

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7360154号
(P7360154)

(45)発行日 令和5年10月12日(2023.10.12)

(24)登録日 令和5年10月3日(2023.10.3)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 9/02 (2006.01)
C 1 2 N 15/53 (2006.01)
C 1 2 N 1/19 (2006.01)
C 1 2 N 1/15 (2006.01)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 9/02
C 1 2 N 15/53
C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/21

Z N A

請求項の数 4 (全12頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-207244(P2019-207244)
(22)出願日 令和1年11月15日(2019.11.15)
(65)公開番号 特開2021-78379(P2021-78379A)
(43)公開日 令和3年5月27日(2021.5.27)
審査請求日 令和4年6月28日(2022.6.28)
(出願人による申告)平成28年度、国立研究開発法人科学技術振興機構、研究成果展開事業 産学共創プラットフォーム共同研究推進プログラム(OPERA)、「ゲノム編集による革新的な有用細胞・生物作成技術の創出」、「ゲノム編集による革新的な有用細胞・生物作成技術の創出に関する国立大学法人東京工業大学による研究開発」、産業技術力強化法第17条の適用を受ける特許出願

(73)特許権者 521255060
株式会社ファイトリピッド・テクノロジーズ
神奈川県横浜市緑区長津田町4259-3 東工大横浜ベンチャープラザ W402
(74)代理人 100107870
弁理士 野村 健一
(74)代理人 100098121
弁理士 間山 世津子
(72)発明者 太田 啓之
東京都目黒区大岡山2丁目12番1号
国立大学法人東京工業大学内
(72)発明者 永井 千夏
東京都目黒区大岡山2丁目12番1号
国立大学法人東京工業大学内
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 4 デサチュレースによるドコサヘキサエン酸合成

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記の(a)、(b)、又は(c)のタンパク質、

(a)配列番号2又は6で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質、

(b)配列番号2又は6で表されるアミノ酸配列において1~15のアミノ酸残基が置換、付加又は欠失したアミノ酸配列からなり、かつ4デサチュレース活性を有するタンパク質、

(c)配列番号2又は6で表されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ4デサチュレース活性を有するタンパク質。

【請求項2】

請求項1に記載のタンパク質をコードする遺伝子。

【請求項3】

請求項2に記載の遺伝子が導入されてなり、この遺伝子が発現することにより、4デサチュレースを生産できる組換え細胞。

【請求項4】

請求項3に記載の組換え細胞を、ドコサペンタエン酸を含む培地中で培養し、前記組換え細胞にドコサヘキサエン酸を生産させ、生産されたドコサヘキサエン酸を採取することを特徴とするドコサヘキサエン酸の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規な 4デサチュレースに関する。本発明の 4デサチュレースを利用して、ドコサヘキサエン酸を製造することが可能である。

【背景技術】

【0002】

ドコサヘキサエン酸は、様々な生理作用を持ち、機能性食品などに利用されており、その需要は非常に高い。4デサチュレースはドコサペンタエン酸をドコサヘキサエン酸に変換する酵素であり、ドコサヘキサエン酸の生合成において重要な役割を果たす。4デサチュレースは幾つかの生物から単離されており、例えば、Pavlova salina由来の4デサチュレース (GenBank ID: AY926606)、Euglena gracilis由来の4デサチュレース (GenBank ID: AY278558、非特許文献1)、Thraustochytrium aureum由来の4デサチュレース (GenBank ID: AF391546) などが知られている。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0003】

【文献】Meyer,A., Cirpus,P., Ott,C., Schlecker,R., Zahringer,U. and Heinz,E., Biosynthesis of docosahexaenoic acid in Euglena gracilis: biochemical and molecular evidence for the involvement of a Delta4-fatty acyl group desaturase, Biochemistry 42 (32), 9779-9788 (2003)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

