type: none"> • FBAINm: ヤロウイア・リポリティカ FBAINm プロモーター(国際公開第 2005/049805 号パンフレット) • EgD9eS: ミドリムシ由来のコドン最適化Δ9エロンガーゼ(配列番号3、ここで述べられる EgD9eS) • Pex20: ヤロウイア Pex20 遺伝子(ジェンバンク登録番号AF054613)の Pex20 ターミネーター配列
1354~474	ColE1 プラスミド複製起点
2284~1424	大腸菌中での選択のためのアンピシリン抵抗性遺伝子(Amp ^R)
3183~4487	ヤロウイア自律複製配列(ARS18、ジェンバンク登録番号A17608)
6020~4533	ヤロウイア Ura3 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AJ306421)

30

40

【0324】

キメラのFBAINm::EgD9E::Pex20遺伝子を含んでなるプラスミドpZuFmEgD9ES(配列番号52)は、pZUF17プラスミド主鎖を使用して、同様にして合成した。

50

【0325】

pZuFmEgD9E および pZuFmEgD9ES を含んでなるヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 形質転換体の機能解析

一般方法で述べるようにして、プラスミド pZuFmEgD9E および pZuFmEgD9ES (それぞれキメラの FBAINm : : EgD9e : : Pex20 遺伝子および FBAINm : : EgD9eS : : Pex20 遺伝子を含んでなる) を Y2224 株 (野生型ヤロウィア (*Yarrowia*) ATCC # 20362 株の Ura3 遺伝子の自立的突然変異からの FOA 抵抗性突然変異体、実施例 7) に形質転換した。形質転換体を MM プレート上で選択した。30 で 2 日間の生育後、MM プレート上に生育した 3 つの形質転換体を拾って、新鮮な MM プレート上に再度画線培養した。ひとたび生育すると、これらの株を 30 の 3 mL の液体 MM 中に個々に接種し、250 rpm / 分で 2 日間振盪した。細胞を遠心分離して収集して脂質を抽出し、エステル交換反応によって脂肪酸メチルエステルを調製し、引き続いてヒューレットパッカード (Hewlett-Packard) 6890 GC で分析した。

【0326】

GC 分析は、pZuFmEgD9E がある 7 つの全形質転換体中で約 3.2 % の EDA (C20 : 2) の総脂質が生成されたことを示し、これらの 7 株中での LA (C18 : 2) から EDA への平均変換効率は約 18.3 % と判定された (平均、実施例 4 で述べられるように計算された)。

【0327】

対照的に GC 分析は、pZuFmEgD9ES がある 7 つの全形質転換体中で、約 3.6 % の EDA (C20 : 2) の総脂質が生成されたことを示し、これらの 7 株中での LA (C18 : 2) から EDA への平均変換効率は約 20.1 % と判定された。したがって実験的データは、ヤロウィア・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ミドリムシ (*Euglena gracilis*) 9 エロンガーゼ (すなわち EgD9eS、配列番号 3) が、LA を EDA に延長するにあたり野生型 EgD9e 遺伝子 (すなわち配列番号 1) よりも約 16.2 % より効率的であることを実証した。

【0328】

実施例 9
ミドリムシ (*Euglena gracilis*) 9 エロンガーゼ (EgD9e) 発現のためのヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 発現ベクター pY120 の構築

本実施例は、EgD9e 発現のためのヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) ベクター pY120 の構築について述べる。具体的には、pK906 からの NcoI / NotI DNA 断片 (EgD9e を含んでなる、実施例 4 から) を pY115 からの NcoI / NotI DNA 断片 (図 8、実施例 5、ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) FBAINm プロモーターを含んでなる) 中にクローンして、pY120 (配列番号 54、図 11A) を生成した。この図では、EgD9e を「eug e11」と標識する。

【0329】

実施例 10
ミドリムシ (*Euglena gracilis*) 9 エロンガーゼ (EgD9e) 発現のためのダイズ発現ベクター pKR912 の構築

本実施例は、EgD9e 発現のためのダイズベクター pKR912 の構築について述べる。

【0330】

その内容を参照によって本明細書に援用する国際公開第 02/008269 号パンフレットで以前述べられた pKS123 の誘導体である開始プラスミド pKR72 (ATCC 登録番号 PTA-6019、配列番号 55) は、T7 プロモーターおよび転写ターミネー

10

20

30

40

50

ター(T7 prom / HPT / T7 term カセット) で挟まれたハイグロマイシン B リン酸転移酵素遺伝子(HPT) (グリット (G r i t z) , L . およびデービーズ (D a v i e s) , J . , Gene , 25 : 179 ~ 188 頁 (1983 年)) と、細菌 (例えば大腸菌 (E . c o l i)) 中での選択および複製のための細菌複製起点 (o r i) を含有する。さらに pKR72 はまた、ダイズなどの植物中での選択のために、 35S プロモーター (オーデル (O d e l l) ら、 Nature , 313 : 810 ~ 812 頁 (1985 年)) および NOS3' 転写ターミネーター (デピッカー (D e p i c k e r) ら、 J . Mol . Appl . Genet ., 1 : 561 ~ 570 頁 (1982 年)) で挟まれた HPT 遺伝子 (35S / HPT / NOS3' カセット) も含有する。 pKR72 はまた、 - コングリシニン ' サブユニットのためのプロモーター (「 B C O N P r o 」 ; ピーチイ (Beachy) ら、 EMBO J ., 4 : 3047 ~ 3053 頁 (1985 年)) およびファゾリン遺伝子の 3' 転写終結領域 (ドイル (D o y l e) ら、 J . Biol . Chem ., 261 : 9228 ~ 9238 頁 (1986 年)) で挟まれた NotI 制限部位も含有し、したがってダイズ種子中での NotI 部位にクローンした遺伝子の強力な組織特異的発現を可能にする。

【 0331 】

NotI での消化によって EgD9e を pKR906 (実施例 4) から放出し、 pKR72 の NotI 部位にクローンして、 pKR912 (配列番号 56) を生成した。 pKR912 の概略図を図 11B に示し、その中で EgD9e を 「 e u g e l 1 」 と標識する。

20

【 0332 】

実施例 11

ミドリムシ (Euglena gracilis) 9 エロンガーゼ (EgD9e) 発現のためのダイズ中間体クローニングベクター pKR911 の構築

本実施例は、 EgD9e の発現のためのダイズベクター pKR911 の構築について述べる。

【 0333 】

その内容を参照によって本明細書に援用する国際公開第 02/00905 号パンフレットで以前述べられたベクター pKS102 (配列番号 57) は、 T7 prom / HPT / T7 term カセット (実施例 10 で述べられる) 、および細菌 (例えば大腸菌 (E . c o l i)) 中での選択および複製のための細菌複製起点 (o r i) を含有する。

30

【 0334 】

その内容を参照によって本明細書に援用する国際公開第 04/071467 号パンフレットで以前述べられたベクター pKR197 (配列番号 58) は、 T7 prom / HPT / T7 term カセットおよび細菌 o r i を含有するプラスミド pKS102 (配列番号 57) からの AscI 断片と、 con / NotI / Pha s カセットを含有するプラスミド pKR72 (実施例 10 で述べられる) の AscI 断片とを組み合わせて構築された。

【 0335 】

NotI での消化によって EgD9e を pKR906 (実施例 4) から放出し、 pKR197 の NotI 部位にクローンして、中間体クローニングベクター pKR911 (配列番号 59) を生成した。 pKR911 の概略図を図 12A に示し、その中で EgD9e を 「 e u g e l 1 」 と標識する。

40

【 0336 】

実施例 12

ミドリムシ (Euglena gracilis) 8 デサチュラーゼ (EgD8) の cDNA 合成および PCR

本実施例は、米国特許出願第 11/166003 号明細書および米国特許出願第 11/166993 号明細書 (その内容を参照によって本明細書に援用する国際公開第 06/012325 号パンフレットおよび国際公開第 06/012326 号パンフレットに対応す

50

る)で開示されるようなミドリムシ(*Euglena gracilis*)からの8デサチュラーゼ(「EgD8」と命名される)の単離について述べる。この遺伝子の単離は、EgD9eおよびEgD8の同時発現を可能にし、それによって9エロンガーゼ/8デサチュラーゼ経路の発現を可能として、LAおよび/またはALAからのDGLAおよび/またはETAの蓄積を可能にするのに望ましい。

【0337】

カリフォルニア州カールズバッドのインビトロジエン・ライフ・テクノロジーズ(Invitrogen(商標)Life Technologies(Carlsbad, CA))からのcDNA合成用スーパースクリプト(SuperScript)(商標)選択システムを使用して、製造業者のプロトコルに従って、提供されるオリゴ(dT)プライマーによって、765ngのmRNA(実施例1)からミドリムシ(*Euglena gracilis*)cDNAを合成した。合成されたcDNAを20μLの水に溶解した。
10

【0338】

下で述べられる条件を使用して、cDNAからミドリムシ(*Euglena gracilis*)8デサチュラーゼを増幅した。具体的には、cDNA(1μL)を50ピコモルのEg5-1(配列番号62)、50ピコモルのEg3-3(配列番号63)、ウィスコンシン州マディソンのプロメガ(Promega(Madison, WI))からの1μLのPCRスクレオチドミックス(10mM)、インビトロジエン・コーポレーション(Invitrogen Corporation)からの5μLの10×PCR緩衝液、インビトロジエン・コーポレーション(Invitrogen Corporation)からの1.5μLのMgCl₂(50mM)、インビトロジエン・コーポレーション(Invitrogen Corporation)からの0.5μLのTaqポリメラーゼと合わせ、水で50μLにした。反応条件は94で3分間、続いて94で45秒間、55で45秒間および72で1分間を35サイクルであった。PCRを72で7分間で終了し、次に4に保った。5μLに対するアガロースゲル電気泳動法によってPCR反応を分析し、分子量1.3kB前後のDNAバンドが観察された。残る45μLの生成物をアガロースゲル電気泳動法によって分離して、カリフォルニア州オレンジのザイモリサーチ(Zymo Research(Orange, CA))からのザイモクリーン(Zymoclean)(商標)ゲルDNA回収キットを使用して、製造業者のプロトコルに従ってDNAバンドを精製した。得られたDNAを製造業者のプロトコルに従って、プロメガプロメガ(Promega)からのpGEM(登録商標)-Tイージーベクター(Easy Vector)中にクローンした。T7(配列番号64)、M13-28Rev(配列番号65)、Eg3-2(配列番号66)、およびEg5-2(配列番号67)を使用して複数クローンを配列決定した。
20
30

【0339】

このようにしてミドリムシ(*Euglena gracilis*)8デサチュラーゼ(すなわちEg5)のDNA配列(配列番号60)を得た。Eg5の翻訳は、配列番号61で記載されるタンパク質配列を生じさせた。ここでの目的では、「Eg5」はこの明細書残部全体を通じて「EgD8」と称される。
40

【0340】

ここでは詳述しないが、前出の実施例5で述べられる方法を使用して、ヤロウイア・リポリティカ(Yarrowia lipolytica)中の発現のためにコドン最適化された、EgD8の合成バージョン(米国特許出願第11/166003号明細書および米国特許出願第11/166993号明細書(国際公開第06/012325号パンフレットおよび国際公開第06/012326号パンフレットに対応する)で開示されるような)もまた作り出された。EgD8Sと命名されたこの遺伝子は、ここで配列番号68および69として述べられる。

【0341】

実施例13
50

E g D 9 e および E g D 8 の同時発現のためのダイズ発現ベクター p K R 9 1 3 の構築
本実施例は、E g D 9 e および E g D 8 の同時発現のためのダイズベクター p K R 9 1
3 の構築について述べる。

【0342】

その内容を参照によって本明細書に援用する国際公開第02/00904号パンフレットで以前述べられたベクター p K S 1 2 1 (配列番号70) は、クニツツ (K u n i t z) ダイズトリプシン阻害剤 (K T i) プロモーター (ジョフク (J o f u k u) ら、P l a n t C e l l 、1:1079~1093頁 (1989年)) と、その単離について米国特許第6,372,965号明細書で述べられる K T i 3' 終結領域とで挟まれた N o t I 部位を含有する (K T i / N o t I / K T i 3' カセット)。 10

【0343】

その内容を参照によって本明細書に援用する国際公開第05/047479号パンフレットで以前述べられたベクター p K R 4 5 7 (配列番号71) は p K S 1 2 1 の誘導体であり、K T i / N o t I / K T i 3' カセット上流および下流の制限部位が、いくつかのサブクローニングステップを通じて改変されている。ベクター p K R 4 5 7 はまた、その内容を参照によって本明細書に援用する国際公開第04/071467号パンフレットで以前述べられたダイズアルブミン転写ターミネーター (G M - A L B T E R M) を K T i ターミネーター下流に含有して、転写終結を伸ばして強化する。p K R 4 5 7 では、K T i / N o t I / K T i 3' カセット中の K T i プロモーター上流の B a m H I 部位を除去して、B s i W I 、S a l I 、S b f I 、および H i n d I I I 部位を含有する新しい配列 (配列番号72) が付加し、B s i W I 部位が K T i プロモーター 5' 末端に最も近かった。 20

【0344】

さらに p K S 1 2 1 からの K T i / N o t I / K T i 3' カセット中の K T i ターミネーター下流の S a l I 部位を除去して、X b a I (K T i ターミネーター 3' 末端に最も近い)、B a m H I 部位、ダイズアルブミン転写ターミネーター配列、B s i W I 部位、および別の B a m H I 部位を含有する新しい配列 (配列番号73) を付加した。アルブミン転写ターミネーターは、B s i W I 部位をターミネーター 3' 末端に導入するようにデザインされたプライマー o S a l b - 1 2 (配列番号74) と、B a m H I 部位をターミネーター 5' 末端に導入するようにデザインされたプライマー o S a l b - 1 3 (配列番号75) とを使用して、ダイズゲノム D N A から以前増幅されている。 30

【0345】

N o t I での消化によって、実施例12で述べられる p G E M (登録商標) - T イージーベクター (E a s y V e c t o r) から E g D 8 (配列番号60) を放出し、p K R 4 5 7 の N o t I 部位にクローンして p K R 6 8 0 (配列番号76) を生成した。次にプラスミド p K R 6 8 0 を B s i W I で消化し、E g D 8 を含有する断片を p K R 9 1 1 (配列番号59、実施例11) の B s i W I 部位中にクローンして p K R 9 1 3 (配列番号77) を生成した。p K R 9 1 3 の概略図を図12Bに示す。ここで E g D 9 e を「e u g e l 1」 と標識し、E g D 8 を「e u g d 8 - s q 5」 と標識する。 40

【0346】

実施例14

E g D 9 e および E g D 8 の同時発現のためのダイズ発現ベクターの構築

本実施例は、E g D 9 e および E g D 8 の同時発現のためのダイズベクターの構築について述べる。具体的には、プラスミド p K R 6 8 0 (配列番号76、実施例13) を B s i W I で消化して、E g D 8 (配列番号60) を含有する断片を p K R 9 1 2 (配列番号56、実施例10) の B s i W I 部位にクローンした。このようにして強力な種子特異的プロモーターの後ろで、E g D 8 を E g D 9 e と同時発現する。

【0347】

実施例15

E g D 9 e および E g D 8 と、モルティエラ・アルピナ (M o r t i e r e l l a a l

50

p i n a) 5 デサチュラーゼ (M a d 5) との同時発現のためのベクター構築

本実施例は、 E g D 9 e および E g D 8 と、さらにその他の P U F A 遺伝子 (すなわち 5 デサチュラーゼ) との同時発現のためのダイズベクターの構築について述べる。

【 0 3 4 8 】

その内容を参照によって本明細書に援用する米国特許第 6 , 0 7 5 , 1 8 3 号明細書および国際公開第号パンフレット国際公開第 0 4 / 0 7 1 4 6 7 号パンフレットおよび国際公開第 0 5 / 0 4 7 9 4 7 9 号パンフレットで述べられ、全て強力種子特異的プロモーターの制御下にある、 E g D 8 (配列番号 6 0) 、 E g D 9 e (配列番号 1) 、およびモルティエラ・アルピナ (M o r t i e r e l l a a l p i n a) 5 デサチュラーゼ (配列番号 7 8 、 「 M a d 5 」) を含有するダイズ発現ベクターを次のようにして構築する。 10

【 0 3 4 9 】

いくつかのサブクローニングステップを通じて、(その内容を参照によって本明細書に援用する国際公開第 0 4 / 0 7 1 4 6 7 号パンフレットで述べられる) ベクター p K R 2 8 7 の S m a I 部位に、 D N A 配列 (配列番号 8 0) を効果的に付加して、 p K R 7 6 7 (配列番号 8 1) を生成する。このようにして国際公開第 0 4 / 0 7 1 4 6 7 号パンフレットおよび国際公開第 0 5 / 0 4 7 9 4 7 9 号パンフレットで述べられる G y 1 / M a d 5 / l e g A 2 カセットの l e g 1 A 転写ターミネーター 3 ' 末端に、 S b f I 制限部位を付加する。

【 0 3 5 0 】

S b f I ので消化によって G y 1 / M a d 5 / l e g A 2 カセットを p K R 7 6 7 から放出し、得られた断片を実施例 1 4 で述べられるベクターの S b f I 部位中にクローンして、強力種子特異的プロモーターの制御下に全 3 遺伝子 (すなわち E g D 9 e 、 E g D 8 、および M a d 5) を同時発現する新しいベクターを生成した。 20

【 0 3 5 1 】

実施例 1 6

E g D 9 e 、 E g D 8 、および M a d 5 を含んでなるダイズ発現ベクターと、サプロレグニア・ディクリナ (S a p r o l e g n i a d i c l i n a) 1 7 デサチュラーゼ (S d D 1 7) との同時発現

本実施例は、実施例 1 5 で述べられるダイズ発現ベクター (E g D 9 e 、 E g D 8 、および M a d 5 を発現する) と、複数の異なる種子特異的プロモーター / 長鎖 P U F A - 生合成遺伝子の組み合わせを発現する (例えば 1 7 デサチュラーゼを発現する) その他ベクターとを同時形質転換する手段について述べる。プラスミド全体、または適切な遺伝子の組み合わせを含有するプラスミドから精製された A s c I 断片を使用する (いずれのプラスミド断片のあらゆる組み合わせも使用できる) 。 30

【 0 3 5 2 】

例えば実施例 1 5 で述べられるベクターと、アネキシンプロモーター制御下にあって植物中での選択ためのハイグロマイシン抵抗性遺伝子を有するサプロレグニア・ディクリナ (S a p r o l e g n i a d i c l i n a) 1 7 デサチュラーゼ (S d D 1 7) を含有する p K R 3 2 8 (配列番号 8 2 、国際公開第 0 4 / 0 7 1 4 6 7 号パンフレットで述べられる) とを同時形質転換できる。 40

【 0 3 5 3 】

同様に実施例 1 5 で述べられるベクターと、 p K R 3 2 8 に類似するが植物中での選択ための S A M S / A L S / A L S 3 ' カセット (国際公開第 0 4 / 0 7 1 4 6 7 号パンフレットで述べられる) を有する 2 つのベクター p K R 8 8 6 または p K R 8 8 6 r (それぞれ図 1 3 A および図 1 3 B) とを同時形質転換できる。具体的には、 p K R 2 7 1 (配列番号 8 5 、国際公開第 0 4 / 0 7 1 4 6 7 号パンフレットで述べられる) からの A n n / S d d 1 7 / B D 3 0 カセットを含有する P s t I 断片を p K R 2 2 6 (配列番号 8 6 、国際公開第 0 4 / 0 7 1 4 6 7 号パンフレットで述べられる) の S b f I 部位にクローンして、ベクター p K R 8 8 6 (配列番号 8 3) および p K R 8 8 6 r (配列番号 8 4) を作成する。 50

【0354】

実施例17

EgD9e、EgD、およびMad5を含んでなるダイズ発現ベクターと、SdD17およびアラビドプシス(*Arabidopsis*)Fad3との同時発現

本実施例は実施例15で述べられるダイズ発現ベクター(EgD9e、EgD8、およびMad5を発現する)と、複数の異なる種子特異的プロモーター/長鎖PUFA-生合成遺伝子の組み合わせを発現する(例えば17デサチュラーゼおよびFad3を発現する)その他のベクターとを同時形質転換する手段について述べる。

【0355】

実施例15で述べられるベクターと、pKR275(配列番号87、国際公開第04/071467号パンフレットで述べられ、ATCC登録番号PTA-4989を有する)またはpKR329(配列番号88、国際公開第04/07146号パンフレットで述べられる)のどちらかとをダイズに同時形質転換できる。プラスミドpKR275およびpKR329は、それぞれALSまたはハイグロマイシン選択を有し、Ann/Sdd17/BD30カセットに加えてKTi/Fad3/KTi3'遺伝子カセット(国際公開第04/071467号パンフレットで述べられる)を含有する。このようにしてアラビドプシス(*Arabidopsis*)Fad3遺伝子と、サブロレグニア・ディクリナ(*Saprolegnia diclina*)17デサチュラーゼ(SdD17)とを強力種子特異的プロモーターの後ろで同時発現できる。

【0356】

実施例18

EgD9e、EgD8、およびMad5を含んでなるダイズ発現ベクターと、SdD17およびフザリウム・モニリフォルメ(*Fusarium moniliforme*)15デサチュラーゼ(FmD15)との同時発現

本実施例は、実施例15で述べられるダイズ発現ベクター(EgD9e、EgD8、およびMad5を発現する)と、複数の異なる種子特異的プロモーター/長鎖PUFA-生合成遺伝子の組み合わせ発現する(例えば17デサチュラーゼおよび15デサチュラーゼを発現する)その他のベクターとを同時形質転換する手段について述べる。

【0357】

実施例15で述べられるベクターと、ハイグロマイシン選択を有してKTiプロモーター制御下のフザリウム・モニリフォルメ(*Fusarium moniliforme*)15デサチュラーゼ(FmD15)を含有するpKR585(配列番号89、国際公開第05/0479479号パンフレットで述べられ、ATCC登録番号PTA-6019を有する)とをダイズに同時形質転換できる。

【0358】

実施例15で述べられるベクターはまた、ALS選択を有して、Ann/Sdd17/BD30カセットに加えてKTiプロモーター制御下のフザリウム・モニリフォルメ(*Fusarium moniliforme*)15デサチュラーゼを含有するpKR669ともダイズに同時形質転換できる。プラスミドpKR669を次のようにして生成する。BsiWIでの消化によって、プラスミドpKR578(配列番号90、国際公開第05/0479479号パンフレットで述べられ、ATCC登録番号PTA-6280を有する)からKTiプロモーター:FmD15:KTiターミネーターカセットを放出し、選択のためのALS遺伝子、T7prom/HPT/T7termカセット、および細菌ori領域を含有するプラスミドpKR226(配列番号86、国際公開第04/071467号パンフレットで述べられる)のBsiWI部位にクローンして、pKR667(配列番号91)を生成する。プラスミドpKR271(配列番号85、国際公開第04/071467号パンフレットで述べられる)をPstIで消化して、サブロレグニア・ディクリナ(*Saprolegnia diclina*)17デサチュラーゼを含有する断片をpKR667のSbfI部位にクローンして、pKR669を生成する。このようにして、フザリウム・モニリフォルメ(*Fusarium moniliforme*)

10

20

30

40

50

15デサチュラーゼとサプロレグニア・ディクリナ(*Saprolegnia diclina*) 17デサチュラーゼとを強力種子特異的プロモーターの後ろで同時発現できる。pKR669の概略図を図14Aに示す。

【0359】

実施例15で述べられるベクターはまた、ALS選択を有してAnn/Sdd17/B
D30カセットに加えてダイズアルブミンプロモーター(国際公開第04/071467
号パンフレットで述べられる)制御下のフザリウム・モニリフォルメ(*Fusarium
moniliforme*) 15デサチュラーゼ(FmD15)を含有するpKR87
3(配列番号92)ともダイズに同時形質転換できる。具体的には、プラスミドpKR8
73を次のようにして生成する。PCRを使用して、プラスミドpKR132(配列番号
93、国際公開第04/071467号パンフレットで述べられる)からSA/NotI
/SA3'カセットを増幅する。プライマーoSA1b-9(配列番号94)は、プロモ
ーター5'末端にXbaIおよびBsiWI部位を導入するようにデザインされ、プライ
マーオSA1b-2(配列番号95)は、ターミネーター3'末端にBsiWIおよびX
baI部位を導入するようにデザインされる。得られたPCR断片を引き続い
て、NotI/SA3'カセットをpKR160(配列番号96)にクローンして、pKR
160(配列番号96)を生成する。次にプラスミドpKR160をBsiWIで消化し
て、SA/NotI/SA3'カセットをpKR124(配列番号97、国際公開第05
/0479479号パンフレットで述べられる)のBsiWI部位にライゲートして、p
KR163(配列番号98)を生成する。フザリウム・モニリフォルメ(*Fusarium
moniliforme*) 15デサチュラーゼを含有するpY34(配列番号99
、国際公開第05/0479479号パンフレットで述べられる)からのNotI断片を
pKR163(配列番号98)のNotI部位にクローンして、pKR863(配列番号
100)を生成する。BsiWIでの消化によってプラスミドpKR863からSA/F
mD15/SA3'カセットを放出し、選択のためのALS遺伝子、T7prom/HP
T/T7termカセット、および細菌ori領域を含有するプラスミドpKR226(配
列番号86、国際公開第04/071467号パンフレットで述べられる)のBsiW
I部位にクローンして、pKR869(配列番号101)を生成する。プラスミドpKR
271(配列番号85、国際公開第04/071467号パンフレットで述べられる)を
PstIで消化し、サプロレグニア・ディクリナ(*Saprolegnia diclina*) 17デサチュラーゼを含有する断片をpKR869(配列番号101)のSbf
I部位にクローンして、それによってpKR873(配列番号92)を生成する。このよ
うにしてフザリウム・モニリフォルメ(*Fusarium moniliforme*)
15デサチュラーゼとサプロレグニア・ディクリナ(*Saprolegnia diclina*) 17デサチュラーゼとを強力種子特異的プロモーターの後ろで同時発現できる
。pKR873の概略図を図14Bに示す。