20

【0004】

上記のように、4デサチュレースは既に幾つか知られているが、ドコサヘキサエン酸の高い需要を考えると、より多くの生物からこの酵素を得ることが望まれる。本発明は、このような背景の下になされたものであり、新規な4デサチュレースを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者は、上記課題を解決するため鋭意検討を重ねた結果、サルシノクリシス・マリナ (Sarcinochrysis marina) という藻類が、既知の4デサチュレースとは大きくアミノ酸配列が異なる4デサチュレースを有することを見出し、本発明を完成するに至った。

30

【0006】

即ち、本発明は、以下の(1)~(4)を提供する。

(1) 下記の(a)、(b)、又は(c)のタンパク質、

(a) 配列番号2、4、6、又は8で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質、

(b) 配列番号2、4、6、又は8で表されるアミノ酸配列において1又は複数のアミノ酸残基が置換、付加又は欠失したアミノ酸配列からなり、かつ4デサチュレース活性を有するタンパク質、

(c) 配列番号2、4、6、又は8で表されるアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ4デサチュレース活性を有するタンパク質。

【0007】

40

(2) (1)に記載のタンパク質をコードする遺伝子。

【0008】

(3) (2)に記載の遺伝子を有し、この遺伝子が発現することにより、4デサチュレースを生産できる組換え細胞。

【0009】

(4) (3)に記載の組換え細胞を、ドコサペンタエン酸を含む培地中で培養し、前記組換え細胞にドコサヘキサエン酸を生産させ、生産されたドコサヘキサエン酸を採取することを特徴とするドコサヘキサエン酸の製造方法。

【発明の効果】

【0010】

50

本発明は、新規な 4デサチュレースを提供する。 4デサチュレースは、ドコサペンタエン酸をドコサヘキサエン酸へと変換するので、本発明の 4デサチュレースを利用して、ドコサヘキサエン酸を製造することが可能である。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】 デサチュレースの分子系統樹1。

【図2】 デサチュレースの分子系統樹2。

【図3】 分子系統解析に用いた生物種。

【図4】 アライメント解析。

【図5】 ドメイン構造。

【図6】 GC-FID解析。

【図7A】 イオンクロマトグラム (g5079.t1)。

【図7B】 イオンクロマトグラム (g1444.t1)。

【図7C】 イオンクロマトグラム (g4596.t1)。

【図8】 $R_t = 35.758$ のマススペクトル。

【発明を実施するための形態】

【0012】

以下、本発明を詳細に説明する。

(1) タンパク質

本発明のタンパク質は、(a)配列番号2、4、6、若しくは8で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質、(b)配列番号2、4、6、若しくは8で表されるアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸残基が置換、付加若しくは欠失したアミノ酸配列からなり、かつ4デサチュレース活性を有するタンパク質、又は(c)配列番号2、4、6、若しくは8で表されるアミノ酸配列と60%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ4デサチュレース活性を有するタンパク質である。

【0013】

(a)のタンパク質は、サルシノクリシス・マリナ由来の新規な4デサチュレースである。ここで、「4デサチュレース」とは、4デサチュラーゼ、4不飽和化酵素、4脂肪酸不飽和化酵素などとも呼ばれ、ドコサペンタエン酸をドコサヘキサエン酸に変換する酵素である。配列番号2、4、6、及び8で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質は、それぞれg5079.t1_protein、g1444.t1_protein、g4596.t1_protein、及びg6961.t1_proteinという名称が付けられている。これら4種類の4デサチュレースは、いずれも既知の4デサチュレースとのアミノ酸配列の同一性が低く、例えば、Pavlova salina由来の4デサチュレース (AY926606.1_protein) のアミノ酸配列に対する同一性は50%以下である。

【0014】

(b)のタンパク質において、置換、付加又は欠失する1又は複数のアミノ酸残基の数は、1以上の整数であれば特に限定されない。例えば、1～数十程度、好ましくは1～15程度、より好ましくは1～10程度、さらに好ましくは1～5程度、特に好ましくは、1、2、3若しくは4程度とすることができる。