【0360】

実施例19

EgD9e、EgD8、およびMad5を含んでなるダイズ発現ベクターと、Sdd17
およびモルティエラ・アルピナ(*Mortierella alpina*)エロンガーゼ
(Melo)との同時発現

本実施例は、実施例15で述べられるダイズ発現ベクター(EgD9e、EgD8、お
よびMad5発現する)と、複数の異なる種子特異的プロモーター/長鎖PUFA-生
合成遺伝子の組み合わせを発現する(例えば 17デサチュラーゼおよびエロンガーゼを
発現する)その他のベクターとを同時形質転換する手段について述べる。

【0361】

実施例15で述べられるベクターはまた、ALS選択を有してAnn/Sdd17/B
D30カセットに加えて、モルティエラ・アルピナ(*Mortierella alpi
na*)エロンガーゼ(国際公開第04/071467号パンフレットおよび国際公開第0

10

20

30

30

40

50

0 / 1 2 7 2 0 号パンフレットで述べられる)の制御下にダイズアルブミンプロモーター(国際公開第04 / 071467号パンフレットで述べられる)を含有するベクターともダイズに同時形質転換できる。このプラスミドは、前述したのと同様にして生成できる。例えばモルティエラ・アルピナ(*Mortierella alpina*)エロンガーゼ('Maelo')を含有するpKR270(配列番号102、国際公開第04 / 071467号パンフレットで述べられる)からのNotI断片をpKR163(配列番号98)のNotI部位にクローンして、SA/Maelo/SA3'カセットを有するベクターを生成できる。BsiWIでの消化によってプラスミドからSA/Maelo/SA3'カセットを放出し、選択のためのALS遺伝子、T7prom/HPT/T7termカセット、および細菌ori領域を含有するプラスミドpKR226(配列番号86、国際公開第04 / 071467号パンフレットで述べられる)のBsiWI部位にクローンして、新しいプラスミドを生成できる。次にプラスミドpKR271(配列番号85、国際公開第04 / 071467号パンフレットで述べられる)をPstIで消化して、サブロレグニア・ディクリナ(*Saprolegnia diclina*)17デサチュラーゼを含有する断片をSA/Maelo/SA3'カセットを含有する新しいプラスミドのSbfI部位にクローンする。このようにしてモルティエラ・アルピナ(*Mortierella alpina*)エロンガーゼと、サブロレグニア・ディクリナ(*Saprolegnia diclina*)17デサチュラーゼとを強力種子特異的プロモーターの後ろで同時発現できる。

【0362】

10

実施例20

EgD9e、EgD8、およびMad5を含んでなるダイズ発現ベクターと、C_{20/22}エロンガーゼおよび4デサチュラーゼとの同時発現

本実施例は、実施例15で述べられるダイズ発現ベクター(発現するEgD9e、EgD8、およびMad5)と、複数の異なる種子特異的プロモーター/長鎖PUFA-生合成遺伝子の組み合わせを発現する(例えばC_{20/22}エロンガーゼおよび4デサチュラーゼを発現する)その他のベクターとを同時形質転換する手段について述べる。

【0363】

C_{20/22}エロンガーゼ(5エロンガーゼおよび/またはEPAエロンガーゼとしても同定される)および/または4デサチュラーゼもまた、ここで述べられるのと類似したダイズ発現ベクター中に同時発現できる。例えばシゾキトリウム・アグレガタム(*Schizochytrium aggregatum*)(国際公開第02 / 090493号パンフレットで述べられる)からの4デサチュラーゼ、またはパブロバ(*Pavlovia*) (国際公開第04 / 071467号パンフレットで述べられる)からの5エロンガーゼを国際公開第04 / 071467号パンフレットで述べられるものなどの適切なダイズ発現ベクター中にクローンできる。NotI部位を4デサチュラーゼまたは5エロンガーゼの5'および3'末端に導入するようにデザインされたPCRプライマーを使用して、遺伝子を增幅できる。次に得られたPCR産物をNotIで消化して、強力種子特異的プロモーターおよび転写ターミネーターで挟まれたNotI部位を含有する、適切なダイズ発現ベクター中にクローンできる。さらにこれに限定されるものではないが、ここで述べられるもの、または国際公開第04 / 071467号パンフレットまたは国際公開第05 / 047479号パンフレットで述べられものなどのその他のベクター中のサブクローニングからは、ダイズ中での4デサチュラーゼおよび/または5エロンガーゼの発現および同時発現に適したベクターが生じるはずである。

30

【0364】

40

実施例21

ユートレプチエラ(*Eutreptiella*)種CCMP389ゲノムDNA、RNA、およびcDNAの調製

本実施例は、メイン州ウェストブースベイハーバーのビジェロー海洋科学研究所(Bigelow Laboratory for Ocean Sciences (West

50

Boothbay Harbor, Maine) のプロバザリ - ギィヤール国立海洋植物プランクトン培養センター (Provasoli - Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton) (CCMP) から購入したユートレプチエラ (*Eutreptiella*) 種CCMP389からのゲノムDNA、RNA、およびcDNAの調製について述べる。

【0365】

ユートレプチエラ (*Eutreptiella*) 種CCMP389からのRNAおよびゲノムDNAの調製

カリフォルニア州カールスバッドのインビトロジエン (Invitrogen (Carlsbad, CA)) からのトリゾール (Trizol) 試薬を使用して、製造業者のプロトコルに従って、1Lの培養から全RNAおよびゲノムDNAを単離した。具体的には細胞ペレットを0.75mLのトリゾール (Trizol) 試薬に再懸濁し、0.5mLの0.5mmガラスピーブと混合してオクラホマ州バーツビルのバイオスペック (Biospec (Bartlesville, OK)) からのミニピーズビーター中で最速高設定で3分間均質化した。混合物をエッペンドルフ遠心分離内で14,000rpmで30秒間遠心分離し、残骸およびガラスピーブを除去した。上清をインビトロジエン (Invitrogen) からの150μLの24:1クロロホルム:イソアミルアルコールで抽出した。上部水相をRNA単離のために使用し、下部有機相をDNA単離のために使用した。

【0366】

RNA単離では、水相を0.375mLのイソプロピルアルコールと混合し、室温で5分間インキュベートした。8,000rpmおよび4で5分間の遠心分離によって、沈殿したRNAを収集した。ペレットを0.7mLの80%エタノールで一度洗浄し、風乾した。このようにして360μgの総RNAを得た。

【0367】

ゲノムDNA単離では、下部有機相を75μLのエタノールと混合し、室温で5分間インキュベートした。次にエッペンドルフ遠心分離内で、サンプルを5,000rpmで2分間遠心分離した。ペレットを0.75mLの0.1Mクエン酸ナトリウム:10%エタノールで2回洗浄した。毎回、サンプルを洗浄溶液中で室温で15分間インキュベートし、5,000rpmおよび4で5分間の遠心分離がそれに続いた。ペレットを風乾し、300μLの8mM NaOHに再溶解した。サンプルを1MのHEPESでpH7.5に調節した。次にカリフォルニア州バレンシアのキアゲン (Qiagen (Valencia, CA)) からのPCR精製キットで、製造業者のプロトコルで述べられる通りにして、ゲノムDNAをさらに精製した。このようにして40μgのゲノムDNAを単離した。

【0368】

ユートレプチエラ (*Eutreptiella*) 種CCMP389からのcDNA調製

カリフォルニア州パロアルトのBDバイオサイエンス・クローンテック (BD BioScience Clontech (Palo Alto, CA)) からのクリエーター (Creator) (商標)スマート (SMART) (商標) cDNAライブラリー構築キットを使用して、二本鎖cDNAを発生させた。具体的には第1のcDNAストランド合成では、1μLの総RNAサンプル (1.2μg) を1μLのスマート (SMART) (商標) IVオリゴヌクレオチド (配列番号103)、1μLのCDSSII / 3' PCRプライマー (配列番号104)、および2μLの水と個々に混合した。混合物を75で5分間加熱して、氷上で5分間冷却した。サンプルに、2μLの5×第1ストランド緩衝液、1μLの20mM DTT、1μLのdNTPミックス (各10mMのdATP、dCTP、dTTP、およびdGTP)、および1μLのパワースクリプト (Power Script) 逆転写酵素を添加した。サンプルを42で1時間インキュベートした。

【0369】

第1のcDNAストランド合成混合物を增幅ためのテンプレートとして使用した。具体

10

20

30

40

50

的には、反応混合物は、2 μL の上記第1のcDNAストランドサンプル、80 μL の水、10 μL の10×アドバンテージ(Adantage)2 PCR緩衝液、2 μL の50×dNTPミックス(各10mMのdATP、dCTP、dGTP、およびdTTP)、2 μL の5'-PCRプライマー(配列番号105)、2 μL のCDSIII/3'-PCRプライマー(配列番号104)、および2 μL の50×アドバンテージ(Adantage)2ポリメラーゼミックスを含有した。次の条件を使用して、PCR增幅を実施した。95℃で1分間、続いて95℃で10秒間および68℃で6分間を20サイクル。キアゲン(Qiagen)からのPCR精製キットで、製造業者のプロトコルで述べられる通りにして、增幅生成物を精製した。精製した生成物を50 μL の水で溶出した。

【0370】

10

実施例22

ユートレプチエラ(*Eutreptiella*)種CCMP389からの全長9エロンガーゼの単離

本実施例は、ドリムシ(*Euglena gracilis*)(EgD9e、実施例3)およびI.ガルバナ(*galbana*)(IgD9e)9エロンガーゼ配列の保存領域由来のプライマーの使用による、ユートレプチエラ(*Eutreptiella*)種CCMP389からの9エロンガーゼをコードする部分的cDNA断片の同定について述べる。次に部分的cDNA断片の配列に基づいて、遺伝子の5'および3'末端を単離した。これによって、ユートレプチエラ(*Eutreptiella*)種CCMP389

9エロンガーゼ翻訳開始「ATG」コドン上流に51塩基、そして9エロンガーゼ終止コドンの向こう側に662bp伸びるコンティグ(配列番号17)のアセンブリーを可能にした。

20

【0371】

ユートレプチエラ(*Eutreptiella*)種CCMP389からの部分的9エロンガーゼをコードするcDNA断片の同定

ユートレプチエラ(*Eutreptiella*)種CCMP389を9エロンガーゼの存在について分析した。ユートレプチエラ(*Eutreptiella*)種CCMP389 9エロンガーゼを単離するのに適した縮重プライマーのデザインは、DNASTARソフトウェアのメガライン(MegAlign)(商標)プログラムのクラスタルW法(緩慢、正確、ゴネット(Gonnet)オプション;トンプソン(Thompson)ら、*Nucleic Acids Res.*、22:4673~4680頁(1994年))を使用して、2つのエロンガーゼのアラインメントをした際に、EgD9e(配列番号2)およびIgD9e(配列番号8)の双方に共通であるいくつかのひと続きの保存アミノ酸配列の同定に基づいた(クラスタルWアラインメントはここで示さず、代わりにEgD9eおよびIgD9eのクラスタルVアラインメントが図4として提供される)。

30

【0372】

表10に示すように、このアラインメントに基づいて、次の縮重オリゴヌクレオチドのセットをデザインして、ユートレプチエラ(*Eutreptiella*)種CCMP389からの9エロンガーゼ遺伝子コード領域の一部を増幅した。

【0373】

40

【表13】

表10
ユートレプチエラ種CCMP389からのΔ9エロンガーゼ遺伝子を増幅する
のに使用される縮重オリゴヌクレオチド

プライマー	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列	配列番号 2(EgD9e)内の位置
EuEF3	YTNCARTTYTTYCAYCAYTT (配列番号 106)	LQFFHHL (配列番号 107)	150~156
EuER3	TTRAAYTGDATDATYTGCAT (配列番号 108)	MQIIQFN (配列番号 109)	210~216

[注記:配列番号 106 および 108 のために使用される核酸縮重コードは次のとおりである:
R=A/G; Y=C/T; D=G/A/T; および N=A/C/T/G]

【0374】

反応混合物は、1 μL の 1 : 20 希釀 cDNA、各 5 μL の順方向および逆方向プライマー (20 μM)、14 μL の水、およびカリフォルニア州マウンテン・ビューのタカラ・バイオ (TaKaRa Bio (Mountain View, CA)) からの 25 μL のタカラ (TaKaRa) ExTaq 2 × プレミックスを含有した。次のパラメーターを使用して、PCR 増幅を実施した。94 で 1 分間、次に 94 で 20 秒間、55 で 20 秒間、および 72 で 1 分間を 35 サイクル、続いて 72 で 5 分間の最終延長サイクル。

【0375】

PCR 産物のアガロースゲル分析は、約 200 bp の断片が得られたことを示した。断片をキアゲン (Qiagen) PCR 精製キットで精製し、インビトロジェン (Invitrogen) からの pCR 2.1 - TOPO 中にクローニングして、配列決定した。得られた配列 (配列番号 13) を翻訳すると、BLAST プログラム分析 (「基礎的局在性配列検索ツール (Basic Local Alignment Search Tool)」アルトシュール (Altshull)、S. F. ら、J. Mol. Biol. 215: 403~410 頁 (1993 年); 実施例 3) に基づいて、イソクリシス・ガルバナ (Isochrysis galbana) (Igd9e、配列番号 8) からの既知の 9 エロンガーゼとの相同性を有した。

【0376】

ユートレプチエラ (Eutreptiella) 種 CCMP389 9 エロンガーゼ 5' 末端配列の単離

2 回の別個の PCR 増幅において、ユートレプチエラ (Eutreptiella) 種 CCMP389 (実施例 21) の二本鎖 cDNA をテンプレートとして使用した。1 回目の PCR 増幅では、オリゴヌクレオチドプライマーは、BD クローンテック (BD - ClonTech) クリエーター (Creator) (商標) スマート (SMART) (商標) cDNA ライブライアリーキットからの遺伝子特定オリゴヌクレオチド (すなわち 389 E10-5-1 [配列番号 110]) と一般的オリゴヌクレオチド 5' - PCR プライマー (配列番号 105) からなった。次を含んでなる 50 μL の総体積中で PCR 増幅を実施した。テンプレートとしての 1 μL の 1 : 10 希釀ユートレプチエラ (Eutreptiella) 種 CCMP389 cDNA、各 1 μL のプライマー (20 μM)、22 μL の水、および 25 μL のタカラ (TaKaRa) ExTaq 2 × プレミックス。増幅を 94 で 90 秒間、次に 94 で 30 秒間、55 で 30 秒間、および 72 で 1 分間を 30 サイクル、続いて 72 で 7 分間の最終延長サイクルで実施した。

【0377】

10

20

30

40

50

2回目のPCR増幅は、1回目のPCR反応からの1μLの希釈された生成物(1:50)をテンプレートとして使用した。プライマーは、遺伝子特定オリゴヌクレオチド(すなわち389E1o-5-2(配列番号111))およびオリゴヌクレオチドDNR-CDS5'-2(配列番号112)からなった。増幅を上述のように行った。

【0378】

2回目のPCR反応生成物は1%(w/v)アガロース中で電気泳動され、200~800bpのサイズ範囲に及ぶ拡散したバンドとして現れた。キアゲン(Qiagen)ゲル精製キットを使用して、製造業者のプロトコルに従って400bp~600bpの間の生成物を単離し、インビトリオジエン(Invitrogen)からのPCR2.1-TOPO中にクローンし、大腸菌(E.coli)に形質転換した。形質転換体をアンピシリン(100μg/mL)含有LB寒天上で選択した。
10

【0379】

推定上の9エロンガーゼcDNAの5'領域を含んでなる1つの形質転換体からのプラスミドDNAの配列分析は、406bpの断片(すなわち5'-cDNA断片1、配列番号14)を明らかにした。この断片は遺伝子の「ATG」翻訳開始コドン近くまで伸びていたが、開始コドンまたは最初の20~30アミノ酸のいずれも配列番号14に含まれてはいなかった。

【0380】

次に5'-cDNA断片1(配列番号14)の配列に基づいて追加的オリゴヌクレオチド(すなわち389E1o-5-4(配列番号113))をデザインし、PCRによって遺伝子の完全な5'末端を得た。プライマー389E1o-5-2を389E1o-5-4で置き換えたこと以外は、反応混合物および増幅条件は、上の2回目のPCRで使用したのと同じであった。アガロースゲル電気泳動法によって分析すると、PCR産物はここでも200~800bpの間の拡散したバンドとして現れ、サイズ200~500bpの断片を単離して上述のようにクローンおよび形質転換した。
20

【0381】

推定上の9エロンガーゼcDNAの5'領域を含んでなる1つの形質転換体からのプラスミドDNAの配列分析は、197bpの断片(5'-cDNA断片2、配列番号15)を明らかにした。これはcDNAの5'末端、および非翻訳領域上流の51bpを含んだ。
30

【0382】

ユートレプチエラ(Eutreptiella)種CCMP389 9エロンガーゼの3'末端の単離

テンプレートとしてcDNAを使用したPCR増幅によって推定上の9エロンガーゼの3'末端もまた単離した。方法は5'末端単離について上述したようであったが、1回目および2回目双方のPCR増幅で使用したプライマーは、下の表11に示すようであり、20μMでなく10μMであった。さらに72°での最終延長サイクルを7分間から5分間に短縮した。

【0383】

【表14】

表11
3'cDNA 単離のために使用されるオリゴヌクレオチドプライマー

PCR 増幅	遺伝子特異的 オリゴヌクレオチド	一般的オリゴヌクレオチド
1回目	389Elo-3-1 (配列番号 114)	CDSIII/3' PCR プライマー (配列番号 104)
2回目	389Elo-3-2 (配列番号 115)	CDSIII/3' PCR プライマー (配列番号 104)

*CDSIII/3' PCR プライマーは、クローンテックのクリエーター™スマート™cDNA
ライブラリー構築キット中で提供された

【0384】

2回目のPCR増幅から約1kBのDNA断片が発生し、それをキアゲン(Quiggen)PCR精製キットで精製して、PCR2.1-TOPO中にクローンして形質転換および配列決定した。いくつかのクローンの配列分析は約1kB DNA断片が、poly A tailを含む推定上の9エロンガーゼcDNAの3'領域を含有したことを示した。920bpのアセンブルした3'領域のコンティグ配列は、配列番号16として示される。

【0385】

ユートレプチエラ(Eutreptiella)種CCMP389からの全長9エロンガーゼ配列のアセンブリー

オリジナルの部分的cDNA断片(配列番号13)、2つの5'cDNA断片(配列番号14および15)、および3'-cDNA断片(配列番号16)のアセンブリーは、ユートレプチエラ(Eutreptiella)種CCMP389からの9エロンガーゼの完全な配列と、それに加えて51bpの5'非翻訳領域および662bpの3'非翻訳領域(配列番号17、1504bp)とをもたらした。コード領域は792bpの長さであり、アミノ酸263個のタンパク質(配列番号5)をコードする。配列番号4は、ユートレプチエラ(Eutreptiella)種CCMP389 9エロンガーゼのコード配列(ここでE389D9eと命名する)のヌクレオチド配列である。

【0386】

ユートレプチエラ(Eutreptiella)種CCMP389の9エロンガーゼ配列(E389D9e)と既知の9エロンガーゼとの比較

BLAST「nr」データベース(実施例3)中に含まれる配列との類似性についてBLAST検索を行い、配列番号5(すなわちE389D9e)のアイデンティティを判定した。配列番号5がそれに対して最も高い類似性を有する配列を要約するBLAST比較の結果を%同一性、%類似性、および期待値に従って報告する。「%同一性」とは、2つのタンパク質間で同一のアミノ酸の百分率として定義される。「%類似性」とは、2つのタンパク質間で同一または保存されたアミノ酸百分率と定義される。「期待値」は、全くの偶然によりこのサイズのデータベースの検索で予期される、所定スコアでの一致数を特定して、一致の統計的有意性を推定する。

【0387】

したがってここで配列番号5として記載されるアミノ酸断片は、2E-43の期待値で、イソクリシス・ガルバナ(Isochrysis galbana)(配列番号8)の9エロンガーゼであるIgD9eと、38%の同一性および56%の類似性を有する。同様に、E389D9eはクラスタルV法を使用してIgD9eと33.1%同一であり、E389D9eはクラスタルV法を使用してEgD9eと65.1%同一である(図2)。クラスタルV法(ヒギンズ(Higgins), D.G.およびシャープ(Sharp)

10

20

30

40

50

p) , P. M. 、 Comput. Appl. Biosci. 、 5 : 151 ~ 153 頁 (1989 年) ; ヒギンズ (Higgins) ら、 Comput. Appl. Biosci. 、 8 : 189 ~ 191 頁 (1992 年)) によって実施された配列 % 同一性計算は、 レザージーン (LADSERGENE) バイオインフォマティクス計算スイートのメガライン (MegAlign) (商標) v6.1 プログラムを使用して、 ペアワイズアラインメントのためのデフォルトパラメーター (K T U P L E = 1 、 G A P P E N A L T Y = 3 、 W I N D O W = 5 、 D I A G O N A L S S A V E D = 5 、 および G A P L E N G T H P E N A L T Y = 10) で実施した。

【 0388 】

実施例 23

10

ヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) Y 2224 株中のヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 発現ベクター - p F B A I N - 389E1o (ヨートレプチエラ (*Eutreptiella*) 種 C C M P 389 9 エロンガーゼ (E 389D9e) を含んでなる) の構築および機能解析

本実施例は、 ヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 発現ベクター p F B A I N - 389E1o (キメラの F B A I N m : : E 389D9e : : P e x 20 遺伝子を含んでなる) の合成について述べる。 ヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) Y 2224 株中で発現させた場合の E 389D9e の 9 エロンガーゼ活性を引き続いて判定した。

【 0389 】

ヤロウイア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 発現ベクター p F B A I N - 389E1o の構築

20

オリゴヌクレオチド 389E1o - F および 389E1o - R1 (それぞれ配列番号 116 および 117) をプライマーとして使用して、 E 389D9e (配列番号 4) の全長 c D N A を増幅した。 ヨートレプチエラ (*Eutreptiella*) 種 C C M P 389 c D N A (実施例 21) をテンプレートとして、 P C R 反応を次を含んでなる 50 μL の総体積中で個々に実施した。 各 1 μL の 20 μM 順方向および逆方向プライマー、 1 μL の c D N A 、 10 μL の 5 × P C R 緩衝液、 1 μL の d N T P ミックス (各 10 μM) 、 35 μL の水、 およびマサチューセッツ州イプスウィッチのニュー・イングランド・バイオラブズ・インコーポレーテッド (New England Biolabs Inc . (Ipswich, MA)) からの 1 μL のフュージョン (Phusion) ポリメラーゼ。 増幅を 98 °C で 1 分間、 次に 98 °C で 10 秒間、 55 °C で 10 秒間、 および 72 °C で 30 秒間を 30 サイクル、 続いて 72 °C で 5 分間の最終延長サイクルで実施した。 P C R 産物を N c o I および E a r I で消化して、 9 エロンガーゼ c D N A の 5' 領域を含有する約 210 b p の断片を発生させた。 これを E a r I および N o t I でも消化して、 c D N A の 3' 領域を含有する約 600 b p の断片を発生させた。 N c o I / E a r I および E a r I / N o t I 消化断片を 1% (w / v) アガロース中でのゲル電気泳動法に続けて精製した。

30

【 0390 】

E 389D9e 遺伝子が、 Y. リポリティカ (*lipolytica*) F B A I N m プロモーターおよび P E X 20 - 3' ターミネーター領域の制御下にあるように、 N c o I / E a r I および E a r I / N o t I 9 エロンガーゼ消化断片と N c o I / N o t I 消化 p F B A I N - M O D - 1 (配列番号 118) とを一方向性にライゲートした。 具体的にはライゲーション反応は、 次を含有した。 10 μL の 2 × ライゲーション緩衝液、 プロメガ (Promega) からの 1 μL の T 4 D N A リガーゼ、 各 4 μL の約 210 b p および 約 600 b p の断片 (各約 300 ng) 、 および 1 μL の p F B A I N - M O D - 1 (約 150 ng) 。 反応混合物を室温で 2 時間インキュベートして使用し、 インビトロジエン (Invitrogen) からの大腸菌 (*E. coli*) トップ (Top) 10 コンピテント細胞に形質転換した。 キアゲン (Q i a g e n) M i n i p r e p (ミニプレップ) キットを使用して、 形質転換体からのプラスミド D N A を回収した。 制限酵素マッピ