【0015】

(c)のタンパク質において、配列番号2、4、6、又は8で表されるアミノ酸配列との同一性は、60%以上であれば特に限定されないが、好ましくは70%以上であり、より好ましくは80%以上であり、更に好ましくは90%以上であり、特に好ましくは95%以上である。同一性の値は更に高くてもよく、例えば、97%以上、98%以上、又は99%以上とすることもできる。

【0016】

(b)及び(c)のタンパク質は、4デサチュレース活性を有する。ここで、「4デサチュレース活性を有する」とは、ドコサペンタエン酸をドコサヘキサエン酸に変換する反応を触媒する活性を有することをいう。タンパク質が4デサチュレース活性を有することは

10

20

30

40

50

、例えば、酵母等の宿主細胞内で機能するプロモーターの下流にタンパク質をコードする遺伝子を連結した融合遺伝子を、4デサチュレース遺伝子を持たない宿主細胞へ導入し、ドコサベンタエン酸存在下、導入した遺伝子が発現する条件で培養して、宿主細胞又は培養液中のドコサヘキサエン酸の量をガスクロマトグラフィー解析等の方法を用いて測定することにより、確認することができる。

【0017】

(2) 遺伝子

本発明の遺伝子は、上記の本発明のタンパク質をコードする遺伝子である。

【0018】

本発明の遺伝子には、(d)配列番号1、3、5、又は7で表される塩基配列からなる遺伝子、(e)配列番号1、3、5、又は7で表される塩基配列において1又は複数の塩基が置換、付加又は欠失した塩基配列からなる遺伝子、及び(f)配列番号1、3、5、又は7で表される塩基配列と60%以上の同一性を有する塩基配列からなる遺伝子が含まれる。

10

【0019】

(d)の遺伝子は、サルシノクリシス・マリナ由来の新規な4デサチュレース遺伝子である。配列番号1、3、5、及び7で表される塩基配列からなる遺伝子は、それぞれg5079.t1、g1444.t1、g4596.t1、及びg6961.t1という名称が付けられている。

【0020】

(e)の遺伝子において、置換、付加又は欠失する1若しくは複数の塩基の数は、1以上の整数であれば特に限定されない。例えば、1~数十程度、好ましくは1~15程度、より好ましくは1~10程度、さらに好ましくは1~5程度、特に好ましくは、1、2、3若しくは4程度とすることができる。

20

【0021】

(f)の遺伝子において、配列番号1、3、5、又は7で表される塩基配列との同一性は、60%以上であれば特に限定されないが、好ましくは70%以上であり、より好ましくは80%以上であり、更に好ましくは90%以上であり、特に好ましくは95%以上である。同一性の値は更に高くてもよく、例えば、97%以上、98%以上、又は99%以上とすることもできる。

【0022】

なお、塩基配列の同一性は、例えば、リップマン - パーソン法 (Lipman-Pearson法; Science, 227, 1435(1985)) によって計算される。具体的には、遺伝情報処理ソフトウェアGenetyx-Win (Ver.5.1.1;ソフトウェア開発) のホモロジー解析 (Search Homology) プログラムを用いて、Unit size to compare (ktup) を2として解析を行うことにより算出される。アミノ酸配列の同一性は、NCBI (National Center of Biotechnology Information) から提供されているBLASTPのプログラムを用いて算出することができる。

30

【0023】

(3) 組換え細胞

本発明の組換え細胞は、上記の本発明の遺伝子を有し、この遺伝子が発現することにより、4デサチュレースを生産できるものである。

40

【0024】

本発明の組換え細胞は、適当な宿主細胞に、上記の本発明の遺伝子を導入することにより、作製できる。

【0025】

宿主細胞は特に限定されず、原核細胞、真核細胞のいずれでもよい。原核細胞の例としては、細菌、放線菌が挙げられ、真核細胞の例としては、酵母、糸状菌、微細藻類が挙げられる。これらのうち、酵母が宿主細胞として特に好ましく用いられる。