40

50

ングによって正しいクローンを同定し、最終コンストラクトを「pFBAIN-389E1o」と命名した。

【0391】

したがってpFBAIN-389E1o(図15A、配列番号119)は、その結果次の構成要素を含有した。

【0392】

【表15】

表12
プラスミドpFBAIN-389E1o(配列番号119)の構成要素

配列番号119中のRE部位およびヌクレオチド	断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明
BglII-BsiWI (6040~301)	次を含んでなるFBAINm::E389D9e::Pex20 <ul style="list-style-type: none"> • FBAINm: ヤロウィア・リポリティカ FBAINm プロモーター(国際公開第2005/049805号パンフレット) • E389D9e: ユートレプチエラ種CCMP389Δ9 エロンガーゼ(ここで述べられる配列番号4) • Pex20: ヤロウィア Pex20 遺伝子(ジェンバンク登録番号AF054613)のPex20ターミネーター配列
PacI-BglII (4533~6040)	ヤロウィア Ura3 遺伝子(ジェンバンク登録番号AJ306421)
(3123~4487)	ヤロウィア自律複製配列(ARS18、ジェンバンク登録番号A17608)
(2464~2864)	f1 起点
(1424~2284)	大腸菌中での選択のためのアンピシリン抵抗性遺伝子(Amp ^R)
(474~1354)	ColE1 プラスミド複製起点

【0393】

pFBAIN-389E1oを含んでなるヤロウィア・リポリティカ(Yarrowia lipolytica)形質転換体の機能解析

一般方法で述べられるようにして、pFBAIN-389E1o(E389D9eを含んでなる)の5つの個々のクローン、および対照プラスミドpFBAIN-MOD-1をヤロウィア・リポリティカ(Yarrowia lipolytica)Y2224株(実施例7)に形質転換した。ウラシルを欠くMMプレート上に細胞を播種して、30℃に2~3日間保った。次に各プレートから細胞をこすり取り、脂質を抽出してエステル交換により脂肪酸メチルエステルを調製し、引き続いてヒューレットパッカード(Hewlett-Packard)6890 GCで分析した。

【0394】

GC分析は、pFBAIN-389E1oを含んでなる5つの全形質転換体中でEDAが生成された一方、対照株中ではEDAが生成されなかったことを示した(表13)。脂肪酸を18:2(LA)および20:2(EDA)として同定し、それぞれの組成物を総脂肪酸の%で表す。次の式に従って変換効率を計算した。([生成物]/[基質+生成物]

10

20

30

40

50

] * 100。式中、「生成物」は、直接生成物と、それに由来する経路中の全生成物とを含む。

【0395】

【表16】

表13

ユートレプチエラ種 CCMP389Δ9 エロンガーゼ(E389D9e)を過剰発現するよう改変されたヤロウィア・リポリティカ Y2224 株中の脂質組成

プラスミド	クローン	C18:2	C20:2	変換効率
pFBAIN-MOD-1	1	17.4	0	0
pFBAIN-389Elo	1	13.49	2.16	13.80
	2	13.16	1.79	11.97
	3	14.11	1.92	11.98
	4	15.55	0.78	4.78
	5	13.24	1.79	11.91

【0396】

上に示す結果は、ここで配列番号4および5で記載されるユートレプチエラ(*Eutreptiella*)種CCMP389からのクローンされたcDNAが、LAをEDAに効率的に不飽和化し、したがって9エロンガーゼとして機能することを確認する。

【0397】

実施例24

ヤロウィア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)中の発現のためにコドン最適化された合成9エロンガーゼ遺伝子(ユートレプチエラ(*Eutreptiella*)種CCMP389に由来する)(E389D9eS)を含んでなるヤロウィア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)発現ベクターpZUFE389Sの構築および機能解析

本実施例は、キメラのF B A I N : : E 3 8 9 D 9 e S : : P e x 2 0 遺伝子を含んでなる、ヤロウィア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)ベクターpZUFE389Sの機能性発現について述べ、ここでE389D9eSは、ユートレプチエラ(*Eutreptiella*)種CCMP389由来の合成9エロンガーゼであり、ヤロウィア(*Yarrowia*)中の発現のためにコドン最適化されている。したがってこの分析は、次を必要とした。(1)E389D9eSの合成、(2)pZUFE389Sの構築およびヤロウィア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)Y2224株への形質転換、および(3)pZUFE389Sを含んでなるヤロウィア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)Y2224株(E389D9eSを発現する)の形質転換生物中の脂質プロフィール分析。

【0398】

E389D9eSの合成

実施例5、実施例8、および国際公開第2004/101753号パンフレットで述べられるのと類似した様式で、ユートレプチエラ(*Eutreptiella*)種CCMP389(E389D9e、配列番号4および5)の9エロンガーゼ遺伝子のコドン使用頻度をヤロウィア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)中の発現のために最適化した。具体的にはヤロウィア(*Yarrowia*)コドン使用頻度パターン(国際公開第2004/101753号パンフレット)、「ATG」翻訳開始コドン周囲の共通配列、およびRNA安定性の一般方法則(グハニヨギ(Guhaniyogi), G.およびJ.ブルーアー(Brewer)、Gene 265(1~2):11~

10

20

30

40

50

23頁(2001年)に従って、E389D9e(配列番号4)のコード配列に基づき、コドン最適化Δ9エロンガーゼ遺伝子(「E389D9eS」と称する、配列番号6)をデザインした。翻訳開始部位の改変に加えて792bpコード領域(停止コドンを含む)の128bp(16.2%)を改変し、113コドンを最適化した。GC含量は、野生型遺伝子(すなわちE389D9e)中の45.7%から、合成遺伝子(すなわちE389D9eS)中の50.1%に増大した。NcoI部位およびNotI部位をそれぞれ、E389D9eSの翻訳開始コドン周囲および停止コドン後に組み込んだ。図16は、E389D9eおよびE389D9eSのヌクレオチド配列の比較を示す。コドン最適化遺伝子中のいずれの改変もコードされるタンパク質のアミノ酸配列(配列番号5)を変化させなかった。

10

【0399】

デザインされたE389D9eS遺伝子(配列番号6)は、ニュージャージー州ピスカタウェイのジェンスクリプト・コーポレーション(GenScript Corporation (Piscataway, NJ))によって合成され、pUC57(ジェンバンク登録番号Y14837)中にクローンされて、pE389S(配列番号120)を生成した。

【0400】

E389D9eSを含んでなるコンストラクトpZUFE389Sの発生

pZUF17(図7C、配列番号121)のNcoI/NotI断片をE389D9eSを含んでなるpE389S(配列番号120)からのNcoI/NotI断片で置換して、プラスミドpZUFE389S(図15B、配列番号122)を構築した。このライゲーション生成物はpZUFE389Sであり、したがってそれは次の構成要素を含有した。

20

【0401】

【表17】

表14
プラスミドpZUFE389S(配列番号122)の構成要素

配列番号122中のRE部位およびヌクレオチド	断片およびキメラ遺伝子構成要素の説明
EcoRI/BsiWI (6857~1112)	次を含んでなるFBAIN::E389D9eS::Pex20 <ul style="list-style-type: none"> • FBAIN: ヤロウイア・リポリティカ FBAIN プロモーター (国際公開第2005/049805号パンフレット) • E389D9eS: ユートレプチエラ種CCMP389由来のコドン最適化Δ9エロンガーゼ(配列番号6) • Pex20: ヤロウイア Pex20 遺伝子(ジェンバンク登録番号AF054613)のPex20ターミネーター配列
2148~1268	ColE1プラスミド複製起点
3078~2218	大腸菌中での選択のためのアンピシリン抵抗性遺伝子(Amp ^R)
3977~5281	ヤロウイア自律複製配列(ARS18、ジェンバンク登録番号A17608)
6835~5324	ヤロウイア Ura3 遺伝子(ジェンバンク登録番号AJ306421)

30

40

50

【0402】

p Z U F E 3 8 9 S を含んでなるヤロウィア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) 形質転換体の機能解析

一般方法で述べるようにして、プラスミド p Z U F E 3 8 9 S を Y 2 2 2 4 株 (野生型ヤロウィア (Yarrowia) ATCC # 2 0 3 6 2 株の U r a 3 遺伝子の自立的突然変異からの F O A 抵抗性突然変異体、実施例 7) に形質転換した。形質転換体を M M プレート上で選択した。30 で 2 日間の生育後、形質転換体を拾って、新鮮な M M プレート上に再度画線培養した。ひとたび生育すると、これらの株を 30 の 3 mL の液体 M M 中に個々に接種し、2 5 0 r p m / 分で 2 日間振盪した。細胞を遠心分離して収集して脂質を抽出し、エステル交換反応によって脂肪酸メチルエステルを調製し、引き続いてヒューレットパッカード (Hewlett - Packard) 6 8 9 0 G C で分析した。

【0403】

G C 分析は、12 つの全形質転換体中で約 2 . 2 % の C 2 0 : 2 (E D A) の総脂質が生成されたことを示し、これらの 12 株中の C 1 8 : 2 から C 2 0 : 2 への変換効率は約 1 2 % と判定された (平均、実施例 2 3 で述べられるように計算された)。

【0404】

実施例 2 5

ミドリムシ (E u g l e n a g r a c i l i s) (E g D 9 e または E g D 9 e S) および / またはユートレプチエラ (E u t r e p t i e l l a) 種 C C M P 3 8 9 (E 3 8 9 D 9 e または E 3 8 9 D 9 e S) 9 エロンガーゼの発現のための代案のダイズ発現ベクターの構築

上の実施例は、例示的であるが限定を意図しないことが、当業者によって理解されるであろう。例えばここで述べられる方法に類似するがこれに限定されるものではない方法を使用して、E g D 9 e の発現のために上の実施例 1 0 、 1 1 、および 1 3 ~ 1 5 で作り出されたダイズ発現ベクターのいずれかを容易に改質して、代わりに E g D 9 e S 、 E 3 8 9 D 9 e および / または E 3 8 9 D 9 e S の発現 (または同時発現) を可能にできる。9 エロンガーゼの 5 ' および 3 ' 末端に N o t I 部位を導入するようにデザインされた P C R プライマーを使用して、遺伝子を増幅できる。次に得られた P C R 産物を N o t I で消化して、強力種子特異的プロモーターと転写ターミネーターとで挟まれた N o t I 部位を含有する、適切なダイズ発現ベクター中にクローンできる。ここで述べられる、または国際公開第 2 0 0 4 / 0 7 1 4 6 7 号パンフレットまたは国際公開第 2 0 0 5 / 0 4 7 4 7 9 号パンフレットで述べられる (が、これらに限定されるものではない) その他のベクター中へのさらなるサブクローニングからは、ダイズ中の 9 エロンガーゼの発現に適したベクターが生じるであろう。

【0405】

さらにここで述べられる遺伝子、プロモーター、ターミネーター、および遺伝子カセットに加えて、当業者は、ここで E g D 9 e 、 E g D 9 e S 、 E 3 8 9 D 9 e および / または E 3 8 9 D 9 e S の発現のために述べられる方法に類似するが、これに限定されるものではない方法で、その他のプロモーター / 遺伝子 / ターミネーター / カセットの組み合わせが合成できることを理解できる。同様に、本発明の 9 エロンガーゼのいずれかとの同時発現のために、その他の P U F A 遺伝子 (下の表 1 7 で述べるものなど) を発現することが望ましいかもしれない。

【0406】

例えば国際公開第 2 0 0 4 / 0 7 1 4 6 7 号パンフレットおよび国際公開第 2 0 0 4 / 0 7 1 1 7 8 号パンフレットは、ダイズ中における胚芽特異的発現で使用するためのいくつかのプロモーターおよび転写ターミネーター配列の単離について述べる。さらに国際公開第 2 0 0 4 / 0 7 1 4 6 7 号パンフレット、国際公開第 2 0 0 5 / 0 4 7 4 7 9 号パンフレット、および国際公開第 2 0 0 6 / 0 1 2 3 2 5 号パンフレットは、個々のプロモーター、遺伝子、および転写ターミネーターを固有の組み合わせで共にライゲートすることによる、複数のプロモーター / 遺伝子 / ターミネーター / カセットの組み合わせの合成につ

10

20

30

40

50

いて述べる。一般に適切なプロモーター（表15に列挙されるが、これに限定されるものではない）および転写ターミネーター（表16に列挙されるが、これに限定されるものではない）で挟まれたN o t I部位を使用して所望の遺伝子をクローンする。遺伝子の5'および3'末端にN o t I部位を導入するようにデザインされたオリゴヌクレオチドでのP C R增幅を使用して、N o t I部位を表17に列挙されるが、これに限定されるものではない、対象とする遺伝子に付加できる。次に得られたP C R産物をN o t Iで消化して、適切なプロモーター/N o t I/ターミネーターカセット中にクローンする。

【0407】

さらに国際公開第2004/071467号パンフレット、国際公開第2005/047479号パンフレットおよび国際公開第2006/012325号パンフレットは、所望の表現型の発現を得るために、（適切な選択可能なマーカーカセットに加えて）固有の組み合わせの個々の遺伝子カセットをさらに結合させることについて述べる。これは主に異なる制限酵素部位を使用して行われるが、いくつかの技術を利用して所望のプロモーター/遺伝子/転写ターミネーターの組み合わせを達成できることが、当業者には理解できる。そうすることで、胚芽特異的プロモーター/遺伝子/転写ターミネーターカセットのあらゆる組み合わせを達成できる。当業者はまた、これらのカセットが個々のD N A断片上または複数の断片上に位置でき、遺伝子の同時発現が複数のD N A断片の同時形質転換の結果であることも理解できる。

【0408】

【表18】

10

20

表15
種子特異的プロモーター

プロモーター	生物	プロモーター参考文献
β-コングリシニンα'-サブユニット	ダイズ	ビーチイ(Beachy)ら著、EMBOJ.、4:3047~3053頁(1985年)
クニツツトリプシン阻害剤	ダイズ	ジョフク(Jofuku)ら著、Plant Cell、1:1079-1093頁(1989年)
アネキシン	ダイズ	国際公開第2004/071467号パンフレット
グリシニンGy1	ダイズ	国際公開第2004/071467号パンフレット
アルブミン2S	ダイズ	米国特許第6,177,613号明細書
レグミンA1	エンドウマメ	レリー(Rerie)ら著、Mol.Gen.Genet.、225:148~157頁(1991年)
β-コングリシニンβ-サブユニット	ダイズ	国際公開第2004/071467号パンフレット
BD30(P34とも称される)	ダイズ	国際公開第2004/071467号パンフレット
レグミンA2	エンドウマメ	レリー(Rerie)ら著、Mol.Gen.Genet.、225:148~157頁(1991年)

30

40

【0409】

【表19】

表 16
転写ターミネーター

転写ターミネーター	生物	参考文献
ファゼオリン 3'	マメ	国際公開第 2004/071467 号パンフレット
クニッツトリプシン阻害剤 3'	ダイズ	国際公開第 2004/071467 号パンフレット
BD30(P34 とも称される)3'	ダイズ	国際公開第 2004/071467 号パンフレット
レグミン A2 3'	エンドウマメ	国際公開第 2004/071467 号パンフレット
アルブミン 2S 3'	ダイズ	国際公開第 2004/071467 号パンフレット

10

【0410】

【表20】

表17
PUFA 生合成経路遺伝子

遺伝子	生物	参考文献
Δ6 デサチュラーゼ	サプロレグニア・ディクリナ	国際公開第 2002/081668 号パンフレット
Δ6 デサチュラーゼ	モルティエラ・アルピナ	米国特許第 5,968,809 号明細書
エロンガーゼ	モルティエラ・アルピナ	国際公開第 2000/12720 号パンフレット、 米国特許第 6,403,349 号明細書
Δ5 デサチュラーゼ	モルティエラ・アルピナ	米国特許第 6,075,183 号明細書
Δ5 デサチュラーゼ	サプロレグニア・ディクリナ	国際公開第 2002/081668 号パンフレット
Δ15 デサチュラーゼ	フザリウム・モニリフォルメ	国際公開第 2005/047479 号パンフレット
Δ17 デサチュラーゼ	サプロレグニア・ディクリナ	国際公開第 2002/081668 号パンフレット
エロンガーゼ	スラウストキトリウム・アウレウム (<i>Thraustochytrium aureum</i>)	国際公開第 2002/08401 号パンフレット、 米国特許第 6,677,145 号明細書
エロンガーゼ	パブロバ種	ペレイラ(Pereira)ら著、Biochem.J.、 384:357~366 頁(2004 年)
Δ4 デサチュラーゼ	シゾキトリウム・アグレガタム	国際公開第 2002/090493 号パンフレット
Δ9 エロンガーゼ	イソクリシス・ガルバナ	国際公開第 2002/077213 号パンフレット
Δ8 デサチュラーゼ	ミドリムシ	国際公開第 2000/34439 号パンフレット、 米国特許第 6,825,017 号明細書、国際 公開第 2004/057001 号パンフレット、国 際公開第 2006/012325 号パンフレット
Δ8 デサチュラーゼ	アカントアーバ・ カステラーニ	サヤノバ(Sayanova)ら著、FEBS Lett.、 580:1946~1952 頁(2006 年)
Δ8 デサチュラーゼ	パブロバ・サリナ	国際公開第 2005/103253 号パンフレット
Δ8 デサチュラーゼ	パブロバ・ルセリ	米国仮特許出願第 60/795810 号明細書
Δ8 デサチュラーゼ	テトルエトレプチア・ ポムクテンシス CCMP1491	米国仮特許出願第 60/853563 号明細書
Δ8 デサチュラーゼ	ユートレプチエラ種 CCMP389	米国仮特許出願第 60/853563 号明細書
Δ8 デサチュラーゼ	ユートレプチエラ・ギムナスチカ 近種 CCMP1594	米国仮特許出願第 60/853563 号明細書

【0411】

実施例 26

体細胞性ダイズ胚芽培養物の形質転換

培養条件

ダイズ胚芽形成懸濁培養物 (c v . J a c k) は、光度 6.0 ~ 8.5 μE / m² / s の冷白色蛍光灯による 16 : 8 時間の昼 / 夜光周期で、150 rpm、26 の回転振盪器上の 35 mL の液体培地 S B 1 9 6 (下の処方参照) 中で維持できる。培養物は、およそ 3

10

20

30

40

50

5 mg の組織を 35 mL の新鮮な液体 S B 1 9 6 中に接種して、7 日 ~ 2 週間毎に継代培養される（好ましい継代培養間隔は 7 日毎である）。

【 0 4 1 2 】

ダイズ胚芽形成懸濁培養物は、粒子ガン衝撃法によって、以前述べられたプラスミドおよびDNA断片で形質転換できる（クライン（Klein）ら、Nature（London）、327：70~73頁（1987年）；米国特許第4,945,050号明細書）。デュポン（DuPont）バイオリストイック（Biostatic）（商標）PDS 1000 / HE装置（ヘリウム後付け）を全ての形質転換のために使用する。

【 0 4 1 3 】

ダイズ胚芽形成懸濁液培養の開始

10

各開始間を 5 ~ 7 日間開けて、ダイズ培養を毎月 2 回開始する。定植後 45 ~ 55 日の入手可能なダイズ植物から未熟種子入りサヤを摘み取って、種子を外皮から取り出して滅菌マゼンタ・ボックスに入れる。1滴のアイボリー（ivory）石鹼添加 5% クローラックス（Clorox）溶液（すなわち 95 mL のオートクレーブ済み蒸留水に 5 mL のクローラックス（Clorox）および 1 滴の石鹼を添加して良く混合する）中で 15 分間振盪して、ダイズ種子を滅菌する。2 本の 1 L 入り滅菌蒸留水を使用して種子をすくいで、4 mm 未満のものを個々の顕微鏡スライドに載せる。種子の小さな端を切断して、子葉を種子被膜から押し出す。子葉（プレート当たり 25 ~ 30 個）を S B 1 培地を含有するプレートに移す。子葉を含有するプレートをファイバーテープで覆って 8 週間保存する。その後、二次胚芽を切断して S B 1 9 6 液体培地に 7 日間入れる。

20

【 0 4 1 4 】

衝撃のためのDNA調製

対象とする遺伝子および選択可能なマークー遺伝子を含有する、無傷のプラスミドまたはDNAプラスミド断片のどちらかを衝撃のために使用できる。p K R 2 7 4 (ATCC 登録番号 P T A - 4 9 8 8)、p K R 6 8 5 (ATCC 登録番号 P T A - 6 0 4 7) または p K R 6 8 1 (ATCC 登録番号 P T A - 6 0 4 6)などのプラスミドおよび / またはその他の発現プラスミドからの断片を消化されたプラスミドのゲル単離によって得ることができる。各場合において、下述する 0.5 mL の特定酵素ミックス中で 100 µg のプラスミドDNAを使用できる。プラスミドは、NE 緩衝液 4 (20 mM のトリス - 酢酸、10 mM の酢酸マグネシウム、50 mM の酢酸カリウム、1 mM のジチオスレイトール、pH 7.9) 中の A s c I (100 単位)、100 µg / mL の B S A、および 5 mM の

30

- メルカプトエタノールにより、37 度で 1.5 時間で消化できる。得られたDNA断片をバイオウィタカー・モレキュラー・アプリケーションズ（Biowhitaker Molecular Applications）からの 1% のシープラーカー（Seal aquue）（登録商標）G T G アガロース上のゲル電気泳動法によって分離でき、P U F A 生合成遺伝子を含有するDNA断片をアガロースゲルから切除できる。DNAは、ゲラーゼ（G E L a s e ）（登録商標）消化酵素を使用して、製造業者のプロトコルに従ってアガロースから精製できる。代案としてはプラスミド全体、またはプラスミド全体と断片との組み合わせが使用できる。

【 0 4 1 5 】

40

5 µL の 1 µg / µL DNA 溶液（無処置プラスミドまたは上述のように調製されたDNA断片のいずれか）、50 µL の 2.5 M C a C l₂、および 20 µL の 0.1 M スペルミジンに、3 mg の金粒子（3 mg の金）を含有する滅菌蒸留水の 50 µL のアリコートを添加できる。ボルテックス振盪器のレベル 3 で混合物を 3 分間振盪し、卓上遠心分離器内で 10 秒間遠沈する。400 µL の 100% エタノールでの洗浄後、超音波処理によって 40 µL の 100% エタノール中にペレットを懸濁する。遺伝子銃 P D S 1 0 0 0 / HE 装置ディスクの各フライングディスクに、5 µL の DNA 懸濁液を小分けして入れる。各 5 µL のアリコートは衝撃あたり（例えばディスクあたり）およそ 0.375 mg の金を含有した。

【 0 4 1 6 】

50

組織調製およびDNAによる衝撃

およそ150～200mgの7日齢の胚芽懸濁培養物を空の滅菌 $60 \times 15\text{ mm}$ ペトリ皿に入れ、皿をプラスチックメッシュで覆う。膜破裂圧力を1100PSIに設定して、チャンバーを27～28インチ水銀圧の真空に脱気して、組織をプレートあたり1または2回衝撃する。組織を保持／停止スクリーンからおよそ3.5インチに置く。

【0417】

形質転換された胚芽の選択

ハイグロマイシン（ハイグロマイシンBリン転移酵素（HPT）遺伝子が選択可能な標識として使用された場合）またはクロルスルフロン（アセト乳酸シターゼ（ALS）遺伝子が選択可能な標識として使用された場合）のいずれかを使用して、形質転換された胚芽を選択する。

【0418】

ハイグロマイシン（HPT）選択

衝撃に続いて、上述のように組織を新鮮なSB196培地に入れて培養する。衝撃の6日後に、SB196を30mg/Lハイグロマイシンの選択物質を含有する新鮮なSB196で交換する。選択培地は毎週新しくする。選択の4～6週後に、形質転換されていない壊死性胚芽形成クラスターから、緑色の形質転換された組織が生育しているのが観察されるかもしれない。単離された緑色組織を取り出して、マルチウェルプレートに接種し、新しいクローン増殖され形質転換された胚芽形成懸濁培養物を生成する。

【0419】

クロルスルフロン（ALS）選択

衝撃に続いて、組織を新鮮なSB196培地を入れた2つのフラスコに分割し、上述のように培養する。衝撃の6～7日後、SB196を100ng/mLクロルスルフロンの選択物質を含有する新鮮なSB196と交換する。選択培地は毎週新しくする。選択の4～6週後に、形質転換されていない壊死性胚芽形成クラスターから、緑色の形質転換された組織が生育しているのが観察されるかもしれない。単離された緑色組織を取り出して、SB196を含有するマルチウェルプレートに接種し、新しいクローン増殖され形質転換された胚芽形成懸濁培養物を生成する。

【0420】

ダイズ体細胞性胚芽の植物への再生

胚芽形成懸濁培養物から植物全体を得るために、組織を再生する必要がある。

【0421】

胚芽成熟

生産形質転換からの形質転換胚芽形成クラスターは、冷白色蛍光灯（フィリップス（Philips）冷白色エコノワット（Econowatt）F40/CW/RS/EW）およびアグロ（Agro）（フィリップス（Philips）F40アグロ（Agro）電球（40W））の下、光強度90～120 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ の16：8時間の光周期で、SB196中において26で、上述のようにマルチウェルプレート中で4～6週間（モデル系では1～3週間）培養した。その後、胚芽クラスターを取り出して、SB166固体寒天培地に1～2週間（モデル系では1週間）入れ、次にSB103培地で3～4週間継代培養して胚芽を成熟させた。SB103中のプレート上での成熟後、個々の胚芽をクラスターから取り出して乾燥させ、前述のようにそれらの脂肪酸組成の変更についてスクリーンした。必要に応じて、下で述べるようないくつかの事象から植物を得た。