【0026】

宿主細胞に遺伝子を導入する方法は特に限定されず、宿主細胞の種類等によって適宜選択すればよい。例えば、宿主細胞に導入可能でかつ組み込まれた遺伝子を発現可能なべく

50

ターを用いることができる。ベクターは、上記の本発明の遺伝子のほか、プロモーターや転写終結配列などを含むものであることが好ましい。また、g1444.t1_proteinのように、シトクロームb5ドメイン構造を持たない 4デサチュレースの遺伝子を導入する場合は、シトクロームb5をコードする遺伝子を一緒に導入してもよい。

【0027】

(4) ドコサヘキサエン酸の製造方法

本発明のドコサヘキサエン酸の製造方法は、上記の本発明の組換え細胞を、ドコサペンタエン酸を含む培地中で培養し、組換え細胞にドコサヘキサエン酸を生産させ、生産されたドコサヘキサエン酸を採取することを特徴とするものである。

【0028】

培養条件は、組換え細胞の宿主に応じて適宜選択することができ、その宿主に対して通常用いられる培養条件を使用できる。

【0029】

組換え細胞において生産されたドコサヘキサエン酸を採取する方法としては、通常生体内の不飽和脂肪酸などを単離する際に用いられる方法、例えば、培養物や細胞から、ろ過、遠心分離、破碎、クロマトグラフィー、溶媒抽出などによりドコサヘキサエン酸を単離、回収する方法が挙げられる。

【実施例】

【0030】

以下に、実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0031】

〔実施例1〕 4デサチュレースの候補の特定

エイコサペンタエン酸やドコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸といった -3多価不飽和脂肪酸は栄養学的に有用であり、機能性食品等に用いられている。本件では、ドコサヘキサエン酸の生産に関与するタンパク質の探索を行った。

【0032】

以下の手法でサルシノクリシス・マリナ (*Sarcinochrysis marina*) のゲノム配列を解析し、脂肪酸の不飽和化を担う酵素の一種である 4デサチュレース (以下、「4-DES」という場合がある。) の候補物質を特定した。また一般に、デサチュレースの基質特異性はその構造からは推測が難しいとされているため、候補は複数得た。

【0033】

S. marina の 4-DESを推定するために、デサチュレースの分子系統樹を作成した。様々な生物種のデサチュレースのアミノ酸配列を収集するために、JGI genomic database (<https://jgi.doe.gov/>) の54生物種のタンパク質配列及び*S. marina*のタンパク質配列から、NCBI BLASTP(2.7.1+)により既知の 4デサチュレースのアミノ酸配列としてGenbank ID: AY926606(Pavlova salina), AY278558(*Euglena gracilis*), AF391546(*Thraustochytrium aureum*)をQueryとし、P-value 1e-15以下となる類似タンパク質を抽出した。これらのタンパク質配列は、MAFFT(v7.222)を用いて、アミノ酸配列のアライメントを行い、trimAl(v1.2)を用いて、系統学的推定に用いる領域を選定した。その結果抽出された91タンパク質の162領域を用いてAminosan(v1.0)によりアミノ酸置換モデルを推定した。その結果に基づいて置換モデルLG + F + G(8) (図1) 及びLG + G(8) (図2) より、MEGA(version 7)を用いて最尤法により分子系統樹を作成した。図の中央上部の縦棒はアミノ酸置換距離を示し、各枝の数値はブーストラップ法による500回の試行による枝の再現確率を示す。不飽和化部位が既知のデサチュレースは、その不飽和化部位を表記し、*S. marina*のアミノ酸配列及びQueryに用いた 4デサチュレースは黒枠で囲んだ。図中に示される各生物種は図3に示した。

【0034】

その結果、*S. marina*の 4-DES遺伝子の候補としてg5079.t1 (図1、2) 及びg1444.t1 (図1) 及びg4596.t1 (図1、2) 及びg6961.t1 (図2) を得た。g5079.t1遺伝

10

20

30

40

50

子の塩基配列及びそれがコードするアミノ酸配列を、それぞれ配列番号 1 及び 2 に示した。g1444.t1 遺伝子の塩基配列及びそれがコードするアミノ酸配列を、それぞれ配列番号 3 及び 4 に示した。g4596.t1 遺伝子の塩基配列及びそれがコードするアミノ酸配列を、それぞれ配列番号 5 及び 6 に示した。g6961.t1 遺伝子の塩基配列及びそれがコードするアミノ酸配列を、それぞれ配列番号 7 及び 8 に示した。

【 0 0 3 5 】

〔実施例 2〕 4-DES のアミノ酸配列のアライメント

図 4 にアミノ酸配列のアライメントを示す。アライメントの作成には Multiple Sequence Alignment by CLUSTALW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) を用いて、各アミノ酸配列の全長を酵素活性が既知である Genbank ID: AY926606 (Pavlova salina) と比較した。

10

【 0 0 3 6 】

図中の記号 "*" では完全に一致している、":" では強い類似性のあるグループに属している、"." では、弱い類似性のあるグループに属していることを示している。g5079.t1_protein 及び g1444.t1_protein 及び g4596.t1_protein 及び g6961.t1_protein と、AY926606.1_protein との同一性はそれぞれ 41.055%、20.2073%、16.5548%、16.5877% である。

【 0 0 3 7 】

〔実施例 3〕 4-DES のドメイン構造

次にそれぞれのドメイン構造を図 5 に示す。ドメイン構造解析は HMMER (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/>) を用いて行った。図中の各ドメインは以下のものを指す。

20

「Cyt-b5」: Cytochrome b5-like Heme/Steroid binding domain

「FA_desaturase」: Fatty acid desaturase

【 0 0 3 8 】

デサチュレースは電子供与体としてシトクローム b5 が必須であると考えられている (Mitchell and Martin 1995; Qiu et al. 2002)。g1444.t1_protein でのみシトクローム b5 ドメイン構造が見られないが、これは g1444.t1_protein を導入した出芽酵母株において活性が確認されなかったことの大きな一因であると考えられる。

【 0 0 3 9 】

〔実施例 4〕 4-DES 活性の確認

30

以下、出芽酵母を用いて行った 4-DES 活性の確認実験について述べる。

〔方法〕

【 0 0 4 0 】

出芽酵母における発現コンストラクトは、pYES2_NotI_V5His6 ベクター上に作成した。このベクターは、pYES2.1/V5-His-TOPO (Invitrogen) のクローニングサイトに NotI サイトを付与させた改変ベクターで、本発明者の所属する研究室において作成したものである (未公開)。ベクターが導入された酵母は、ウラシルを含まない培地上で生育することができる。

【 0 0 4 1 】

(1) *S. marina* 4-DES 候補を下記のプライマーセットを用いて PCR により増幅し、上述の pYES2_NotI_V5His6 の NotI サイトに In-fusion HD Cloning Kit を用いて導入し、出芽酵母形質転換のためのコンストラクトを作製した。尚、V5-His6 を C 末端側に付与していない。

40

・ g5079.t1

F : CTCGCCCTTGCGGCCATGTGCAAGCCCGACTTC (配列番号 9)

R : CTCGCCCTTGCGGCCCTTAGTCGAGCTTGGTCTCG (配列番号 10)

・ g1444.t1

F : CTCGCCCTTGCGGCCATGACCTGCGAAGCGCC (配列番号 11)

R : CTCGCCCTTGCGGCCCTACAGCTCTTTGACGCGGG (配列番号 12)

・ g4596.t1

50

F : CTCGCCCTTGCGGCCATGGGCAAGGGAGGCCAGCG (配列番号 1 3)

R : CTCGCCCTTGCGGCCCTCACATGGCGGGGAAGTCGC (配列番号 1 4)

【 0 0 4 2 】

その後、導入した塩基配列にエラーがないことをシーケンシングにより確認した。g5 079.t1、g1444.t1、及びg4596.t1を導入したコンストラクトの塩基配列を、それぞれ配列番号 1 5、1 6、及び 1 7 に示した。

【 0 0 4 3 】

(2) 作成した*S. marina* 4-DES / pYES2ならびに、コントロールとしてpYES2.1/V 5-His /LacZ (Invitrogen)をそれぞれ出芽酵母株 (W303-1B, MAT {leu2-3,112 trp 1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15, rad5-535}) に酢酸リチウム法を用いて 10

【 0 0 4 4 】

(3) 得られた形質転換酵母株を、2%ラフィノースを含むSC-Ura培地200 mLに懸濁し、30 で一晩、前培養を行った。その後、2%ガラクトース、500 μ M Docosapentaenic acid及び0.25% Sorbitan Monolaurateを含むSC-Ura培地250 mLに、初期細胞濃度がOD₆₀₀=0.4となるよう前培養した細胞を懸濁し、30 、120 rpmで培養を行った。

【 0 0 4 5 】

(4) 培養24時間後、培養液20 mLを遠心分離により回収し、細胞を水で3回洗浄した。その後、Bligh&Dyer法による脂質抽出を行った。 20

【 0 0 4 6 】

(5) 得られた総脂質500 μ gに100 μ L 1 mM C21:0ならびに400 μ L塩酸メタノールを加えて85 1時間の反応を行った。その後、ヘキサンを用いて脂肪酸メチルエステルを抽出し、GCサンプルとしGC-FID及びGC-MS解析を行った。

【 0 0 4 7 】

GC-FID条件

分析装置 : Nexis GC-2030 (島津製作所製)

カラム : URBON-HR-SS-10 (25m × 0.25mmI.D df=0.25 μ m)

キャリアガス : 高純度ヘリウム 30

オープン温度 : 180 保持17分 210 (3 /min昇温) 210 保持7分 180 (15 /min降温) 180

注入口温度 : 250

注入方法 : スプリット

スプリット比 : 40.0:1

注入量 : 2 .0 μ L

検出器温度 : 250

【 0 0 4 8 】

GC-MS条件

分析装置 : GCMS-TQ8050 (島津製作所製) 40

1st カラム SH-Rtx-1614 15m × 0.25mmI.D df=0.10 μ m

2nd カラム BPX50 2.5m × 0.10mmI.D df=0.10 μ m

オープン温度 : 40 保持2分 160 (30 /min昇温) 270 (2 /min降温) 270 保持5分

キャリアガス : 高純度ヘリウム

気化室温度 : 250

注入方法 : スプリット

スプリット比 : 1:1

注入量 : 1.0 μ L

Modulation Period : 12 sec 50

Hot Jet Duration : 350 msec (325)

インターフェース温度 : 240

イオン源温度 : 230

イオン化モード : EI

測定モード : スキャン

質量範囲 : m/z=45-1000

スキャン速度 : 20000 u/sec

【 0 0 4 9 】

〔 結果 〕

図 6 に GC-FID 結果を示す。図 6 (A) は出芽酵母 W303-1B 株にコントロールとして LacZ 遺伝子を導入して得られた形質転換体の培養細胞から抽出した総脂質のガスクロマトグラフィー解析により得られたクロマトグラムである。図 6 (B) は出芽酵母 W303-1B 株に g5079.t1 遺伝子を導入して得られた形質転換体の培養細胞から抽出した総脂質のガスクロマトグラフィー解析により得られたクロマトグラムである。図 6 (C) は出芽酵母 W303-1B 株に g1444.t1 遺伝子を導入して得られた形質転換体の培養細胞から抽出した総脂質のガスクロマトグラフィー解析により得られたクロマトグラムである。図 6 (D) は出芽酵母 W303-1B 株に g4596.t1 遺伝子を導入して得られた形質転換体の培養細胞から抽出した総脂質のガスクロマトグラフィー解析により得られたクロマトグラムである。

【 0 0 5 0 】

図 6 に示すように、g5079.t1 遺伝子及び g4596.t1 遺伝子を導入した形質転換体において、4 デサチュレースの生成物であるドコサヘキサエン酸 (DHA, 22:6) とみられるピークを確認した。そこで、ガスクロマトグラフ質量分析に供することにより図 7、8 に示す同定を行った。

【 0 0 5 1 】

図 7 A は出芽酵母 W303-1B 株に g5079.t1 遺伝子を導入して得られた形質転換体の培養細胞から抽出した総脂質の包括的 2 次元ガスクロマトグラフィー解析により得られた全イオンクロマトグラムである。図 7 B は出芽酵母 W303-1B 株に g4596.t1 遺伝子を導入して得られた形質転換体の培養細胞から抽出した総脂質の包括的 2 次元ガスクロマトグラフィー解析により得られた全イオンクロマトグラムである。図 7 C は DHA メチルエステルを含む標準物質の、包括的 2 次元ガスクロマトグラフィー解析により得られた全イオンクロマトグラムである。DHA メチルエステルの保持時間は 35.758 である。

【 0 0 5 2 】

図 8 は、DHA メチルエステルの保持時間 35.758 分のマススペクトルを比較した図である。g5079.t1 及び g4596.t1 導入酵母で得られたマススペクトルは DHA メチルエステルと一致していた。

【 産業上の利用可能性 】

【 0 0 5 3 】

本発明のタンパク質を利用して、機能性食品やサプリメントとして有用なドコサヘキサエン酸を製造できるので、本発明は、食品や医薬に関連する産業分野において利用可能である。

10

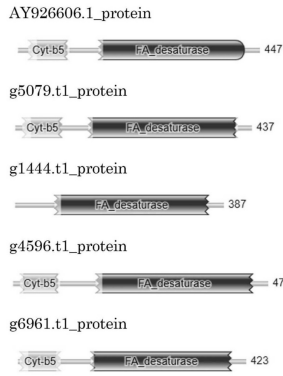
20

30

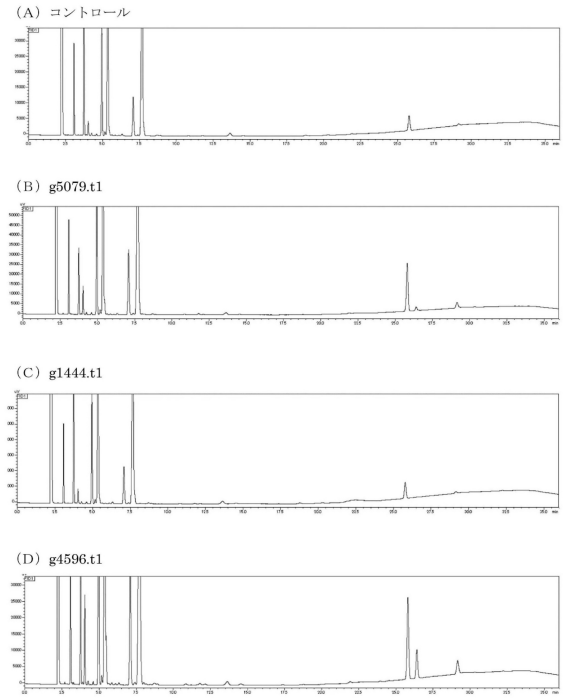
40

50

【 5 】



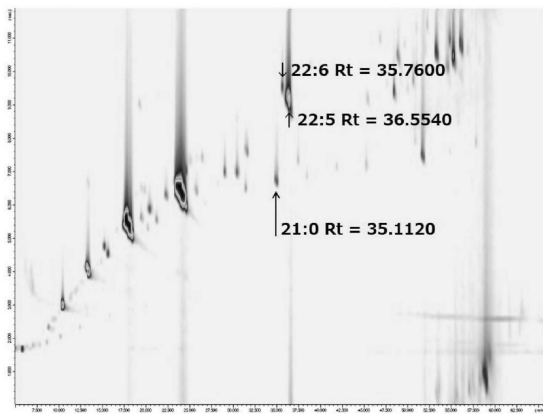
【 6 】



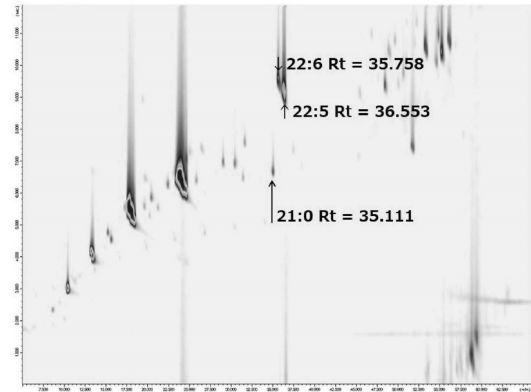
10

20

【 7 A 】



【 7 B 】

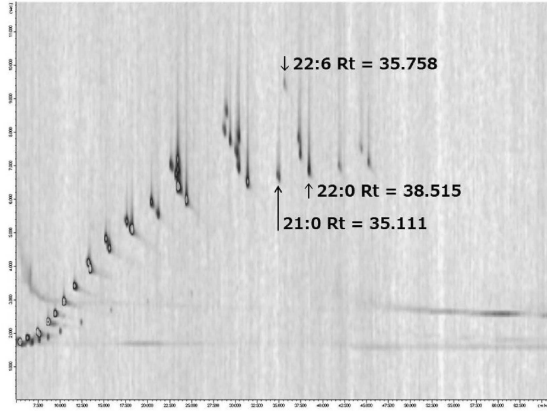


30

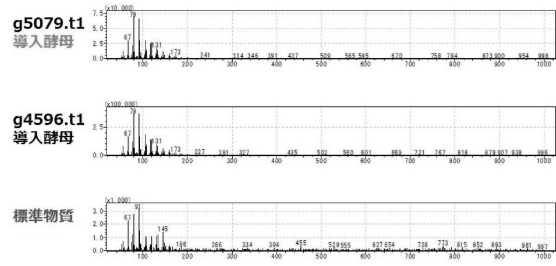
40

50

【 図 7 C 】



【 図 8 】



10

【 配列表 】

0007360154000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

		F I	
<i>C 1 2 N</i>	<i>5/10 (2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i>	<i>5/10</i>
<i>C 1 2 P</i>	<i>7/6434(2022.01)</i>	<i>C 1 2 P</i>	<i>7/6434</i>
<i>C 1 2 R</i>	<i>1/865(2006.01)</i>	<i>C 1 2 R</i>	<i>1:865</i>
<i>C 1 2 R</i>	<i>1/89 (2006.01)</i>	<i>C 1 2 R</i>	<i>1:89</i>

(72)発明者 下嶋 美恵

東京都目黒区大岡山2丁目12番1号 国立大学法人東京工業大学内

(72)発明者 岩井 雅子

東京都目黒区大岡山2丁目12番1号 国立大学法人東京工業大学内

(72)発明者 堀 孝一

東京都目黒区大岡山2丁目12番1号 国立大学法人東京工業大学内

(72)発明者 佐々木 結子

東京都目黒区大岡山2丁目12番1号 国立大学法人東京工業大学内

審査官 大久保 元浩

(56)参考文献

特表2006-522592(JP,A)

特表2016-500514(JP,A)

再公表特許第2015/194628(JP,A1)

特開2017-192342(JP,A)

特開2017-051153(JP,A)

再公表特許第2015/137449(JP,A1)

戦略的創造研究推進事業CREST研究領域「藻類・水圏微生物の機能解明と制御によるバイオエネルギー創成のための基盤技術の創出」研究課題「植物栄養細胞をモデルとした藻類脂質生産系の戦略的構築」研究終了報告書、研究期間平成23年10月～平成29年3月、2017年、1-61

生物学、2012年、90(7)、392-395

hypothetical protein AURANDRAFT_11873, partial [Aureococcus anophagefferens],NCBI Protein database[online], Accession No.XP_009032162, 2014年09月04日

hypothetical protein AURANDRAFT_28278 [Aureococcus anophagefferens],NCBI Protein database[online], Accession No.XP_009038318, 2014年09月04日

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N

C 1 2 P

C 0 7 K

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

U n i P r o t / G e n e S e q