【0422】

代案としてはいくつかのモデル系実験で、胚芽をダイズ組織分化および成熟液体培地（SHaM液体培地；シュミット（Schmidt）ら、Cell Biology and Morphogenesis 24:393頁（2005年））中で、修正手順を使用して成熟させた。簡単に述べると、上述のようにSB19中で4週間の選択後、胚芽クラスターを取り出して250mLエルレンマイアーフラスコ内の35mLのSB228（SHaM液体培地）に入れた。胚芽が成熟する間、組織を光度60～85 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$

10

20

30

40

50

の冷白色蛍光灯による 16 : 8 時間の昼 / 夜光周期で、130 rpm、26 の回転振盪器上の SHaM 液体培地中に 2 ~ 3 週間保った。SHaM 液体培地中で 2 ~ 3 週間生育させた胚芽は、SB166 / SB103 上で 5 ~ 8 週間培養した胚芽と、サイズおよび脂肪酸含量が等しかった。

【0423】

SHaM 液体培地中での成熟後、個々の胚芽をクラスターから取り出して乾燥させ、前述のようにそれらの脂肪酸組成の変更についてスクリーンした。必要に応じて、下で述べるようないくつかの事象から植物を得た。

【0424】

胚芽乾燥および発芽

10

成熟した個々の胚芽は、空の小型ペトリ皿 (35 × 10 mm) におよそ 4 ~ 7 日間入れて乾燥できる。プレートをファイバーテープで密封する (小型湿度室を作る)。乾燥させた胚芽を SB71 - 4 培地に定植し、そこで上述したのと同一の培養条件で発芽させる。発芽した小植物を発芽培地から取り出して水ですすぎ、次に 24 - セルパックトレー内のレディアース (Redi-Earth) に定植し、透明なプラスチックドームで覆う。2 週間後ドームを除去して、植物をさらに 1 週間、強化する。小植物が丈夫そうであれば、それらを鉢あたり 3 本までの小植物を 10 インチの鉢内のレディアース (Redi-Earth) に移植する。10 ~ 16 週後、成熟種子を採取し、細断して上述のように脂肪酸について分析できる。

【0425】

20

培地処方

【0426】

【表 21】

SB196-FN ライト(Lite)液体増殖培地(1L あたり)

MS FeEDTA – 100 × 原液1	10mL
MS硫酸塩 – 100 × 原液2	10mL
FNライト(Lite)ハロゲン化物 – 100 × 原液3	10mL
FNライト(Lite) P、B、Mo – 100 × 原液4	10mL
B5ビタミン(1mL/L)	1.0mL
2,4-D(最終濃度10mg/L)	1.0mL
KNO ₃	2.83gm
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.463gm
アスパラギン	1.0gm
スクロース(1%)	10gm
pH5.8	

30

【0427】

40

【表 2 2】

FN ライト(Lite)原液

原液番号	1000mL	500mL	
1 - MS FeEDTA 100×原液			
Na ₂ EDTA*	3.724g	1.862g	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	2.784g	1.392g	
*最初に添加し暗色瓶中で攪拌しながら溶解する			10
2 - MS 硫酸塩 100×原液			
MgSO ₄ ·7H ₂ O	37.0g	18.5g	
MnSO ₄ ·H ₂ O	1.69g	0.845g	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.86g	0.43g	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0025g	0.00125g	
3 - FN ライト(Lite)ハロゲン化物 100×原液			
CaCl ₂ ·2H ₂ O	30.0g	15.0g	
KI	0.083g	0.0715g	20
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.0025g	0.00125g	
4 - FN ライト(Lite)P、B、Mo 100×原液			
KH ₂ PO ₄	18.5g	9.25g	
H ₃ BO ₃	0.62g	0.31g	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.025g	0.0125g	

【0 4 2 8】

S B 1 固体培地 (1 L あたり)

1 袋の M S 塩 (ギブコ / B R L (G i b c o / B R L) 、 カタログ番号 1 1 1 1 7 - 0 6
6) 30

1 m L B 5 ビタミン 1 0 0 0 × 原液

3 1 . 5 g スクロース

2 m L 2 , 4 - D (最終濃度 2 0 m g / L)

p H 5 . 7

8 g T C 寒天

【0 4 2 9】

S B 1 6 6 固体培地 (1 L あたり)

1 袋の M S 塩 (ギブコ / B R L (G i b c o / B R L) - カタログ番号 1 1 1 1 7 - 0 6
6) 40

1 m L B 5 ビタミン 1 0 0 0 × 原液

6 0 g マルトース

7 5 0 m g M g C l ₂ 六水和物

5 g 活性炭

p H 5 . 7

2 g ゲルライト (g e l r i t e)

【0 4 3 0】

S B 1 0 3 固体培地 (1 L あたり)

1 袋の M S 塩 (ギブコ / B R L (G i b c o / B R L) - カタログ番号 1 1 1 1 7 - 0 6
6) 50

1 mL B5ビタミン 1000×原液

60g マルトース

750mg MgCl₂六水和物

pH 5.7

2g ゲルライト (gelrite)

【0431】

SB71-4 固体培地 (1Lあたり)

1瓶のガンボーグ (Gamborg) のB5塩、スクロース添加 (ギブコ/BRL (Gibco/BRL) - カタログ番号 21153-036)

pH 5.7

10

5g TC寒天

【0432】

2,4-D原液

ファイトテク (Phytotech) からカタログ番号 D295 の既製品を得る - 濃度は

1mg / mL

【0433】

B5ビタミン原液 (100mLあたり)

10g ミオイノシトール

100mg ニコチン酸

100mg ピリドキシンHCl

20

1g チアミン

アリコートを -20 に保存する、溶液が十分迅速に溶解しない場合、加熱攪拌プレートによって低レベルの熱を加える。

【0434】

クロルスルフロン原液

0.01N水酸化アンモニウム中 1mg / mL

【0435】

体細胞胚を誘導するために、表面滅菌したダイズ栽培品種 A2872 の未成熟種子から切除した長さ 3 ~ 5 mm の子葉を 26 で明または暗状態において、適切な寒天培地上で 6 ~ 10 週間培養できる。次に二次胚を生じた体細胞胚を切除して、適切な液体培地に入れる。初期球状段階胚として増殖する体細胞胚クラスターについて、繰り返し選択した後、懸濁液を下述のように維持する。

30

【0436】

ダイズ胚芽形成懸濁培養物は、蛍光灯による 16 : 8 時間の昼 / 夜光周期で、150 rpm、26 の回転振盪器上の 35 mL の液体培地中で維持できる。およそ 35 mg の組織を 35 mL の液体培地に接種して、培養を 2 週間毎に継代培養する。

【0437】

次にダイズ胚芽形成懸濁培養物を粒子ガン衝撃法によって形質転換してもよい (Klein (Klein) ら、Nature (London)、327:70 ~ 73 頁 (1987 年) ; 米国特許第 4,945,050 号明細書)。デュポン (DuPont) バイオリストイック (Biostatic) (商標) PDS1000 / HE 装置 (ヘリウム後付け) をこれらの形質転換のために使用できる。

40

【0438】

ダイズ形質転換を促進するのに使用できる選択可能なマーカー遺伝子は、カリフラワーモザイクウイルスからの 35S プロモーター (オーデル (Odell) ら、Nature、313:810 ~ 812 頁 (1985 年)) と、プラスミド pJRK225 からのハイグロマイシン B リン酸転移酵素遺伝子 (大腸菌 (E. coli)) から; グリッツ (Gritz) ら、Gene、25:179 ~ 188 頁 (1983 年)) と、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (Agrobacterium tumefaciens) の Ti プラスミドの T-DNA からのノパリンシンターゼ遺伝子の 3' 領域とから構成される組み換

50

えDNAコンストラクトである。ファゼオリン5'領域、本ポリペプチドをコードする断片、およびファゼオリン3'領域を含んでなる種発現カセットは、制限酵素断片として単離できる。次にこの断片をマーカー遺伝子を保有するベクターの固有の制限部位に挿入できる。

【0439】

50 μLの60mg/mL 1 μm金粒子懸濁液に、次を記載順に添加する。5 μLのDNA(1 μg/μL)、20 μLのスペルミジン(0.1M)、および50 μLのCaCl₂(2.5M)。次に粒子調製品を3分間攪拌し、微量遠心管中で10秒間遠沈して上清を除去する。次にDNA被覆された粒子を400 μLの70%エタノールで1回洗浄し、40 μLの無水エタノールに再懸濁する。DNA/粒子懸濁液を1秒間ずつ3回超音波処理できる。次に5 μLのDNA被覆された金粒子を各マクロキャリアディスクに装填する。

10

【0440】

およそ300~400mgの2週間経過懸濁培養物を空の60×15mmペトリ皿に入れ、組織からピペットで残留液体を除去する。各形質転換実験では、通常およそ5~10枚の組織プレートに衝撃を与える。膜破裂圧力を1100psiに設定し、チャンバーを28インチ水銀圧の真空に排気する。組織を保持スクリーンからおよそ3.5インチ離して置き、3回衝撃を与える。衝撃に続いて組織を二分して液体中に戻し、上述のように培養できる。

【0441】

20

衝撃の5~7日後、液体培地を新鮮培地に交換し、衝撃の11~12日後、50mg/mLのハイグロマイシンを含有する新鮮な培地で交換してもよい。この選択的培地は、毎週取り替えることができる。衝撃の7~8週間後、緑色の形質転換組織が、未形質転換壞死胚芽形成クラスターから生育するのが観察されるかもしれない。単離された緑色組織を取り出して個々のフラスコに接種し、新しいクローン的に増殖させた形質転換胚芽形成懸濁培養物を発生させる。新しい各系列は、独立した形質転換事象として取り扱ってもよい。次にこれらの懸濁液を継代培養して、未成熟胚芽のクラスターとして維持でき、または個々の体細胞胚の成熟および発芽によって、全植物体に再生できる。

【図面の簡単な説明】

【0442】

30

【図1】様々な中間体を通じてミリスチン酸のDHAへの変換を提供する-3/-6脂肪酸合成経路を図示する。

【図2】本発明のミドリムシ(*Euglena gracilis*) 9エロンガーゼのアミノ酸配列(配列番号2)、本発明のユートレプチエラ(*Eutreptiella*)種CCMP389 9エロンガーゼのアミノ酸配列(配列番号5)、およびイソクリシス・ガルバナ(*Isochrysis galbana*) (NCBI登録番号AAL37626(GI 17226123))からの長鎖PUFA延長酵素のアミノ酸配列(配列番号8)のクラスタルVアラインメントを示す(デフォルトパラメーターによる)。

【図3】ミドリムシ(*Euglena gracilis*)細胞抽出物(実施例1)の脂質プロフィールのクロマトグラムを示す。

40

【図4】本発明のミドリムシ(*Euglena gracilis*) 9エロンガーゼのアミノ酸配列(配列番号2)と、イソクリシス・ガルバナ(*Isochrysis galbana*) (NCBI登録番号AAL37626(GI 17226123))からの長鎖PUFA延長酵素のアミノ酸配列(配列番号8)とのクラスタルVアラインメントを示す(デフォルトパラメーターによる)。

【図5】pY119のプラスミドマップである。

【図6】サッカロミセス・セレヴィシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)中でのミドリムシ(*Euglena gracilis*) 9エロンガーゼ(*EgD9e*)機能解析の結果である。

【図7A】pY5-30のプラスミドマップである。

50

【図7B】pDMW263のプラスミドマップである。

【図7C】pZUF17のプラスミドマップである。

【図8】pY115のプラスミドマップである。

【図9A】ヤロウィア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)ゲートウェイ(Gateway)（登録商標）目的ベクターpBY1のプラスミドマップである。

【図9B】pBY2のプラスミドマップである。

【図9C】pBY1-FAEのプラスミドマップである。

【図10】ミドリムシ(*Euglena gracilis*) 9エロンガーゼ遺伝子(*EgD9e*、配列番号1)と、ヤロウィア・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遺伝子(*EgD9eS*、配列番号3)とのDNA配列の比較を示す。 10

【図11A】pY120のプラスミドマップである。

【図11B】pKRR912のプラスミドマップである。

【図12A】pKRR911のプラスミドマップである。

【図12B】pKRR913のプラスミドマップである。

【図13A】pKRR886のプラスミドマップである。

【図13B】pKRR886rのプラスミドマップである。

【図14A】pKRR669のプラスミドマップである。

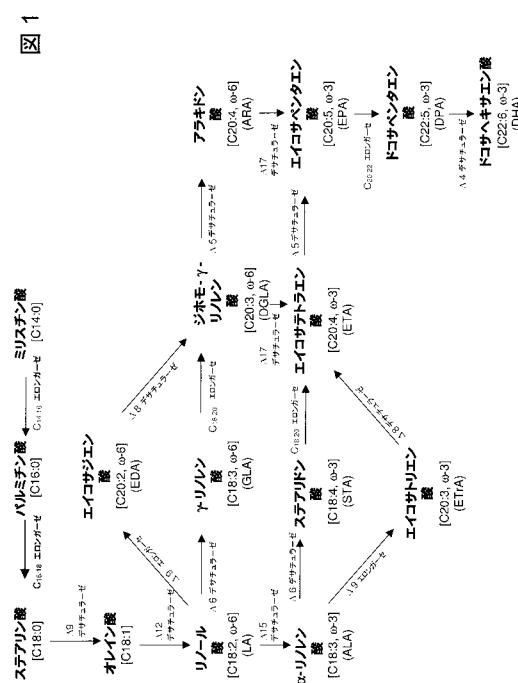
【図14B】pKRR873のプラスミドマップである。 20

【図15A】pFBAIN-389E1oのプラスミドマップである。

【図15B】pZUFE389Sのプラスミドマップである。

【図16】ユートレプチエラ(*Eutreptiella*)種CCMP389 9エロンガーゼ遺伝子(*E389D9e*、配列番号4)と、*Y.リポリティカ*(*lipolytica*)中での発現のためにコドン最適化された合成遺伝子(*E389D9eS*、配列番号6)とのDNA配列の比較を示す。

【図1】



【 図 3 】

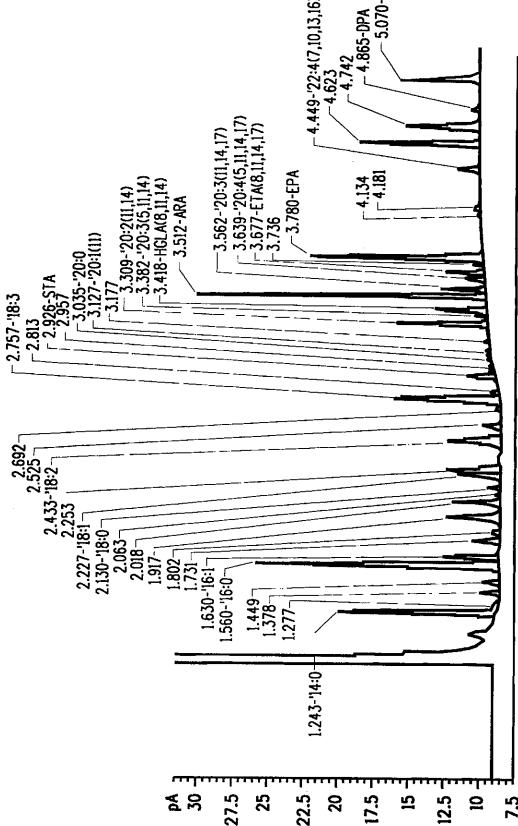
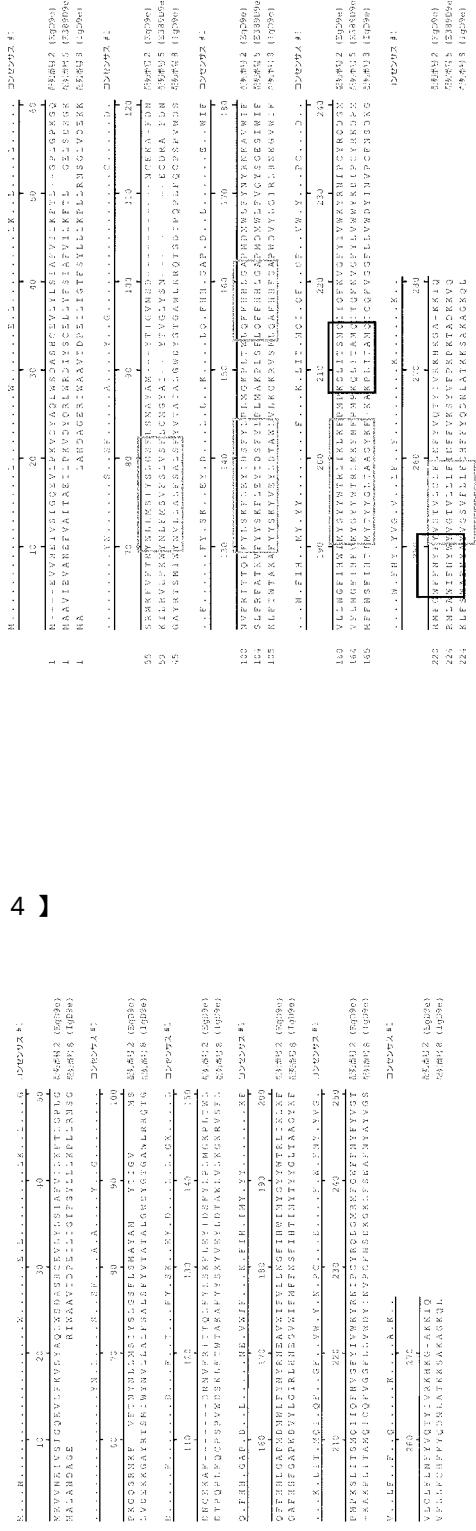
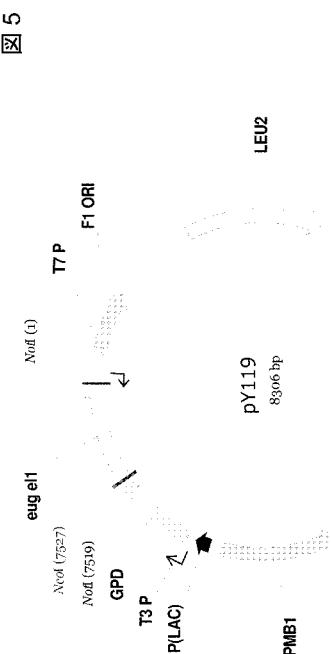


FIG. 3

【 図 4 】

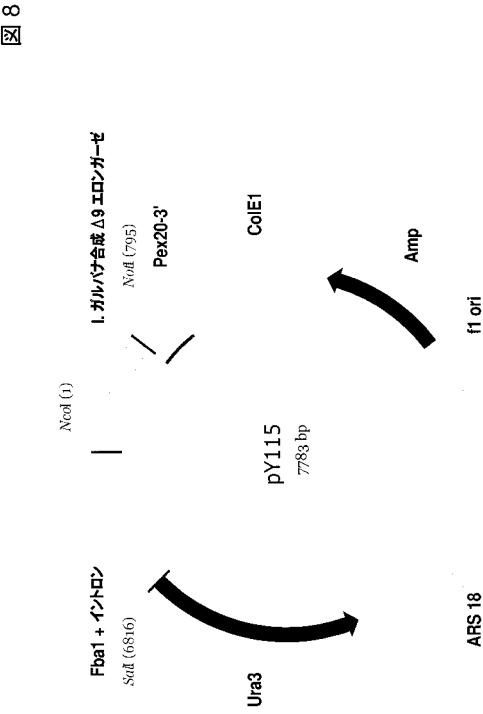


【圖 5】

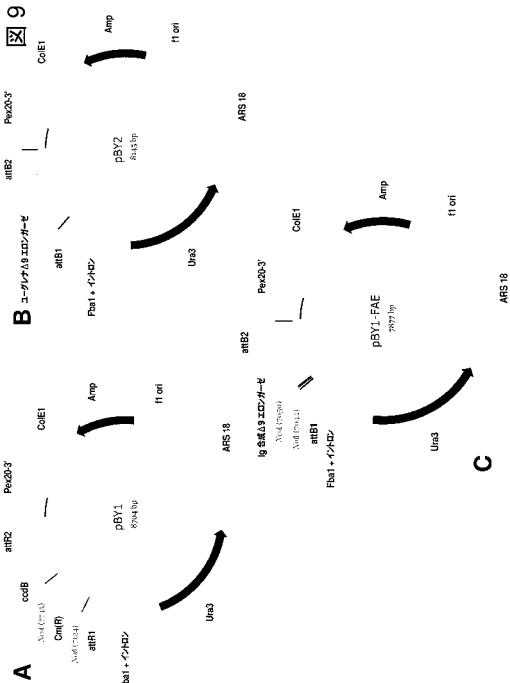


【 図 6 】

【 叁 8 】



【 义 9 】



【 図 1 0 】

10
四

【 図 1 1 】

【図12】

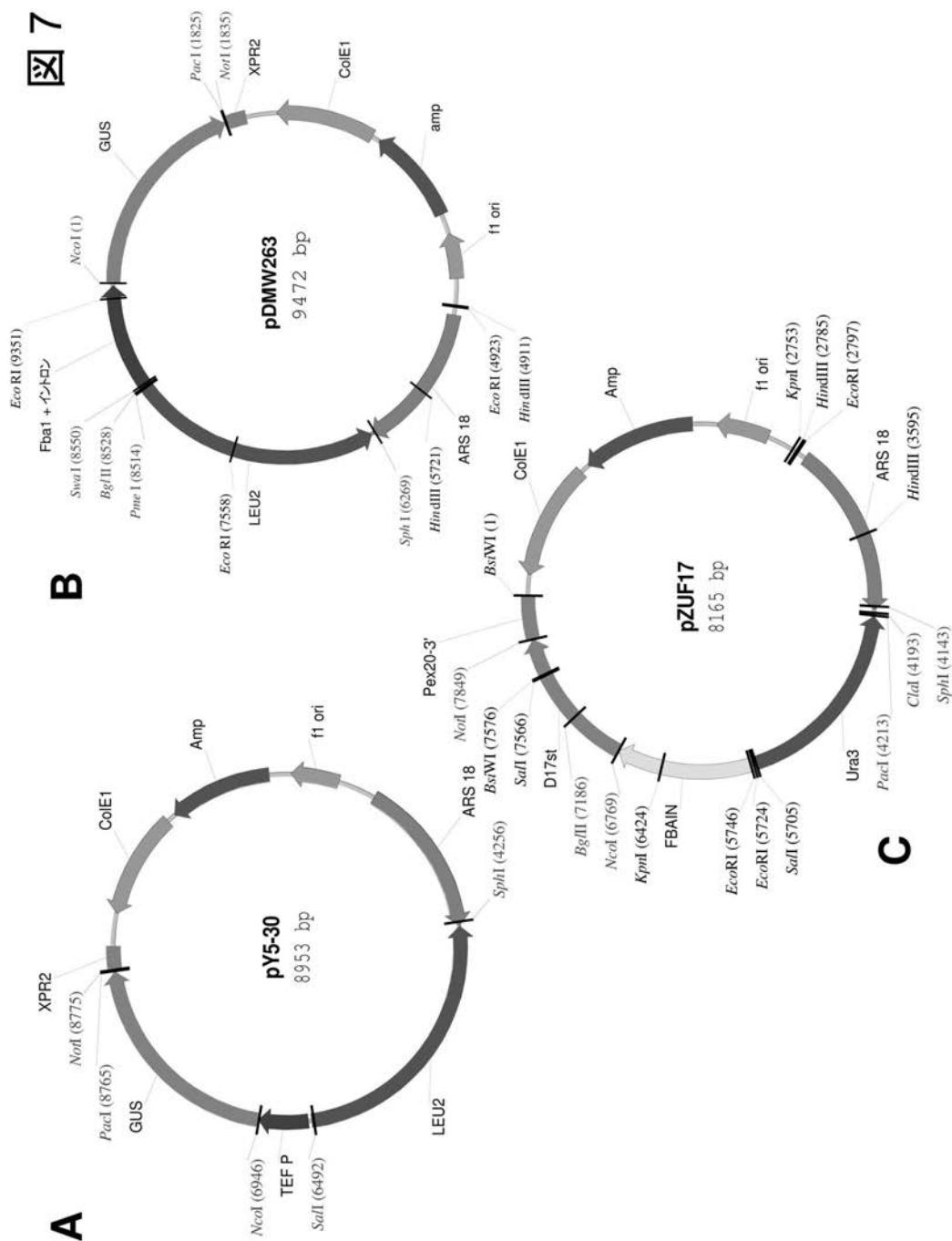
【図13】

【 図 1 4 】

【図15】

【図 1 6】

【図7】



【配列表】

0005123861000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 ダムード , ハワード・グレン
アメリカ合衆国デラウェア州 19707 ホツケシン・ケンウイツクロード 4

(72)発明者 マッゴニグル , ブライアン
アメリカ合衆国デラウェア州 19806 - 2501 ウィルミントン・ノースユニオンストリート 1
707

(72)発明者 スー , ツイシオング
アメリカ合衆国ペンシルベニア州 19317 - 9728 チヤズフォード・ハーベイレーン 111

(72)発明者 ズー , クイン・クン
アメリカ合衆国ペンシルベニア州 19382 ウエストチエスター・レバーロード 544

審査官 池上 文緒

(56)参考文献 特表 2004 - 531248 (JP, A)
国際公開第 2004 / 101753 (WO, A1)
FEBS Lett. (2002) vol.510, no.3, p.159-165

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

C12N 9/10

C12P 7/64

PubMed

BIOSIS/WPI(DIALOG)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq