

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5129574号

(P5129574)

(45) 発行日 平成25年1月30日(2013. 1. 30)

(24) 登録日 平成24年11月9日(2012. 11. 9)

(51) Int. Cl.

F 1

C 1 2 N 1/19 (2006. 01)

C 1 2 N 1/19 Z N A

C 1 2 P 7/64 (2006. 01)

C 1 2 P 7/64

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 R 1/645 (2006. 01)

C 1 2 N 1/19 Z N A

C 1 2 R 1:645

請求項の数 9 (全 209 頁)

(21) 出願番号 特願2007-540126 (P2007-540126)
 (86) (22) 出願日 平成17年11月3日(2005. 11. 3)
 (65) 公表番号 特表2008-518627 (P2008-518627A)
 (43) 公表日 平成20年6月5日(2008. 6. 5)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2005/040255
 (87) 国際公開番号 W02006/052870
 (87) 国際公開日 平成18年5月18日(2006. 5. 18)
 審査請求日 平成20年8月8日(2008. 8. 8)
 (31) 優先権主張番号 60/624, 812
 (32) 優先日 平成16年11月4日(2004. 11. 4)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

微生物の受託番号 ATCC PTA-7184
 微生物の受託番号 ATCC PTA-7185
 微生物の受託番号 ATCC PTA-7186
 微生物の受託番号 ATCC PTA-7187

(73) 特許権者 390023674
 イー・アイ・デュポン・ドウ・ヌムール・
 アンド・カンパニー
 E. I. DU PONT DE NEMO
 URS AND COMPANY
 アメリカ合衆国、デラウェア州、ウイリミ
 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】 ヤロウィア・リポリティカ (YARROWIALIPOLYTICA) の高エイコサペンタエン酸生成株

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a) Δ 6 デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、
 b) C_{18/20} エロンガーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、
 c) Δ 5 デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、
 d) Δ 1 7 デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、および
 e) Δ 1 2 デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、ここで、当該 Δ 1 2
 デサチュラーゼ遺伝子は配列番号 2 8 のアミノ酸配列に対し少なくとも 9 5 % の同一性を
 有するアミノ酸配列をコードする、
 の ω - 3 / ω - 6 脂肪酸生合成経路遺伝子を油性のヤロウィア・リポリティカ酵母に導入
 することにより得られる、エイコサペンタエン酸 (EPA) 生成のための組換え生産宿主
 細胞であって、

ここで、当該油性ヤロウィア・リポリティカ酵母はその細胞乾燥重量の 2 5 % を超える
 量を油として蓄積するものであり、また、当該組換え酵母は細胞の総脂質中少なくとも 5
 % のエイコサペンタエン酸を生産することができることを特徴とする、組換え生産宿主細
 胞。

【請求項 2】

a) Δ 1 5 デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、
 b) Δ 6 デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、
 c) C_{18/20} エロンガーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、

10

20

d) $\Delta 5$ デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、および

e) $\Delta 12$ デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、ここで、当該 $\Delta 12$ デサチュラーゼ遺伝子は配列番号28のアミノ酸配列に対し少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列をコードする、

の $\omega-3/\omega-6$ 脂肪酸生合成経路遺伝子を油性のヤロウィア・リポリティカ酵母に導入することにより得られる、エイコサペンタエン酸 (EPA) 生成のための組換え生産宿主細胞であって、

ここで、当該油性ヤロウィア・リポリティカ酵母はその細胞乾燥重量の25%を超える量を油として蓄積するものであり、また、当該組換え酵母は細胞の総脂質中少なくとも5%のエイコサペンタエン酸を生産することができることを特徴とする、組換え生産宿主細胞。

10

【請求項3】

a) $\Delta 9$ エロンガーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、

b) $\Delta 8$ デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、

c) $\Delta 5$ デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、

d) $\Delta 17$ デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、および

e) $\Delta 12$ デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、ここで、当該 $\Delta 12$ デサチュラーゼ遺伝子は配列番号28のアミノ酸配列に対し少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列をコードする、

の $\omega-3/\omega-6$ 脂肪酸生合成経路遺伝子を油性のヤロウィア・リポリティカ酵母に導入することにより得られる、エイコサペンタエン酸生成のための組換え生産宿主細胞であって、

20

ここで、当該油性ヤロウィア・リポリティカ酵母はその細胞乾燥重量の25%を超える量を油として蓄積するものであり、また、当該組換え酵母は細胞の総脂質中少なくとも5%のエイコサペンタエン酸を生産することができることを特徴とする、組換え生産宿主細胞。

【請求項4】

a) $\Delta 15$ デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、

b) $\Delta 9$ エロンガーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、

c) $\Delta 8$ デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、

d) $\Delta 5$ デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、および

e) $\Delta 12$ デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、ここで、当該 $\Delta 12$ デサチュラーゼ遺伝子は配列番号28のアミノ酸配列に対し少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列をコードする、

30

の $\omega-3/\omega-6$ 脂肪酸生合成経路遺伝子を油性のヤロウィア・リポリティカ酵母に導入することにより得られる、エイコサペンタエン酸生成のための組換え生産宿主細胞であって、

ここで、当該油性ヤロウィア・リポリティカ酵母はその細胞乾燥重量の25%を超える量を油として蓄積するものであり、また、当該組換え酵母は細胞の総脂質中少なくとも5%のエイコサペンタエン酸を生産することができることを特徴とする、組換え生産宿主細胞。

40

【請求項5】

$C_{16/18}$ エロンガーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子がさらに油性ヤロウィア・リポリティカ酵母に導入され、また、当該油性ヤロウィア・リポリティカ酵母が、ペルオキシソームアシル-CoAオキシダーゼ $ACOX3$ ($Pox3$)、リパーゼ1 ($Lip1$)、および $\Delta 12$ デサチュラーゼよりなる群から選択される酵素をコードするあらゆる天然遺伝子を欠いていることを特徴とする、請求項1に記載の組換え生産宿主細胞。

【請求項6】

$C_{16/18}$ エロンガーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子がさらに油性ヤロウィア・リポリティカ酵母に導入され、また、当該油性ヤロウィア・リポリティカ酵母種が、アシ

50

ルーC o Aオキシダーゼ2 (P o x 2)、およびサッカロピンデヒドロゲナーゼ (L y s 5) よりなる群から選択される酵素をコードするあらゆる天然遺伝子を欠いていることを特徴とする、請求項3に記載の組換え生産宿主細胞。

【請求項7】

- (1) $\Delta 9$ デサチュラーゼ、
- (2) C_{14/16} エロンガーゼ、
- (3) C_{16/18} エロンガーゼ、

よりなる群から選択される酵素をコードする少なくとも1つの遺伝子がさらに油性ヤロウィア・リポリティカ酵母に導入されていることを特徴とする、請求項1～4のいずれかに記載の組換え生産宿主細胞。

【請求項8】

- (i) D G A T 1、D G A T 2、およびP D A T よりなる群から選択されるジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ、
- (ii) アシルーC o A：1-アシルリゾホスファチジルコリンアシルトランスフェラーゼ (L P C A T)、
- (iii) グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ (G P A T)、および
- (iv) リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ (L P A A T)

よりなる群から選択される酵素をコードする少なくとも1つの遺伝子がさらに油性ヤロウィア・リポリティカ酵母に導入されていることを特徴とする、請求項1～4のいずれかに記載の組換え生産宿主細胞。

【請求項9】

a) 請求項1～4のいずれか一項に記載の組換え生産宿主細胞を培養して、エイコサペンタエン酸を含んでなる微生物油が生成され、

b) ステップ (a) の微生物油を回収すること
を含んでなるエイコサペンタエン酸を含んでなる微生物油の生成方法。

【発明の詳細な説明】

【関連出願との関係】

【0001】

本願明細書は、2004年11月4日に出願された米国仮特許出願第60/624812号明細書の利益を主張する。

【技術分野】

【0002】

本発明はバイオテクノロジー分野にある。より具体的には本発明は、エイコサペンタエン酸 ($\omega-3$ 多価不飽和脂肪酸) を高濃度で効率的に生成できる、油性酵母ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) の遺伝子操作された株に関する。

【背景技術】

【0003】

エイコサペンタエン酸 (E P A；シス-5、8、11、14、17-エイコサペンタエン酸； $\omega-3$) は、生物学的に活性のプロスタグランジンの生合成における重要な中間体である。さらにE P Aは、臨床および薬学的価値を有するとして認識されている。例えば以下のE P Aの薬理作用が知られている。(1) 血小板凝固阻害作用 (血栓溶解作用)、(2) 血液中性脂肪低下作用、(3) 血液V L D L-コレステロールおよびL D L-コレステロールを低下させ、H D L-コレステロール (抗動脈硬化作用) を増大させる作用、(4) 血液粘度低下作用、(5) 血圧低下作用、(6) 抗炎症薬作用、および(7) 抗腫瘍作用。したがってE P Aは、血液コレステロールおよびトリグリセリドを低下させる自然なアプローチを提供する。E P Aの摂取量増大は有益であり、または冠動脈心疾患、高血圧、炎症性疾患 (例えば関節リウマチ)、肺および腎臓疾患、タイプII糖尿病、肥満症、潰瘍性大腸炎、クローン病、神経性食欲不振症、火傷、骨関節炎、骨粗鬆症、注意欠陥/多動性障害、および結腸直腸癌の早期において好ましい効果を有することが示されて

10

20

30

40

50

いる（例えば非特許文献1、非特許文献2のレビューを参照されたい）。最近の研究結果もまた、統合失調症などの精神障害の処置におけるEPAの用途を裏付けた（特許文献1、特許文献2）。最後にEPAはまた、機能性食品（栄養補給食品）、幼児栄養、バルクニュートリション（bulk nutrition）、化粧品、および動物の健康に関連した製品で使用される。

【0004】

EPAは異なるタイプの魚油および海洋性プランクトン中に自然に見られるが、この ω -3脂肪酸の供給は高まる需要を満たすのに十分でないことが予期される。魚油は高度に不均一な組成を有し（したがってEPAを濃縮するための大規模な精製を要する）、不快な味および臭いを有し（除去を経済的に困難にし、油を食物成分として許容できなくする）、重金属汚染物質の環境的生物濃縮および入手可能性の変動を被りやすい（天候、疾患または魚の乱獲のため）。

【0005】

魚油の代替物として、EPAはまた微生物的にも生成できる。一般に微生物油生産は、適切な培養培地中でEPAを自然に合成できる適切な微生物を培養して、（通常の細胞代謝過程で起きる）油合成をさせることを伴い、発酵培地からの微生物の分離、および細胞内油回収のための処理が続く。利用する特定微生物に基づいて、多数の異なるプロセスが存在する〔例えば従属栄養珪藻キクロテラ（*Cyclotella*）種およびニッチア（*Nitzschia*）種（特許文献3）；シュドモナス（*Pseudomonas*）、アルテロモナス（*Alteromonas*）またはシュワネラ（*Shewanella*）種（特許文献4）；クサレカビ（*Pythium*）属の糸状菌類（特許文献5）；またはモルティエラ・エロンガータ（*Mortierella elongata*）、M. エクシグア（*exigua*）、またはM. ハイグロフィラ（*hygrophila*）（特許文献6）〕。発酵は微生物それ自身の自然の能力に依存するために、これらの方法は全て、油の収率を実質的に改善できない、または生成する油組成物の特性を調節できない弱点がある。さらにいくつかの生物（例えばチノリモ（*Porphyridium*）、モルティエラ（*Mortierella*））の工業規模での大規模発酵は高価であり、および／または培養困難である。

【0006】

したがって組換え手段を使用したEPAの微生物生産は、天然微生物源からの生成に比べていくつかの利点を有することが予期される。例えば宿主中への新しい生合成経路の導入によって、および／または望まれない経路の抑止によって、宿主の天然由来微生物脂肪酸プロファイルを変更し、それによって所望PUFA（またはその抱合形態）の生成レベルの増大をもたらす、望まれないPUFAの生成を低減することができるので、油生成に好ましい特性を有する組換え微生物を使用できる。第2に組換え微生物は、特異的用途を有するかもしれない特定形態でPUFAを提供できる。さらに培養条件を調節することで、とりわけ微生物的発現酵素の特定基質源を提供することで、または望まれない生化学的経路を抑止するための化合物の添加／遺伝子操作によって、微生物油生産を操作できる。したがって例えばその他のPUFA下流または上流生成物の顕著な蓄積なしに、このようにして生成された ω -3対 ω -6脂肪酸比率を修正し、または特定のPUFA（例えばEPA）生成を操作することが可能である。

【0007】

ほとんどの微生物的に生成されたEPAは、（主に藻類、コケ、真菌、線形動物、およびヒトに見られる） $\Delta 6$ デサチュラーゼ／ $\Delta 6$ エロンガーゼ経路を通じて合成され、そこでは1.) $\Delta 12$ デサチュラーゼの作用によってオレイン酸がLAに変換され、2.) 場合により $\Delta 15$ デサチュラーゼの作用によってLAがALAに変換され、3.) $\Delta 6$ デサチュラーゼの作用によってLAがGLAに変換され、および／またはALAがSTAに変換され、3.) $C_{18/20}$ エロンガーゼの作用によってGLAがDGLAに変換され、および／またはSTAがETAに変換され、3.) $\Delta 5$ デサチュラーゼの作用によってDGLAがARAに変換され、および／またはETAがEPAに変換され、および4.) 場合に

より $\Delta 17$ デサチュラーゼの作用によってARAがEPAに変換される(図1)。しかしEPA生合成のための代案の $\Delta 9$ エロンガーゼ/ $\Delta 8$ デサチュラーゼ経路がユーグレナ種などのいくつかの生物で作動し、そこではそれが C_{20} PUFA形成のための支配的経路である(非特許文献3、特許文献7および非特許文献4)。この経路では上述のように、1.) $\Delta 9$ エロンガーゼによってLAおよびALAがEDAおよびETRAにそれぞれ変換され、2.) $\Delta 8$ デサチュラーゼによってEDAおよびETRAがDGLAおよびETAにそれぞれ変換され、3.) DGLAおよびETAが最終的にEPAに変換される。

【0008】

したがって文献は、(EPA生成に関与する) $\omega-3/\omega-6$ PUFA生合成経路の様々な部分がサッカロミセス・セレヴィシエ(*Saccharomyces cerevisiae*) (非油性酵母)中に導入されるいくつかの最近の例を報告する。具体的には非特許文献5は、植物脂肪酸デサチュラーゼ(FAD2およびFAD3)発現に際してのリノレン酸合成を報告し、ナットゾン(Knutzon)ら、特許文献8は、*S. セレヴィシエ(cerevisiae)*中で、アブラナ(*Brassica napus*)からの1つのデサチュラーゼ、真菌モルティエラ・アルピナ(*Mortierella alpina*)からの2つのデサチュラーゼを発現させて、リノレン酸(LA)、 γ -リノレン酸(GLA)、ALA、およびステアリドン酸(STA)の生成をもたらし、非特許文献6は*S. セレヴィシエ(cerevisiae)*中で海洋珪藻フェオダクチラム・トリコルナタム(*Phaeodactylum tricornutum*)からの2つのデサチュラーゼを発現させて、EPA生成をもたらした。同様の成功が植物中で報告されている(例えば非特許文献7)。

【0009】

したがって今や多様な生物から、 $\Delta 6$ デサチュラーゼ/ $\Delta 6$ エロンガーゼおよび $\Delta 9$ エロンガーゼ/ $\Delta 8$ デサチュラーゼ経路をコードする遺伝子が同定され特性決定されており、いくつかはその他のPUFAデサチュラーゼおよびエロンガーゼと組み合わせられて異種発現されているが、これらの経路のどちらも酵母などの微生物中に導入されておらず、複雑な代謝エンジニアリングを通じて操作され、商業量のEPAの経済的生産(すなわち全脂肪酸の10%を超える)を可能にしていない。さらにこのようなエンジニアリングのための宿主生物の最も適切な選択に関して、かなりの矛盾が存在する。

【0010】

最近、ピカタッジョ(*Piccataggio*)ら、特許文献9は、EPAなどのPUFAの生成のための好ましいクラスの微生物としての油性酵母、具体的にはヤロウィア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*) (以前はカンジダ・リポリチカ(*Candida lipolytica*)として分類された)の有用性を探求した。油性酵母は自然に油合成および蓄積ができる酵母として定義され、油蓄積は細胞乾燥重量の約80%に達することができる。これらの生物における $\omega-6$ および $\omega-3$ 脂肪酸生成の自然の欠如にもかかわらず(自然に生成されるPUFAは18:2脂肪酸(そしてそれほど多くはないが18:3脂肪酸)に限定されるので)、ピカタッジョ(*Piccataggio*)ら、特許文献9は、比較的単純な遺伝子操作アプローチを使用して、*Y. リポリティカ(lipolytica)*における(全脂肪酸の)1.3%のARAおよび1.9%のEPAの生成を実証した。特定の宿主生物におけるEPAの経済的な商業生産を可能にする、より複雑な代謝エンジニアリングは実施されていない。

【0011】

本出願人らは、 $\Delta 6$ デサチュラーゼ/ $\Delta 6$ エロンガーゼ経路、または $\Delta 9$ エロンガーゼ/ $\Delta 8$ デサチュラーゼ経路のどちらかを使用して、総油画分中に25%を超えるEPAを生成できるヤロウィア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)株をエンジニアリングすることで、既述の問題を解決した。これらの油性酵母におけるEPA生産性をさらに増強する追加的代謝エンジニアリングおよび発酵方法が提供される。

【0012】

【特許文献1】米国特許第6,331,568号明細書

10

20

30

40

50

【特許文献2】米国特許第6,624,195号明細書
 【特許文献3】米国特許第5,244,921号明細書
 【特許文献4】米国特許第5,246,841号明細書
 【特許文献5】米国特許第5,246,842号明細書
 【特許文献6】米国特許第5,401,646号明細書
 【特許文献7】国際公開第00/34439号パンフレット
 【特許文献8】米国特許第6,136,574号明細書
 【特許文献9】国際公開第2004/101757号パンフレット
 【非特許文献1】マッコール (McColl), J. 著、「NutraCos」 2 (4) : 35~40頁 (2003年)

10

【非特許文献2】C. C. アコー (Akoh) およびO. -M. ライ (Lai) 編、「健康的脂質 (Healthful Lipids)」より、シンクレア (Sinclair), A. ら著、第16節、AOCs, Campaign, IL、(2005年)

【非特許文献3】ウォリス (Wallis), J. G. およびブラウズ (Browse), J. 著、「Arch. Biochem. Biophys.」365:307~316頁 (1999年)

【非特許文献4】キ (Qi), B. ら著、「FEBS Letters.」510:159~165頁 (2002年)

【非特許文献5】ダイヤー (Dyer), J. M. ら著、「Appl. Environ. Microbiol.」59:224~230頁 (2002年)

20

【非特許文献6】ドマーグ (Domergue), F. ら著、「Eur. J. Biochem.」269:4105~4113頁 (2002年)

【非特許文献7】Qi (キ), B. ら著、「Nature Biotech.」22:739~745頁 (2004年)

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明は、微生物油におけるEPA生成のための生産宿主を提供する。菌株は、それをEPA生成のためにユニークに魅力的にする、いくつかの遺伝的要素および修正を組み込んだ組換えヤロウィア (Yarrowia) 種である。

30

【0014】

したがって本発明は、

- a) $\Delta 6$ デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、
- b) $C_{18/20}$ エロンガーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、
- c) $\Delta 5$ デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、および
- d) $\Delta 17$ デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子

の $\omega-3/\omega-6$ 脂肪酸生合成経路遺伝子を含んでなる遺伝子プールを含んでなる、背景ヤロウィア (Yarrowia) 種を含んでなる、エイコサペンタエン酸生成のための組換え生産宿主細胞を提供し、

前記 $\omega-3/\omega-6$ 脂肪酸生合成経路遺伝子の少なくとも1つが過剰発現される。

40

【0015】

別の実施形態では、本発明は、

- a) $\Delta 15$ デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、
- b) $\Delta 6$ デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、
- c) $C_{18/20}$ エロンガーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、および
- d) $\Delta 5$ デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子

の $\omega-3/\omega-6$ 脂肪酸生合成経路の遺伝子を含んでなる遺伝子プールを含んでなる、背景ヤロウィア (Yarrowia) 種を含んでなる、エイコサペンタエン酸生成のための組換え生産宿主細胞を提供し、

前記 $\omega-3/\omega-6$ 脂肪酸生合成経路遺伝子の少なくとも1つが過剰発現される。

50

【0016】

代案の実施形態では、本発明は、

- a) $\Delta 9$ エロンガーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、
- b) $\Delta 8$ デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、
- c) $\Delta 5$ デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、および
- d) $\Delta 17$ デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子

の $\omega-3/\omega-6$ 脂肪酸生合成経路の遺伝子を含んでなる遺伝子プールを含んでなる、背景ヤロウィア (Yarrowia) 種を含んでなる、エイコサペンタエン酸生成のための組換え生産宿主細胞を提供し、

前記 $\omega-3/\omega-6$ 脂肪酸生合成経路遺伝子の少なくとも1つが過剰発現される。

10

【0017】

別の実施形態では、本発明は、

- a) $\Delta 15$ デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、
- b) $\Delta 9$ エロンガーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、
- c) $\Delta 8$ デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、および
- d) $\Delta 5$ デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子

の $\omega-3/\omega-6$ 脂肪酸生合成経路の遺伝子を含んでなる遺伝子プールを含んでなる、背景ヤロウィア (Yarrowia) 種を含んでなる、エイコサペンタエン酸生成のための組換え生産宿主細胞を提供し、

前記 $\omega-3/\omega-6$ 脂肪酸生合成経路遺伝子の少なくとも1つが過剰発現される。

20

【0018】

本発明の追加的実施形態としては、本発明の生産宿主の遺伝子プールの一部として、 $\Delta 12$ デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子を添加することが挙げられる。本発明の生産宿主の遺伝子は、配列番号173~183および389よりなる群から選択される核酸配列を有する特異的プロモーターの制御下にあってもよく、 $\omega-3/\omega-6$ 脂肪酸生合成経路の様々な要素を含んでなる追加的遺伝子を有してもよい。

【0019】

別の実施形態では、本発明は、

- a) 請求項1、2、3、4、5、15、19または22のいずれか一項に記載の生産宿主を培養して、エイコサペンタエン酸を含んでなる微生物油が生成され、
 - b) 場合によりステップ(a)の微生物油を回収すること
- を含んでなる、エイコサペンタエン酸を含んでなる微生物油の生成方法を提供する。

30

【0020】

さらに別の実施形態では、本発明は、少なくとも5%のエイコサペンタエン酸から少なくとも約30%のエイコサペンタエン酸の範囲のエイコサペンタエン酸濃度を有する、本発明の生産宿主によって作られる微生物油を提供する。

【0021】

その他の実施形態では、本発明は、エイコサペンタエン酸を含んでなる本発明の微生物油の有効量を含んでなる、食物および飼料製品を提供する。

【0022】

別の実施形態では、本発明は、本発明の微生物油を含んでなり、さらに様々な飼料栄養素による飼料製品の補給のためにそれに添加された酵母バイオマスを含んでなる飼料製品を含んでなる。

40

【0023】

その他の実施形態では、本発明は、ヒトおよび動物によって消費可能な形態で本発明の微生物油を提供することで、様々な臨床症状の処置方法を提供する。

【0024】

生物学的寄託

以下の命名、登録番号、および寄託日を有する以下の生物材料をバージニア州マナッサ (Manassas, VA) 20110-2209ユニバーシティ・ブルヴァード10

50

801の米国微生物系統保存機関（ATCC）に寄託した。

【0025】

【表1】

生物材料	登録番号	寄託日
プラスミド pY89-5	ATCC PTA-6048	2004 年 6 月 4 日
ヤロウィア・リポリティカ Y2047	ATCC PTA-_____	2005 年 10 月 26 日
ヤロウィア・リポリティカ Y2201	ATCC PTA-_____	2005 年 10 月 26 日
ヤロウィア・リポリティカ Y2096	ATCC PTA-_____	2005 年 10 月 26 日

10

【0026】

本願明細書の一部を形成する以下の詳細な説明および添付の配列説明によって、本発明をより完全に理解できるであろう。

【0027】

以下の配列は、37 C. F. R. § 1. 821～1. 825（「ヌクレオチド配列および／またはアミノ酸配列開示を含む特許出願の要件－配列規則」）を満たし、世界知的所有権機関（WIPO）標準 ST. 25（1998）および EPO および PCT の配列表要件（規則 5. 2 および 49. 5（a）の 2）、および実施細則第 208 号および附属書 C）に一致する。ヌクレオチドおよびアミノ酸配列データのために使用される記号および型式は、37 C. F. R. § 1. 822 で述べられる規則に従う。

20

【0028】

配列番号 1～125、173～183、および 369～389 は、表 1 で同定されるプロモーター、遺伝子またはタンパク質（またはその断片）をコードする ORF である。

【0029】

【表2】

表 1

遺伝子およびタンパク質配列番号の要約

説明	核酸 配列番号	タンパク質 配列番号
モルティエラ・アルピナ Δ6 デサチュラーゼ	1(1374bp)	2(457AA)
ヤロウィア・リポリティカ中での発現のために コドン最適化されたモルティエラ・アルピナ由来合成 Δ6 デサチュラーゼ	3(1374bp)	2(457AA)
モルティエラ・アルピナ Δ6 デサチュラーゼ「B」	4(1521bp)	5(458AA)
モルティエラ・アルピナ Δ5 デサチュラーゼ	6(1341bp)	7(446AA)
イソクリシス・ガルバナ Δ5 デサチュラーゼ	8(1329bp)	9(442AA)
ヤロウィア・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・ガルバナ由来合成 Δ5 デサチュラーゼ	10(1329bp)	9(442AA)
ヒト Δ5 デサチュラーゼ	11(1335bp)	12(444AA)
ヤロウィア・リポリティカ中での発現のために コドン最適化されたヒト由来合成 Δ5 デサチュラーゼ	13(1335bp)	12(444AA)

30

40

【0030】

【表 3】

ゼブラフィッシュΔ5/Δ6 デサチュラーゼ Drd6/d5(V) (ジェンバンク登録番号 AF309556)	369 (1590bp)	370 (444AA)
ゼブラフィッシュΔ5/Δ6 デサチュラーゼ(ジェンバンク 登録番号 BC068224)	371 (1946bp)	-
ゼブラフィッシュΔ5/Δ6 デサチュラーゼ突然変異 Drd6/d5(M)	372 (1335bp)	373 (444AA)
サブロレグニア・ディクリナΔ17 デサチュラーゼ	14(1077bp)	15(358AA)
ヤロウシア・リポリティカ中での発現のために コドン最適化された サブロレグニア・ディクリナ由来 合成Δ17 デサチュラーゼ遺伝子	16(1077bp)	15(358AA)
モルティエラ・アルピナ C _{18/20} エロンガーゼ	17(957bp)	18(318AA)
ヤロウシア・リポリティカ中での発現のために コドン最適化された モルティエラ・アルピナ由来合成 C _{18/20} エロンガーゼ遺伝子	19(957bp)	18(318AA)
スラウストキトリウム・アウレウム C _{18/20} エロンガーゼ	20(819bp)	21(272AA)
ヤロウシア・リポリティカ中での発現のために コドン最適化された スラウストキトリウム・アウレウム 由来合成 C _{18/20} エロンガーゼ遺伝子	22(819bp)	21(272AA)
ヤロウシア・リポリティカΔ12 デサチュラーゼ	23(1936bp)	24(419AA)
モルティエラ・イザベリナΔ12 デサチュラーゼ	25(1203bp)	26(400AA)
フザリウム・モニリフォルメΔ12 デサチュラーゼ	27(1434bp)	28(477AA)
アスペルギルス・ニデュランスΔ12 デサチュラーゼ	29(1416bp)	30(471AA)
黄色コウジ菌(<i>Aspergillus flavus</i>)Δ12 デサチュラーゼ	-	31(466AA)
アスペルギルス・フミガーツスΔ12 デサチュラーゼ	-	32(424AA)
マグナボルテ・グリセアΔ12 デサチュラーゼ	33(1656bp)	34(551AA)
ニューロスボラ・クラッサΔ12 デサチュラーゼ	35(1446bp)	36(481AA)
フザリウム・グラミネアリウムΔ12 デサチュラーゼ	37(1371bp)	38(456AA)
モルティエラ・アルピナΔ12 デサチュラーゼ	374 (1403bp)	375(400AA)
サッカロミセス・クリヴェリΔ12 デサチュラーゼ	-	376(416AA)
クリヴェロミセス・ラクチスΔ12 デサチュラーゼ	377 (1948bp)	378(415AA)
カンジダ・アルビカンスΔ12 デサチュラーゼ	-	379(436AA)
デバリオミセス・ハンセニ CBS767Δ12 デサチュラーゼ	-	380(416AA)
フザリウム・モニリフォルメΔ15 デサチュラーゼ	39(1209bp)	40(402AA)
アスペルギルス・ニデュランスΔ15 デサチュラーゼ	41(1206bp)	42(401AA)
マグナボルテ・グリセアΔ15 デサチュラーゼ	43(1185bp)	44(394AA)
ニューロスボラ・クラッサΔ15 デサチュラーゼ	45(1290bp)	46(429AA)
フザリウム・グラミネアリウムΔ15 デサチュラーゼ	47(1212bp)	48(403AA)

【表 4】

モルティエラ・アルピナΔ 15 デサチュラーゼ	381 (1353bp)	382 (403AA)
クリヴェロミセス・ラクチスΔ 15 デサチュラーゼ	383 (1248bp)	384 (415AA)
カンジダ・アルビカンスΔ 15 デサチュラーゼ	-	385 (433AA)
サッカロミセス・クリヴェリΔ 15 デサチュラーゼ	-	386 (419AA)
デバリオミセス・ハンセニ CBS767 Δ 15 デサチュラーゼ	-	387 (435AA)
アスペルギルス・フミガーツスΔ 15 デサチュラーゼ	-	388 (396AA)
イソクリシス・ガルバナΔ 9 エロンガーゼ	49 (792bp)	50 (263AA)
ヤロウィア・リポリティカ中での発現のために コドン最適化された合成 Δ 9 エロンガーゼ遺伝子	51 (792bp)	50 (263AA)
ミドリムシΔ 8 デサチュラーゼ遺伝子 (非機能性、ジェンバンク登録番号 AAD45877)	52 (1275bp)	53 (419AA)
ミドリムシΔ 8 デサチュラーゼ遺伝子 (非機能性、 ウォーリスら著、Archives of Biochem. Biophys., 365:307~316 頁 (1999 年)、国際公開 第 00/34439 号パンフレット)	-	54 (422AA)
ヤロウィア・リポリティカ中での発現のためにコドン 最適化された合成 Δ 8 デサチュラーゼ遺伝子 (D8S-1)	55 (1270bp)	-
ヤロウィア・リポリティカ中での発現のためにコドン 最適化された合成 Δ 8 デサチュラーゼ遺伝子 (D8S-3)	56 (1269bp)	-
ミドリムシΔ 8 デサチュラーゼ遺伝子 (Eg5)	57 (1271bp)	58 (421AA)
ミドリムシΔ 8 デサチュラーゼ遺伝子 (Eg12)	59 (1271bp)	60 (421AA)
ヤロウィア・リポリティカ中での発現のためにコドン 最適化された合成 Δ 8 デサチュラーゼ遺伝子 (D8SF)	61 (1272bp)	62 (422AA)
ドブネズミ C _{16/18} エロンガーゼ	63 (2628bp)	64 (267AA)
ヤロウィア・リポリティカ中での発現のためにコドン 最適化されたドブネズミ由来合成 C _{16/18} エロンガーゼ 遺伝子	65 (804bp)	64 (267AA)
モルティエラ・アルピナ C _{16/18} エロンガーゼ (ELO3)	66 (828bp)	67 (275AA)
モルティエラ・アルピナ ELO3、部分的 cDNA 配列	68 (607bp)	-
モルティエラ・アルピナ ELO3、ゲノム歩行によって 得られた 3' 配列	69 (1,042bp)	-
モルティエラ・アルピナ ELO3、ゲノム歩行によって 得られた 5' 配列	70 (2,223bp)	-
モルティエラ・アルピナ ELO3、cDNA コンティグ	71 (3,557bp)	-

【表 5】

モルティエラ・アルピナ ELO3、イントロン	72(542bp)	-
モルティエラ・アルピナ ELO3、ーゲノムコンティグ	73(4,099bp)	-
ヤロウィア・リポリティカ C _{16/18} エロンガーゼ遺伝子	74(915bp)	75(304AA)
カンジダ・アルビカンスの有望な脂肪酸エロンガーゼ (ジェンバンク登録番号 EAL04510)	-	76(353AA)
ヤロウィア・リポリティカ C _{14/16} エロンガーゼ遺伝子	77(978bp)	78(325AA)
ニューロスボラ・クラッサ FEN1 遺伝子(ジェンバンク 登録番号 CAD70918)	-	79(337AA)
モルティエラ・アルピナ リゾホスファチジン酸 アシルトランスフェラーゼ(LPAAT1)	80(945bp)	81(314AA)
モルティエラ・アルピナ リゾホスファチジン酸 アシルトランスフェラーゼ(LPAAT2)	82(927bp)	83(308AA)
ヤロウィア・リポリティカ リゾホスファチジン酸 アシルトランスフェラーゼ(LPAAT1)	84 (1549bp)	85(282AA)
ヤロウィア・リポリティカ リゾホスファチジン酸アシルトラン スフェラーゼ(LPAAT2)、遺伝子を含んでなるゲノム断片	86 (1495bp)	-
ヤロウィア・リポリティカ リゾホスファチジン酸 アシルトランスフェラーゼ(LPAAT2)	87(672bp)	88(223AA)
ヤロウィア・リポリティカ リン脂質:ジアシルグリセロール アシルトランスフェラーゼ(PDAT)	89 (2326bp)	90(648AA)
ヤロウィア・リポリティカ アシル-CoA:ステロール-アシル トランスフェラーゼ(ARE2)	91 (1632bp)	92(543AA)
シノラブディス・エレガンス アシル-CoA:1-アシルリゾホ スファチジルコリンアシルトランスフェラーゼ(LPCAT)	-	93(282AA)
ヤロウィア・リポリティカ ジアシルグリセロール アシルトランスフェラーゼ(DGAT1)	94 (1578bp)	95(526AA)
モルティエラ・アルピナ ジアシルグリセロール アシルトランスフェラーゼ(DGAT1)	96 (1578bp)	97(525AA)
ニューロスボラ・クラッサ ジアシルグリセロール アシルトランスフェラーゼ(DGAT1)	-	98(533AA)
ジベレラ・ゼアエ PH-1 ジアシルグリセロール アシルトランスフェラーゼ(DGAT1)	-	99(499AA)
マグナボルテ・グリセア ジアシルグリセロール アシルトランスフェラーゼ(DGAT1)	-	100 (503AA)
アスペルギルス・ニデュランス ジアシルグリセロール アシルトランスフェラーゼ(DGAT1)	-	101 (458AA)
ヤロウィア・リポリティカ ジアシルグリセロール アシルトランスフェラーゼ(DGAT2)	102(2119bp) 104(1380bp) 106(1068bp)	103(514AA) 105(459AA) 107(355AA)
モルティエラ・アルピナ ジアシルグリセロール アシルトランスフェラーゼ(DGAT2)	108 (996bp)	109 (331AA)

【表 6】

モルティエラ・アルピナグリセロール-3-リン酸 アシルトランスフェラーゼ (GPAT)	110 (2151bp)	111 (716AA)
M. アルピナ GPAT、部分的 cDNA 配列	112 (1212bp)	-
M. アルピナ GPAT、-1050bp~+2886bp の領域を 含んでなるゲノム断片	113 (3935bp)	-
M. アルピナ GPAT、ゲノム歩行によって得られた 3' cDNA 配列	114 (965bp)	-
M. アルピナ GPAT、ゲノム歩行によって得られた 5' 配列	115 (1908bp)	-
M. アルピナ GPAT、ゲノム歩行によって得られた 内部配列	116 (966bp)	-
M. アルピナ GPAT-イントロン#1	117 (275bp)	-
M. アルピナ GPAT-イントロン#2	118 (255bp)	-
M. アルピナ GPAT-イントロン#3	119 (83bp)	-
M. アルピナ GPAT-イントロン#4	120 (99bp)	-
ヤロウィア・リポリティカ ジアシルグリセロールコリン ホスホトランスフェラーゼ (CPT1)、遺伝子を含んでなる ゲノム 断片	121 (2133bp)	-
ヤロウィア・リポリティカ ジアシルグリセロールコリン ホスホトランスフェラーゼ (CPT1)	122 (1185bp)	123 (394AA)
サッカロミセス・セレヴィシエイノシトールスフィンゴ リン脂質特異的ホスホリパーゼ C (ISC1)	124 (1434bp)	125 (477AA)
ヤロウィア・リポリティカグリセルアルデヒド-3-リン酸 デヒドロゲナーゼプロモーター (GPD)	173 (971bp)	-
ヤロウィア・リポリティカグリセルアルデヒド-3-リン酸 デヒドロゲナーゼ+イントロンプロモーター (GPDIN)	174 (1174bp)	-
ヤロウィア・リポリティカホスホグリセリン酸ムターゼ プロモーター (GPM)	175 (878bp)	-
ヤロウィア・リポリティカフルクトース-ビスリン酸 アルドラーゼプロモーター (FBA)	176 (1001bp)	-
ヤロウィア・リポリティカフルクトース-ビスリン酸 アルドラーゼ+イントロンプロモーター (FBAIN)	177 (973bp)	-
ヤロウィア・リポリティカフルクトース-ビスリン酸 アルドラーゼ+変性イントロンプロモーター (FBAINm)	178 (924bp)	-
ヤロウィア・リポリティカグリセロール-3-リン酸 アシルトランスフェラーゼプロモーター (GPAT)	179 (1130bp)	-
ヤロウィア・リポリティカアンモニウム輸送体 プロモーター (YAT1)	180 (778bp)	-
ヤロウィア・リポリティカ翻訳延長因子 EF1- α プロモーター (TEF)	181 (436bp)	-

【表 7】

ヤロウィア・リボリティカ キメラ GPM::FBA イントロン プロモーター (GPM::FBAIN)	182 (1020bp)	-
ヤロウィア・リボリティカ キメラ GPM::GPD イントロン プロモーター (GPM::GPDIN)	183 (1052bp)	-
ヤロウィア・リボリティカ エクスポートタンパク質 プロモーター (EXP1)	389 (1000bp)	-

10

【0035】

配列番号 126～172 および 390～395 は、表 2 で同定されるようなプラスミドである。

【0036】

【表 8】

表 2
プラスミド配列番号の要約

プラスミド	対応図	配列番号
pY5-30	7A	126(8,953bp)
pKUNF12T6E	9A	128(12,649bp)
pDMW232	9B	129(10,945bp)
pZP3L37	9C	130(12,690bp)
pY37/F15	9D	131(8,194bp)
pKO2UF2PE	9E	132(10,838bp)
pZKUT16	10A	133(5,833bp)
pKO2UM25E	10B	134(12,663bp)
pDMW302T16	10C	135(14,864bp)
pDMW303	10D	136(15,996bp)
pDMW271	10E	137(13,034bp)
pZKUGPI5S	11A	138(6,912bp)
pZKUGPE1S	-	139(6,540bp)
pKO2UM26E	11B	140(13,321bp)
pZKUM	-	141(4,313bp)
pKUNT2	11C	142(6,457bp)
pZUF17	11D	143(8,165bp)
pDMW237	14A	144(7,879bp)
pY54PC	-	145(8,502bp)
pKUNFmkF2	14D	146(7,145bp)
pZF5T-PPC	15B	147(5,553bp)
pDMW297	15D	148(10,448bp)
pZP2C16M899	16A	149(15,543bp)
pDMW314	16B	150(13,295bp)
pDMW325	16C	151(15,559bp)
pZKSL5598	16D	152(16,325bp)
pY72	17A	390(10,189bp)
pY80	17B	391(12,558bp)
pY79	17C	392(8,982bp)
pY86	17D	393(10,424bp)
pY94	18A	394(10,485bp)

10

20

30

【 0 0 3 7 】

【表 9】

pY91M	18B	395(8,423bp)
pMLPAT-17	-	153(8,015bp)
pMLPAT-Int	-	154(8,411bp)
pZUF-MOD-1	18C	155(7,323bp)
pMDGAT1-17	18D	156(8,666bp)
pMDGAT2-17	-	157(8,084bp)
pMGPAT-17	18E	158(9,239bp)
pZF5T-PPC-E3	-	159(5,031bp)
pZUF6S	21A	160(8,462bp)
pZUF6S-E3WT	21B	161(11,046bp)
pZKUGPYE1-N	21C	162(6,561bp)
pZKUGPYE2	21D	163(6,498bp)
pZUF6TYE2	-	164(10,195bp)
pZKUGPYE1	22A	165(6,561bp)
pZUF6FYE1	22B	166(10,809bp)
pYCPT1-17	-	167(8,273bp)
pZP2I7+Ura	22C	168(7,822bp)
pYCPT1-ZP2I7	-	169(7,930bp)
pTEF::ISC1	-	170(8,179bp)
pY20	22D	171(8,196bp)
pLV13	22E	172(5,105bp)

10

20

【0038】

配列番号368は、ヤロウィア（*Yarrowia*）種中で最適に発現される遺伝子のコドン最適化翻訳開始部位に対応する。

【0039】

配列番号184～197は、ヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）プロモーター領域を増幅するのに使用される、プライマーYL211、YL212、YL376、YL377、YL203、YL204、GPAT-5-1、GPAT-5-2、ODMW314、YL341、ODMW320、ODMW341、27203-F、および27203-Rにそれぞれ対応する。

30

【0040】

配列番号198～201はそれぞれ、リアルタイム分析のために使用されるオリゴヌクレオチドYL-URA-16F、YL-URA-78R、GUS-767F、およびGUS-891Rである。

【0041】

配列番号202～217は、一緒になってI. ガルバナ（*galbana*）Δ9エロンガーゼ（すなわちそれぞれ、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）のコドン最適化コード領域全体を含んでなる、8対のオリゴヌクレオチドに対応する。

40

【0042】

配列番号218～221は、コドン最適化Δ9エロンガーゼ遺伝子の合成中にPCR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。

【0043】

50

配列番号 222 は、pT9 (1-4) に記載の 417bp の NcoI/PstI 断片であり、配列番号 223 は pT9 (5-8) に記載の 377bp の PstI/NotI 断片である。

【0044】

配列番号 224~249 は、一緒になってミドリムシ (*E. gracilis*) Δ8 デサチュラーゼのコドン最適化コード領域全体を含んでなる 13 対のオリゴヌクレオチド (すなわちそれぞれ、D8-1A、D8-1B、D8-2A、D8-2B、D8-3A、D8-3B、D8-4A、D8-4B、D8-5A、D8-5B、D8-6A、D8-6B、D8-7A、D8-7B、D8-8A、D8-8B、D8-9A、D8-9B、D8-10A、D8-10B、D8-11A、D8-11B、D8-12A、D8-12B、D8-13A、および D8-13B) に対応する。

10

【0045】

配列番号 250~257 は、コドン最適化 Δ8 デサチュラーゼ遺伝子の合成中に PCR 増幅のために使用されるプライマー D8-1F、D8-3R、D8-4F、D8-6R、D8-7F、D8-9R、D8-10F、および D8-13R にそれぞれ対応する。

【0046】

配列番号 258 は pT8 (1-3) に記載の 309bp の NcoI/BglII 断片であり、配列番号 259 は pT8 (4-6) に記載の 321bp の BglII/XhoI 断片であり、配列番号 260 は pT8 (7-9) に記載の 264bp の XhoI/SacI 断片であり、配列番号 261 は pT8 (10-13) に記載の 369bp の SacI/NotI 断片である。

20

【0047】

配列番号 262 および 263 は、pDMW255 における D8S-2 合成中に使用される、プライマー ODMW390 および ODMW391 にそれぞれ対応する。

【0048】

配列番号 264 および 265 は、実施例 15 で述べられるキメラ D8S-1::XPR および D8S-2::XPR 遺伝子である。

【0049】

配列番号 266 および 267 は、D8S-3 合成中に使用されるプライマー ODMW392 および ODMW393 に対応する。

30

【0050】

配列番号 268 および 269 は、ミドリムシ (*Euglena gracilis*) からの Δ8 デサチュラーゼ増幅のために使用される、プライマー Eg5-1 および Eg3-3 にそれぞれ対応する。

【0051】

配列番号 270~273 は、Δ8 デサチュラーゼクローンを配列決定するために使用される、プライマー T7、M13-28Rev、Eg3-2、および Eg5-2 にそれぞれ対応する。

【0052】

配列番号 274 は、D8S-3 増幅のために使用されるプライマー ODMW404 に対応する。

40

【0053】

配列番号 275 は、D8S-3 を含んでなる 1272bp のキメラ遺伝子である。

【0054】

配列番号 276 および 277 は、クローンされた D8S-3 遺伝子中に新しい制限酵素部位を作り出すのに使用される、プライマー YL521 および YL522 にそれぞれ対応する。

【0055】

配列番号 278~291 は、D8SF を生成する部位特異的変異誘発反応で使用されるプライマー YL525、YL526、YL527、YL528、YL529、YL530

50

、Y L 5 3 1、Y L 5 3 2、Y L 5 3 3、Y L 5 3 4、Y L 5 3 5、Y L 5 3 6、Y L 5 3 7、およびY L 5 3 8にそれぞれ対応する。

【0056】

配列番号292は、W497L突然変異を含んでなる突然変異A H A S遺伝子である。

【0057】

配列番号293～295は、BDクローンテック・クリエイター・スマート (B D - C l o n t e c h C r e a t o r S m a r t) (登録商標) cDNAライブラリーキットのプライマーであり、スマート (S M A R T) I Vオリゴヌクレオチド、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。

【0058】

配列番号296は、M. アルピナ (a l p i n a) cDNAライブラリー配列決定のために使用される、M13順方向プライマーに対応する。

【0059】

配列番号297～300および302～303は、M. アルピナ (a l p i n a) L P A A T 2 O R F のクローニングのために使用される、プライマーM L P A T - F、M L P A T - R、L P A T - R e - 5 - 1、L P A T - R e - 5 - 2、L P A T - R e - 3 - 1、およびL P A T - R e - 3 - 2にそれぞれ対応する。

【0060】

配列番号301および304は、Y. リポリティカ (l i p o l y t i c a) L P A A T 1 O R F の5 ' (1129bp) および3 ' (938bp) 領域にそれぞれ対応する。

【0061】

配列番号305および306は、「対照」プラスミドpZUF-MOD-1を作り出すために使用される、プライマーp z u f - m o d 1 およびp z u f - m o d 2 にそれぞれ対応する。

【0062】

配列番号307および308は、M. アルピナ (a l p i n a) D G A T 1 O R F のクローニングのために使用される、プライマーM A C A T - F 1 およびM A C A T - R にそれぞれ対応する。

【0063】

配列番号309および310は、M. アルピナ (a l p i n a) D G A T 2 O R F のクローニングのために使用されるプライマーM D G A T - F およびM D G A T - R 1 にそれぞれ対応する。

【0064】

配列番号311および312は、PCRを変性させてM. アルピナ (a l p i n a) G P A T を増幅するために使用される、プライマーM G P A T - N 1 およびM G P A T - N R 5 にそれぞれ対応する。

【0065】

配列番号313～315は、M. アルピナ (a l p i n a) G P A T の3 ' - 末端増幅のために使用される、プライマーM G P A T - 5 N 1、M G P A T - 5 N 2、およびM G P A T - 5 N 3 にそれぞれ対応する。

【0066】

配列番号316および317は、ゲノム歩行のために使用されるクローンテック (C l o n T e c h) のユニバーサル・ゲノムウォーカー (U n i v e r s a l G e n o m e W a l k e r) (商標) キットからのゲノムウォーカー (G e n o m e W a l k e r) アダプターに対応する。

【0067】

配列番号318～321は、ゲノム歩行で使用されるPCRプライマーである、M G P A T - 5 - 1 A、A d a p t o r - 1 (A P 1)、M G P A T - 3 N 1、およびN e s t e d A d a p t o r P r i m e r 2 (A P 2) にそれぞれ対応する。

10

20

30

40

50

【0068】

配列番号322および323は、M. アルピナ (*alpina*) GPATを増幅するために使用される、プライマーmgpat-cdna-5およびmgpat-cdna-Rにそれぞれ対応する。

【0069】

配列番号324および325は、M. アルピナ (*alpina*) ELO3の3'-末端領域を単離するゲノム歩行のために使用される、プライマーMA Elong3'1およびMA elong3'2にそれぞれ対応する。

【0070】

配列番号326および327は、M. アルピナ (*alpina*) ELO3の5'-末端領域を単離するゲノム歩行のために使用されるプライマーMA Elong5'1およびMA Elong5'2にそれぞれ対応する。

10

【0071】

配列番号328および329は、M. アルピナ (*alpina*) cDNAから完全なELO3を増幅するために使用される、プライマーMA ELONG5' NcoI 3およびMA ELONG3' NotI 1にそれぞれ対応する。

【0072】

配列番号330および331は、Y. リポリティカ (*lipolytica*) YE2のコード領域を増幅するために使用されるプライマーYL597およびYL598にそれぞれ対応する。

20

【0073】

配列番号332～335は、Y. リポリティカ (*lipolytica*) YE1のコード領域を増幅するために使用される、プライマーYL567、YL568、YL569、およびYL570にそれぞれ対応する。

【0074】

配列番号336および337は、Y. リポリティカ (*lipolytica*) YE1のクローニング中に、部位特異的変異誘発のために使用されるプライマーYL571およびYL572にそれぞれ対応する。

【0075】

配列番号338および339は、Y. リポリティカ (*lipolytica*) CPT1 ORFのクローニングのために使用される、プライマーCPT1-5'-NcoIおよびCPT1-3'-NotIにそれぞれ対応する。

30

【0076】

配列番号340および341は、S. セレヴィシエ (*cerevisiae*) ISC1 ORFのクローニングのために使用される、プライマーIsclFおよびIsclRにそれぞれ対応する。

【0077】

配列番号342および343は、S. セレヴィシエ (*cerevisiae*) PCL1 ORFのクローニングのために使用される、プライマーPcl1FおよびPcl1Rにそれぞれ対応する。

40

【0078】

配列番号344～347は、Y. リポリティカ (*lipolytica*) DGAT2遺伝子の標的を定めた中断のために使用される、プライマーP95、P96、P97、およびP98にそれぞれ対応する。

【0079】

配列番号348～350は、中断されたY. リポリティカ (*lipolytica*) DGAT2遺伝子の標的を定めた組み込みをスクリーニングするために使用される、プライマーP115、P116、およびP112にそれぞれ対応する。

【0080】

配列番号351～354は、Y. リポリティカ (*lipolytica*) PDAT遺伝

50

子の標的を定めた中断のために使用される、プライマー P 3 9、P 4 1、P 4 0、および P 4 2 にそれぞれ対応する。

【0081】

配列番号 3 5 5～3 5 8 は、中断された Y. リポリティカ (l i p o l y t i c a) P D A T 遺伝子の標的を定めた組み込みをスクリーニングするために使用される、プライマー P 5 1、P 5 2、P 3 7、および P 3 8 にそれぞれ対応する。

【0082】

配列番号 3 5 9 および 3 6 0 は、Y. リポリティカ (l i p o l y t i c a) D G A T 1 の単離のために使用される、P 2 0 1 および P 2 0 3 としてそれぞれ同定される縮重プライマーである。

10

【0083】

配列番号 3 6 1～3 6 5 は、Y. リポリティカ (l i p o l y t i c a) 中の推定上の D G A T 1 遺伝子の標的を定めた中断のための標的カセット創出のために使用される、プライマー P 2 1 4、P 2 1 5、P 2 1 6、P 2 1 7、および P 2 1 9 にそれぞれ対応する。

【0084】

配列番号 3 6 6 および 3 6 7 は、中断された Y. リポリティカ (l i p o l y t i c a) D G A T 1 遺伝子の標的を定めた組み込みをスクリーニングするために使用される、プライマー P 2 2 6 および P 2 2 7 にそれぞれ対応する。

【0085】

20

配列番号 3 9 6～4 0 1 は、W 4 9 7 L 突然変異を含んでなる突然変異ヤロウィア・リポリティカ (Y a r r o w i a l i p o l y t i c a) A H A S 遺伝子の合成のために使用される、プライマー 4 1 0、4 1 1、4 1 2、4 1 3、4 1 4、および 4 1 5 にそれぞれ対応する。

【0086】

配列番号 4 0 2 および 4 0 3 は、A c o 3 ' ターミネーターを含有する N o t I / P a c I 断片を増幅するのに使用される、プライマー Y L 3 2 5 および Y L 3 2 6 にそれぞれ対応する。

【0087】

配列番号 4 0 4 は、真菌 Δ 1 5 および Δ 1 2 デサチュラーゼに見られる H i s B o x 1 モチーフに対応する。

30

【0088】

配列番号 4 0 5 は、Δ 1 5 デサチュラーゼ活性を有する真菌タンパク質の徴候であるモチーフに対応し、一方配列番号 4 0 6 は、Δ 1 2 デサチュラーゼ活性を有する真菌タンパク質を示すモチーフに対応する。

【0089】

配列番号 4 0 7 は、C r e リコンビナーゼ酵素によって認識される L o x P 遺伝子組換え部位に対応する。

【0090】

配列番号 4 0 8 および 4 0 9 は、プラスミド p Y 8 0 の合成中に G P D : : F m 1 : : X P R 2 を増幅するのに使用される、プライマー 4 3 6 および 4 3 7 にそれぞれ対応する。

40

【0091】

配列番号 4 1 0～4 1 3 は、二機能 Δ 5 / Δ 6 デサチュラーゼをクローンするのに使用されるプライマー 4 7 5、4 7 7、4 7 8、および 4 7 6 にそれぞれ対応する。

【0092】

配列番号 4 1 4 および 1 2 7 は、部位特異的変異誘発によってプラスミド p Y 9 1 M からプラスミド p Y 9 1 V を作り出すのに使用される、プライマー 5 0 5 および 5 0 6 にそれぞれ対応する。

【発明を実施するための最良の形態】

50

【0093】

本願明細書で引用した全ての特許、特許出願、および公報は、引用することによりそれらの内容全体を組み込んだものとする。これは具体的に以下の本出願人の譲受人の同時係属出願を含む。

米国特許出願第10/840478号明細書(2004年5月6日出願)、
米国特許出願第10/840579号明細書(2004年5月6日出願)、
米国特許出願第10/840325号明細書(2004年5月6日出願)、
米国特許出願第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(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)、
米国仮特許出願第60/624812号明細書(2004年11月4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(2004年12月29日出願)、
米国仮特許出願第60/689031号明細書(2005年6月9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11/225354号明細書(2005年9月13日出願)、
米国特許出願第10/253,882号明細書(2005年10月19日出願)、および
米国特許出願第11/254,173号明細書(2005年10月19日出願)。

10

20

【0094】

主題発明に従って、本出願人らは、25%を超えるエイコサペンタエン酸(EPA、20:5、 ω -3)を生成できるヤロウィア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)生産宿主株を提供する。この特定の多価不飽和脂肪酸(PUFA)の蓄積は、2つの異なる機能性 ω -3/ ω -6脂肪酸生合成経路のどちらかの導入によって達成される。第1の経路は、高レベル組換え発現のための油性酵母宿主中の Δ 6デサチュラーゼ、 $C_{18/20}$ エロンガーゼ、 Δ 5デサチュラーゼ、および Δ 17デサチュラーゼまたは Δ 15デサチュラーゼ活性のいずれかがあるタンパク質を含んでなり、そこではEPA油はまたGLAも含んでなる。後者の経路は、 Δ 9エロンガーゼ、 Δ 8デサチュラーゼ、 Δ 5

30

【0095】

主題発明には多くの用途がある。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、特に乳児用調製粉乳として、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。この場合PUFAは、一般に経口投与されるが、例えば非経口的(例えば皮下、筋肉内または静脈内)、経直腸、経膈、または局所的(例えば軟膏またはローション)など、それによってそれらが成功裏に吸収されるあらゆる経路によって投与できる。

40

【0096】

組換え手段によって生成されたPUFAをヒトまたは動物に補給することは、添加PUFAレベルならびにそれらの代謝子孫の増大をもたらすことができる。例えばEPAでの

50

処置は、E P Aのレベル増大だけでなく、エイコサノイド（すなわちプロスタグランジン、ロイコトリエン、トロンボキサン）などのE P Aの下流生成物をもたらす。複雑な調節機序は、このような機序を防止、調節または克服して、個体中の特異的P U F Aの所望レベルを達成するために、様々なP U F Aを組み合わせ、または異なるP U F A抱合体を添加することを望ましくする。

【0097】

水産養殖飼料（すなわち乾燥飼料、半湿および湿潤飼料）は一般に栄養素組成物の少なくとも1～2％が ω -3および／または ω -6 P U F Aであることを必要とするので、代案の実施形態では、ここで開示される方法によって作られたP U F A、またはその誘導体をこれらの調合物合成において利用できる。

10

【0098】

定義

本開示中では、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。

【0099】

「読み取り枠」はO R Fと略記される。

【0100】

「ポリメラーゼ連鎖反応」はP C Rと略記される。

【0101】

「米国微生物系統保存機関」はA T C Cと略記される。

【0102】

「多価不飽和脂肪酸」はP U F Aと略記される。

20

【0103】

「ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ」はD A G A TまたはD G A Tと略記される。

【0104】

「リン脂質：ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ」はP D A Tと略記される。

【0105】

「グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ」はG P A Tと略記される。

【0106】

「リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ」はL P A A Tと略記される。

30

【0107】

「アシル-CoA：1-アシルリゾホスファチジルコリンアシルトランスフェラーゼ」は「L P C A T」と略記される。

【0108】

「アシル-CoA：ステロールアシルトランスフェラーゼ」はA R E 2と略記される。

【0109】

「ジアシルグリセロール」はD A Gと略記される。

【0110】

「トリアシルグリセロール」はT A Gと略記される。

40

【0111】

「Co-酵素A」はC o Aと略記される。

【0112】

「ホスファチジルコリン」はP Cと略記される。

【0113】

「フザリウム・モニリフォルメ（*Fusarium moniliforme*）」という用語は「フザリウム・ベルチシリオイデス（*Fusarium verticillioides*）」と同義である。

【0114】

50

「食品」という用語は、一般にヒトの消費に適したあらゆる食物を指す。典型的な食品としては、肉製品、穀物製品、ペーカリー食品、スナック食品、乳製品などが挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0115】

「機能性食品」という用語は、それが含有する伝統的栄養素を超えて健康上の利点を提供するかもしれないあらゆる変性食物または成分を含む、潜在的に健康的な製品を包含する食物を指す。機能性食品としては、ビタミン、ハーブ、および栄養補給食品で強化されたシリアル、パンなどの食物および飲料が挙げられる。機能性食品は、その栄養価を超えて健康上の利点を提供する物質を含有し、そこでは物質は食物中に自然に存在し、または意図的に添加される。

10

【0116】

ここでの用法では「メディカルフード」という用語は、医師の監督下で経腸的に消費または投与されるために調合され、医学的評価により広く認められている科学的原理に基づいて、独特の栄養要求性が確立されている疾患または病状の特異的食餌管理用である食物を指す〔希少難病医薬法（21 U. S. C. 360ee（b）（3））第5節（b）を参照されたい〕。食物は以下の場合に限り「メディカルフード」である。（i）それが経口摂取またはチューブによる経腸栄養の手段による患者への部分的なまたは専用の給食のために、特別に調合され処理された製品である（その自然な状態で使用される天然由来食材とは対照的に）。（ii）それが治療的または慢性医療の必要性のために、通常の食材または特定の栄養素を経口摂取、消化、吸収、または代謝する能力が制限されたまたは損なわれた患者、またはその食餌管理が正常な食餌の修正のみでは達成できないその他の特別な医学的に判定された栄養要件を有する患者の食餌管理を対象とする。（iii）それが医学的評価によって判定された特異的疾患または症状から帰結する、ユニークな栄養要件の管理のために特に修正された栄養補給を提供する。（iv）それが医療的監督下で使用されることが意図される。および（v）それがとりわけメディカルフードの使用指示に関して繰り返し医療的ケアを必要とする、積極的な継続中の医療的監督を受けている患者のみを対象とすることが意図される。したがって栄養補助食品または従来の食物とは異なり、独特の栄養要件が確立されている疾患または症状の特定の食餌管理を意図するメディカルフードは、特定疾患または症状のための独特の栄養補給の提供に関して科学的に妥当な効能書を有してもよい。メディカルフードは医学的監督の下で使用されるという要件によって、メディカルフードは、特別な食餌用途（例えば低アレルギー性食品）のためのより幅広いカテゴリーの食物、および健康機能をうたう食物（例えば栄養補助食品）とは区別される。

20

30

【0117】

「医学的栄養物」という用語は、ここで定義されるようなメディカルフードであり、典型的に特別な食餌要件のために特にデザインされた強化飲料を指す。医学的栄養物は、一般に特定の病状または食餌条件に焦点を合わせた食餌組成物を含んでなる。市販医学的栄養物の例としては、エンシュア（Ensure）（登録商標）およびブースト（Boost）（登録商標）が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0118】

「医薬品」という用語は、ここでの用法では、米国で販売される場合に米連邦食品医薬品化粧品法の第505または505条によって規制される化合物または物質を意味する。

40

【0119】

「乳児用調製粉乳」という用語は、それがヒト母乳をシミュレーションするという理由で、ヒト幼児による消費のためにだけデザインされた食物を意味する。典型的な乳児用調製粉乳の市販例としては、シミラック（Similac）（登録商標）、およびイソミル（Isomil）（登録商標）が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0120】

「栄養補助食品」という用語は、次のような製品を指す。（i）食餌に栄養補給することを意図し、したがって、従来の食物として、または食事または食餌の唯一のアイテムと

50

して使用されない。(i i) 1つもしくはそれ以上の食餌成分(例えばビタミン、ミネラル、ハーブまたはその他の植物性薬品、アミノ酸、酵素、および腺エキスをはじめとする)またはそれらの構成要素を含有する。(i i i) 丸薬、カプセル、錠剤、または液体として経口摂取することが意図される。(i v) 栄養補助食品としてラベル表示される。

【0121】

「臨床症状」という用語は、ヒトまたは動物の健康および満足な状態を損ない、PUFAおよび特に $\omega-3$ および $\omega-6$ 脂肪酸の補給によって改善できる、ヒトまたは動物における症状を意味する。臨床症状は、冠動脈心疾患などの文献で立証された病状、または栄養的制御不良によってもたらされる健康不良の一般症状として現れることができる。

【0122】

「食物類似物」とは、肉、チーズ、ミルクなどに関わらず、その食物対応物と似ているように製造された食物様製品であり、その対応物の外観、味、およびテクスチャを有することが意図される。したがって「食物」という用語は、ここでの用法では食物類似物もまた包含する。

【0123】

「水産養殖飼料」および「アクアフィード」という用語は、水産養殖産業において天然飼料を栄養補給するまたは置き換える人造または人工餌(配合飼料)を指す。したがってアクアフィードは、養殖魚および甲殻類(すなわちより安価な基本的食物魚種[例えばコイ、イヅミダイ、およびナマズなどの淡水魚]および高級またはすき間市場用のより高価な換金産物種[例えば主にエビ、サケ、マス、ハマチ、スズキ、タイ、およびハタなどの海産および通し回遊種]の双方)に有用な人工的に配合された飼料を指す。これらの配合飼料は、互いに補完して、水産養殖種のために栄養的に完全な食餌を形成する様々な割合のいくつかの成分から構成される。

【0124】

「動物飼料」という用語は、家畜(ペット、農業家畜など)をはじめとする動物による消費、または例えば養魚業などの食物生産のために飼育される動物のみを意図した飼料を指す。

【0125】

「飼料栄養素」という用語は、本発明の組換え生産宿主を含んでなる酵母バイオマス由来であってもよい、タンパク質、脂質、炭水化物、ビタミン、ミネラル、および核酸などの栄養素を意味する。

【0126】

ここでの用法では「バイオマス」という用語は、商業的に顕著な量でEPAを生成する組換え生産宿主の発酵からの使用済み酵母細胞物質を特に指す。

【0127】

「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 C_{12} ~ C_{22} の様々な鎖長の長鎖脂肪酸(アルカン酸)を指す。優勢な鎖長は C_{16} ~ C_{22} の間である。脂肪酸の構造は単純な表記法システム「X:Y」によって表され、ここでXは特定の脂肪酸中の炭素(C)原子の総数であり、Yは二重結合の数である。「飽和脂肪酸」対「不飽和脂肪酸」、「一不飽和脂肪酸」対「多価不飽和脂肪酸」(または「PUFA」)、および「オメガ-6脂肪酸」($\omega-6$ または $n-6$)対「オメガ-3脂肪酸」($\omega-3$ 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号パンフレットで提供される。

【0128】

本開示においてPUFA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、 $\omega-3$ および $\omega-6$ 脂肪酸およびそれらの前駆物質の一般名、本願明細書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。

【0129】

10

20

30

40

50

【表 10】

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 -リノール酸	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 - リノール酸	DGLA	シス-8、11、14- エイコサトリエン酸	20:3 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
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

【0130】

「高レベルEPA生成」という用語は、微生物宿主の総脂質中に少なくとも約5%のEPA、好ましくは総脂質中の少なくとも約10%のEPA、より好ましくは総脂質中の少なくとも約15%のEPA、より好ましくは総脂質中の少なくとも約20%のEPA、より好ましくは総脂質中の少なくとも約25～30%のEPA、より好ましくは総脂質中の少なくとも約30～35%のEPA、より好ましくは少なくとも約35～40%、そして最も好ましくは総脂質中の少なくとも約40～50%のEPAの生成を指す。EPAの構造的な形態は限定されず、したがって例えばEPAは総脂質中に遊離脂肪酸として、または

【0131】

「あらゆるGLAを欠く」という用語は、約0.1%に至る検出可能レベルを有する機器を使用してGC分析によって測定した場合における、微生物宿主の総脂質中のあらゆる検出可能なGLAの欠如を指す。

【0132】

「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、生きるために経口摂取しなくてはならない特定のPUFAを指す。例えば哺乳類は、必須脂肪酸LA(18:2、 ω -6)およびALA(18:3、 ω -3)を合

成できない。その他の必須脂肪酸としては、G L A ($\omega-6$)、D G L A ($\omega-6$)、A R A ($\omega-6$)、E P A ($\omega-3$)、およびD H A ($\omega-3$)が挙げられる。

【0133】

「微生物油」または「単細胞油」は、微生物（例えば藻類、油性酵母菌、および糸状菌）によって、それらの生涯において天然に生成される油である。「油」という用語は、25℃で液体であり、通常多価不飽和脂質である脂質物質を指す。対照的に「脂肪」という用語は、25℃で固形物であり、通常飽和である脂質物質を指す。

【0134】

「リピッドボディ」とは、通常、特定のタンパク質およびリン脂質単層に結合する脂肪滴を指す。これらの細胞小器官は、ほとんどの生物が中性脂質を輸送／貯蔵する部位である。リピッドボディは、T A G ー生合成酵素を含有する小胞体のミクロドメインから発生すると考えられ、それらの合成およびサイズは、特定のタンパク質構成要素によって調節されているように見える。

10

【0135】

「中性脂質」とは、貯蔵脂肪および油として一般にリピッドボディの細胞に見られる脂質を指し、細胞pHでは脂質が荷電群を有さないことからこう呼ばれる。一般にこれらは完全に非極性で水に対する親和性がない。中性脂質とは、一般に脂肪酸とグリセロールのモノー、ジー、および／またはトリエステルを指し、それぞれモノアシルグリセロール、ジアシルグリセロールまたはT A G (または集散的にアシルグリセロール)とも称される。アシルグリセロールから遊離脂肪酸を放出するためには、加水分解反応が起きなくてはならない。

20

【0136】

「トリアシルグリセロール」、「油」、および「T A G」という用語は、グリセロール分子とエステル化する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「油生合成」は、一般に細胞におけるT A G 合成を指す。

【0137】

「アシルトランスフェラーゼ」という用語は、アミノアシル基 (E C 2 . 3 . 1 . -) 以外の基の転移に関与する酵素を指す。

30

【0138】

「D A G A T」という用語は、ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ（アシル-C o A ージアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼまたはジアシルグリセロール-O ーアシルトランスフェラーゼとしても知られる）(E C 2 . 3 . 1 . 20) を指す。この酵素は、アシル-C o A および1, 2 ージアシルグリセロールからT A G およびC o A への変換に関与する（したがってT A G 生合成の最終段階に関与する）。D G A T 1 およびD G A T 2 の2つのD A G A T 酵素ファミリーが存在する。前者のファミリーはアシル-C o A : コレステロールアシルトランスフェラーゼ (A C A T) 遺伝子ファミリーと類似しており、後者のファミリーは関連性がない（ラルディサバル (L a r d i z a b a l) ら著、J . B i o l . C h e m . 276 (42) : 38862 ~ 38869 頁 (2001年)) 。

40

【0139】

「P D A T」という用語は、リン脂質：ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ酵素 (E C 2 . 3 . 1 . 158) を指す。この酵素は、リン脂質のs n - 2 位から1, 2 ージアシルグリセロールのs n - 3 位へのアシル基転移に関与し、その結果リゾリン脂質およびT A G が得られる（したがってT A G 生合成の最終段階に関与する）。この酵素はアシル-C o A ー非依存性機序を通じてT A G を合成することで、D G A T (E C 2 . 3 . 1 . 20) とは異なる。

【0140】

「A R E 2」という用語は、アシル-C o A + ステロール = C o A + ステロールエステ

50

ルの反応を触媒するアシル-CoA：ステロールアシルトランスフェラーゼ酵素を指す（EC 2. 3. 1. 26、ステロールエステルシンターゼ2酵素としてもまた知られている）。

【0141】

「GPAT」という用語は、gp at 遺伝子によってコードされ、アシル-CoAおよびsn-グリセロール3-リン酸をCoAおよび1-アシル-sn-グリセロール3-リン酸に変換する（リン脂質生合成の第1のステップ）グリセロール3-リン酸-O-アシルトランスフェラーゼ酵素（E. C. 2. 3. 1. 15）を指す。

【0142】

「LPAAT」という用語は、リゾホスファチジン酸-アシルトランスフェラーゼ酵素（EC 2. 3. 1. 51）を指す。この酵素は、CoAおよび1, 2-ジアシル-sn-グリセロール3-リン酸（ホスファチジン酸）を生成する、1-アシル-sn-グリセロール3-リン酸（すなわちリゾホスファチジン酸）上へのアシル-CoA基の転移に関与する。文献はまた、アシル-CoA：1-アシル-sn-グリセロール3-リン酸2-O-アシルトランスフェラーゼ、1-アシル-sn-グリセロール3-リン酸アシルトランスフェラーゼおよび／または1-アシルグリセロールリン酸アシルトランスフェラーゼ（AGATと略記される）としてのLPAATについても言及する。

【0143】

「LPCAT」という用語は、アシル-CoA：1-アシルリゾホスファチジルコリンアシルトランスフェラーゼを指す。この酵素は、CoAとホスファチジルコリン（PC）間のアシル基交換に関与する。ここではそれはまた、CoAとリゾホスファチジン酸（LPA）をはじめとするその他のリン脂質間のアシル交換に関与する酵素も指す。

【0144】

「総脂質および油画分中のパーセント（％）PUFA」とは、これらの画分中の全脂肪酸に対するPUFA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（PC）画分、ホスファチジルエタノールアミン（PE）画分、およびトリアシルグリセロール（TAGまたは油）画分内に位置する脂質を含む。しかし「脂質」および「油」という用語は、本願明細書全体で同義的に使用される。

【0145】

「ホスファチジルコリン」または「PC」という用語は、細胞膜の主要構成要素であるリン脂質を指す。PCの化学構造は、一般にコリン分子、リン酸基、およびグリセロールを含んでなるとして記述でき、そこでは脂肪酸アシル鎖がR基として、グリセロール分子のsn-1およびsn-2位上に付着する。

【0146】

「PUFA生合成経路酵素」という用語は、 $\Delta 4$ デサチュラーゼ、 $\Delta 5$ デサチュラーゼ、 $\Delta 6$ デサチュラーゼ、 $\Delta 12$ デサチュラーゼ、 $\Delta 15$ デサチュラーゼ、 $\Delta 17$ デサチュラーゼ、 $\Delta 9$ デサチュラーゼ、 $\Delta 8$ デサチュラーゼ、 $\Delta 9$ 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、PUFAの生合成に関連する酵素（および前記酵素をコードする遺伝子）のいずれかを指す。

【0147】

「 $\omega-3/\omega-6$ 脂肪酸生合成経路」という用語は、適切な条件下で発現されると、 $\omega-3$ および $\omega-6$ 脂肪酸のいずれか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 $\omega-3/\omega-6$ 脂肪酸生合成経路に関与する遺伝子は、以下の酵素のいくつかまたは全てをコードする。 $\Delta 12$ デサチュラーゼ、 $\Delta 6$ デサチュラーゼ、 $C_{18/20}$ エロンガーゼ、 $C_{20/22}$ エロンガーゼ、 $\Delta 5$ デサチュラーゼ、 $\Delta 17$ デサチュラーゼ、 $\Delta 15$ デサチュラーゼ、 $\Delta 9$ デサチュラーゼ、 $\Delta 8$ デサチュラーゼ、 $\Delta 9$ エロンガーゼ、および $\Delta 4$ デサチュラーゼ。代表的な経路は図1に示され、様々な中間体を経由するオレイン酸のDHAへの変換が提供され、 $\omega-3$ および $\omega-6$ 脂肪酸の双方が、共通の原料

10

20

30

40

50

からどのように生成されてもよいかを実証する。経路は自然に2つの部分に別れ、1つの部分は $\omega-3$ 脂肪酸、別の部分は $\omega-6$ 脂肪酸のみを発生させる。 $\omega-3$ 脂肪酸のみを発生させる部分をここで $\omega-3$ 脂肪酸生合成経路と称するのに対し、 $\omega-6$ 脂肪酸のみを発生させる部分はここで $\omega-6$ 脂肪酸生合成経路と称する。

【0148】

「機能性」という用語は、ここで $\omega-3/\omega-6$ 脂肪酸生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（*in vivo*）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、「 $\omega-3/\omega-6$ 脂肪酸生合成経路」または「機能性 $\omega-3/\omega-6$ 脂肪酸生合成経路」は、上の段落で列挙される全遺伝子が必要とされることを暗示しないものとする。

10

【0149】

「 $\omega-6 \Delta 6$ デサチュラーゼ/ $\Delta 6$ エロンガーゼ経路」という用語は、 $\Delta 6$ デサチュラーゼ、 $C_{18/20}$ エロンガーゼ、 $\Delta 5$ デサチュラーゼ、および $\Delta 17$ デサチュラーゼ遺伝子を最低限含むEPA脂肪酸生合成経路を指す。「 $\omega-3 \Delta 6$ デサチュラーゼ/ $\Delta 6$ エロンガーゼ経路」という用語は、最低限、 $\Delta 15$ デサチュラーゼ、 $\Delta 6$ デサチュラーゼ、 $C_{18/20}$ エロンガーゼ、および $\Delta 5$ デサチュラーゼの遺伝子を含むEPA脂肪酸生合成経路を指す。「複合 $\Delta 6$ デサチュラーゼ/ $\Delta 6$ エロンガーゼ経路」という用語は、最低限、 $\Delta 15$ デサチュラーゼ、 $\Delta 6$ デサチュラーゼ、 $C_{18/20}$ エロンガーゼ、 $\Delta 5$ デサチュラーゼ、および $\Delta 17$ デサチュラーゼの遺伝子を含むEPA脂肪酸生合成経路を指す。最後に「 $\Delta 6$ デサチュラーゼ/ $\Delta 6$ エロンガーゼ経路」という用語は、総称的にあらゆる1個もしくはそれ以上の上述の $\Delta 6$ デサチュラーゼ/ $\Delta 6$ エロンガーゼ経路を指す。

20

【0150】

同様にして、「 $\omega-6 \Delta 9$ エロンガーゼ/ $\Delta 8$ デサチュラーゼ経路」という用語は、最低限、 $\Delta 9$ エロンガーゼ、 $\Delta 8$ デサチュラーゼ、 $\Delta 5$ デサチュラーゼ、および $\Delta 17$ デサチュラーゼの遺伝子を含むEPA脂肪酸生合成経路を指す。「 $\omega-3 \Delta 9$ エロンガーゼ/ $\Delta 8$ デサチュラーゼ経路」という用語は、最低限、 $\Delta 15$ デサチュラーゼ、 $\Delta 9$ エロンガーゼ、 $\Delta 8$ デサチュラーゼ、および $\Delta 5$ デサチュラーゼの遺伝子を含むEPA脂肪酸生合成経路を指す。複合 $\Delta 9$ エロンガーゼ/ $\Delta 8$ デサチュラーゼ経路」という用語は、最低限、 $\Delta 15$ デサチュラーゼ、 $\Delta 9$ エロンガーゼ、 $\Delta 8$ デサチュラーゼ、 $\Delta 5$ デサチュラーゼ、および $\Delta 17$ デサチュラーゼの遺伝子を含むEPA脂肪酸生合成経路を指す。「 $\Delta 9$ エロンガーゼ/ $\Delta 8$ デサチュラーゼ経路」という用語は、総称的にあらゆる1個もしくはそれ以上の上述の $\Delta 9$ エロンガーゼ/ $\Delta 8$ デサチュラーゼ経路を指す。

30

【0151】

「デサチュラーゼ」という用語は、不飽和化できる、すなわち1個もしくはそれ以上の脂肪酸に二重結合を導入して、興味のある脂肪酸または前駆物質を生じさせるポリペプチドを指す。特定の脂肪酸を指すために、本願明細書全体を通じて ω 参照システムを使用するのにもかかわらず、 Δ 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。ここで特に関心が高いのは、1.) 分子のカルボキシル末端から数えて17および18番目の炭素原子間で脂肪酸を不飽和化し、例えばARAからEPAへのおよび/またはDGLAからETAへの変換を触媒する $\Delta 17$ デサチュラーゼ、2.) LAからGLAへのおよび/またはALAからSTAへの変換を触媒する $\Delta 6$ デサチュラーゼ、3.) DGLAからARAへのおよび/またはETAからEPAへの変換を触媒する $\Delta 5$ デサチュラーゼ、4.) DPAからDHAへの変換を触媒する $\Delta 4$ デサチュラーゼ、5.) オレイン酸からLAへの変換を触媒する $\Delta 12$ デサチュラーゼ、6.) LAからALAへのおよび/またはGLAからSTAへの変換を触媒する $\Delta 15$ デサチュラーゼ、7.) EDAからDGLAへのおよび/またはETraからETAへの変換を触媒する $\Delta 8$ 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）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 $\Delta 9$ デサチュラーゼである。

40

50

【0152】

本発明の $\Delta 15$ デサチュラーゼに言及する「二機能」という用語は、ポリペプチドが酵素基質として、オレイン酸およびLAの双方を使用する能力を有することを意味する。同様に本発明の $\Delta 5$ デサチュラーゼに言及する「二機能」という用語は、ポリペプチドが以下を使用する能力を有することを意味する。(1) DGLAおよびETAよりなる群から選択される少なくとも1つの酵素基質、および(2) LAおよびALAよりなる群から選択される少なくとも1つの酵素基質。「酵素基質」とは、ポリペプチドが活性部位で基質に結合し、反応性様式でそれに作用することを意味する。

【0153】

「エロンガーゼ系」という用語は、エロンガーゼ系が作用する脂肪酸基質よりも炭素2個分長い酸を生成する、脂肪酸炭素鎖の伸長に關与する4つの酵素の一揃いを指す。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)ら著、The 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、CO₂および β -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、 β -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、STAからETA、およびEPAからDPAへの変換である。

【0154】

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 β -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およびタイプ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C_{14/16}エロンガーゼは、C₁₄基質(例えばミリスチン酸)を利用し、C_{16/18}エロンガーゼはC₁₆基質(例えばパルミチン酸)を利用し、C_{18/20}エロンガーゼはC₁₈基質(例えばGLA、STA)を利用し、C_{20/22}エロンガーゼはC₂₀基質(例えばEPA)を利用する。同様に $\Delta 9$ 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(それによって例えばC_{16/18}エロンガーゼおよびC_{18/20}エロンガーゼの双方として作用する)ことに留意することは重要である。好ましい実施形態では、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ァイ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最も望ましい。

【0155】

「高親和力エロンガーゼ」または「EL1S」または「ELO1」という用語は、その基質特異性が好ましくはGLAに対するものであるC_{18/20}エロンガーゼを指す(エロンガーゼ反応の生成物がDGLA[すなわち $\Delta 6$ エロンガーゼ])。このようなエロンガーゼの1つについては、国際公開第00/12720号パンフレットで述べられ、ここで配列番号17および18として提供される。しかし出願者らはこの酵素がまた、18:2(LA)および18:3(ALA)に対してもいくらかの活性を有することを示した。したがって配列番号18は、(その $\Delta 6$ エロンガーゼ活性に加えて) $\Delta 9$ エロンガーゼ活性を示す。したがってここで配列番号18として提供されるC_{18/20}エロンガーゼは、本発明で述べられるように $\Delta 6$ デサチュラーゼ/ $\Delta 6$ エロンガーゼ経路内の双方で機能し、そして例えばイソクリシス・ガルバナ(Isochrysis galbana) $\Delta 9$ エロンガーゼ(配列番号50)の代わりとして、 $\Delta 9$ エロンガーゼ/ $\Delta 8$ デサチュラーゼ経路内で機能できると結論された。

【0156】

「EL2S」または「ELO2」という用語は、その基質特異性が、好ましくはGLA

10

20

30

40

50

に対するもの（エロンガーゼ反応の生成物がDGLA）および／またはSTA（エロンガーゼ反応の生成物がSTA）に対するものであるC_{18/20}エロンガーゼを指す。このような1つのエロンガーゼについては、米国特許第6,677,145号明細書で述べられ、ここで配列番号20および21として提供される。

【0157】

「ELO3」という用語は、elo3遺伝子（配列番号66）によってコードされるモルティエラ・アルピナ（*Mortierella alpina*）C_{16/18}脂肪酸エロンガーゼ酵素（ここで配列番号67として提供される）を指す。「YE2」という用語は、ここで配列番号74として提供される遺伝子によってコードされる、ヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）C_{16/18}脂肪酸エロンガーゼ酵素（ここで配列番号75として提供される）を指す。ここで報告されるデータに基づいて、ELO3およびYE2は、どちらもパルミチン酸（16：0）からステアリン酸（18：0）への変換を優先的に触媒する。

10

【0158】

「YE1」という用語は、ここで配列番号77として提供される遺伝子によってコードされる、ヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）C_{14/16}脂肪酸エロンガーゼ酵素（ここで配列番号78として提供される）を指す。ここで報告されるデータに基づいて、YE2はミリスチン酸（14：0）のパルミチン酸（16：0）への変換を優先的に触媒する。

20

【0159】

「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（例えばサチュラーゼまたはエロンガーゼ）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から誘導される経路中の全生成物が含まれる）。

【0160】

「油性」という用語は、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（ウィーテ（Weete）著、「真菌脂質生化学（*Fungal Lipid Biochemistry*）」第2版、Plenum、1980年）。一般にこれらの微生物細胞の油含量は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）著、*Appl. Environ. Microbiol.* 57：419～25頁（1991年））。

30

【0161】

「油性酵母菌」という用語は、油を生成できる酵母菌として分類される微生物を指す。一般に油性微生物の細胞油またはトリアシルグリセロール含量はS字形曲線に従い、脂質濃度は対数増殖後期または定常増殖初期において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）著、*Appl. Environ. Microbiol.* 57：419～25頁（1991年））。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、ヤロウィア（*Yarrowia*）、カンジダ（*Candida*）、ロドトルラ（*Rhodotorula*）、ロドスポリジウム（*Rhodospiridium*）、クリプトコッカス（*Cryptococcus*）、トリコスポロン（*Trichosporon*）、およびリポマイセス（*Lipomyces*）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

【0162】

「発酵性炭素源」という用語は、微生物が代謝してエネルギーを引き出す炭素源を意味する。本発明の典型的な炭素源としては、単糖類、少糖類、多糖類、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、二酸化炭素、メタノール、ホルムアルデヒド、ギ酸、および炭素含有アミンが挙げられるが、これに限定されるものではない。

50

【0163】

ここでの用法では、「単離された核酸断片」は、場合により合成、非天然または修飾ヌクレオチド塩基を含有する一本鎖または二本鎖であるRNAまたはDNAのポリマーを意味する。DNAポリマーの形態の単離された核酸断片は、1個またはそれ以上のcDNA、ゲノムDNAまたは合成DNAの断片を含んでなってもよい。

【0164】

アミノ酸またはヌクレオチド配列の「かなりの部分」とは、当業者による配列の手動評価によって、あるいはBLAST（「基礎的局在性配列検索ツール（Basic Local Alignment Search Tool）」アルトシュール（Altschul）、S. F. ら著、J. Mol. Biol. 215: 403~410頁（1993年））などのアルゴリズムを使用したコンピュータ自動化アラインメントおよび同定によって、遺伝子またはポリペプチドの推定上の同定を得るのに十分なポリペプチドのアミノ酸配列または遺伝子のヌクレオチド配列を含んでなる部分である。推定的にポリペプチドまたは核酸配列が既知のタンパク質または遺伝子に相同的であると同定するためには、一般に10個以上の隣接するアミノ酸または30個以上のヌクレオチド配列が必要である。さらにヌクレオチド配列に関して、20~30個の隣接するヌクレオチドを含んでなる遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプローブを配列依存遺伝子同定法（例えばサザンハイブリダイゼーション）および単離（例えば細菌コロニーまたはバクテリオファージ・プラークの原位置（in situ）ハイブリダイゼーション）において使用してもよい。さらにプライマーを含んでなる特定の核酸断片を得るために、塩基12~15個の短いオリゴヌクレオチドを増幅プライマーとしてPCRで使用してもよい。したがってヌクレオチド配列の「かなりの部分」は、配列を含んでなる核酸断片を特異的に同定および／または単離できるようにする十分な配列を含んでなる。

【0165】

「相補的」と言う用語は、互いにハイブリダイズできるヌクレオチド塩基間の関係について述べるために使用される。例えばDNAについて、アデノシンはチミンに相補的であり、シトシンはグアニンに相補的である。

【0166】

「コドン縮重」とは、コードされるポリペプチドのアミノ酸配列に影響することなく、ヌクレオチド配列の変更を可能にする遺伝コードにおける性質を指す。当業者は、任意のアミノ酸を特定化するためのヌクレオチドコドンの利用において、特定の宿主細胞によって示される「コドンバイアス」を十分承知している。したがって宿主細胞中における改善された発現のために遺伝子を合成する場合、コドン使用頻度が宿主細胞の好ましいコドン使用頻度に近くなるようように、遺伝子をデザインすることが望ましい。

【0167】

「化学的に合成された」とは、DNA配列に関連して構成要素ヌクレオチドが、生体外で（in vitro）構築されたことを意味する。確立した手順を使用してDNAの手動化学合成を達成してもよく、あるいはいくつかの市販の機器の1つを使用して自動化学合成を実施できる。「合成遺伝子」は、当業者に知られた手順を使用して化学的に合成されるオリゴヌクレオチド構成単位から構築できる。これらの構成単位をライゲートしアニールして遺伝子セグメントを形成し、次にそれを酵素的にアセンブルして遺伝子全体を構成する。したがってヌクレオチド配列の最適化に基づいて、最適な遺伝子発現のために遺伝子を調整し、宿主細胞のコドンバイアスを反映させることができる。当業者は、コドン利用が宿主によって好まれるコドンに偏っている場合の遺伝子発現成功の見込みを理解する。好ましいコドンの判定は、配列情報が利用できる宿主細胞から誘導された遺伝子の調査に基づくことができる。

【0168】

「遺伝子」とは特定のタンパク質を発現する核酸断片を指し、それはコード領域を単独で指してもよく、またはコード配列に先行する（5'非コード配列）およびそれに続く（3'非コード配列）制御配列を含んでもよい。「天然遺伝子」とは、自然界にそれ自体の

制御配列と共に見られる遺伝子を指す。「キメラ遺伝子」とは、自然界に共に見られない制御およびコード配列を含んでなる天然遺伝子でないあらゆる遺伝子を指す。したがってキメラ遺伝子は、異なる供給源から誘導される制御配列およびコード配列、あるいは同一供給源から誘導されるが、自然界に見られるのとは異なるやり方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。「内在性遺伝子」とは、生物ゲノムにおいてその天然位置にある天然遺伝子を指す。「外来性」遺伝子とは、遺伝子移入によって宿主生物に導入される遺伝子を指す。外来性遺伝子は、非天然生物に挿入された天然遺伝子、天然宿主内の新しい位置に導入された天然遺伝子、あるいはキメラ遺伝子を含んでなることができる。「導入遺伝子」とは、形質転換手順によってゲノム中に導入された遺伝子である。「コドン最適化遺伝子」とは、そのコドン使用頻度が宿主細胞の好むコドン使用頻度を模倣するようにデザインされた遺伝子である。

10

【0169】

「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。「適切な制御配列」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プロセッ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、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、およびステムループ構造を含んでもよい。

【0170】

「プロモーター」とは、コード配列または機能性RNAの発現を調節できるDNA配列を指す。一般にコード配列は、プロモーター配列に対して3'に位置する。プロモーターは、そっくりそのまま天然遺伝子から誘導されてもよく、あるいは自然界に見られる異なるプロモーターから誘導される異なる要素からなってもよく、あるいは合成DNAセグメントを含んでなってもよい。異なるプロモーターは、異なる組織または細胞タイプ中で、あるいは異なる開発段階において、あるいは異なる環境または生理学的条件に呼応して、遺伝子の発現を導いてもよいことが当業者には理解される。ほとんどの細胞タイプ中でほとんどの場合に遺伝子の発現を引き起こすプロモーターは、一般に「構成的プロモーター」と称される。ほとんどの場合、制御配列のはっきりした境界は完全に画定されていないので、異なる長さのDNA断片が同一のプロモーター活性を有してもよいこともさらに認識される。

20

30

【0171】

「GPATプロモーター」または「GPATプロモーター領域」という用語は、gpatt遺伝子によってコードされるグリセロール-3-リン酸-O-アシルトランスフェラーゼ酵素（E. C. 2. 3. 1. 15）の「ATG」翻訳開始コドンの前にあって、発現に必要な5'上流非翻訳領域を指す。適切なヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）GPATプロモーター領域の例については、米国特許出願第11/225354号明細書で述べられる。

【0172】

「GPDプロモーター」または「GPDプロモーター領域」という用語は、gpd遺伝子によってコードされるグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ酵素（E. C. 1. 2. 1. 12）の「ATG」翻訳開始コドンの前にあって、発現に必要な5'上流非翻訳領域を指す。適切なヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）GPDプロモーター領域の例については、国際公開第2005/003310号パンフレットで述べられる。

40

【0173】

「GPMプロモーター」または「GPMプロモーター領域」という用語は、gpm遺伝子によってコードされるホスホグリセリン酸ムターゼ酵素（E. C. 5. 4. 2. 1）の「ATG」翻訳開始コドンの前にあって、発現に必要な5'上流非翻訳領域を指す。適切なヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）GPMプロモーター領域の例については、国際公開第2005/003310号パンフレットで述べら

50

れる。

【0174】

「FBAプロモーター」または「FBAプロモーター領域」という用語は、fba1遺伝子によってコードされるフルクトースービスリン酸アルドラーゼ酵素（E. C. 4. 1. 2. 13）の「ATG」翻訳開始コドンの前にあって、発現に必要である5'上流非翻訳領域を指す。適切なヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）FBAプロモーター領域の例については、国際公開第2005/049805号パンフレットで述べられる。

【0175】

「FBAINプロモーター」または「FBAINプロモーター領域」という用語は、fba1遺伝子の「ATG」翻訳開始コドンの前にあって発現に必要である5'上流非翻訳領域、ならびにfba1遺伝子のイントロンを有する5'コード領域部分を指す。適切なヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）FBAINプロモーター領域の例については、国際公開第2005/049805号パンフレットで述べられる。

10

【0176】

「GPDINプロモーター」または「GPDINプロモーター領域」という用語は、gpd遺伝子の「ATG」翻訳開始コドンの前にあって発現に必要である5'上流非翻訳領域、ならびにgpd遺伝子のイントロンを有する5'コード領域部分を指す。適切なヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）GPDINプロモーター領域の例については、米国特許出願第11/183664号明細書で述べられる。

20

【0177】

「YAT1プロモーター」または「YAT1プロモーター領域」という用語は、yat1遺伝子によってコードされるアンモニウム輸送体酵素（TC2. A. 49；ジェンバンク（GenBank）登録番号XM_504457）の「ATG」翻訳開始コドンの前にあって、発現に必要である5'上流非翻訳領域を指す。適切なヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）YAT1プロモーター領域の例については、米国特許出願第11/185301号明細書で述べられる。

【0178】

「EXP1プロモーター」または「EXP1プロモーター領域」という用語は、ヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）「YALI0C12034g」遺伝子（ジェンバンク登録番号XM_501745）によってコードされるタンパク質の「ATG」翻訳開始コドンの前にあって、発現に必要である5'上流非翻訳領域を指す。「YALI0C12034g」と、sp|Q12207 S. セレヴィシエ（*Cerevisiae*）非古典的輸出タンパク質2（その機能が、開裂可能なシグナル配列を欠くタンパク質輸出の新規経路に関与する）との顕著な相同性に基づいて、この遺伝子をEXP1と命名されたタンパク質をコードするexp1遺伝子とここで命名する。適切なヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）EXP1プロモーター領域の例は配列番号389として述べられるが、これは本来、制限を意図するものではない。当業者は、EXP1プロモーター配列の正確な境界が完全に画定されていないため、長さが増大または減少したDNA断片が、同一のプロモーター活性を有してもよいことを認識するであろう。

30

40

【0179】

「プロモーター活性」という用語は、プロモーターの転写効率のアセスメントを指す。これは例えば（例えばノーザンブロット法またはプライマー伸長法による）プロモーターからのmRNA転写量の測定によって直接に、またはプロモーターから発現する遺伝子産物量を測定して間接に判定されてもよい。

【0180】

「イントロン」とは、ほとんどの真核生物において、（コード領域、5'非コード領域、または3'非コード領域のいずれかの中の）遺伝子配列中に見られる非コードDNA配

50

列である。それらの全機能は知られていないが、いくつかのエンハンサーは、イントロン中に位置する（ジャコペリ（G i a c o p e l l i ），F. ら著、Gene Expr. 11：95～104頁（2003年））。これらのイントロン配列は転写されるが、mRNAがタンパク質に翻訳される前にmRNA前駆体転写物内から除去される。このイントロン除去プロセスは、イントロンのどちらかの側の配列（エクソン）の自己スプライシングによって起きる。

【0181】

「エンハンサー」という用語は、隣接する真核生物プロモーターからの転写レベルを上昇させ、それによって遺伝子の転写を増大できるシス制御配列を指す。エンハンサーは、数十キロベースのDNAにわたってプロモーターに作用でき、それらが制御するプロモーターに対して5'または3'であることができる。エンハンサーはまた、イントロン内に位置できる。

10

【0182】

「3'非翻訳配列」および「転写ターミネーター」という用語は、コード配列の下流に位置したDNA配列を指す。これには、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が含まれる。ポリアデニル化シグナルは、通常mRNA前駆物質の3'末端へのポリアデニル酸トラクトの付加に影響することで特徴づけられる。3'領域は、転写、RNAプロセッ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できる。

【0183】

20

「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、あるいはそれは一次転写物の転写後プロセッシングから誘導されるRNA配列であるかもしれず、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されることができRNAを指す。「cDNA」とは、mRNAに対して相補的であり、それから誘導される二重鎖DNAを指す。「センスRNA」とは、mRNAを含み、細胞によってタンパク質に翻訳されることができ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、国際出願公開第99/28508号パンフレット）。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、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。

30

【0184】

「作動可能に連結した」という用語は、1つの機能が他方の機能によって影響されるような、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に影響できる（すなわちコード配列がプロモーターの転写調節下にある）場合、それはそのコード配列と作動可能に連結する。コード配列はセンスまたはアンチセンスオリエンテーションで、制御配列に作動可能に連結できる。

40

【0185】

「発現」という用語は、ここでの用法では、本発明の核酸断片から誘導されるセンス（mRNA）またはアンチセンスRNAの転写および安定した蓄積を指す。発現はまた、mRNAのポリペプチドへの翻訳を指してもよい。

【0186】

「成熟」タンパク質とは、転写後処理されたポリペプチド、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を指す。「前駆物質」タンパク質とはmRNA翻訳の一次生成物を指し、すなわちプレおよびプロペプチドは存在したままである。プレおよびプロペプチドは、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）。

50

【0187】

「リコンビナーゼ」という用語は、部位特異的遺伝子組換えを実行して、DNA構造を変更させる酵素を指し、トランスポサゼ、ラムダ組み込み／切除酵素、ならびに部位特異的リコンビナーゼが挙げられる。

【0188】

「リコンビナーゼ部位」または「部位特異的リコンビナーゼ配列」とは、リコンビナーゼが認識して結合するDNA配列を意味する。これは、機能性が維持されてリコンビナーゼ酵素がなおも部位を認識し、DNA配列に結合して2つの隣接するリコンビナーゼ部位間の遺伝子組換えを触媒できるならば、野生型または突然変異リコンビナーゼ部位であってもよいものと理解される。

10

【0189】

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

【0190】

「プラスミド」、「ベクター」、および「カセット」という用語は、細胞の中心的代謝の一部ではない遺伝子を運ぶことが多く、通常環状二本鎖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、あらゆる供給源から誘導され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ず、そこではいくつかのヌクレオチド配列が独自の構成に連結または組換えされ、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。「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。

20

【0191】

「相同的組換え」という用語は、(交差中の)2つのDNA分子間のDNA断片の交換を指す。交換される断片は、2個のDNA分子間で同一ヌクレオチド配列の部位(すなわち「相同性領域」)に挟まれる。「相同性領域」という用語は、相同的組換えに関与する、核酸断片上の互いに相同性を有するひと続きのヌクレオチド配列を指す。効果的な相同的組換えは、一般に長さが少なくとも約10bpである相同性領域で起き、少なくとも約50bpの長さが好ましい。典型的に遺伝子組換えが意図される断片は、標的を定めた遺伝子中断または置換が所望される少なくとも2つの相同性領域を含有する。

30

【0192】

「配列分析ソフトウェア」という用語は、ヌクレオチドまたはアミノ酸配列の分析のために有用なあらゆるコンピュータアルゴリズムまたはソフトウェアプログラムを指す。「配列分析ソフトウェア」は、市販のものでも、あるいは独立して開発されてもよい。典型的な配列分析ソフトウェアとしては、1.) ウィスコンシン州マディソンのジェネティック・コンピュータ・グループ(Genetics Computer Group (GCG) (Madison, WI))からのGCGパッケージプログラム、ウィスコンシン・パッケージ(Wisconsin Package)バージョン9.0、2.) BLASTP、BLASTN、BLASTX(アルトシュール(Altschul)ら著、J. Mol. Biol. 215:403~410頁(1990年))、3.) ウィスコンシン州マディソンのDNASTAR(DNASTAR, Inc. (Madison, WI))からのDNASTAR、4.) ミシガン州アンアバーのジーンコーズ社(Gene Codes Corporation (Ann Arbor, MI))からのシーケンチャー(Sequencher)、および5.) スミスーウォーターマン・アルゴリズムを組み入れたFASTAプログラム(W. R. ピアソン(Pearson)著、Comput. Methods Genome Res. [Proc. Int. Symp.] (1994年)、1992年会議、111~20頁、スハイ、サンドル(Suhai, Sandor

40

50

）編、Plenum、New York, NY）が挙げられるが、これに限定されるものではない。本願明細書の文脈内では、配列分析ソフトウェアを分析のために使用する場合、分析結果は特に断りのない限り、言及されるプログラムの「デフォルト値」に基づくものと理解される。ここでの用法では、「デフォルト値」とは、最初に初期化されるときにソフトウェアに最初にロードされる、あらゆる値またはパラメータの組を意味する。

【0193】

「保存ドメイン」または「モチーフ」という用語は、進化的に関連する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一組のアミノ酸を意味する。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。Δ15 デサチュラーゼ活性を有する真菌タンパク質の徴候であるモチーフは、配列番号405として提供される一方、Δ12 デサチュラーゼ活性を有する真菌タンパク質の徴候であるモチーフは、配列番号406として提供される。

【0194】

ここで使用される標準組換えDNAおよび分子クローニング技術は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. 著、「分子クローニング：実験室マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」第2版、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor, NY (1989年) (以下マニアティス (Maniatis))；シルハビー (Silhavy), T. J.、ベンナン (Bennan), M. L.、およびエンクイスト (Enquist), L. W. 著、「遺伝子融合実験 (Experiments with Gene Fusions)」、Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1984年)；およびオースベル (Ausubel), F. M. 著、「分子生物学現代プロトコル (Current Protocols in Molecular Biology)」、Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscienceによる出版 (1987年) で述べられている。

【0195】

EPA生成に好ましい微生物宿主：ヤロウィア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica)

本出願人らの研究 (ピカタッジョ (Picataggio) ら、国際公開第2004/101757号パンフレット参照) に先だって、油性酵母は、PUFAの生産プラットフォームとして使用するのに適した微生物クラスとして以前に調査されている。典型的に油性酵母として同定された属としては、以下が挙げられるが、これに限定されるものではない。ヤロウィア (Yarrowia)、カンジダ (Candida)、ロドトルラ (Rhodotorula)、ロドスポリジウム (Rhodospiridium)、クリプトコッカス (Cryptococcus)、トリコスポロン (Trichosporon) およびリポミセス (Lipomyces)。より具体的には例示的な油合成酵母として、次が挙げられる。ロドスポリジウム・トルロイデス (Rhodospiridium toruloides)、リポミセス・スターケイ (Lipomyces starkeyi)、L. リポフェラス (lipoferus)、カンジダ・レブカウフィ (Candida revkaufi)、C. プリケリーマ (pulcherrima)、C. トロピカリス (tropicalis)、C. ユチリス (utilis)、トリコスポロン・プランズ (Trichosporon pullans)、T. クタネウム (cutaneum)、ロドトルラ・グルチヌス (Rhodotorula glutinus)、R. グラミニス (graminis)、およびヤロウィア・リポリティカ (Yarrowia

10

20

30

40

50

alipolytica) (以前はカンジダ・リポリチカ (*Candida lipolytica*) として分類された)。

【0196】

油性酵母は、EPAの経済的な商業生産の宿主生物としてのそれらの使用を容易にする、いくつかの性質を有すると見なされる。第1に生物体は自然に油合成および蓄積ができるものとして定義され、そこでは油は、細胞乾燥重量の約25%を超え、より好ましくは細胞乾燥重量の約30%を超え、そして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。第2に高含油量で油性酵母を生育させる技術は、十分に開発されている (例えばEP第0 005 277 B1号明細書; ラトレッジ (*Ratlledge*), C. 著、*Prog. Ind. Microbiol.* 16: 119~206頁 (1982年) 参照)。これらの生物は、過去に多様な目的のために商業的に使用されている。例えばヤロウィア・リポリチカ (*Yarrowia lipolytica*) の様々な株は、歴史的に以下の製造および生産のために使用されている。イソシトレートリアーゼ (DD第259637号明細書); リパーゼ (SU第1454852号明細書、国際公開第2001083773号パンフレット、DD第279267号明細書); ポリヒドロキシアルカノアート (国際公開第2001088144号パンフレット); クエン酸 (RU第2096461号明細書、RU第2090611号明細書、DD第285372号明細書、DD第285370号明細書、DD第275480号明細書、DD第227448号明細書、PL第160027号明細書); エリトリトール (EP第770683号明細書); 2-オキソグルタル酸 (DD第267999号明細書); γ -デカラクトン (米国特許第6, 451, 565号明細書、FR第2734843号明細書); γ -ドデカラクトン (EP第578388号明細書); およびピルビン酸 (特開平09-252790号公報)。

【0197】

油性酵母として分類される生物から、ヤロウィア・リポリチカ (*Yarrowia lipolytica*) がここでの目的で好ましい微生物宿主として選択された。この選択は、 ω -3脂肪酸をTAG画分に組み込める油性株が利用でき、生物が遺伝的操作に適しており、種が以前に食物等級クエン酸の安全食品認定 (米国食品医薬品局に従った「GRAS」) 供給源として使用された知識に基づいた。さらに別の実施形態では、高脂質含量 (パーセント乾燥重量として測定される) および高容量生産性 (g/Lh^{-1} として測定される) を有する野生型株の同定を目的とする予備的研究の結果、最も好ましいのはATCC#20362、ATCC#8862、ATCC#18944、ATCC#76982、および/またはLGAMS (7) 1 (パパニコラオウ (*Papanikolaou*), S., およびアゲリス (*Aggelis*), G. 著、*Bioresour. Technol.* 82 (1): 43~9頁 (2002年)) と命名されたY. リポリチカ (*lipolytica*) 株である

【0198】

国際公開第2004/101757号パンフレットで述べられるように、ヤロウィア・リポリチカ (*Yarrowia lipolytica*) は、以前に ω -3/ ω -6合成経路をコードする遺伝子の導入および発現によって遺伝子改変され、1.3%のARAおよび1.9%のEPAをそれぞれ生成した。より具体的には (ARA合成のための Δ 6デサチュラーゼ、 Δ 5デサチュラーゼ、および高親和力PUFA $C_{18/20}$ エロンガーゼ、またはEPA合成のための Δ 6デサチュラーゼ、 Δ 5デサチュラーゼ、高親和力PUFA $C_{18/20}$ エロンガーゼ、およびコドン最適化 Δ 17デサチュラーゼのどちらかを含んでなる) 2つの異なるDNA発現コンストラクトを別々に形質転換して、酵素オロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ (EC4.1.1.23) をコードするY. リポリチカ (*lipolytica*) 染色体のURA3遺伝子に組み込んだ。適切な基質を供給された宿主細胞のGC分析からは、ARAおよびEPAの生成が検出された。この研究は、 ω -6および ω -3脂肪酸生成のために油性宿主が遺伝子改変される能力のコンセプトの証明を実証するのには適切であったが、総油画分中5%を超えるEPA、より好ましくは総油画分中10%を超えるEPA、さらにより好ましくは総油画分中15~20

10

20

30

40

50

%を超えるEPA、最も好ましくは総油画分中25～30%を超えるEPAの合成を可能にするのに必要な複雑な代謝エンジニアリングを実施できなかった。

【0199】

本願明細書中では、複雑な代謝エンジニアリングが実施されて、(1) EPAの合成および高蓄積を可能にする好ましいデサチュラーゼおよびエロンガーゼが同定され、(2) オメガ脂肪酸の貯蔵脂質プール(すなわちトリアシルグリセロール画分)内への転移を可能にするアシルトランスフェラーゼ活性が操作され、(3) 強力プロモーター、マルチコピー発現、および/またはコドン最適化の使用によって、デサチュラーゼ、エロンガーゼ、およびアシルトランスフェラーゼが過剰発現され、(4) EPAの全体的蓄積を減少させるPUFA生合成経路内の特定遺伝子の発現がダウンレギュレートされ、(5) EPA生成に影響する経路および包括的制御因子が操作される。代謝エンジニアリングのこれらの各態様、ならびにこの油性酵母中でのEPA生産性をさらに増強する発酵方法について下で述べる。

10

【0200】

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答えて誘発される。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。例えばパルミチン酸は、 $\Delta 9$ デサチュラーゼの作用によってその不飽和誘導体[パルミトリン酸(16:1)]に変換される。同様にパルミチン酸は、 $C_{16/18}$ 脂肪酸エロンガーゼによって延長されてステアリン酸(18:0)が形成し、それは $\Delta 9$ デサチュラーゼによってその不飽和誘導体に変換され、それによってオレイン(18:1)酸を生じることができる。

20

【0201】

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.) リゾホスファチジン酸を生じる、アシルトランスフェラーゼによるアシル-CoAの1分子のグリセロール-3-リン酸塩へのエステル化、2.) 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)を生じる、アシルトランスフェラーゼによるアシル-CoAの第2の分子のエステル化、3.) 1,2-ジアシルグリセロール(DAG)を生じる、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、および4.) TAGを形成する、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(図2)。

30

【0202】

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。アシルトランスフェラーゼによってTAGに組み込むことができる脂肪酸の制限を意図しない例のいくつかとしては、カプリン(10:0)、ラウリン(12:0)、ミリスチン(14:0)、パルミチン(16:0)、パルミトリン(16:1)、ステアリン(18:0)、オレイン(18:1)、バクセン(18:1)、LA、エレオステアリン酸(18:3)、ALA、GLA、アラキジン酸(20:0)、EDA、ETra、DGLA、ETA、ARA、EPA、ベヘン酸(22:0)、DPA、DHA、リグノセリン(24:0)、ネルボン(24:1)、セロチン(26:0)、およびモンタン(28:0)脂肪酸が挙げられる。本発明の好ましい実施形態では、TAGへのEPAの組み込みが最も望ましい。

40

【0203】

ω -3脂肪酸であるEPAの生合成

オレイン酸がEPA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

50

うに、EPA生成のための複数の代案の経路が存在する。

【0204】

具体的には、全ての経路は、 $\Delta 12$ デサチュラーゼの作用によるオレイン酸から第1の $\omega-6$ 脂肪酸であるLA (18:2) への初期変換を必要とする。次にEPA生合成のための「 $\omega-6$ $\Delta 6$ デサチュラーゼ/ $\Delta 6$ エロンガーゼ経路」を使用し（それによって主として $\omega-6$ 脂肪酸の形成を通じてEPA生合成が起きる）、PUFAが次のようにして形成される。（1） $\Delta 6$ デサチュラーゼの作用によってLAがGLAに変換される、（2） $C_{18/20}$ エロンガーゼの作用によってGLAがDGLAに変換され、（3） $\Delta 5$ デサチュラーゼの作用によってDGLAがARAに変換され、（4） $\Delta 17$ デサチュラーゼの作用によってARAがEPAに変換される。代案としては、主として「 $\omega-3$ $\Delta 6$ デサチュラーゼ/ $\Delta 6$ エロンガーゼ経路」を通じた $\omega-3$ 脂肪酸の形成を通じてEPA生合成が起きる場合、（1） $\Delta 15$ デサチュラーゼの作用によってLAが第1の $\omega-3$ 脂肪酸であるALAに変換され、（2） $\Delta 6$ デサチュラーゼの作用によってALAがSTAに変換され、（3） $C_{18/20}$ エロンガーゼの作用によってSTAがETAに変換され、（4） $\Delta 5$ デサチュラーゼの作用によってETAがEPAに変換される。場合により $\Delta 17$ デサチュラーゼの作用によってDGLAからETAが生成する場合、または $\Delta 6$ デサチュラーゼ、 $C_{18/20}$ エロンガーゼ、および $\Delta 5$ デサチュラーゼと併せて、 $\Delta 15$ デサチュラーゼおよび $\Delta 17$ デサチュラーゼの双方が同時発現される場合のどちらかで、EPA生成に先だって $\omega-6$ および $\omega-3$ 脂肪酸の組み合わせを合成できる。

10

【0205】

EPA生合成の代案の経路は、 $\Delta 9$ エロンガーゼおよび $\Delta 8$ デサチュラーゼを利用する。より具体的には、「 $\omega-6$ $\Delta 9$ エロンガーゼ/ $\Delta 8$ デサチュラーゼ経路」を通じて、 $\Delta 9$ エロンガーゼの作用によってLAがEDAに変換され、次に $\Delta 8$ デサチュラーゼがEDAをDGLAに変換する。引き続く $\Delta 5$ デサチュラーゼの作用によるDGLA不飽和化からは、上述のようにARAが生じ、そこでARAは $\Delta 17$ デサチュラーゼの作用によって直接にEPAに変換できる。対照的に「 $\omega-3$ $\Delta 9$ エロンガーゼ/ $\Delta 8$ デサチュラーゼ経路」を使用して、 $\Delta 15$ デサチュラーゼの作用によってLAが最初にALAに変換される。次に $\Delta 9$ エロンガーゼの作用によってALAがETraに変換され、それにETraをETAに変換する $\Delta 8$ デサチュラーゼが続く。引き続く $\Delta 5$ デサチュラーゼの作用によるETAの不飽和化によって、EPAが生じる。

20

30

【0206】

分かりやすくするために、これらの各経路ならびにそれらの際立った特性を下の表に要約する。

【0207】

【表 1 1】

表 4
EPA 生合成のための代案の生合成経路

名称	EPA のために 最低限必要な 遺伝子*	経路
ω -6 Δ 6 デサチュラーゼ/ Δ 6 エロンガーゼ経路	Δ 6D, C _{18/20} ELO, Δ 5D, Δ 17D	PUFA 生成物の ω -3/ ω -6 比を改善する
ω -3 Δ 6 デサチュラーゼ/ Δ 6 エロンガーゼ経路	Δ 15D, Δ 6D, C _{18/20} ELO, Δ 5D	引き続き PUFA 生合成のために基質の ω -3/ ω -6 比を改善し、GLA を欠く油を 生成する
複合 Δ 6 デサチュラーゼ/ Δ 6 エロンガーゼ経路	Δ 15D, Δ 6D, C _{18/20} ELO, Δ 5D, Δ 17D	—
ω -6 Δ 9 エロンガーゼ/ Δ 8 デサチュラーゼ経路	Δ 9ELO, Δ 8D, Δ 5D, Δ 17D	PUFA 生成物の ω -3/ ω -6 比を改善する
ω -3 Δ 9 エロンガーゼ/ Δ 8 デサチュラーゼ経路	Δ 15D, Δ 9 ELO, Δ 8D, Δ 5D	引き続き PUFA 生合成のために基質の ω -3/ ω -6 比を改善し、GLA を欠く油を 生成する
複合 Δ 9 エロンガーゼ/ Δ 8 デサチュラーゼ経路	Δ 15D, Δ 9 ELO, Δ 8D, Δ 5D, Δ 17D	—

* 略語:「D」= デサチュラーゼ、「ELO」= エロンガーゼ

【0 2 0 8】

所望ならば、基質として EPA を使用していくつかのその他の PUFA を生成できる。例えば C_{20/22} エロンガーゼおよび Δ 4 デサチュラーゼの作用によって、EPA をさらに DHA に変換できる。

【0 2 0 9】

EPA 合成のための微生物遺伝子の選択

EPA 生成のためにヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) に導入することが必要な特定の機能性は、宿主細胞（およびその天然 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）、基質の入手可能性、および所望の最終産物に左右されることが考察される。天然宿主細胞について、Y. リポリティカ (*lipolytica*) は 18:2 脂肪酸を自然に生成し、したがって天然 Δ 12 デサチュラーゼ（配列番号 23 および 24、国際公開第 2004/104167 号パンフレット参照）を有することが知られている。所望の最終産物については、 Δ 9 エロンガーゼ／ Δ 8 デサチュラーゼ経路の発現結果に対立するものとして、 Δ 6 デサチュラーゼ／ Δ 6 エロンガーゼ経路の発現結果が、このようにして生成された油の最終脂肪酸プロフィールとして上に記述されている（すなわち高 EPA 油の最終組成中の % GLA）。

【0 2 1 0】

したがっていくつかの実施形態では、 Δ 6 デサチュラーゼ／ Δ 6 エロンガーゼ経路を通じて EPA を生成することが望ましい。したがって EPA 生合成のために、最低限、 Δ 6 デサチュラーゼ、C_{18/20} エロンガーゼ、 Δ 5 デサチュラーゼ、および Δ 17 デサチュラーゼまたは Δ 15 デサチュラーゼのどちらか（または双方）の遺伝子を宿主生物に導入して発現させなくてはならない。さらに好ましい実施形態では、宿主株は、 Δ 9 デサチュラ

ーゼ、 $\Delta 12$ デサチュラーゼ、 $C_{14/16}$ エロンガーゼ、および $C_{16/18}$ エロンガーゼの少なくとも1つをさらに含む。

【0211】

代案の実施形態では、GLAの同時合成なしにEPAを生成することが望ましい（したがって $\Delta 9$ エロンガーゼ/ $\Delta 8$ デサチュラーゼ経路の発現を要する）。その結果、この戦略は、EPA生合成のために、最低限、 $\Delta 9$ エロンガーゼ、 $\Delta 8$ デサチュラーゼ、 $\Delta 5$ デサチュラーゼ、および $\Delta 17$ デサチュラーゼまたは $\Delta 15$ デサチュラーゼのどちらか（または双方）の遺伝子を宿主生物に導入して発現することを要する。さらに好ましい実施形態では、宿主株は、 $\Delta 9$ デサチュラーゼ、 $\Delta 12$ デサチュラーゼ、 $C_{14/16}$ エロンガーゼ、および $a C_{16/18}$ エロンガーゼの少なくとも1つをさらに含む。

10

【0212】

当業者は、EPA生合成のために所望される各酵素をコードする、様々な候補遺伝子を同定できるであろう。有用なデサチュラーゼおよびエロンガーゼ配列はあらゆる供給源に由来してもよく、例えば天然供給源（細菌、藻類、真菌、植物、動物などから）から単離され、半合成経路によって生成され、または新規（*de novo*）合成される。宿主中に導入されるデサチュラーゼおよびエロンガーゼ遺伝子の特定の供給源は本発明にとって重大でないが、デサチュラーゼまたはエロンガーゼ活性を有する特異的ポリペプチド選択のための配慮としては以下が挙げられる。1.) ポリペプチドの基質特異性、2.) ポリペプチドまたはその構成要素が律速酵素であるかどうか、3.) デサチュラーゼまたはエロンガーゼが所望のPUFA合成に必須であるかどうか、および/または4.) ポリペ

20

【0213】

追加的实施形態では、特定の各デサチュラーゼおよび/またはエロンガーゼの変換効率を考慮することもまた有用であろう。より具体的には、各酵素が基質を生成物に変換するのに100%の効率で機能することは稀なので、宿主細胞中に生成される未精製油の最終脂質プロファイルは、典型的に（例えば100%のEPA油とは対照的に）所望のEPAならびに様々な上流中間PUFAからなる様々なPUFAの混合物である。したがってEPA生合成を最適化するのに際し、各酵素の変換効率の配慮もまた重要な変数であり、生成物の最終所望の脂質プロファイルの観点から考慮しなくてはならない。

30

【0214】

上の各考慮を念頭に置いて、公的に入手できる文献（例えばジェンバンク）、特許文献、およびPUFAを生成する能力を有する微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を有する候補遺伝子を同定できる。例えば以下のジェンバンク登録番号は、EPA生合成に有用な公的に入手できる遺伝子の例を指す。AY131238、Y055118、AY055117、AF296076、AF007561、L11421、NM_031344、AF465283、AF465281、AF110510、AF465282、AF419296、AB052086、AJ250735、AF126799、AF126798（ $\Delta 6$ デサチュラーゼ）；AF199596、AF226273、AF320509、AB072976、AF489588、AJ510244、AF419297、AF07879、AF067654、AB022097（ $\Delta 5$ デサチュラーゼ）；AAG36933、AF110509、AB020033、AAL13300、AF417244、AF161219、AY332747、AAG36933、AF110509、AB020033、AAL13300、AF417244、AF16

40

50

1219、X86736、AF240777、AB007640、AB075526、AP002063（ $\Delta 12$ デサチュラーゼ）；NP__441622、BAA18302、BAA02924、AAL36934（ $\Delta 15$ デサチュラーゼ）；AF338466、AF438199、E11368、E11367、D83185、U90417、AF085500、AY504633、NM__069854、AF230693（ $\Delta 9$ デサチュラーゼ）；AF390174（ $\Delta 9$ エロンガーゼ）；AF139720（ $\Delta 8$ デサチュラーゼ）；およびNP__012339、NP__009963、NP__013476、NP__599209、BAB69888、AF244356、AAF70417、AAF71789、AF390174、AF428243、NP__955826、AF206662、AF268031、AY591335、AY591336、AY591337、AY591338、AY605098、AY605100、AY630573（ $C_{14/16}$ 、 $C_{16/18}$ 、および $C_{18/20}$ エロンガーゼ）。同様に特許文献は、PUFA生成に関与する多くの追加的な遺伝子のDNA配列（および／または上のいくつかの遺伝子およびそれらの単離方法に関する詳細）を提供する〔例えば国際公開第02/077213号パンフレット（ $\Delta 9$ エロンガーゼ）；国際公開第00/34439号パンフレットおよび国際公開第04/057001号パンフレット（ $\Delta 8$ デサチュラーゼ）；米国特許第5,968,809号明細書（ $\Delta 6$ デサチュラーゼ）；米国特許第5,972,664号明細書および米国特許第6,075,183号明細書（ $\Delta 5$ デサチュラーゼ）；国際公開第94/11516号パンフレット、米国特許第5,443,974号明細書、国際公開第03/099216号パンフレット、および国際公開第05/047485号パンフレット（ $\Delta 12$ デサチュラーゼ）；国際公開第93/11245号パンフレット（ $\Delta 15$ デサチュラーゼ）；国際公開第91/13972号パンフレットおよび米国特許第5,057,419号明細書（ $\Delta 9$ デサチュラーゼ）；米国特許出願公開第2003/0196217 A1号明細書（ $\Delta 17$ デサチュラーゼ）；および国際公開第00/12720号パンフレット、米国特許第6,403,349号明細書、米国特許第6,677,145号明細書、米国特許出願公開第2002/0139974 A1号明細書、米国特許出願公開第2004/0111763号明細書（ $C_{14/16}$ 、 $C_{16/18}$ 、および $C_{18/20}$ エロンガーゼ）〕。これらの各特許および出願は、引用することによりそれらの内容全体を本願明細書に編入する。

【0215】

上の例は制限を意図するものではなく、異なる供給源に由来する（1） $\Delta 6$ デサチュラーゼ、 $C_{18/20}$ エロンガーゼ、 $\Delta 5$ デサチュラーゼ、および $\Delta 17$ デサチュラーゼまたは $\Delta 15$ デサチュラーゼのどちらか（または双方）（そして場合により $\Delta 9$ デサチュラーゼ、 $\Delta 12$ デサチュラーゼ、 $C_{14/16}$ エロンガーゼおよび／または $C_{16/18}$ エロンガーゼをコードするその他の遺伝子）、または（2） $\Delta 9$ エロンガーゼ、 $\Delta 8$ デサチュラーゼ、 $\Delta 5$ デサチュラーゼ、および $\Delta 17$ デサチュラーゼまたは $\Delta 15$ デサチュラーゼのどちらか（または双方）（そして場合により $\Delta 9$ デサチュラーゼ、 $\Delta 12$ デサチュラーゼ、 $C_{14/16}$ エロンガーゼおよび／または $C_{16/18}$ エロンガーゼをコードするその他の遺伝子）をコードする多数のその他の遺伝子が、ヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）中への導入に適する。

【0216】

EPA合成のために好ましい遺伝子

しかしヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）中での発現に適することができるデサチュラーゼおよびエロンガーゼの幅広い選択にも関わらず、本発明の好ましい実施形態では、デサチュラーゼおよびエロンガーゼは以下（またはその誘導体）から選択される。

【0217】

【表 1 2】

表 5

ヤロウィア・リポリティカにおける EPA 生合成のために好ましい
デサチュラーゼおよびエロンガーゼ

ORF	生物	参考文献	配列番号
Δ6 デサチュラーゼ	モルティエラ・アルピナ	ジェンバンク登録番号 AF465281、 米国特許第 5,968,809 号明細書	1,2
Δ6 デサチュラーゼ	モルティエラ・アルピナ	ジェンバンク登録番号 AB070555	4,5
C _{18/20} エロンガーゼ (「ELO1」)	モルティエラ・アルピナ	ジェンバンク登録番号 AX464731、 国際公開第 00/12720 号 パンフレット	17,18
C _{18/20} エロンガーゼ (「ELO2」)	スラウストキトリウム・ アウレウム	米国特許第 6,677,145 号明細書	20,21
Δ9 エロンガーゼ	イソクリシス・ガルバナ	ジェンバンク登録番号 AF390174	49,50
Δ8 デサチュラーゼ	ミドリムシ	同時係属米国特許出願 第 11/166993 号	57,58
Δ5 デサチュラーゼ	モルティエラ・アルピナ	ジェンバンク登録番号 AF067654、 米国特許第 6,075,183 号明細書	6,7
Δ5 デサチュラーゼ	イソクリシス・ガルバナ	国際公開 第 02/081668 A2 号パンフレット	8,9
Δ5 デサチュラーゼ	ヒト	ジェンバンク登録番号 NP_037534	11,12
Δ5/Δ6 デサチュラーゼ	ゼブラフィッシュ	ジェンバンク登録番号 AF309556	369, 370
Δ5/Δ6 デサチュラーゼ	ゼブラフィッシュ	ジェンバンク登録番号 BC068224	371
Δ5/Δ6 デサチュラーゼ	ゼブラフィッシュ	—	372, 373
Δ17 デサチュラーゼ	サブロレグニア・ ディクリナ	米国特許出願公開第 2003/0196217 A1 号明細書	14,15

10

20

30

【0 2 1 8】

【表 1 3】

C _{16/18} エロンガーゼ (「YE2」)	ヤロウィア・リポリティカ	—	74, 75
C _{16/18} エロンガーゼ (「ELO3」)	モルティエラ・アルピナ	—	66, 67
C _{16/18} エロンガーゼ (rELO2)	ドブネズミ	ジェンバンク登録番号 AB071986	63, 64
C _{14/16} エロンガーゼ (「YE1」)	ヤロウィア・ リポリティカ	—	77,78
Δ 12 デサチュラーゼ	ヤロウィア・ リポリティカ	国際公開 第 2004/104167 号パンフレット	23,24
Δ 12 デサチュラーゼ	モルティエラ・イザベリナ	ジェンバンク登録番号 AF417245	25,26
Δ 12 デサチュラーゼ (Fm d12)	フザリウム・ モニリフォルメ	国際公開 第 2005/047485 号パンフレット	27,28
Δ 12 デサチュラーゼ (An d12)	アスペルギルス・ ニデュランス	A.ニデュランス(nidulans)ゲノム プロジェクト中のコンティグ 1.15 (scaffold 1)、AAG36933、 国際公開 第 2005/047485 号パンフレット	29,30
Δ 12 デサチュラーゼ	黄色コウジ菌 (<i>Aspergillus flavus</i>)	ジェンバンク登録番号 AY280867 (VERSION AY280867.1.gi: 30721844)、国際公開 第 2005/047485 号パンフレット	31
Δ 12 デサチュラーゼ (Afd12p)	アスペルギルス・ フミガーツス	アスペルギルス・フミガーツスゲノム プロジェクト中の AFA.133c344248: 345586 逆転(AfA5C5.001c)、 国際公開 第 2005/047485 号パンフレット	32
Δ 12 デサチュラーゼ (Mg d12)	マグナポルテ・ グリセア	M.グリセア(grisea)ゲノムプロジェクト 中のコンティグ 2.375 中の遺伝子座 MG01985.1、国際公開 第 2005/047485 号パンフレット	33,34
Δ 12 デサチュラーゼ (Ncd12)	ニューロスボラ・ クラッサ	ジェンバンク登録番号 AABX01000374、国際 公開第 2005/047485 号パンフレット	35、36
Δ 12 デサチュラーゼ (Fg d12)	フザリウム・ グラミネアリウム	F.グラミネアリウム(graminearium) ゲノムプロジェクト中のコンティグ 1.233、国際公開 第 2005/047485 号パンフレット	37,38
Δ 12 デサチュラーゼ (Mad12)	モルティエラ・ アルピナ	ジェンバンク登録番号 AB020033	374,375
Δ 12 デサチュラーゼ (Skd12)	サッカロミセス・ クリヴェリ	ジェンバンク登録番号 BAD08375	376
Δ 12 デサチュラーゼ (Kld12p)	クリヴェロミセス・ ラクチス	「酵母菌プロジェクト・ジェノレビュー」 (バイオインフォマティクス・センター、 LaBRI、フランス国タランスセデックス) の K.ラクチスデータベースの <u>Klla0B: 35614..36861</u> アンチセンス(m)からの gnl GLV KLLA0B00473g ORF	377,378

【表 1 4】

Δ 12 デサチュラーゼ (Cad12p)	カンジダ・アルビカンズ	ジェンバンク登録番号 EAK94955	379
Δ 12 デサチュラーゼ (Dhd12p)	デバリオミセス・ハンセ ニ CBS767	ジェンバンク登録番号 CAG90237	380
Δ 15 デサチュラーゼ (Fm d15)	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	39,40
Δ 15 デサチュラーゼ (An d15)	アスペルギルス・ ニデュランス	A.ニデュランス (nidulans) ゲノム プロジェクト中のコンティグ 1.122 (scaffold 9)、国際公開 第 2005/047479 号パンフレット	41,42
Δ 15 デサチュラーゼ (Mg d15)	マグナポルテ・グリセア	M.グリセア (grisea) ゲノムプロジェクト 中のコンティグ 2.1597 中の遺伝子座 MG08474.1、国際公開 第 2005/047479 号パンフレット	43,44
Δ 15 デサチュラーゼ (Nc d15)	ニューロスポラ・クラッサ	ジェンバンク登録番号 AABX01000577、国際公開 第 2005/047479 号パンフレット	45,46
Δ 15 デサチュラーゼ (Fg d15)	フザリウム・ グラミネアリウム	F.グラミネアリウム (graminearium) ゲノムプロジェクト中のコンティグ 1.320 (BAA33772.1)、 国際公開 第 2005/047479 号パンフレット	47,48
Δ 15 デサチュラーゼ (Mad15)	モルティエラ・アルピナ	ジェンバンク登録番号 AB182163	381,382
Δ 15 デサチュラーゼ (Kld15p)	クリヴェロミセス・ラクチス	ジェンバンク登録番号 XM_451551	383,384
Δ 15 デサチュラーゼ (Cad15p)	カンジダ・アルビカンズ	ジェンバンク登録番号 EAL03493	385
Δ 15 デサチュラーゼ (Skd15)	サッカロミセス・クリヴェリ	ジェンバンク登録番号 BAD11952	386
Δ 15 デサチュラーゼ (Dhd15p)	デバリオミセス・ハンセニ CBS767	ジェンバンク登録番号 CAG88182	387
Δ 15 デサチュラーゼ (Afd15p)	アスペルギルス・ フミガーツス	ジェンバンク登録番号 EAL85733	388

* 注記: アスペルギルス・フミガーツスゲノムプロジェクトは、サンガー・インスティテュート (Sanger Institute) と、マンチェスター大学 (University of Manchester) 内の協力者と、ゲノム研究所 (Institute of Genomic Research, TIGR) によって資金援助される。A.ニデュランス (nidulans) ゲノムプロジェクトは、マサチューセッツ州ケンブリッジのゲノム研究センター (Center for Genome Research, CGR (Cambridge, MA)) によって資金援助される。M.グリセア (grisea) ゲノムプロジェクトは、CGR および国際イネいもち病ゲノムコンソーシアム (International Rice Blast Genome Consortium) によって資金援助される。F.グラミネアリウム (graminearium) ゲノムプロジェクトは、CGR および国際ジベレラ・ゼアエゲノムコンソーシアム (International Gibberella zeae Genome Consortium, IGGR) によって資金援助される。

【0 2 2 0】

本出願人らは様々なエロンガーゼの多数の分析を実施して、ヤロウィア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) 中で発現する際の各酵素の基質特異性および／または基質選択性を判定または確認した。例えば 2 つの Y. リポリティカ (lipolytica) エロンガーゼのコード配列は公的に入手でき、各タンパク質は推定上の長鎖脂肪酸アシルエロンガーゼとして注釈され、またはその他の脂肪酸エロンガーゼと顕著な相同性を共有しているが、これらの酵素の基質特異性はいまだかつて判定されていない。ここで実施した分析に基づいて、Y E 1 は基質として C₁₄ 脂肪酸を優先的に使用して C₁₆ 脂肪酸を生成する脂肪酸エロンガーゼ (すなわち C_{14/16} エロンガーゼ) であると判定

され、YE2は基質としてC₁₆脂肪酸を優先的に使用してC₁₈脂肪酸を生成する脂肪酸エロンガーゼ（すなわちC_{16/18}エロンガーゼ）であると判定された。同様に新規M. アルピナ（alpina）ELO3遺伝子の同定に際して、配列はその他の脂肪酸エロンガーゼに相同的であると特性決定された。しかしC_{16/18}エロンガーゼとしてのELO3の特性を確認するために、脂質プロファイルの分析が必要であった。

【0221】

Δ12デサチュラーゼについて、本出願人らはY. リポリティカ（lipolytica）中で18:2を生成する際に、フザリウム・モニリフォルメ（Fusarium moniliforme）Δ12デサチュラーゼ（配列番号27によってコードされる）が、天然ヤロウィア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）Δ12デサチュラーゼよりも高い効率で機能するという意外な発見をした（国際公開第2005/047485号パンフレット参照）。具体的には、TEFプロモーター制御下にあるY. リポリティカ（lipolytica）Δ12デサチュラーゼをコードするキメラ遺伝子の発現によって以前得られた（LAの生成物蓄積59%）よりも、Y. リポリティカ（lipolytica）中でTEFプロモーター制御下にあるF. モニリフォルメ（moniliforme）Δ12デサチュラーゼの発現が、高いレベルの18:2を生成する（LAの生成物蓄積68%）と判定された。これはそれぞれ85%対74%の%基質変換（ $([18:2+18:3] / [18:1+18:2+18:3]) \times 100$ として計算される）の差に相当する。これらの結果に基づいて、Y. リポリティカ（lipolytica）の高EPA生成株を操作する手段として、本真菌F. モニリフォルメ（moniliforme）Δ12デサチュラーゼの発現は、その他の知られているΔ12デサチュラーゼよりも好ましい（しかし当業者は、例えばコドン最適化に続いてY. リポリティカ（lipolytica）中でF. モニリフォルメ（moniliforme）Δ12デサチュラーゼの活性が増強できることを期待するであろう）。

【0222】

代案としては、最近、ヤロウィア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）において、おそらく改善された効率で機能する5つの新しいΔ12デサチュラーゼが同定されている。具体的には、サッカロミセス・クリヴェリ（Saccharomyces kluyveri）Δ12デサチュラーゼ（ジェンバンク登録番号BAD08375）についてワタナベ（Watanabe）ら著、Biosci. Biotech. Biochem. 68（3）：721～727頁（2004年）で述べられているのに対し、モルティエラ・アルピナ（Mortierella alpina）（ジェンバンク登録番号AB182163）からのものについてはサクラダニ（Sakuradani）ら著、Eur. J. Biochem. 261（3）：812～820頁（1999年）で述べられる。これらの配列および下述の方法を使用して、以下の3つの追加的Δ12デサチュラーゼがここで本出願人らによって同定された。クリヴェロミセス・ラクチス（Kluyveromyces lactis）gnl|GLV|KLLA0B00473gORF（配列番号378）、カンジダ・アルビカンス（Candida albicans）ジェンバンク登録番号EAK94955（配列番号379）、およびデバリオミセス・ハンセニ（Debaryomyces hansenii）CBS767ジェンバンク登録番号CAG90237（配列番号380）。ヤロウィア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）におけるこれらの追加的Δ12デサチュラーゼのいずれかの過剰発現は、LA生成を増大させる手段として有用であることができ、それによってその他の下流PUFA（例えばEPA）の生成増大を可能にする。

【0223】

別の好ましい実施形態では、F. モニリフォルメ（moniliforme）（配列番号39および40）は以前から知られているΔ15デサチュラーゼと比べていくつかのユニークな特性を有するので、この特定のΔ15デサチュラーゼは、ALA生成を増大させる好ましいΔ15デサチュラーゼである。第一に、F. モニリフォルメ（moniliforme）Δ15デサチュラーゼは、その顕著なΔ12デサチュラーゼ活性によって区別

される（したがって酵素を二機能として特徴づける）。以前の研究では、配列番号40をコードするキメラ遺伝子で形質転換されたヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）の $\Delta 12$ デサチュラーゼ中断株が、96%のLAをALAに変換（%基質変換は $[18:3] / [18:2 + 18:3] \times 100$ として計算される）したのに加えて、24%のオレイン酸をLAに変換できた（%基質変換は $([18:2 + 18:3] / [18:1 + 18:2 + 18:3]) \times 100$ として計算される）と判定されている。第二に、F. モニリフォルメ（*moniliforme*） $\Delta 15$ デサチュラーゼは、Y. リポリティカ（*lipolytica*）中で発現すると、その他の異種発現された $\Delta 15$ デサチュラーゼについて述べられたものと比べて（例えば非油性酵母サッカロミセス・セレヴィシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）中でC. エレガンス（*elegans*） $\Delta 15$ デサチュラーゼを発現した際のALA%生成物蓄積はわずか4.1%であった（ミーサピオドスク（*Meesapyodsuk*）ら著、*Biochem.* 39:11948~11954頁（2000年））、ALAの非常に高い合成を可能にする〔すなわち配列番号40をコードするキメラ遺伝子で形質転換されたY. リポリティカ（*lipolytica*）は、形質転換宿主細胞において、全脂肪酸に対して31%のALA%生成物蓄積を実証でき、それは83%のALA変換効率に等しい（ $[18:3] / [18:2 + 18:3] \times 100$ として計算される）〕一方、アブラナ（*B. napus*） $\Delta 15$ デサチュラーゼをS. セレヴィシエ（*cerevisiae*）中で発現させると、ALAの%生成物蓄積はわずか1.3%であった（リード（*Reed*），D. W. 著、*Plant Physiol.* 122:715~720頁（2000年））。最後に、F. モニリフォルメ（*moniliforme*） $\Delta 15$ 酵素は、下流の18:2の ω -6誘導体に対して比較的幅広い基質特異性を有する。具体的には $\Delta 15$ デサチュラーゼは、GLAからSTA、DGLAからETA、およびARAからEPAへの変換を触媒できる。

【0224】

好ましい $\Delta 15$ デサチュラーゼとしての現行のF. モニリフォルメ（*moniliforme*） $\Delta 15$ 酵素の同定にもかかわらず、最近、ヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）において、おそらく改善された効率で機能できる新しい6つの $\Delta 15$ デサチュラーゼが同定されている。具体的には、サッカロミセス・クリヴェリ（*Saccharomyces kluyveri*） $\Delta 15$ デサチュラーゼ（ジェンバンク登録番号BAD11952、Skd15）についてオオウラ（*Oura*）ら著、*Microbiol.* 150:1983~1990頁（2004年）で述べられる一方、モルティエラ・アルピナ（*Mortierella alpina*）（ジェンバンク登録番号AB182163、Mad15）からのものについてはサクラダニ（*Sakurada ni*）ら著、「*Appl. Microbiol. Biotechnol.*」66:648~654頁（2005年）で述べられる。どちらの配列もそれぞれ以前同定されたS. クリヴェリ（*kluyveri*）およびM. アルピナ（*alpina*） $\Delta 12$ デサチュラーゼに対するそれらの近い相同性に基づいて部分的に同定され、それらの機能活性の決定がそれに続いたので、これらの2対のタンパク質は、フザリウム・モニリフォルメ（*Fusarium moniliforme*）、アスペルギルス・ニデュランス（*Aspergillus nidulans*）、マグナポルテ・グリセア（*Magnaporthe grisea*）、ニューロスボラ・クラッサ（*Neurospora crassa*）、およびフザリウム・グラミネアリウム（*Fusarium graminearum*）（上の表参照）のものと同様に、近縁関係にある真菌 $\Delta 12$ および $\Delta 15$ デサチュラーゼの追加的な例を提供した。この発見は、真菌 $\Delta 12$ デサチュラーゼ様配列の「対」が、 $\Delta 15$ デサチュラーゼ活性を有する1つのタンパク質および $\Delta 12$ デサチュラーゼ活性を有する1つのタンパク質を含んでなると思われるという本出願人らの以前の仮説（国際公開第2005/047480号パンフレットおよび国際公開第2005/047485号パンフレット参照）に追加的な支持を提供した。このようにして同様の $\Delta 12$ デサチュラーゼ様タンパク質の「対」が、クリヴェロミセス・ラクチス（*Kluyveromyces*

lactis)、カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*)、デバリオミセス・ハンセニ (*Debaryomyces hansenii*) CBS767、およびアスペルギルス・フミガーツス (*Aspergillus fumigatus*) においてここで同定され、予測されたように各対の1つのメンバーは以前同定された *S. クリヴェリ* (*kluyveri*) $\Delta 12$ デサチュラーゼ (*Skd12*) により近く整列し、およびもう1つは *Skd15* により近く整列した (図3A)。したがってこの分析に基づいて、本出願人らは、*K. ラクチス* (*lactis*) ジェンバンク登録番号 XM_451551、*D. ハンセニ* (*hansenii*) CBS767 ジェンバンク登録番号 CAG88182、*C. アルビカンス* (*albicans*) ジェンバンク登録番号 EAL03493、および *A. フミガーツス* (*fumigatus*) ジェンバンク登録番号 EAL85733 を、*Y. リポリティカ* (*lipolytica*) におけるその過剰発現が $\omega-3$ 脂肪酸の生成を増大するのに有用であることができる、推定上の真菌 $\Delta 15$ デサチュラーゼとして同定した。

10

【0225】

追加的な実施形態では、本出願人らは、 $\Delta 12$ デサチュラーゼ活性とは対照的に、 $\Delta 15$ デサチュラーゼ活性を有する真菌配列を容易に区別する手段を同定した。具体的には *Mad12*、*Skd12*、*Ncd12*、*Fmd12*、*Mgd12*、*And12*、*Fgd12*、*Dhd12p*、*Kld12p*、*Cad12p*、*Afd12p*、*Mad15*、*Skd15*、*Ncd15*、*Fmd15*、*Mgd15*、*And15*、*Fgd15*、*Dhd15p*、*Kld15p*、*Cad15p*、および *Afd15p* を含んでなるアミノ酸アラインメントを分析すると (上の表参照)、真菌 $\Delta 15$ または $\Delta 12$ デサチュラーゼの全てが *Fmd15* (配列番号40) の102位に対応する位置に、*Ile* または *Val* アミノ酸残基のどちらかをそれぞれ含有し、それは高度に保存された *His Box 1* (「HECGH」、配列番号404) からアミノ酸残基わずか3個分離れた位置であることが明らかになった (表6)。

20

【0226】

【表 15】

表 6
 真菌 Δ12 および Δ15 デサチュラーゼの保存された
 His Box 1 周辺アミノ酸アラインメントの比較

対応アミノ酸残基	モチーフ	デサチュラーゼ
配列番号 375 の 107～118	WVLAHECGHQS F	Mad12
配列番号 376 の 116～127	WVLAHECGHQA F	Skd12
配列番号 36 の 153～164	WVLAHECGHQA F	Ncd12
配列番号 28 の 149～160	WVIAHECGHGA F	Fmd12
配列番号 34 の 160～171	WVLAHECGHQA F	Mgd12
配列番号 30 の 143～154	WVLAHECGHQA F	And12
配列番号 38 の 130～141	WVIAHECGHGA F	Fgd12
配列番号 378 の 106～117	WVLAHECGHQA F	Kld12p
配列番号 379 の 135～146	WVLAHECGHQA F	Cad12p
配列番号 380 の 120～131	WVLAHECGHQA F	Dhd12p
配列番号 32 の 142～153	WVLAHECGHQA F	Afd12p
配列番号 382 の 105～116	W LAHECGHGA F	Mad15
配列番号 386 の 117～128	W LAHECGHSA F	Skd15
配列番号 46 の 119～130	W LAHECGHGA F	Ncd15
配列番号 40 の 101～112	W LGHECGHGA F	Fmd15
配列番号 44 の 95～106	W LAHECGHGA F	Mgd15
配列番号 42 の 88～99	W LAHECGHGA F	And15
配列番号 48 の 101～112	W LGHECGHGA F	Fgd15
配列番号 384 の 117～128	W LAHECGHGA F	Kld15p
配列番号 385 の 130～141	W LAHECGHGA F	Cad15p
配列番号 387 の 132～143	W LAHECGHGA F	Dhd15p
配列番号 388 の 94～105	W LAHECGHGA F	Afd15p

【0227】

本出願人らは、真菌デサチュラーゼにおいて、この位置の I l e および V a l は、それぞれ Δ 1 5 および Δ 1 2 デサチュラーゼ特異性の決定因子であると結論する。より具体的には本出願人らは、対応残基に I l e があるあらゆる真菌 Δ 1 2 デサチュラーゼ様タンパク質（すなわち、またはモチーフ I X X H E C G H [配列番号 405]）は Δ 1 5 デサチュラーゼであり、対応残基に V a l があるあらゆる真菌 Δ 1 2 デサチュラーゼ様タンパク質（すなわち、またはモチーフ V X X H E C G H [配列番号 406]）は Δ 1 2 デサチュラーゼであると提案する。したがってこの単一ロイシン／バリンアミノ酸は、将来の真菌デサチュラーゼを同定および注釈するときに、重要な残基とみなされる。さらに真菌 Δ 1 2 デサチュラーゼ様タンパク質をコードする遺伝子（例えばここで配列番号 40 として述べられるフザリウム・モニリフォルメ（*Fusarium moniliforme*）デサチュラーゼ）において、この位置での I l e から V a l への変化をもたらす突然変異が、Δ 1 2 不飽和化などに向けた酵素特異性を変化させることが考察され、反対にこの位置での V a l から I l e への変化もたらす突然変異は、Δ 1 5 不飽和化などに向けた酵素特異性を変化させることが考察される。

【0228】

好ましい実施形態では、利用される特定の経路次第で、E P A 生成のために宿主細胞で

発現するのに最も有利であるとして、様々な $\Delta 5$ デサチュラーゼが選択されもよい。具体的には $\omega-6 \Delta 6$ デサチュラーゼ/ $\Delta 6$ エロンガーゼ経路または $\omega-6 \Delta 9$ エロンガーゼ/ $\Delta 8$ デサチュラーゼ経路を発現する際には、*M. アルピナ* (*alpina*)、*I. ガルバナ* (*galbana*)、およびヒト (*H. sapiens*) $\Delta 5$ デサチュラーゼが好ましい。対照的に $\omega-3 \Delta 6$ デサチュラーゼ/ $\Delta 6$ エロンガーゼ経路または $\omega-3 \Delta 9$ エロンガーゼ/ $\Delta 8$ デサチュラーゼ経路（それによって $\omega-3$ PUFA合成に有利にする）を利用することが望ましい場合は、フィトフトラ・メガスペルマ (*Phytophthora megasperma*) からのまたはゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) からのものなどの $\omega-3$ 選択性 $\Delta 5$ デサチュラーゼを利用することが有利かもしれない。

ヘースティングス (*Hastings*) らは、サッカロミセス・セレヴィシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 中でのゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) cDNA (ジェンバンク登録番号AF309556) の発現が、 $\omega-6$ 基質との比較で明らかに $\omega-3$ 選択性であり、 $\Delta 5$ デサチュラーゼ活性よりもわずかに高い $\Delta 6$ デサチュラーゼ活性がある、二機能 $\Delta 6$ および $\Delta 5$ デサチュラーゼ活性を示したことを最初に報告した。引き続いて本出願人らは、ジェンバンク登録番号AF309556の相同体として、ORFの984位における1bp (T) 欠失 (ヌル突然変異をもたらす) および1171位の1bp置換 (GからA) (VからMへのアミノ酸変化をもたらす) が異なる、ジェンバンク登録番号BC068224を同定した。次にV1171M突然変異を除いて、ジェンバンク登録番号AF309556によってコードされるタンパク質と同一の突然変異タンパク質 (ここで「Drd6/d5 (M)」として同定される) を作り出した。

ここでの本出願人らによる予備的研究では、*S. セレヴィシエ* (*cerevisiae*) 中でのDrd6/d5 (M) の発現は、ジェンバンク登録番号AF309556よりも約50%低い活性を示すと判定されたが、ETAを生成するヤロウィア (*Yarrowia*) 株中での発現は、Drd6/d5 (M) がはるかににより $\omega-3$ 特異的であることが立証された。したがって $\omega-3$ PUFA合成の増大のためには、 $\omega-3 \Delta 6$ デサチュラーゼ/ $\Delta 6$ エロンガーゼ経路、または $\omega-3 \Delta 9$ エロンガーゼ/ $\Delta 8$ デサチュラーゼ経路のどちらかの発現に際して、この酵素 (ここで配列番号373として同定される) または同様の基質特異性を有するものが望ましい。

【0229】

もちろん本発明の代案の実施形態では、配列番号2、5、7、9、12、15、18、21、24、26、28、30~32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、58、64、67、75、78、370、373、375、376、378~380、382、および384~388によってコードされるデサチュラーゼおよびエロンガーゼと実質的に同一のその他のDNAもまた、ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 中でのEPA生成のために使用できる。「実質的に同一の」とは、増大する好ましさの順で、選択されるポリペプチド、またはアミノ酸配列をコードする核酸配列と少なくとも80%、90%または95%の相同性を示すアミノ酸配列または核酸配列を意図する。ポリペプチドでは、比較配列の長さは一般に、少なくとも16個のアミノ酸、好ましくは少なくとも20個のアミノ酸または最も好ましくは35個のアミノ酸である。核酸では、比較配列の長さは一般に、少なくとも50個のヌクレオチド、好ましくは少なくとも60個のヌクレオチド、より好ましくは少なくとも75個のヌクレオチド、そして最も好ましくは110個のヌクレオチドである。

【0230】

相同性は、典型的に配列分析ソフトウェアを使用して測定され、「配列分析ソフトウェア」という用語は、ヌクレオチドまたはアミノ酸配列の分析のために有用なあらゆるコンピュータアルゴリズムまたはソフトウェアプログラムを指す。「配列分析ソフトウェア」は、市販のものでも、あるいは独立して開発されてもよい。典型的な配列分析ソフトウェアとしては、1.) ウィスコンシン州マディソンのジェネティック・コンピュータ・グループ (*Genetics Computer Group* (GCG) (Madison, WI)) からのGCGパッケージプログラム、ウィスコンシン・パッケージ (*Wisconsin*

nsin Package) バージョン 9.0、2.) BLASTP、BLASTN、BLASTX (アルトシュール (Altschul) ら著、J. Mol. Biol. 215: 403~410 頁 (1990 年))、3.) ウィスコンシン州マディソンの DNASTAR (DNASTAR, Inc. (Madison, WI)) からの DNASTAR、および 4.) スミスーウォーターマン・アルゴリズムを組み入れた FASTA プログラム (W. R. ピアソン (Pearson) 著、Comput. Methods Genome Res. [Proc. Int. Symp.] (1994 年)、1992 年会議、111~20 頁、スハイ、サンドル (Suhai, Sandor) 編、Plenum, New York, NY) が挙げられるが、これに限定されるものではない。本願明細書の文脈内では、配列分析ソフトウェアを分析のために使用する場合、分析結果は特に断りのない限り、言及されるプログラムの「デフォルト値」に基づくものと理解される。ここでの用法では、「デフォルト値」とは、最初に初期化されるときにソフトウェアに最初にロードされる、あらゆる値またはパラメータの組を意味する。一般に、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、およびその他の修正に相同性の程度を割り当てて同様の配列を対応させる。

10

【0231】

より好ましい実施形態では、配列番号 2、9、12、15、18、21、50、58、および 64 で述べられるものと実質的に同一のデサチュラーゼおよびエロンガーゼをコードするコドン最適化遺伝子が利用される。具体的には当業者によく知られているように、選択される宿主微生物中での最適遺伝子発現のためのコドンで天然遺伝子中のコドンを置換して、コードされる mRNA の翻訳効率を増大させることで、異種の遺伝子の発現を増大できる。したがって変性ポリペプチドが代案の宿主に好まれるコドンを使用するように、異種宿主中で発現する特定のポリペプチドをコードするコドン部分を修正することが有用であることが多く、宿主が好むコドンの使用は、ポリペプチドをコードする外来性遺伝子の発現を実質的に増強できる。

20

【0232】

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、どれが最高頻度で使用されるかを判定することにより、関心のあ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、関心のあるポリペプチド（例えばデサチュラーゼ、エロンガーゼ、アシルトランスフェラーゼ）のコード配列を全部または部分的に合成できる。DNA の全部（または一部）はまた、転写 mRNA 中に存在するあらゆる不安定化配列または二次構造領域を除去するように合成できる。DNA の全部（または一部）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するように合成できる。

30

【0233】

さらに翻訳開始コドン「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で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修正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。酵母菌中での発現のために、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。代案としてはここでヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) について実証されるように、宿主中の共通翻訳開始配列を判定して、関心のある宿主中で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換えできる。

40

【0234】

本発明では、上述の宿主の好みに基づいて、表 5 からのいくつかのデサチュラーゼおよびエロンガーゼ遺伝子がヤロウィア・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*) コドン使用頻度プロフィールを判定し (国際公開第 04/101757 号パンフレット参照)、好ましいコドンを同定することで可能であった。次に Y. リポ

50

リティカ (lipolytica) 中での遺伝子発現をさらに最適化するために、「ATG」開始コドン周辺の共通配列を判定した (すなわち「MAMMATGNHS」(配列番号 368)、ここで使用した核酸縮重コードは次のとおり。M=A/C、S=C/G、H=A/C/T、および N=A/C/G/T)。下の表 7 は、Y. リポリティカ (lipolytica) 中で発現した際の天然遺伝子とコドン最適化遺伝子の活性を比較し、各コドン最適化遺伝子に関する詳細を提供する。%Sub. Conv. は「%基質変換」の略語であり、Codon-Opt. は「コドン最適化」の略語である。

【0235】

【表 16】

表 7

ヤロウィア・リポリティカ中での EPA 生合成のために最も好ましい
コドン最適化デサチュラーゼおよびエロンガーゼ

天然遺伝子	天然 遺伝子の 基質転換 %	コドン最適化 遺伝子中で 変性された 全塩基	コドン 最適化 遺伝子の 基質転換%	参考文献	コドン 最適化 配列番号
M. アルピナ Δ6 デサチュラーゼ (ジェンバンク登録 番号 AF465281)	30%	1374bp の 152 (144 個のコドン に対応する)	42%	国際公開 第 04/101753 号 パンフレット	3
M. アルピナ 高親和力 C _{18/20} エロンガーゼ (ジェンバンク登録 番号 AX464731)	30%	957bp の 94 (85 個のコドン に対応する)	47%	国際公開 第 04/101753 号 パンフレット	19
T. アウレウム C _{18/20} エ ロンガーゼ (「ELO2」)	33%	817bp の 114 (108 個のコドン に対応する)	46%	—	22
S. ディクリナ Δ17 デサチュラーゼ (米国特許第 2003/0196217 A1 号 明細書)	23%	1077bp の 127 (117 個のコドン に対応する)	45%	同時係属 米国特許出願 第 10/840478 号	16
イソクリシス・ ガルバナ Δ9 エロンガーゼ	—	789bp の 126 (123 個のコドン に対応する)	30%	—	51
ミドリムシ Δ8 デサチュラーゼ	—	1263bp の 207 (192 個のコドン に対応する)	75%	同時係属 米国特許出願 第 11/166993 号	61
イソクリシス・ ガルバナ Δ5 デサチュラーゼ	7%	1323bp の 203 (193 個のコドン に対応する)	32%	—	10
ヒト Δ5 デサチュラーゼ (ジェンバンク登録番号 NP_037534)	—	1335bp の 227 (207 個のコドン に対応する)	30%	—	13
ドブネズミ C _{16/18} エロンガーゼ (ジェンバンク登録番号 AB071986)	—	792bp の 127 (125 個のコドン に対応する)	43%	—	65

【0236】

本発明の追加的な代案の実施形態では、配列番号 3、10、13、16、19、22、51、61、および 65 として表される好ましいデサチュラーゼおよびエロンガーゼと実

10

20

30

40

50

質的に同一でない、その他のDNAもまた、ここでの目的のために使用できる。例えば本発明の教示に従ったヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 中への導入に有用な $\Delta 6$ デサチュラーゼポリペプチドをコードするDNA配列は、GLAまたはSTAを生成する能力を有する微生物から得られてもよい。このような微生物としては、例えばモルティエラ (*Mortierella*)、コニディオボルス (*Conidiobolus*)、ピシウム (*Pythium*)、フィトファトラ (*Phytophthora*)、ペニシリウム (*Penicillium*)、チノリモ (*Porphyridium*)、コイドスポリウム (*Coidosporium*)、ケカビ (*Mucor*)、フザリウム (*Fusarium*)、アスペルギルス (*Aspergillus*)、ロドトルラ (*Rhodotorula*)、およびハエカビ (*Entomophthora*) 属に属するものが挙げられる。チノリモ (*Porphyridium*) 属内で特に興味深いのは、*P. クルエンタム* (*cruentum*) である。モルティエラ (*Mortierella*) 属内で特に興味深いのは、*M. エロンガータ* (*elongata*)、*M. エクシグア* (*exigua*)、*M. ハイグロフィラ* (*hygrophila*)、*M. ラマニアナ* (*ramanniana*) アングリスポラ (*angulispora*) 変種、および *M. アルピナ* (*alpina*) である。ケカビ (*Mucor*) 属内で特に興味深いのは、*M. シルシネロイデス* (*circinelloides*) および *M. ジャバニカス* (*javanicus*) である。

10

【0237】

代案としては、例えば *M. アルピナ* (*alpina*) $\Delta 6$ デサチュラーゼと実質的に同一でないが、分子のカルボキシル末端から6個めの炭素で脂肪酸分子を不飽和化できる関連デサチュラーゼもまた、デサチュラーゼがなおもLAをGLAにおよび／またはALAをSTAに効果的に変換できると仮定すれば、本発明において $\Delta 6$ デサチュラーゼとして有用であろう。したがって関連デサチュラーゼおよびエロンガーゼは、ここで開示されるデサチュラーゼおよびエロンガーゼと実質的に同一に機能するそれらの能力によって同定できる（または作り出せる）。

20

【0238】

上で提案されたように、別の実施形態では、当業者は例えばここでの目的に適切した $\Delta 12$ デサチュラーゼおよび $\Delta 6$ デサチュラーゼ活性の双方を有する融合タンパク質を作り出せる。これは隣接するリンカーと共に $\Delta 12$ デサチュラーゼおよび $\Delta 6$ デサチュラーゼを一緒に融合することで可能である。 $\Delta 12$ デサチュラーゼまたは $\Delta 6$ デサチュラーゼのどちらかが、融合タンパク質のN-末端部分にあることができる。適切なリンカー分子をデザインおよび合成する手段は、当業者によって容易に知られており、例えばリンカーはひと続きのアラニンまたはリジンアミノ酸であることができ、融合酵素の活性に影響しない。

30

【0239】

最後に、配列を合成し、配列を一緒にまとめる方法は、文献においてよく確立されていることが技術分野で知られている。したがって生体外 (*in vitro*) での変異誘発および選択、部位特異的変異誘発、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用いて、天然由来デサチュラーゼおよび／またはエロンガーゼ遺伝子の変異を得ることができる。これによって生体内 (*in vivo*) でそれぞれデサチュラーゼまたはエロンガーゼ活性を有し、宿主細胞中で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（例えばより長い半減期または所望のPUFAのより高速の生成）がある、ポリペプチドの生成が可能になる。

40

【0240】

要約すれば、ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 中でのEPA生成に適したPUFA生合成経路酵素をコードする好ましいデサチュラーゼおよびエロンガーゼ遺伝子の配列が提示されるが、これらの遺伝子がここで本発明を限定することは意図されない。ここでの目的に適したPUFA生合成経路酵素をコードする多数のその他の遺伝子が、多様な供給源（例えば適切なデサチュラーゼまたはエロンガーゼ

50

活性を有する野生型、コドン最適化、合成および／または突然変異酵素）から単離できる。これらの代案のデサチュラーゼは、1.) 分子のカルボキシル末端から数えて17番目および18番目の炭素原子間で脂肪酸を不飽和化し、ARAからEPAおよび／またはDGLAからETAへの変換を触媒する ($\Delta 17$ デサチュラーゼ)、2.) LAからGLAおよび／またはALAからSTAへの変換を触媒する ($\Delta 6$ デサチュラーゼ)、3.) DGLAからARAおよび／またはETAからEPAへの変換を触媒する ($\Delta 5$ デサチュラーゼ)、4.) オレイン酸からLAへの変換を触媒する ($\Delta 12$ デサチュラーゼ)、5.) LAからALAへの変換を触媒する ($\Delta 15$ デサチュラーゼ)、6.) EDAからDGLAおよび／またはETRAからETAへの変換を触媒する ($\Delta 8$ デサチュラーゼ)、および／または7.) パルミチン酸からパルミトレイン酸および／またはステアリン酸からオレイン酸 ($\Delta 9$ デサチュラーゼ) への変換を触媒する能力によって特徴づけられる。同様に、ここでの目的に適したエロンガーゼは、特定源からのものに限定されない。むしろここでの目的に有用な酵素は、エロンガーゼが作用する基質と比べて炭素2個分脂肪酸炭素鎖を延長し、それによって一価または多価不飽和脂肪酸を生じるそれらの能力によって特徴づけられる。より具体的にはこれらのエロンガーゼは、1.) LAをEDAにおよび／またはALAをETRAに延長する ($\Delta 9$ エロンガーゼ)、2.) C18基質を延長してC20生成物を生成する ($C_{18/20}$ エロンガーゼ)、3.) C14基質を延長してC16生成物を生成する ($C_{14/16}$ エロンガーゼ)、および／または4.) C16基質を延長してC18生成物を生成する ($C_{16/18}$ エロンガーゼ) 能力によって特徴づけられる。ここでもいくつかのエロンガーゼは、幅広い基質特異性の結果として、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。

【0241】

アシルトランスフェラーゼおよびTAG生合成終末ステップにおけるそれらの役割

アシルトランスフェラーゼは、TAGの生合成に深く関与する。TAG合成をもたらす関与遺伝子および代謝中間体に関する詳細を含む、酵母菌におけるTAG生合成に関する2つの包括的なミニレビューは、D. ソルガー (Sorger) およびG. ダウム (Daum) 著、「Appl. Microbiol. Biotechnol.」61:289～299頁 (2003年)、およびH. ミュルナー (Muelner) およびG. ダウム (Daum) 著、Acta Biochimica Polonica、51(2):323～347頁 (2004年) である。これらのレビューの著者らは、真核生物アシルトランスフェラーゼ遺伝子ファミリー (下記) の異なるクラスを明確に要約するが、脂質粒子におけるTAG合成および中性脂質形成の調節側面についてほとんど分かっていないこともまた認める。

【0242】

中性脂質合成をもたらすアシル-CoA-依存または非依存エステル化反応に関与する、4つの真核生物のアシルトランスフェラーゼ遺伝子ファミリーが同定されている。

(1) アシル-CoA: コレステロールアシルトランスフェラーゼ (ACAT) ファミリー、EC2.3.1.26 (ステロールアシルトランスフェラーゼとして一般的に知られている)。この遺伝子ファミリーとしては、アシル-CoAおよびステロールからCoAおよびステロールエステルへの変換に関与する酵素が挙げられる。このファミリーとしてはまた、TAG生合成の終末ステップに関与するDGAT1も挙げられる。

(2) レシチン: コレステロールアシルトランスフェラーゼ (LCAT) ファミリー、EC2.3.1.43。この遺伝子ファミリーは、ホスファチジルコリンおよびステロールからステロールエステルおよび1-アシルグリセロホスホコリンへの変換に関与する。このファミリーとしてはまた、TAG生合成をもたらすリン脂質のsn-2位から1,2-ジアシルグリセロールのsn-3位へのアシル基転移に関与する、リン脂質: ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ (PDAT) 酵素も挙げられる。

(3) ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ (DAGAT) ファミリー、EC2.3.1.20。(DGAT2をはじめとする) この遺伝子ファミリーは、TAG生合成の終末ステップに関与する。

(4) グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼおよびアシル-CoA リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ (GPAT/LPAT) ファミリー。GPAT (E. C. 2. 3. 1. 15) タンパク質がTAG生合成の第1のステップに関与するのに対し、LPAT (E. C. 2. 3. 1. 51) 酵素はTAG生合成の第2のステップに関与する。このファミリーとしてはまた、リン脂質とCoAの間のアシル交換を触媒するリゾホスファチジルコリンアシルトランスフェラーゼ (LPCAT) が挙げられる。

【0243】

これらの4つのアシルトランスフェラーゼ遺伝子ファミリーは一緒になって、中性脂質形成のための重複する生合成システムを表し、分別制御、代案の局在化、および異なる基質特異性 (H. ミュルナー (M u e l l n e r) および G. ダウム (D a u m)、前出) の結果であるように見える。これらの4つの各遺伝子ファミリーについて、25%を超えるEPAの合成を可能にするヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 中での代謝エンジニアリングに対するそれらの重要性に基づいてここで論じる。

【0244】

様々なアシルトランスフェラーゼの機能性

ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 中でのこれらのアシルトランスフェラーゼの多くの間の相互作用を図4に概略的に示す。最初にTAG生合成の直接的機序に注目すると、このプロセスにおける第1のステップは、リゾホスファチジン酸 (LPA) (および副産物としてCoA) を生成する、GPATを経由する、1分子のアシル-CoAからsn-グリセロール-3-リン酸へのエステル化である。次にLPATによって触媒される反応である、アシル-CoAの第2の分子のエステル化によって、リゾホスファチジン酸がホスファチジン酸 (PA) (および副産物としてCoA) に変換される。次にホスファチジン酸ホスファターゼは、ホスファチジン酸からのリン酸基の除去に関与して、1, 2-ジアシルグリセロール (DAG) を生じる。引き続いてDAG AT (例えばDGAT1、DGAT2またはPDAT) によって第3の脂肪酸がDAGのsn-3位に付加されて、TAGが形成する。

【0245】

歴史的にDGAT1は、アシル-CoA基がDAGに転移されてTAGを形成する、アシル-CoAおよびDAGからTAGおよびCoAへの変換に関与する反応を触媒する、TAG合成に特異的に関与する唯一の酵素であると考えられてきた。DGAT1はACATと相通的であることが知られていたが、最近の研究はACAT遺伝子ファミリーと無関係のDAG AT酵素の新しいファミリーを同定した。したがって命名法は今やACAT遺伝子ファミリー (DGAT1ファミリー) と関係があるDAG AT酵素と、無関係のもの (DGAT2ファミリー) との間で区別する (ラルディサバル (Lardizabal) ら著、J. Biol. Chem. 276 (42) : 38862~38869頁 (2001年))。真核生物の全ての主要な門 (真菌、植物、動物、および基底真核生物) において、DGAT2ファミリーのメンバーが同定されている。

【0246】

さらにより最近、ダルキビスト (Dahlqvist) ら (Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 97 : 6487~6492頁 (2000年)) およびエルカース (Oelkers) ら (J. Biol. Chem. 275 : 15609~15612頁 (2000年)) は、TAG合成が、アシル-CoA不在下でもアシル-CoA-非依存性機構酵素を通じて起きることができることを発見した。具体的にはPDATがホスファチジルコリン基質のsn-2位からアシル基を除去して、DAGに転移させてTAGを生じる。この酵素は、構造的にLCATファミリーと関係があり、PDATの機能はDGAT2程にはよく特性決定されていないが、PDATはいくつかの油料種子においてリン脂質から「異常な」脂肪酸を除去する上で主要な役割を果たすと見なされている (バナーズ (Banas), A. ら著、Biochem. Soc. Trans. 28 (6) : 703~705頁 (2000年))。

サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 中での TAG 合成に関して、3つの経路について述べられている (サンダガー (Sandager), L. ら著、J. Biol. Chem. 277 (8): 6478~6482 頁 (2002年))。まず TAG は、主に DGAT2 (DGA1 遺伝子によってコードされる) の作用によって、DAG および アシル-CoA から合成される。しかしより最近では、PDAT (LRO1 遺伝子によってコードされる) もまた同定されている。最後にアシル-CoA およびステロールを利用してステロールエステル (および少量の TAG、サンダガー (Sandager), L. ら著、Biochem. Soc. Trans. 28 (6): 700~702 頁 (2000年) 参照) を生成する2つのアシル-CoA: ステロール-アシルトランスフェラーゼ (ARE1 および ARE2 遺伝子によってコードされる) が知られている。PDAT および DGAT2 を合わせると、S. セレビシエ (*S. cerevisiae*) 油生合成のおよそ95%に参与している。

10

D G A T 1、D G A T 2、P D A T、およびA R E 2（下記）をコードするいくつかの公的に入手できる配列に基づいて、本出願人らはヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）において、D G A T 1（配列番号 9 4）、D G A T 2（配列番号 1 0 2、1 0 4、および 1 0 6 [ここで配列番号 1 0 2 は、配列番号 1 0 4 および 1 0 6 として提供される少なくとも 2 つの追加的入れ子 O R F を含有し、配列番号 1 0 6 によってコードされる O R F はその他の知られている D G A T 酵素と高度の類似性を有し、配列番号 1 0 6 中の中断は天然遺伝子の D G A T 機能を除去したので、配列番号 1 0 7 のポリペプチドが D G A T 機能性を有することが確認された]）、P D A T（配列番号 8 9）、およびA R E 2（配列番号 9 1）をコードする遺伝子を単離し、特性決定した。しかしS. セレヴィシエ（*cerevisiae*）中で開発された、P D A T および D G A T 2 がおよそ 9 5 % の油生合成に参与するモデルとは対照的に、ヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）の P D A T、D G A T 2、および D G A T 1 は、約 9 5 % までの油生合成に参与することが発見された（さらにA R E 2 が油生合成にマイナーな寄与をするかもしれない）。

20

ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) の TAG 画分中での EPA 蓄積において、その機能が重要であり得る最終アシルトランスフェラーゼ酵素は LPCAT である。図 4 に示すように、この酵素 (EC 2. 3. 1. 23) は sn-ホスファチジルコリンの sn-2 位における双方向アシル交換に関与して、 ω -6 および ω -3 PUFA 生合成を増強すると仮定される。この仮説は以下の研究に基づく。(1) スティン (Stymne), S. および A. K. ストバート (Stobart) は、*Biochem J.* 223 (2) : 305~14 頁 (1984 年) で、LPCAT がアシル-CoA プールおよびホスファチジルコリン (PC) プールの間の交換に影響すると仮定した。(2) ドマーグ (Domergue), F. らは、*J. Bio. Chem.* 278 : 35115 頁 (2003 年) で、PC の sn-2 位における GLA の蓄積、および酵母中で ARA を効率的に合成できないことが、アシル-CoA プール内で起きる PUFA 生合成に伴う延長ステップの結果である一方、 Δ 5 および Δ 6 不飽和化ステップは大部分 PC の sn-2 位で起きると提案した。(3) アバディ (Abbadì), A. らは、*The Plant Cell*, 16 : 2734~2748 頁 (2004 年) で、遺伝子導入油料種子植物における PUFA 蓄積抑圧の分析に基づいて、LPCAT が、 Δ 6 デサチュラーゼ/ Δ 6 エロンガーゼ経路の成功裏の再構成において重要な役割を果たすと提案した。(4) (レンツ (Renz), A. らは、国際公開第 2004/076617 A2 号パンフレットで、*S. cerevisiae* 中の遺伝的に導入された Δ 6 デサチュラーゼ/ Δ 6 エロンガーゼ経路において、延長効率を実質的に改善するシノラブディス・エレガンス (*Caenorhabditis elegans*) (T06E8. 1) から LPCAT をコードする遺伝子を提供した。研究者らは、デサチュラーゼが脂

30

40

50

質結合脂肪酸 (sn-2 アシル PC) 中の二重結合の導入を触媒する一方、エロンガーゼは CoA エステル化脂肪酸 (アシル-CoA) の延長を排他的に触媒するので、LPCAT が、リン脂質およびアシル-CoA プール間における新たに合成された脂肪酸の効率的かつ連続的な交換を可能にしたと結論した。

【0250】

EPA 合成のための異種アシルトランスフェラーゼ遺伝子の選択

ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 中で自然に生成される PUFA は 18:2 脂肪酸 (もっと稀には 18:3 脂肪酸) に限定されるので、GPAT、LPAAAT (すなわち LPAAAT1 または LPAAAT2)、DGAT1、DGAT2、PDAT、および LPCAT をコードする宿主生物の天然遺伝子は、18:3 およびより長い脂肪酸を含んでなる TAG (例えば EPA) を効率的に合成するのが困難であると思われる。したがって場合によっては、異種の (または「外来性」) アシルトランスフェラーゼが、天然酵素よりも好ましいかもしれない。

【0251】

様々な生物中で多数のアシルトランスフェラーゼ遺伝子が同定され、公共および特許文献中で開示されている。例えば以下のジェンバンク登録番号は、脂質生合成で有用な公的に入手できるアシルトランスフェラーゼ遺伝子の例を指す。CQ891256、AY441057、AY360170、AY318749、AY093169、AJ422054、AJ311354、AF251795、Y00771、M77003 (GPAT); Q93841、Q22267、Q99943、O15120、Q9NRZ7、Q9NRZ5、Q9NUQ2、O35083、Q9D1E8、Q924S1、Q59188、Q42670、P26647、P44848、Q9ZJN8、O25903、Q42868、Q42870、P26974、P33333、Q9XFW4、CQ891252、CQ891250、CQ891260、CQ891258、CQ891248、CQ891245、CQ891241、CQ891238、CQ891254、CQ891235 (LPAAAT); AY445635、BC003717、NM_010046、NM_053437、NM_174693、AY116586、AY327327、AY327326、AF298815、および AF164434 (DGAT1); および NC_001147 [遺伝子座 NP_014888]、NM_012079、NM_127503、AF051849、AJ238008、NM_026384、NM_010046、AB057816、AY093657、AB062762、AF221132、AF391089、AF391090、AF129003、AF251794、および AF164434 (DGAT2); P40345、O94680、NP_596330、NP_190069、および AB006704 [gi:2351069] (PDAT)。同様に特許文献は、TAG 生成に関与する多数の追加的な遺伝子の DNA 配列 (および/または上のいくつかの遺伝子に関する詳細およびそれらの単離方法) を提供する [例えば米国特許第 5,210,189 号明細書、国際公開第 2003/025165 号パンフレット (GPAT); EP 第 1144649 A2 号明細書、EP 第 1131438 号明細書、米国特許第 5,968,791 号明細書、米国特許第 6,093,568 号明細書、国際公開第 2000/049156 号パンフレット、および国際公開第 2004/087902 号パンフレット (LPAAAT); 米国特許第 6,100,077 号明細書、米国特許第 6,552,250 号明細書、米国特許第 6,344,548 号明細書、米国特許出願公開第 2004/0088759 A1 号明細書および米国特許出願公開第 20040078836 A1 号明細書 (DGAT1); 米国特許出願公開第 2003/124126 号明細書、国際公開第 2001/034814 号パンフレット、米国特許出願公開第 2003/115632 号明細書、米国特許出願公開第 2003/0028923 号明細書、および米国特許出願公開第 2004/0107459 号明細書 (DGAT2); 国際公開第 2000/060095 号パンフレット (PDAT); および国際公開第 2004/076617 A2 号パンフレット (LPCAT)。

【0252】

上の例は制限を意図するものではなく、異なる供給源に由来するD G A T 1、D G A T 2、P D A T、G P A T、L P C A T、およびL P A A Tをコードする多数のその他の遺伝子が、ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 中への導入に適している。例えば本出願人らは、モルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) (配列番号96および97)、ニューロスボラ・クラッサ (*Neurospora crassa*) (配列番号98)、ジベレラ・ゼアエ (*Gibberella zeae*) P H - 1 (配列番号99)、マグナポルテ・グリセア (*Magnaporthe grisea*) (配列番号100)、およびアスペルギルス・ニデュランス (*Aspergillus nidulans*) (配列番号101) から新規D G A T 1を同定し、モルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) から新規D G A T 2 (配列番号108および109)、G P A T (配列番号110および111)、L P A A T 1 (配列番号80および81)、およびL P A A T 2 (配列番号82および83) を同定した。

10

【0253】

E P A 合成に好ましいアシルトランスフェラーゼ遺伝子

しかしヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 中での発現に適したアシルトランスフェラーゼの幅広い選択にもかかわらず、本発明の好ましい実施形態では、D G A T 1、D G A T 2、P D A T、G P A T、L P A A T、およびL P C A Tは、顕著な量のより鎖長の長い ω -6 (例えばA R A) および/または ω -3 (例えばE P A、D H A) P U F Aを生成する生物から選択される。したがって以下の酵素 (またはその誘導体) が特に好ましい。

20

【0254】

【表17】

表 8

ヤロウィア・リポリティカの高 EPA 生成株中での発現に好ましい
異種アシルトランスフェラーゼ

ORF	生物	参考文献	配列番号
DGAT1	モルティエラ・アルピナ	同時係属米国特許出願 第 11/024544 号	96,97
DGAT2	モルティエラ・アルピナ	同時係属米国特許出願 第 11/024545 号	108,109
GPAT	モルティエラ・アルピナ	—	110,111
LPAAT1	モルティエラ・アルピナ	—	80,81
LPAAT2	モルティエラ・アルピナ	同時係属米国特許仮出願 第 60/689031 号	82,83
LPCAT	シノラブディス・エレガンス	クローン T06E8.1、国際公開 第 2004/076617 A2 号パンフレット	93

30

40

【0255】

ここでの本発明を制限することは意図しないが、野生型生物が全脂肪酸 (T F A) の 50%を超える濃度でA R Aを合成できることから、M. アルピナ (*alpina*) が異種アシルトランスフェラーゼの好ましい供給源として選択された。同様にしてC. エレガンス (*elegans*) は、そのT F Aの20~30%までをE P Aとして生成できる。

【0256】

もちろん本発明の代案の実施形態では、配列番号80~83、93、96、97、およ

50

び108～111によってコードされるアシルトランスフェラーゼと実質的に同一のその他のDNAもまた、ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 中での異種発現のために使用して、TAG画分中のEPAの生成および蓄積を容易にできる。より好ましい実施形態では、配列番号80～83、93、96、97、および108～111で述べられるものと実質的に同一のアシルトランスフェラーゼをコードするコドン最適化遺伝子が利用された。

【0257】

外来性遺伝子発現のための一般発現システム、カセット、ベクター、および形質転換

EPAの高レベル生成をもたらすものなどの外来性タンパク質の高レベル発現を指示する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については、当業者によく知られている。これらのいずれかを使用して、好ましいデサチュラーゼ、エロンガーゼ、およびアシルトランスフェラーゼをコードするキメラ遺伝子を構築できる。次にこれらのキメラ遺伝子をヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 中に導入し、標準の形質転換法を使用して、コードした酵素の高レベル発現を提供できる。

10

【0258】

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、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具体的選択は、所望の発現産物、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、選択マーカー、および自律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(例えばプロモーター)、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、形質転換された宿主細胞の遺伝子に由来することが最も好ましいが、このような制御領域は、必ずしも生産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。

20

【0259】

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、各ベクターが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。

30

【0260】

関心のあ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関心のある遺伝子を導入するその他のあらゆる方法が挙げられる。ヤロウィア・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、およびチエン(Chen), D. C. ら著、「*Appl Microb Biotechnol.*」48(2):232～235頁(1997年)が挙げられる。

40

【0261】

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。形質転換宿主細胞は、国際公開第2004/101757号パンフレットおよび国際公開第2005/003310号パンフレ

50

ット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。

【0262】

ここで使用するための好ましい選択方法は、カナマイシン、ハイグロマイシン、およびアミノグリコシドG418に対する抵抗性、ならびにウラシル、ロイシン、リジン、トリプトファンまたはヒスチジンを欠く培地に生育する能力である。代案の実施形態では、5-フルオロオロト酸（5-フルオロウラシル-6-カルボン酸一水和物、「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. 著、「酵母2-ハイブリッド・システム（Yeast 2-Hybrid System）」、Oxford University: New York、第7巻、109～147頁、1997年）。

10

【0263】

ここで利用された代案の好ましい選択方法は、スルホニル尿素抵抗性に基づく、ヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）のための顕性の非抗生物質マーカーに依存する。技術はまた、半数体、二倍体、異数体または異種接合体であってもよい、その他の工業酵母株にも一般に適用できる。工業酵母株のための遺伝的形質転換システムの開発に対する次の2つの主要な制限を克服することが期待される。（1）天然の栄養要求株がほとんどなく、自然発生または誘導栄養要求性突然変異体の単離は株の倍数性によって妨げられる。（2）抗生物質抵抗性マーカーの使用は、抗生物質抵抗性遺伝子を持つ遺伝子改変生物の放出に対する制限のために、株の商業利用を制限するかもしれない。プイグ（Puig）らは、J. Agric. Food Chem. 46:1689～1693頁（1998年）で、標的株をウリジン栄養要求株にするための遺伝子操作、および関心のある特質を導入するためのURA3マーカーの引き続く使用に基づいて、これらの制限を克服する方法を開発したが、この戦略は日常的業務のためには面倒過ぎると見なされた。

20

【0264】

ヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）を形質転換するためのここで開示される新しいスルホニル尿素抵抗性選択マーカーは、外来性遺伝子に依存しないが、突然変異天然遺伝子に依存する。したがってそれは栄養要求性を必要とせず、また栄養要求株ももたらさず野性型株の形質転換を可能にする。より具体的にはマーカー遺伝子（配列番号292）は、スルホニル尿素除草剤抵抗性を与える単一アミノ酸変化（W497L）を有する天然アセトヒドロキシ酸シンターゼ（AHASまたはアセト乳酸シンターゼ；E. C. 4. 1. 3. 18）である。AHASは分枝鎖アミノ酸生合成経路中の最初の一般的な酵素であり、それはスルホニル尿素およびイミダゾリノン除草剤の標的である。W497L突然変異は、サッカロミセス・セレヴィシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）中で報告されている（ファルコ（Falco）、S. C. 、ら著、Dev. Ind. Microbiol. 30:187～194頁（1989年）；ダグルビー（Duggleby）、R. G. 、ら、Eur. J. Biochem. 270:2895頁（2003年））。最初の試験は、以下の結果として、ヤロウィア（*Yarrowia*）細胞が除草剤に自然に抵抗性でないことを判定した。1.）除草剤の取り込み不良または皆無、2.）AHASの形態の天然除草剤抵抗性の存在、および／または3.）除草剤不活性化機序の使用。これによって形質転換体選択手段としての突然変異AHAS遺伝子（配列番号292）の合成および使用が可能になった。

30

40

【0265】

選択マーカーをリサイクルする追加的方法是、部位特異的リコンビナーゼシステムに依存する。簡単に述べると、部位特異的遺伝子組換えシステムは、以下の2つの要素からなる。（1）特徴的なDNA配列〔例えばLoxP〕を有する遺伝子組換え部位、および（2）2つの以上の遺伝子組換え部位が、同一DNA分子上に特定間隔で同一方向に配向す

50

る場合、特異的にDNA配列に結合して、DNA配列間の遺伝子組換え（すなわち切除）を触媒するリコンビナーゼ酵素〔例えばCre〕。複数の逐次形質転換中での使用のために好ましい一組の選択マーカーを「リサイクル」することが可能なので、この方法には選択手段としての用途がある。

【0266】

具体的には、宿主ゲノム中への挿入が望ましい標的遺伝子（例えばデサチュラーゼ、エロンガーゼ、アシルトランスフェラーゼ）、ならびに遺伝子組換え部位の側面に位置する第1の選択マーカー（例えばUra3、ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ〔HPPT〕）を含んでなる組み込みコンストラクトを作り出す。形質転換および形質転換体の選択に続いて、第2の選択マーカー（例えばスルホニル尿素抵抗性〔AHAS〕）を保有する複製型プラスミド、およびゲノム中に導入された部位特異的遺伝子組換え部位を認識するのに適したリコンビナーゼの導入によって、第1の選択マーカーが染色体から切除される。第2のマーカーを保有する形質転換体の選択および宿主ゲノムからの第1の選択マーカーの切除の確認に続いて、次に複製型プラスミドを選択不在下で宿主からキュアリングした。これによって第1のまたは第2の選択マーカーのどちらも有さない形質転換体が生成し、したがって形質転換の別の一巡のためのキュアリング株が入手できる。当業者は、方法が本発明で使用される特定の選択マーカーまたは部位特異的遺伝子組換えシステムに限定されないことを認識する。

【0267】

ヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）における外来性遺伝子の過剰発現

当業者にはよく知られているように、遺伝子（例えばデサチュラーゼ）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保証されない。転写、翻訳、タンパク質安定性、酸素制限、および宿主細胞からの分泌の側面を制御するいくつかの遺伝子要素を操作することが望ましいかもしれない。より具体的には以下を変化させることで、遺伝子発現を制御してもよい。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、クローンされた遺伝子のコピー数、および遺伝子がプラスミド上にあるかまたは宿主細胞のゲノム中に組み込まれているかどうか、合成された外来タンパク質の最終細胞内位置、宿主生物中の翻訳効率、宿主細胞内のクローン遺伝子タンパク質の本質的な安定性、および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。これらのいくつかの過剰発現方法について下で考察し、それらはヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）において、例えばデサチュラーゼ、エロンガーゼ、およびアシルトランスフェラーゼを過剰発現する手段として、本発明中で有用である。

【0268】

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

【0269】

所望の宿主細胞中で、デサチュラーゼ、エロンガーゼ、およびアシルトランスフェラーゼ遺伝子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、当業者にはなじみが深い。ヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）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。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、関心のある遺伝子に作動可能に連結された、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、代案としては安定発現が、関心のある遺伝子に作動可能に連結された構成的プロモー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。転写開始調節領域は、例えば次から得ることができる。1.) アルコールデヒドロゲナーゼ、グリセル

アルデヒド 3-リン酸-デヒドロゲナーゼ、ホスホグリセリン酸ムターゼ、フルクトース-ビスリン酸アルドラーゼ、ホスホグルコース-イソメラーゼ、ホスホグリセラートキナーゼ、グリセロール-3-リン酸-O-アシルトランスフェラーゼなどの解糖経路中の遺伝子、または 2.) 酸ホスファターゼ、ラクターゼ、メタロチオネイン、グルコアミラーゼ、翻訳延長因子 EF1- α (TEF) タンパク質 (米国特許第 6, 265, 185 号明細書)、リボソームタンパク質 S7 (米国特許第 6, 265, 185 号明細書)、アンモニウム輸送体タンパク質、輸出タンパク質などの調節可能遺伝子。構成的または誘導的転写が所望されるかどうか、関心のある 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、いくつかの制御配列のいずれか 1 つを使用できる。上に提供した例は、ここでの本発明における制限を意図しない。

10

【0270】

当業者は承知しているように、様々なプロモーターの活性を比較する多様な方法が利用できる。このタイプの比較は、 ω -6 および ω -3 脂肪酸生成に有用なキメラ遺伝子を構築するのに一揃いのプロモーターが必要である、将来の応用で使用するための各プロモーターの強度決定を容易にするのに有用である。したがってレポーター遺伝子 (すなわち β -グルクロニダーゼ (GUS) をコードする大腸菌 (*E. coli*) 遺伝子) の発現に基づいて、プロモーター活性を間接に定量化することが有用かもしれない。代案の実施形態では、より定量的な手段を使用してプロモーター活性を定量化することが有用な場合もある。適切な一方法は、リアルタイム PCR の使用である (リアルタイム PCR 応用の一般レビューについては、ギンジンガー (Ginzinger), D. J. 著、*Experimental Hematology*, 30:503~512 頁 (2002 年) を参照されたい)。リアルタイム PCR は、蛍光性レポーターの検出および定量化に基づく。このシグナルは、反応中の PCR 生成物量と正比例して増大する。各サイクルにおいて蛍光放出量を記録することで、対数期中に PCR 反応をモニターすることが可能であり、そこでは PCR 生成物量の最初の顕著な増大が標的テンプレートの初期量に相関する。単位複製配列の定量的な検出のために、(1) 蛍光性プローブの使用、または (2) DNA 結合作用物質 (例えば SYBR-green I、臭化エチジウム) の使用の 2 つの一般方法がある。相対遺伝子発現比較のために内部標準として内在性対照 (例えば染色体性にコードされる 16S rRNA 遺伝子) を使用することが必要であり、それによって各リアルタイム PCR 反応に添加された全 DNA 量の差について正規化できるようになる。リアルタイム PCR の具体的方法については、技術分野でたくさん書かれている。例えば「リアルタイム PCR 特別号 (Real Time PCR Special Issue)」、*Methods*, 25 (4): 383~481 頁 (2001 年) を参照されたい。

20

30

【0271】

リアルタイム PCR 反応に続いて、以下の使用によって、記録された蛍光強度を使用してテンプレートの量を定量化する。1.) 絶対標準法 (生体外 (*in vitro*) 翻訳 RNA (cRNA) などの既知量の標準が使用される)、2.) 相対標準法 (各ランにおいて既知量の標的核酸がアッセイデザインに含まれる)、または 3.) 遺伝子発現の相対定量化のための比較 C_T 法 ($\Delta \Delta C_T$) (標的配列の相対量が選択された基準値のいずれかと比べられ、基準値と比較して結果が得られる)。比較 C_T 法は、最初に標的の C_T 値と正規化群の間の差 (ΔC_T) を判定することを要し、 $\Delta C_T = C_T$ (標的) - C_T (正規化群) である。この値を定量化する各サンプルについて計算し、それに対して各比較がなされる基準として、1 個のサンプルを選択しなくてはならない。比較 $\Delta \Delta C_T$ 計算は、各サンプル ΔC_T とベースライン ΔC_T の間の差を見だし、次にこれらの値を式 $2^{-\Delta \Delta C_T}$ に従って絶対値に変換することを伴う。

40

【0272】

しかしヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 中での発現に適することができるプロモーターの幅広い選択にもかかわらず、本発明の好ましい実施形態では、プロモーターは下の表 9 に示すもの (またはその誘導体) から選択される。

50

【0273】

【表18】

表9

ヤロウィア・リポリティガにおける過剰発現に好ましい天然プロモーター

プロモーター 名称	位置*	天然遺伝子	活性 「順位」	参考文献	配列 番号
TEF	—	翻訳延長因子 EF1- α	1	ミュラー (Muller) らに 付与された米国特許 6,265,185 号明細書、 ジェンバンク登録番号 AF054508	181
GPD	-968bp～+3bp	グリセルアルデヒド -3-リン酸- デヒドロゲナーゼ	2	国際公開第 2005/003310 号パンフレット	173
GPM	-875bp～+3bp	ホスホグリセリン酸 ムターゼ	1	国際公開第 2005/003310 号パンフレット	175
FBA	-1001bp～-1bp	フルクトース-ビスリン酸 アルドラーゼ	4	国際公開第 2005/049805 号パンフレット	176
FBAIN	-804bp～+169bp (102bp の イントロン[+64～ +165]を含む)	フルクトース-ビスリン酸 アルドラーゼ	7	国際公開第 2005/049805 号パンフレット	177
FBAINm	-804bp～+169bp 修正あり***	フルクトース-ビスリン酸 アルドラーゼ	5	国際公開第 2005/049805 号パンフレット	178
GPDIN	-973bp～+201bp (146bp のイントロン [+49～+194]を 含む)	グリセルアルデヒド- 3-リン酸- デヒドロゲナーゼ	3	同時係属米国特許出願第 11/183664 号	174
GPAT	-1130～+3bp	グリセロール-3-リン酸- O-アシルトランス フェラーゼ	5	同時係属米国特許出願第 11/225354 号	179
YAT1	-778～-1bp	アンモニウム 輸送体酵素	6	同時係属米国特許出願第 11/185301 号	180
EXP1	-1000～-1bp	輸出タンパク質	6	-	389

* 位置は天然遺伝子に対するものであり、「ATG」翻訳開始コドンの「A」の位置は+1と命名される。

*** FBAINm プロモーターは FBAIN プロモーターの修正バージョンであり、FBAINm は FBAIN プロモーターの ATG 翻訳開始コドンとイントロンの間の 52bp の欠失(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ろの新しい翻訳共通モチーフを有する。さらに FBAIN プロモーターと発現させる遺伝子コード領域とを融合させると融合タンパク質が発生するのに対し、FBAINm プロモーターはこのような融合タンパク質を発生させない。

【0274】

GPMの活性がTEFとほぼ同じであるのに対し、GPD、FBA、FBAIN、FBAINm、GPDIN、GPAT、YAT1、およびEXP1の活性は、全てTEFを超える（活性は「活性順位」と題された欄で相対様式で定量化され、「1」は最低活性のプロモーターに対応するのに対し、「7」は最高活性のプロモーターに対応する）。この定量化は、レポーターとしての β -グルクロニダーゼ (GUS) をコードする大腸菌 (E. Coli) 遺伝子 (ジェファーソン (Jefferson), R. A. 著、Nature. 14; 342: 837～838頁 (1989年))、およびヤロウィア (Yarrowia) Xpr 遺伝子の約100bpの3'領域を有するキメラ遺伝子を作り出すために各プロモーターが使用される、比較研究に基づく。各発現コンストラクト中のGUS活性は、組織化学的および／または蛍光定量的アッセイ (ジェファーソン (Jefferson), R. A. 著、「Plant Mol. Biol. Reporter」5: 387～405頁 (1987年)) によって、および／またはリアルタイムPCRの使用によって測

10

20

30

40

50

定された。

【0275】

YAT1プロモーターは、本出願人らによって、ヤロウィア (*Yarrowia*) 内で同定された、油性条件（すなわち窒素制限）下で誘導可能な第1のプロモーターとして特徴づけられた、という点においてユニークである。具体的には、YAT1プロモーターは窒素含有（例えば約0.5%までの硫酸アンモニウム）培地中で活性であるが、宿主細胞を窒素制限条件（例えば非常に低レベルのアンモニウムを含有する、またはアンモニウムを欠く培地中）下で生育させると、プロモーター活性が増大する。したがって好ましい培地は、約0.1%未満の硫酸アンモニウムまたはその他の適切なアンモニウム塩を含有するものである。より好ましい実施形態では、約8~12%のグルコースおよび約0.1%以下の硫酸アンモニウムを含有する高グルコース培地（HGM）などの高い炭素対窒素（すなわちC:N）比の培地中で宿主細胞を生育させると、YAT1プロモーターが誘導される。これらの条件はまた、油性酵母（例えばヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*)）中で油脂生成を誘導するのに十分である。細胞抽出物のGUS活性に基づいて、YAT1プロモーター活性は、細胞を最小培地からHGMに移して24時間生育させると約37倍増大し、HGM中で120時間後には活性はいくらか低下するが、なおも窒素を含んでなる最小培地中での活性よりも25倍高い（実施例1）。

10

【0276】

もちろん本発明の代案の実施形態では、表9で上述したプロモーター領域のいずれかに由来するその他のプロモーターもまた、ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 中での異種発現のために使用して、TAG画分中のEPAの生成および蓄積を容易できる。特に上述のプロモーターのいずれかの長さの修正は、これらの制御配列の正確な境界が完全に画定されていないので、同一活性を有する突然変異プロモーターをもたらしすることができる。代案の実施形態では、FBAINおよびGPDINプロモーターのイントロン内に位置するエンハンサーを使用して、天然ヤロウィア (*Yarrowia*) プロモーターと比べて活性増大を有するキメラプロモーターを作り出すことができる（例えばキメラGPM::FBAINおよびGPM::GPDINプロモーター（配列番号182および183）は、ヤロウィア (*Yarrowia*) Xpr遺伝子の約100bpの3'領域によってGUSレポーター遺伝子発現を推進すると、GPMプロモーター単独と比べて活性が増大した）。

20

30

【0277】

終結領域は、それから開始領域が得られた遺伝子の3'領域から、または異なる遺伝子から誘導されることができる。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じ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。好ましくは終結領域は、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*) である酵母菌遺伝子から誘導される。 γ -インターフェロンおよび α -2インターフェロンをコードする哺乳類の遺伝子の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から誘導されてもよい。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、ここでの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；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No. CAA04661；Pox3：ジェンバンク登録番号XP_503244) ターミネーター；Pex20（ジェンバンク登録番号AF054613）ターミネーター；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；Lip

40

50

2 (ジェンバンク登録番号AJ012632)ターミネーター；および3-オキソアシル-c o Aチオラーゼ (OCT、ジェンバンク登録番号X69988)ターミネーター。

【0278】

上述のデサチュラーゼ、エロンガーゼおよび／またはアシルトランスフェラーゼ遺伝子の追加的コピー (すなわち1個のコピーを超える) をヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 中に導入して、それによってEPA生成および蓄積を増大させてもよい。具体的には遺伝子の追加的コピーを、単一発現コンストラクト内でクローンしてもよく、および／またはプラスミドコピー数を増大させることで、またはクローンされた遺伝子のゲノム中への複数組込みによって (下記)、クローンされた遺伝子の追加的コピーを宿主細胞中に導入してもよい。例えば一実施形態では、ヤロウィア (*Yarrowia*) ゲノム中に、3コピーの $\Delta 12$ デサチュラーゼ、2コピーの $\Delta 6$ デサチュラーゼ、3コピーの $C_{18/20}$ エロンガーゼEL1S、1コピーの $C_{18/20}$ エロンガーゼEL2S、5コピーの $\Delta 5$ デサチュラーゼ、3コピーの $\Delta 17$ デサチュラーゼ、および2コピーの $C_{16/18}$ エロンガーゼを含んでなるキメラ遺伝子を導入し組み込んで、ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 株 (すなわちY2096株) を遺伝子操作して、25%を超えるEPAを生成した。同様に代案の実施形態では、ヤロウィア (*Yarrowia*) ゲノム中に、1コピーの $\Delta 12$ デサチュラーゼ、1コピーの $C_{16/18}$ エロンガーゼ、5コピーの $\Delta 9$ エロンガーゼ、3コピーの $\Delta 8$ デサチュラーゼ、4コピーの $\Delta 5$ デサチュラーゼ、および2コピーの $\Delta 17$ デサチュラーゼを含んでなるキメラ遺伝子を導入し組み込んで、Y. リポリティカ (*lipolytica*) Y2201株を遺伝子操作して、9%を超えるEPAを生成した。さらに別の代案の実施形態では、ロウィア (*Yarrowia*) ゲノム中に、5コピーの $\Delta 15$ デサチュラーゼ、1コピーの $\Delta 12$ デサチュラーゼ、2コピーの $\Delta 9$ エロンガーゼ、2コピーの $\Delta 8$ デサチュラーゼ、および1コピーの二機能 $\Delta 5/\Delta 6$ デサチュラーゼを含んでなるキメラ遺伝子をヤ導入し組み込んで、Y. リポリティカ (*lipolytica*) L116株を遺伝子操作して、約1.3%のEPAを生成した。

【0279】

一般に、油性酵母中での発現に適した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) がひとたび得られると、それを宿主細胞中で自律複製できるプラスミドベクターに入れ、または宿主細胞ゲノム中に直接組み込む。発現カセットの組み込みは、宿主ゲノム内で無作為に起きることができ、または宿主遺伝子座との遺伝子組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。本発明では依存しないが、内在性遺伝子座によって転写および翻訳調節領域の全てまたはいくつかを提供でき、コンストラクトは内在性遺伝子座を標的とする。

【0280】

本発明では、ヤロウィア・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。このような目的で、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。

【0281】

シュミッターベルガー (Schmid-Berger) らは、「J. Bact. 176 (9): 2477~2482頁 (1994年) で、ヤロウィア・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Ylt1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、それぞれ長さおよそ700bp) の存在によって特徴づけられる。Ylt1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」、1

8：97～113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、Y. リポリティカ（*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、Y. リポリティカ（*lipolytica*）の全株がゼータ領域を有するわけではない（例えばATCC #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遺伝子座（ジェンバンク登録番号AF260230）、Lys5遺伝子座（ジェンバンク登録番号M34929）、Aco2遺伝子座（ジェンバンク登録番号AJ001300）、Pox3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）、 $\Delta 12$ デサチュラーゼ遺伝子座（配列番号23）、Lip1遺伝子座（ジェンバンク登録番号Z50020）および／またはLip2遺伝子座（ジェンバンク登録番号AJ012632）が挙げられる。

10

【0282】

有利なことにUra3遺伝子は、5-FOA選択（前出）と組み合わせて繰り返し使用できる。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遺伝子をヤロウィア（*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選択使用して同定された）を生成する。したがってUra3遺伝子（と組み合わさった5-FOA選択）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、それによって容易に、遺伝的修正がヤロウィア（*Yarrowia*）ゲノムに容易な様式で組み込めるようにする。

20

【0283】

用途によっては、本タンパク質を異なる細胞区画に向けることが有用であろう（例えばアシル-CoAプール対ホスファチジルコリンプール）。ここで述べられる目的のためには、EPAが遊離脂肪酸として、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見いだされてもよい。EPA生合成を可能にするポリペプチドをコードする上述のキメラ遺伝子をさらに遺伝子操作して、適切な細胞内標的配列を含めてもよいことが構想された。

30

【0284】

ユーレットツェック（Juretzek）らは、「Yeast」、18：97～113頁（2001年）で、ヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）中に組み込んだプラスミドコピー数の安定性が、使用される個々の形質転換体、受容株、および標的プラットフォームに依存することに気づいた。したがって当業者は、所望の発現レベルおよびパターンを示す株を得るために複数の形質転換体をスクリーンしなくてはならないことを認識する。このようなスクリーニングは、DNAブロットのサザン分析（サザン（Southern）著、J. Mol. Biol. 98：503頁（1975年））、mRNA発現のノーザン分析（クロツェック（Kroczeck）著、J. Chromatogr. Biomed. Appl.、618（1～2）：133～145頁（1993年））、タンパク質発現のウェスタン分析、PUFA生成物の表現型分析またはGC分析によって達成されてもよい。

40

【0285】

要約すると、上述の各手段が、ヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lip*

50

ol y t i c a) における特定遺伝子産物（例えばデサチュラーゼ、エロンガーゼ、アシルトランスフェラーゼ）の発現を増大させるのに有用であり、バイオテクノロジーの当業者は、方法の最も適切な組み合わせを容易に選択してEPAの高生産を可能にできる。

【0286】

EPA生成増大のための経路エンジニアリング

上述の方法は個々の異種遺伝子の発現をアップレギュレートするのに有用であるが、ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 中でEPA生成を増大させるというチャレンジは、はるかにより複雑であり、様々な代謝経路の協調操作を必要とするかもしれない。PUFA生合成経路中の操作について最初に対処し、それにTAG生合成経路およびTAG分解経路中の望ましい操作が続く。

10

【0287】

以前述べられたように、総油画分の5%を超えるEPA、またはより好ましくは総油画分の10%を超えるEPA、またはさらにより好ましくは総油画分の15~20%を超えるEPA、または最も好ましくは総油画分の25~30%を超えるEPAを生成するヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 株の構築は、 $\Delta 6$ デサチュラーゼ/ $\Delta 6$ エロンガーゼ経路発現のために、少なくとも $\Delta 6$ デサチュラーゼ、 $C_{18/20}$ エロンガーゼ、 $\Delta 5$ デサチュラーゼ、および $\Delta 17$ デサチュラーゼまたは $\Delta 15$ デサチュラーゼのどちらか（または双方）の遺伝子を要し、 $\Delta 9$ エロンガーゼ/ $\Delta 8$ デサチュラーゼ経路発現のために、少なくとも $\Delta 9$ エロンガーゼ、 $\Delta 8$ デサチュラーゼ、 $\Delta 5$ デサチュラーゼ、および $\Delta 17$ デサチュラーゼまたは $\Delta 15$ デサチュラーゼのどちらか（または双方）の遺伝子を要する。しかしどちらの実施形態でも、宿主株中に $\Delta 9$ デサチュラーゼ、 $\Delta 12$ デサチュラーゼ、 $C_{14/16}$ エロンガーゼおよび/または $C_{16/18}$ エロンガーゼをさらに含むことが望ましいかもしれない。

20

【0288】

フザリウム・モニリフォルメ (*Fusarium moniliforme*) $\Delta 12$ デサチュラーゼは%基質変換の増大を示すので（国際公開第2005/047485号パンフレット）、場合によっては天然ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) $\Delta 12$ デサチュラーゼをそれで置換することが有利であると立証されるかもしれない。より具体的には、どちらの $\Delta 12$ デサチュラーゼもオレイン酸からLAへの変換を触媒するが、2つの酵素はそれらの全体的特異性が異なる（それによって各酵素の%基質変換に影響を与える）。本出願人らはF. モニリフォルメ (*moniliforme*) $\Delta 12$ デサチュラーゼが、Y. リポリティカ (*lipolytica*) $\Delta 12$ デサチュラーゼよりも高いLA負荷能力をホスファチジルコリン基質のsn-2位に有すると判定した（それによって $\Delta 6$ デサチュラーゼによる引き続く反応が容易になる）。これに基づいて、Y. リポリティカ (*lipolytica*) $\Delta 12$ デサチュラーゼのノックアウトと併せたF. モニリフォルメ (*moniliforme*) $\Delta 12$ デサチュラーゼの過剰発現は、引き続くEPAへの変換に生成物増大をもたらすかもしれない。

30

【0289】

いくつかの実施形態では、宿主生物の天然DAG AT活性を調節し、それによってY. リポリティカ (*lipolytica*) 宿主の脂肪および油内のPUFAのパーセントの操作を可能にすることが有用かもしれない。具体的には油生合成は、油生成中にポリ不飽和化と競合することが予期されるので、生物体の1個もしくは以上のアシルトランスフェラーゼ（例えばPDATおよび/またはDGAT1および/またはDGAT2）の活性を低下させまたは不活性化し、それによって脂肪および油画分に組み込まれる（全脂肪酸に対する）PUFAのパーセントを同時に増大させながら、油生合成の全体的速度を低下させることが可能である。これはポリ不飽和化がより効率的に起きようになる、または換言すれば、特異的DAG ATの活性をダウンレギュレートすることにより、油生合成とポリ不飽和化間の基質競合が減少して、油生成中のポリ不飽和化に有利になるためである。

40

【0290】

50

当業者は、ダウンレギュレーションの最適レベルを解明するのに必要な技能、およびこのような阻害を達成するのに必要な手段を有する。例えばいくつかの好ましい実施形態では、単一DAG ATの活性を操作することが望ましいかもしれない（例えばDGAT1ノックアウトを作り出す一方、PDATおよびDGAT2の活性は改変されない）。代案の実施形態では、全部で「n」個の天然DAG ATおよび全部で「n-1」個のアシルトランスフェラーゼ活性を含んでなる油性生物が変性され、低下した油生合成速度がもたらされる一方、残るアシルトランスフェラーゼはその野生型活性を保持する。場合によっては、いくつかの好ましい油性生物中で天然DAG AT全部の活性を操作して、ポリ不飽和化速度に対する油生合成の最適速度を達成することが望ましいかもしれない。

【0291】

同様に本出願人らは、対応する天然ヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）アシルトランスフェラーゼのノックアウトと併せた異種アシルトランスフェラーゼの発現が、宿主細胞中で生成する全体的EPAを顕著に増大できると仮定した。具体的にはY. リポリティカ（*lipolytica*）中で自然に生成されるPUFAは18:2脂肪酸に限定され、天然酵素はより長い鎖脂肪酸との反応を効率的に触媒しないかもしれないので、先に提案されたように、C20以上の脂肪酸に対して特異性を有する異種のGPAT、LPAAT、DGAT1、DGAT2、PDAT、およびLPCATアシルトランスフェラーゼが、天然酵素よりも好ましい。この結論に基づいて、本出願人らはM. アルピナ（*alpina*）中でGPAT、LPAAT、DGAT1、およびDGAT2をコードする遺伝子を同定し、EPAを生成する遺伝子操作されたヤロウィア（*Yarrowia*）宿主中でこれらの遺伝子を発現させて、増大するPUFA生合成を得た（ここでの実施例20~23）。引き続いて天然および異種アシルトランスフェラーゼ間の基質競合を低下させる手段として、Y. リポリティカ（*lipolytica*）中のいくつかの天然アシルトランスフェラーゼ（例えばDGAT1およびDGAT2）の活性を減少させ、またはノックアウトした。

【0292】

EPA生成に影響する経路および包括的制御因子の操作もまた、考慮しなくてはならない。例えばパルミチン酸（16:0）およびステアリン酸（18:0）などのより長鎖の飽和および不飽和脂肪酸の前駆物質の利用可能性を増大させることで、PUFA生合成経路中への炭素の流れを増大させることが有用である。前者の合成がC_{14/16}エロンガーゼ活性に依存する一方、後者の合成はC_{16/18}エロンガーゼ活性に依存する。したがって天然ヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）C_{14/16}エロンガーゼ（配列番号77および78）の過剰発現は、実質的に16:0および16:1脂肪酸（対照株に比べて22%増大）の生成を増大させ、同様に天然Y. リポリティカ（*lipolytica*）C_{16/18}エロンガーゼ（配列番号74および75）の過剰発現は、実質的に18:0、18:1、18:2、および18:3脂肪酸（対照株に比べて18%増大）の生成を増大させ、C₁₆脂肪酸の蓄積を低下させた（対照株に比べて22%減少）。もちろんここで実証されるように、そしてイナガキ（*Inagaki*）, K. らによってBiosci. Biotech. Biochem. 66（3）: 613~621頁（2002年）の研究で提案されるように、本発明のいくつかの実施形態では、例えばドブネズミ（*Rattus norvegicus*）からの〔ジェンバンク登録番号AB071986、ここでの配列番号63および64〕および／またはM. アルピナ（*alpina*）からの〔配列番号66および67〕異種C_{16/18}エロンガーゼを同時発現することが有用かもしれない。したがってEPA生合成のためにY. リポリティカ（*lipolytica*）宿主株は、最低限、操作されて（1）Δ6デサチュラーゼ、C_{18/20}エロンガーゼ、Δ5デサチュラーゼ、およびΔ17デサチュラーゼまたはΔ15デサチュラーゼのどちらか（または双方）、または（2）Δ9エロンガーゼ、Δ8デサチュラーゼ、Δ5デサチュラーゼ、およびΔ17デサチュラーゼまたはΔ15デサチュラーゼ（または双方）のどちらか、のいずれかを発現しなくてはならないが、さらに好ましい実施形態では、宿主株は、Δ9デサチュラーゼ、Δ12デサチュラーゼ、C_{14/16}エロンガーゼおよび／または

10

20

30

40

50

a C_{16/18}エロンガーゼの少なくとも1つをさらに含む。

【0293】

別の好ましい実施形態では、本発明のヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 中で脂肪酸分解およびTAG分解に影響する経路が変性され、アシル-CoAプールまたはTAG画分のどちらかの細胞中に蓄積したEPAの分解が最小化された。これらの経路は、それぞれアシル-CoAオキシダーゼおよびリパーゼ遺伝子によって代表される。より具体的にはアシル-CoAオキシダーゼ (EC 1. 3. 3. 6) はペルオキシソームβ-酸化反応を触媒し、分解の各サイクルはアセチル-CoA分子と、脂肪酸基質よりも炭素原子2個分短い脂肪酸とを生じる。それぞれジェンバンク登録番号AJ001299~AJ001303 (対応するジェンバンク登録番号XP_504703、XP_505264、XP_503244、XP_504475、およびXP_502199も参照されたい) に対応する、POX1、POX2、POX3、POX4、およびPOX5遺伝子 (Aco1、Aco2、Aco3、Aco4、およびAco5遺伝子としても知られている) によってコードされる5種のアシル-CoAオキシダーゼイソ酵素が、ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 中に存在する。各イソ酵素は異なる基質特異性を有し、例えばPOX3遺伝子が短鎖脂肪酸に対して活性のアシル-CoAオキシダーゼをコードするのに対し、POX2遺伝子はより長鎖の脂肪酸に対して活性のアシル-CoAオキシダーゼをコードする (ワング (Wang), H. J. ら著、「J. Bacteriol.」、181: 5140~5148頁 (1999年))。これらの遺伝子のいずれか1つの活性を低下させまたは除去することによって、ここでの目的に有利たり得る様式で、本発明の宿主細胞中のペルオキシソームβ-酸化を修正できることが考察される。最後にいかなる混乱も避けるために、本出願人らは上述のようなアシル-CoAオキシダーゼをPOX遺伝子として言及するが、この用語は、いくつかの公的に入手できる文献に従ったAco遺伝子命名法と同義的に使用できる。

【0294】

同様に、細胞内、膜結合、および細胞外酵素をはじめとするいくつかのリパーゼ (EC 3. 1. 1. 3) が、Y. リポリティカ (*lipolytica*) 中で検出されている (ショピナ (Choupina), A. ら著、「Curr. Genet.」35: 297頁 (1999年); ピニェダ (Pignede), G. ら著、「J. Bacteriol.」182: 2802~2810頁 (2000年))。例えばLip1 (ジェンバンク登録番号Z50020) およびLip3 (ジェンバンク登録番号AJ249751) は細胞内または膜結合であり、一方Lip2 (ジェンバンク登録番号AJ012632) は細胞外リパーゼをコードする。酵素は、TAGおよび水がDAGおよび脂肪酸アニオンに直接分解される反応を触媒するので、これらの各リパーゼは中断の標的であった。

【0295】

さらに代案の実施形態では、好ましいヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 宿主株中で、いくつかのホスホリパーゼの活性を操作できる。ホスホリパーゼは、膜脂質の生合成および分解において重要な役割を果たす。より具体的には「ホスホリパーゼ」という用語は、グリセロリン脂質中の1個もしくはそれ以上のエステル結合を加水分解する能力を共有する異種性酵素群を指す。全てのホスホリパーゼは基質としてリン脂質を標的とするが、各酵素は特定のエステル結合を切断する能力を有する。したがってホスホリパーゼ命名法は個々のホスホリパーゼを区別して、リン脂質分子中の特定の結合標的を示唆する。例えばホスホリパーゼA₁ (PLA₁) がグリセロール部分のsn-1位で脂肪酸アシルエステル結合を加水分解するのに対し、ホスホリパーゼA₂ (PLA₂) はこの分子のsn-2位で脂肪酸を除去する。PLA₁ (EC 3. 1. 1. 3) およびPLA₂ (EC 3. 1. 1. 4) の作用は、それぞれ遊離脂肪酸および2-アシルリゾリン脂質または1-アシルリゾリン脂質の蓄積をもたらす。ホスホリパーゼC (PLC) (EC 3. 1. 4. 3) は、リン脂質主鎖中のリン酸ジエステル結合を加水分解して、1, 2-DAG、そして関与する特異的リン脂質種次第でホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミンなどを生じる (例えばPLC₁は以下の反応に関与する

：1-ホスファチジル-1D-ミオイノシトール4，5-ビスリン酸+H₂O=1D-ミオイノシトール1，4，5-トリスリン酸+DAG；ISC1はイノシトールスフィンゴリン脂質-特異的ホスホリパーゼCをコードする[サワイ(Sawai)，H.ら著、「J. Biol. Chem.」275、39793～39798頁(2000年)]。第2のリン酸ジエステル結合はホスホリパーゼD(PLD)(EC3.1.4.4)によって切断され、ここでも関与するリン脂質のクラス次第でホスファチジン酸およびコリンまたはエタノールアミンを生じる。ホスホリパーゼB(PLB)は、sn-1およびsn-2脂肪酸の双方を除去する能力を有し、(脂肪酸を放出するために酵素がリン脂質[PLB活性]およびリゾリン脂質[リゾホスホリパーゼ活性]の双方から脂肪酸を切断する)、およびリゾホスホリパーゼ-アシルトランスフェラーゼ活性(遊離脂肪酸をリゾリン脂質に転移することによって酵素がリン脂質を生成できる)の双方のヒドロラーゼを有することでユニークである。ここでの本発明で実証されるように、形質転換ヤロウィア(Yarrowia)宿主細胞の総油画分中に蓄積するEPAの濃度を増大させるために、これらのホスホリパーゼの1個もしくはそれ以上を過剰発現することが有用かもしれない。この効果は、ホスホリパーゼがトリグリセリドの延長またはその中への組み込みのどちらかのために、アシル基をPCからCoAプールへ放出するので観察されると仮定される。

【0296】

別の代案の実施形態では、全体的EPA生合成を増大させる手段として、ヤロウィア・リポリティカ(Yarrowia lipolytica)の好ましい宿主株において、ホスファチジルコリン(PC)生合成に関与するCDP-コリン経路中の酵素もまた操作できる。この技術の有用性は、ジアシルグリセロールコリンホスホトランスフェラーゼ(EC2.7.8.2)をコードするY.リポリティカ(lipolytica)CPT1遺伝子の過剰発現によって、ここでの本発明において実証され、それによって遺伝子操作されたY.リポリティカ(lipolytica)株においてEPA生合成増大がもたらされた。当業者はPC生合成経路についてよく知っており、その他の適切な候補酵素を認識する。

【0297】

上述のものなどの生化学的経路を操作する方法については当業者によく知られているが、天然遺伝子の活性を低下させるまたは排除するためのいくつかの技術の概説を下で簡単に提示する。これらの技術は上述したように、天然ヤロウィア・リポリティカ(Yarrowia lipolytica)Δ12デサチュラーゼ、GPAT、LPAAAT、DGAT1、DGAT2、PDAT、LPCAT、アシル-CoAオキシダーゼ2(Aco2またはPox2)、アシル-CoAオキシダーゼ3(Aco3またはPox3)および/またはリパーゼ遺伝子の活性をダウンレギュレートするのに有用であろう。

【0298】

当業者は天然遺伝子活性を低下させまたは排除するために利用するのに最も適した技術を見極める知識を身に付けているが、一般に、特定遺伝子の内在性活性は、例えば以下によって低下または除去できる。1.) 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遺伝子を中断する。2.) 遺伝子の転写生成物にアンチセンス配列の転写のためのカセットを提供する。3.) 天然に[または突然変異されて]特定遺伝子の活性がわずかまたは皆無である宿主細胞を使用する。4.) 変異誘発したヘテロサブユニットを過剰発現することで(すなわち2つの以上ヘテロサブユニットを含んでなる酵素中で)、「優性阻害の」の結果として酵素活性を低下させる。5.) iRNA技術を使用する。場合によっては望まれない遺伝子経路の阻害はまた、特異的阻害物質(例えば米国特許第4,778,630号明細書で述べられるものなどのデサチュラーゼ阻害物質)の使用を通じて達成できる。

【0299】

遺伝子中断では、そのコード配列を妨害し、それによって遺伝子を機能的に不活性化するために、中断させたい構造遺伝子中に外来DNA断片(典型的に選択可能マーカー遺伝

10

20

30

40

50

子、しかし場合により発現時に望ましい表現型を与えるキメラ遺伝子またはキメラ遺伝子クラスター)を挿入して中断させる。中断カセットの宿主細胞中への形質転換は、相同的組換えによって、機能性天然遺伝子の非機能性中断遺伝子による置換をもたらす(例えばハミルトン(Hamilton)ら著、「J. Bacteriol.」171:4617~4622頁(1989年);バルバス(Balbas)ら著、「Genes」、136:211~213頁(1993年);ゲルデナー(Geldener)ら著、「Nucleic Acid Res.」24:2519~2524頁(1996年);およびスミス(Smith)ら著、「Methods Mol. Cell. Biol.」5:270~277頁(1996年)参照)。

【0300】

10

アンチセンス技術は、標的遺伝子配列が既知の場合に遺伝子をダウンレギュレートする別の方法である。これを達成するために、所望の遺伝子からの核酸セグメントをクローンして、RNAのアンチセンス鎖が転写されるようにプロモーターに作動可能に連結する。次にこのコンストラクトを宿主細胞に導入し、RNAのアンチセンス鎖を生成する。アンチセンスRNAは、関心のあるタンパク質をエンコードするmRNAの蓄積を防止することで、遺伝子発現を阻害する。当業者は特定遺伝子の発現を低下させるために、アンチセンス技術の使用に特別な考慮が伴うことを理解する。例えばアンチセンス遺伝子の適切な発現レベルは、当業者には既知の異なる調節因子を使用した、異なるキメラ遺伝子の使用を必要とするかもしれない。

【0301】

20

配列が既知の場合、標的を定めた遺伝子中断およびアンチセンス技術が遺伝子をダウンレギュレートする効果的手段を提供するが、配列ベースではないその他のより特異性が低い方法が開発されている(例えばUV放射線/化学物質による変異誘発または転位因子/トランスポゾンの使用、国際公開第04/101757号パンフレットを参照されたい)。

【0302】

代案の実施形態では、特定遺伝子の内在性活性はタンパク質発現を調節する制御配列を操作することで低下できる。技術分野でよく知られているように、コード配列に関連づけられた制御配列としては、コード配列上流(5'非コード配列)、中、または下流(3'非コード配列)に位置して、転写、RNAプロセッ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する、転写および翻訳「調節」ヌクレオチド配列が挙げられる。したがって特定遺伝子の制御配列の操作とは、遺伝子のプロモーター、翻訳リーダー配列、イントロン、エンハンサー、開始制御領域、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、およびステムループ構造の操作を指してもよい。したがって例えばDAG A Tの発現をダウンレギュレートするために、DAG A Tのプロモーターを消去または中断し、それによって脂質および油合成速度を低下できる。代案としては、DAG A Tの発現を駆動する天然プロモーターを、天然プロモーターと比べて低下したプロモーター活性を有する異種のプロモーターで置換できる。制御配列を操作するのに有用な方法については、当業者によく知られている。

30

【0303】

40

要約すると、ここで提供される教示を使用して、形質転換体油性微生物宿主は微生物宿主の総脂質の少なくとも約5%のEPA、好ましくは総脂質の少なくとも約10%のEPA、より好ましくは総脂質の少なくとも約15%のEPA、より好ましくは総脂質の少なくとも約20%のEPA、より好ましくは総脂質の少なくとも約25~30%のEPA、より好ましくは総脂質の少なくとも約30~35%のEPA、より好ましくは少なくとも約35~40%、そして最も好ましくは総脂質の少なくとも約40~50%のEPAを生成する。

【0304】

EPA合成のための発酵プロセス

形質転換された微生物宿主細胞は、キメラ遺伝子の発現(例えばデサチュラーゼ、エロ

50

ンガーゼ、アシルトランスフェラーゼなどをコードする)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EPA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、炭素一対一窒素比、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が挙げられる。ヤロウィア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)は、一般に複合培地(例えば酵母菌抽出物ーペプトンー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。

10

【0305】

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、および植物油(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が挙げられる。さらに炭素源としては、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る。上述の全ての炭素源およびそれらの混合物が本発明で適切であることが期待されるが、好ましい炭素源は糖および/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。

20

【0306】

窒素は、無機(例えば $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)または有機(例えば尿素またはグルタミン酸)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、および油性酵母の生育と、EPA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(Kyle)およびR. コリン(Colin)編、「単細胞油の工業的応用(Ind. Appl. Single Cell Oils)」より、ナカハラ(Nakahara) T. ら著、61~97頁(1992年))。

30

【0307】

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、ヤロウィア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)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pH4.0~pH8.0の間であり、pH5.5~pH7.0が初期生育条件の範囲として好ましい。発酵は好気性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。

40

【0308】

典型的に油性酵母菌細胞中のPUFA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、二段階プロセスを必要とする。したがって最も好ましくは、ヤロウィア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)におけるEPA生成には、二段階発酵プロセスが必要である。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

50

発酵プロセスデザイン（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についても同様に述べられる。

【0309】

EPAの精製および加工

EPAをはじめとするPUFA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中に見いだすことができ、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。酵母菌脂質の抽出技術、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) 著、「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) 著、「Adv. Appl. Microbiol.」45 : 271~312頁 (1997年) にもある。

10

【0310】

一般にEPAおよびその他のPUFA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、鹸化と、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。

【0311】

脱酸されたおよび／または精製されたEPAを含有する油は、水素化することで、様々な融解特性およびテクスチャがある脂肪をもたらしすることができる。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、室温で異なる程度の固形性を必要とし、油源の物理特性の改変のみを通じて製造できる。これは触媒の水素付加を通じて最も一般的に達成できる。

20

【0312】

水素付加はニッケルなどの触媒の助けによって、水素が不飽和脂肪酸二重結合に付加される化学反応である。水素付加は、2つの主要効果を有する。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に脂肪酸変性が融点を上昇させて室温で半液体または固体の脂肪がもたらされるので、油の物理特性が変化する。

【0313】

水素付加反応に影響する多くの変数があり、それは次に最終生成物の組成を変化させる。圧力、温度、触媒タイプおよび濃度、攪拌および反応器設計をはじめとする操作条件は、調節できるより重要なパラメーターである。選択的水素付加条件を使用して、より低不飽和のものに優先して、より高不飽和の脂肪酸を水素化できる。非常に軽いまたはブラシ水素付加 (brush hydrogenation) を用いて、液体油の安定性を増大させることが多い。さらに水素付加は液体油を物理的に固形の脂肪に変換する。水素付加の度合いは特定の最終産物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。ベーキング製品を製造するのに使用される液体ショートニング、市販の揚げ物およびロースト操作のために使用される固体脂肪およびショートニング、およびマーガリン製造のためのベースストックは、水素付加を通じて達成される無数の可能な油および脂肪製品の例である。水素付加および水素化製品のより詳細な説明は、パターンソン (Patterson), H. B. W. 著、「脂肪および油の水素付加：理論および実線 (Hydrogenation of Fats and Oils: Theory and Practice)」、米国油化学会、1994年、にある。

30

【0314】

食材で使用するためのY. リポリティカ (lipolytica) のEPA生成株

市場は、現在、 ω -3および／または ω -6脂肪酸（特にARA、EPA、およびDHA）を組み込んだ多種多様な食物および飼料製品を下支えしている。EPAを含んでなる本発明の酵母微生物油は、食物および飼料製品で機能して、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。

40

50

【0315】

ここで述べられる酵母宿主によって生成されるω-3および／またはω-6脂肪酸を含有する微生物油は、食物類似物、肉製品、穀物製品、ベーカリー食品、スナック食品、および乳製品をはじめとするが、これに限定されるものではない、多様な食物および飼料製品で使用するのに適している。さらに本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ディカルフード、ならびに医薬品に健康上の利点を与えてもよい。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。

10

【0316】

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、ダイズタンパク質または豆腐、および共に混合されて、様々な種類の肉をシミュレートする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。肉類似物例としては、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。

【0317】

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に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。したがって代用品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ことが多く、ビタミンおよびミネラルで強化される。

20

【0318】

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。

【0319】

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、アヒル、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

【0320】

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。実施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。

40

【0321】

ベーカリー製品は、上で言及され、ベーキングに匹敵する様式で、天火焼または加工された、すなわち熱に曝すことで乾燥または硬化される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、ベークドスナック、ミニビスケット、ミニクラッカー、ミニクッキー、およびミニプ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。

50

【0322】

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。

【0323】

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。

【0324】

飲料は、液体または乾燥粉末形態であることができる。

【0325】

例えば非炭酸飲料と、生、冷凍、缶詰または濃縮果汁のフルーツジュースと、フレーバーミルクまたはプレー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 Product Division、Abbott Laboratories）からのシミラック（Similac）（登録商標）、エンシュア（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））。

10

【0326】

乳児用調製粉乳は、幼児および小児に食べさせ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 Product 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。

20

30

【0327】

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。

【0328】

その中に本発明のEPA含有油を含めることができる追加的食品としては、例えばチューインガム、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クスが挙げられる。

40

【0329】

健康食品および医薬品

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、および栄養補助食品が含まれる。さらに本発明の微生物油を標準医薬組成物で使用してもよい。本遺伝子操作ヤロウィア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）株、またはそれから産するEPAを含んでなる微生物油は、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が生成できる。例えばARAまたはEPA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

50

、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。

【0330】

動物飼料における使用

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EPA含有油は、様々な動物飼料中の成分として使用できる。

【0331】

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、牧草および干し草生成物（例えばアルファルファ、チモシー、カラスム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、淡水または海水生物および／または動物の繁殖、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。

【0332】

高濃度のARA、EPAおよび／またはDHAを生成する本遺伝子操作ヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）株は、ほとんどの動物飼料配合に含めるのに特に有用であることが考察される。必要な ω -3および／または ω -6PUFAを提供するのに加えて、酵母それ自体が、全体的な動物の健康および栄養に寄与できる有用なタンパク質およびその他の栄養素源（例えばビタミン、ミネラル、核酸、複合糖質など）であり、ならびに調合物の美味性を増大する。したがって本発明の組換え生産宿主を含んでなる酵母バイオマスの添加は、動物飼料配合において優れた追加的飼料栄養素源であることが考察される。より具体的には、ヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）（ATCC#20362）は、乾燥細胞重量に対するパーセントとして以下のおよその化学組成を有する、35%のタンパク質、40%の脂質、10%の炭水化物、5%の核酸、5%の灰分、および5%の水分。さらに炭水化物画分内では、 β -グルカンがおよそ45.6mg/gを構成し、マンナンがおよそ11.4mg/gを構成し、キチンがおよそ52.6mg/gを構成する（一方トレハロースは微量構成要素である〔およそ0.7mg/g〕）。

【0333】

かなり多数の文献が、 β -グルカン、マンナン、およびキチンの免疫調節効果について調査している。細菌および真菌細胞壁の主要構成要素である β -グルカンが、それによって非特異的免疫を刺激する（すなわち「免疫賦活効果」）ことで水産養殖種、ペットおよび家畜およびヒトの健康を改善する手段について最もよく研究されているが、キチンおよびマンナンの双方が同様に有用な免疫賦活剤として認識されている。単純化すると、これらの β -1,3-D-ポリグルコース分子は白血球細胞（例えばマクロファージ、好中球、および単球）の生成を非特異的様式で刺激し、それによって多様な病原体抗原または環境ストレス要因に対する感度および防御を増大させるので、免疫応答の全体的改良は β -グルカンの使用によって達成できる。より具体的には、多数の研究が以下の β -グルカンの機能を実証している。ウィルス性、細菌、真菌、および寄生虫性感染に対する増強された保護を与え、抗生物質およびワクチンと共に使用されるとアジュバント効果を発揮し、創傷治癒を増強し、遊離ラジカルに起因する損傷に対処し、腫瘍の緩解を増強し、細菌内毒素の毒性を和らげ、粘膜免疫を強化する（ラー（Raa），J.ら著、「ノルウェー β -グルカン研究、自然薬品の臨床応用。免疫：抑制、機能不全、および欠損（Norwegian Beta Glucan Research, Clinical Applications of Natural Medicine. Immune: De pre

ssions Dysfunction & Deficiency)」(1990年)でレビューされている)。伝統的畜産業および水産養殖セクター内の双方における酵母β-グルカン、マンナン、およびキチンの有用性について記述している現行の文献の例としては、以下が挙げられる。L. A. ホワイト(White)ら著、「J. Anim. Sci.」80:2619~2628頁(2002年)、離乳ブタにおける栄養補給; K. S. スワンソン(Swanson)ら著、「J. Nutr.」132:980~989頁(2002年)、犬における栄養補給; J. オルトゥー(Ortuno)ら著、「Vet. Immunol. Immunopath.」85:41~50頁(2002年)、ヨーロッパヘダイに投与されたホール・サッカロミセス・セレヴィシエ(*Saccharomyces cerevisiae*); A. ロドリゲス(Rodriguez)ら著「Fish Shell. Immun.」16:241~249頁(2004年)、ヨーロッパヘダイに投与されたホール・ムコール・シルシネロイデス(*Mucor circineoides*); M. バグニ(Bagni)ら(「Fish Shell. Immun.」18:311~325頁(2005年))、β-グルカンを含む酵母抽出物によるスズキの栄養補給; クルススアレス(Cruz-Suarez), L. E.、リックマリー(Ricque-Marie), D.、タピアーサラザール(Tapia-Salazar), M.、オリヴェラーノヴォア(Olivera-Novoa), M. A. およびシヴェラーセセード(Civera-Cerecedo), R. 編、「(水産栄養学における進歩5、第5回水産栄養4シンポジウム紀要(Avances en Nutricion Acuicola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutricion Acuicola)、2000年11月19~22日、メキシコ国ユカタン州メリダ)より、J. ラー(Ra a)著、魚および貝類飼料における免疫賦活剤の使用に関するレビュー。

【0334】

ヤロウィア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)のユニークなタンパク質:脂質:炭水化物組成、ならびにユニークな複合糖質プロフィール(1:4:4.6の比率でマンナン:β-グルカン:キチンを含んでなる)に基づいて、本発明の遺伝子改変酵母細胞(またはその一部)が、動物飼料配合に対する有用な添加剤になり得ることが考察された(例えばホール「凍結乾燥」酵母細胞として、精製された細胞壁として、精製された酵母炭水化物として、または様々なその他の分画された形態で)。

【0335】

水産養殖産業については、様々な魚種の栄養所要量に対する理解の高まり、および飼料製造における技術的進歩が、水産養殖産業における栄養補給または天然飼料を置き換えるための人造または人工飼料(配合飼料)の開発および使用を可能にした。しかし一般に、魚のための水産養殖飼料に含まれる様々な栄養素の一般的割合(乾燥飼料に対するパーセント)は、32~45%のタンパク質、4~28%の脂肪(その内少なくとも1~2%はω-3および/またはω-6PUFAである)、10~30%の炭水化物、1.0~2.5%のミネラル、および1.0~2.5%のビタミンを含む。多様なその他の成分も場合により調合物に添加されてもよい。これらとしては、(1)特にサケ科および鑑賞「水槽」魚のために、肉および皮膚の着色をそれぞれ増強するカロチノイド、(2)ペレットに安定性を提供し、栄養素(例えば牛心臓肉、デンプン、セルロース、ペクチン、ゼラチン、アラビアゴム、ローカストビーン、寒天、カラゲニン、およびその他のアルギン酸塩)の水中への浸出を減少させる結合剤、(3)魚飼料の貯蔵寿命を延長し、脂肪酸敗を低下させる抗菌剤および抗酸化剤などの保存料(例えばビタミンEと、ブチル化ヒドロキシアニソールと、ブチル化ヒドロキシトルエンと、エトキシキンと、プロピオン酸、安息香酸またはソルビン酸のナトリウムおよびカリウム塩)、(4)飼料の美味性および摂取を増強する化学誘引剤および香味料、および(5)その他の飼料原料が挙げられる。これらのその他の飼料原料としては、繊維および灰分(それぞれ充填材としておよびカルシウムおよびリン源として使用するための)、および食餌の栄養価を増強し、魚によるその受容性を高めるための植物質および/または魚粉または粉末イカ(例えば生、冷凍または乾燥藻

類、鹹水エビ、ワムシまたはその他の動物性プランクトン)などの材料が挙げられる。「魚の栄養所要量 (Nutrient Requirements of Fish)」(米国学術研究会議、全米アカデミー: Washington D. C.、1993年)は、魚の必須栄養素および様々な成分の栄養素含量の詳細な説明を提供する。

【0336】

完全な食餌は、栄養的にバランスがとれており、美味で、水安定性でなくてはならず、適切なサイズおよびテクスチャを有さねばならないので、アクアフィード調合物の製造には多様な要素の検討を要する。アクアフィードの栄養組成に関しては、「水産養殖飼料成分ハンドブック (Handbook on Ingredients for Aquaculture Feeds)」ヘルトランプ (Hertrampf), J. W. および F. ピエダッドーパスカル (Piedad-Pascual) 著、Kluwer Academic: Dordrecht, The Netherlands、2000年、および「養殖魚およびエビの栄養と給餌の標準法 (Standard Methods for the Nutrition and Feeding of Farmed Fish and Shrimp)」タコン (Tacon), A. G. J. 著、Argent Laboratories: Redmond、1990年を参照されたい。一般に餌は、乾燥 (すなわち最終含水量 6~10%)、半湿潤 (すなわち含水量 35~40%) または湿潤 (すなわち含水量 50~70%) であるように調合される。乾燥飼料としては、乾燥成分の単純なルースな混合物 (すなわち「粉餌」または「ミール」) と、圧縮ペレット、クランブルまたは顆粒と、フレークとが挙げられる。魚の給餌要件次第で、ペレットは沈降または浮遊するようにできる。半湿潤および湿潤飼料は単一または混合成分 (例えば雑魚または調理マメ) から作られ、ケーキまたはボールに成形できる。

【0337】

高濃度の EPA を生成する本遺伝子操作ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 株が、ほとんどの水産養殖飼料に含めるのに特に有用であることは明らかである。必要な ω -3 および ω -6 PUFA を提供するのに加えて、酵母それ自体が、調合物の美味性を増大できる有用なタンパク質源である。代案の実施形態では、本 Y. リポリティカ (*lipolytica*) 株によって生成される油を細胞集団からの抽出および精製に続いて、水産養殖飼料配合中に直接導入できる。

【0338】

EPA 油補給がもたらす臨床健康上の利点

EPA の食餌補給は、血清コレステロールおよびトリグリセリドを低下させるのに有用であり、例えば冠動脈心疾患、高血圧、炎症性疾患 (例えば関節リウマチ)、肺および腎臓疾患、II 型糖尿病、肥満症、潰瘍性大腸炎、クローン病、神経性食欲不振症、火傷、骨関節炎、骨粗鬆症、注意欠陥/多動性障害、早期結腸直腸癌、および精神障害 (例えば統合失調症) において健康に良い影響を有することが示されている (例えばマッコール (McColl), J. 著、NutraCos 2 (4): 35~40 頁 (2003年)、C. C. アコー (Akoh) および O. -M. ライ (Lai) 編、「健康的脂質 (Healthful Lipids)」より、シンクレア (Sinclair), A. ら著、第 16 節、AOC S, Campaign, IL (2005年) のレビューを参照されたい) が、これらの臨床観察の根底にある分子および生化学的機序は依然として不明である。とりわけ多くの過去の研究は、個々の長鎖 ω -3 脂肪酸 (例えば EPA および DHA) が代謝的および機能的に互いに相異なり、したがってそれぞれが特異的生理学的機能を有するかもしれないことを認識できなかった。この機構的明確さの欠如は、主に臨床試験において、純粋 EPA または純粋 DHA ではなく、PUFA 源として魚油が使用されたことから帰結する [例えばメンヘーデン、タラの肝臓、イワシ、およびカタクチイワシからの油の脂肪酸組成物は、およそ 0.9:1~1.6:1 の EPA:DHA 比を有する油を含んでなる (「脂質ハンドブック (The Lipid Handbook)、第 2 版、F. D. ガンストーン (Gunstone)、J. L. ハーウッド (Harwood)、および F. B. (Padley) 編、Chapman and Hall、1994年) 内の

データに基づく]。それにもかかわらず、EPAそれ自体が重要な ω -3脂肪酸であるという認識の高まりがある。その結果、本発明のEPA強化油が、例えば炎症、心臓血管疾患、遺伝子発現の栄養制御、および異脂肪血症などの様々な治療への応用、そして具体的には冠動脈心疾患、高血圧、炎症性疾患、I I型糖尿病、潰瘍性大腸炎、クローン病、神経性食欲不振症、火傷、骨関節炎、骨粗鬆症、および注意欠陥／多動性障害をはじめとする臨床症状の処置において、非常に幅広い用途を有することがここで期待される。

【0339】

下でこれらの各応用に関連して述べる結果は、臨床人体研究に基づいているが、これはここでの本発明を制限するものではない。具体的には出願者らは、様々なその他の動物（例えば家庭のペット、反芻動物、家禽類、魚など）における同様の健康上の懸念の処置ためのEPA強化油の使用を予見する。

10

【0340】

EPAおよび炎症

魚油が持つ抗炎症特性を説明するために、多くの生化学的機序が提案されている。現在普及している機序は、 ω -3脂肪酸が炎症性細胞膜の ω -6脂肪酸量を減少させて、 ω -6脂肪酸由来炎症促進性メディエータ（例えばシリーズ2プロスタグランジンおよびシリーズ4ロイコトリエン）の合成を可能にする ω -6脂肪酸代謝を阻害することを提案する。さらに ω -3脂肪酸は、強力な炎症メディエータ（例えばシリーズ3プロスタグランジンおよびシリーズ5ロイコトリエン）を生じさせる。しかし最近の研究は、今や、低ナノモル濃度範囲におけるそれらの生物学的活性によって示されるように非常に強力な、レゾルビン（「消散相相互作用生成物」と称される新しい脂質抗炎症メディエータファミリーを同定した。このファミリー内には、EPA誘導レゾルビン（すなわちE-シリーズレゾルビンまたは「RvE」）およびDHA誘導レゾルビン（すなわちD-シリーズレゾルビンまたは「RvD」）の双方がある（セルハン（Serhan），C. N. 著、Pharma. & Therapeutics、105：7～21頁（2005年）でレビューされる）。アリタ（Arita），M. ら著、PNAS、102（21）：7671～7676頁（2005年）で実証されたようなRvE1（5S，12R，18R-トリヒドロキシ-6Z，8E，10E，14Z，16E-EPA）の明確な役割は、ヒトの健康および疾患におけるEPAの有益な作用のいくつかの根拠を形成するかもしれない機制的な証拠を提供する。

20

30

【0341】

この新しい生物学は、炎症過程の栄養的および医学的管理の双方におけるEPA強化製品の可能な有用性を強調する。さらに炎症は、心臓血管から代謝（例えば代謝シンドロームX、肥満症、糖尿病）から神経疾患（例えばアルツハイマー）に至る多くの疾患の根底にあるので、（本発明のものなどの）EPA濃縮油は幅広い有用性を有することが期待される。医学的有用性は、以下から派生するかもしれないことが期待される。（1）メディカルフード中での生理活性因子としてのEPAまたはRvEの使用、および／または（2）一般用医薬品または処方薬への補助治療法としてのEPAの添加。最後に、EPAはRvEおよび医療用に最適化された新しい化学物質合成のための前駆物質としての有用性を見いだすかもしれない。

40

【0342】

EPAおよび心臓血管疾患

魚油およびその関連 ω -3脂肪酸は、二次予防における（すなわち被験者が既に心臓血管症状を示している、または心血管事故を経験しているという背景で）心臓血管疾患の管理において、かなりの心臓保護を示している。これらの研究は有望であるが、これらには、とりわけEPA対DHAの相対重要性、および一次予防背景における[例えば（1）心筋梗塞または狭心症の履歴がなく、血管形成術／ステント術または冠動脈バイパス移植のいずれもない、および（2）狭心症の臨床所見または心電図に異常がない患者における]これらの脂肪酸の有効性など、いくつかの重要な未解決疑問が残されている。

【0343】

50

日本のEPA脂質介入研究(「JELIS」)は、スタチンと組み合わせた>98%精製EPA-エチルエステルを使用した大規模ランダム化比較試験において、これらの疑問に対処する努力をしている(ヨコヤマ(Yokoyama), M. およびH. オリガサ(Origasa) 著、Amer. Heart J.、146:613~620頁(2003年))。結果の最終分析は2005年後半以降であるが、著者らは、スタチンに加えてEPAを投与されている患者における心血管事故が、スタチンを単独投与されている患者に比べて約25%減少すると予測する。さらにこの研究が予測通りの結果を生じれば、これはEPAそれ自体が心臓保護因子であるという強力な支持を提供し、それによってEPA濃縮油の市場が開かれる。それはまた、EPA/レゾルビンタイプ混合物とスタチンとを組み合わせる、および/または現在、魚油を供給源としてそれから製造されるEPA-エチルエステル薬(例えば日本国東京の持田製薬からのEPADL)の製造において、本発明の酵母油を高純度EPA源として利用する機会も与えるかもしれない。

10

【0344】

ω-3PUFAおよび遺伝子発現の栄養制御

長鎖ω-3PUFAは、以下を導くことができる燃料分配者として機能することがよく知られている。(1) グルコースを脂肪酸生合成から外してグリコーゲン貯蔵に向け、(2) 脂肪酸をトリグリセリド合成から外して酸化に向ける。再分配の正味の効果は、循環するトリグリセリドの減少であり、いくつかの種では脂肪沈着の減少である。これらの長鎖ω-3PUFAが、それによって代謝に対する効果を発揮する分子機序は、それに次いで遺伝子発現を制御する、様々なリガンド活性化転写因子との相互作用の結果であること

20

【0345】

これまでのところ脂肪酸による遺伝子転写の制御は、PPAR(ペルオキシソーム増殖因子-活性化受容体)、LXR(肝臓X受容体)、HNF-4α(肝臓核因子4)、およびSREBP(ステロール調節要素結合タンパク質)の少なくとも4つの転写因子ファミリーの活性または豊富さの変化に起因するよう見える(クラーク(Clarke), S. D. 著、J. Nutr.、131(4):1129~1132頁(2001年)およびCurr. Opin. Lipidology、15:13~18頁(2004年);ペゴリエール(Pegorier), J.-P. 著、J. Nutr.、134:2444S~2449S頁(2004年)を参照されたい)。この相互作用の例として、EPAは肝臓中のPPARαの活性化を通じて血清トリグリセリドを低下させると考えられており、そしてその抗炎症薬活性のいくらかは(特に血管壁のレベルで)、動脈マクロファージ中のPPARの生態によって仲介されるかもしれない。

30

【0346】

それによって脂肪酸が特異的遺伝子発現を調節する機序の知識は、全身の脂質代謝のより良い管理、および血清トリグリセリドおよびコレステロールレベル(冠動脈心疾患およびその他の慢性疾患の確立された危険因子)調節のための新しい治療戦略の開発に関する識見を提供するかもしれない。同様に将来の研究は、最適なヒト健康の維持および促進において、栄養素と遺伝子との相互作用の制御因子として、EPA対DHAが果たす差別的役割を評価することが期待される。

40

【0347】

オメガ-3PUFAおよび異脂肪血症

魚油の摂取は、心疾患の増大するリスクを与える有害事象である低比重リポタンパク質(LDL)コレステロールのわずかな増大としばしば結びつけられてきた。ティボルド(Theobald), H. E. ら(Amer. J. Clinical Nutrition、79:558~563頁(2004年))の最近の研究は、このLDLコレステロール上昇が、実のところ(EPAとは対照的に)DHAに起因するかもしれないことを提案した。具体的には約0.7gのDHAの毎日の摂取は、3ヶ月で中高年男女においてLDLコレステロールを7%増大させた。対照的に精製されたEPAまたはEPA強化油を使用した研究は、一般に同様のLDLコレステロール増大を報告していない(ハリス(Ha

50

rris), W. S. 著、Amer. J. Clinical Nutrition、65 (補遺): 1645S~1654S頁(1997年)。低用量のDHAがもたらすLDLコレステロール増大の理由を明らかにするためにさらなる研究が必要であるが、DHAを含有しない本発明のEPA強化油の効用は、潜在的に顕著な臨床上的利点を有するかもしれない。

【0348】

本発明の微生物油を精製し、比較的純粋なEPAを含んでなる油をもたらしことが望ましいかもしれないが、代案の実施形態では、EPAおよび少なくとも1つのその他のPUFAに富んだ最終油製品の使用によって利点が観察されるかもしれない。例えば証拠は、EPAおよびGLAの組み合わせによる栄養補給が、血清脂質に好ましい影響を有するかもしれないことを示唆する。具体的には、M. レイドロー (Laidlaw) およびB. J. ホルブ (Holub) 著、Amer. J. Clinical Nutrition、77: 37~42頁(2003年)によって報告されるように、EPAおよびDHA (合わせて4g) およびGLA (2g) の混合物を含んでなる毎日の栄養補給は、28日の間に健康な女性において血液脂質および脂肪酸プロファイルを変化させた。患者のLDLコレステロールを11.3%低下させるのに加えて、EPA、DHA、およびGLAを投与された患者において、計算された10年間の心筋梗塞リスクは43%低下した。したがってGLAの添加は、EPAおよびDHAがLDLコレステロールのわずかな上昇を引き起こす傾向を相殺する (ティボルド (Theobald) ら、前出)。総合すれば、レイドロー (Laidlaw) およびホルブ (Holub) およびティボルド (Theobald) らによる研究は、EPAおよびGLAの双方が強化されているが、DHAは強化されていない油の臨床上的利点を提案するかもしれない。

【0349】

慢性炎症は、関節炎、糖尿病、および心疾患などの疾患と関係があるため、GLAおよびEPAの補給剤組み合わせの有用性は、慢性炎症を低下させ、それと闘う手段として広く普及している (F. チルトン (Chilton) およびL. タッカー (Tucker) 著、「炎症国家: 我々の国家の秘密の流行病を終わらせる初の臨床的に証明された摂食プラン (Inflammation Nation: The First Clinically Proven Eating Plan to End Our Nation's Secret Epidemic)、 Fireside Books)。具体的にはGLAの補給は以前、炎症の脂質メディエータの創出を低下させ、慢性炎症性疾患 (例えば関節リウマチ) の臨床症状を減弱することが示されているが、この同一脂肪酸の補給はまた、潜在的有害副作用である血清ARAレベルの顕著な増大を引き起こすことでも知られている。これらの二分効果の基本原理は、必須 ω -6脂肪酸LAのARAへの完全な変換 (ω -6 Δ 6デサチュラーゼ/ Δ 6エロンガーゼ経路を経由し、GLAおよびDGLA中間体を通じた) を可能にする肝臓中の Δ 5デサチュラーゼ活性の存在のためであるとされ、一方好中球などの炎症性細胞はDGLAをARAに変換する代謝能力を欠いている。したがってEPAとの同時補給は、DGLA合成を可能にしながら、肝臓中のARA合成をブロックすると仮定された。原理の臨床的証拠は、J. B. バーハム (Barham) ら著、J. Nutr. 130: 1925~1931頁(2000年)のヒト食餌実験において確立され、(血清ARAレベルの上昇を引き起こすことなく) 脂質メディエータを低下させるGLAの能力を維持する補給戦略は、EPAの添加を必要とすることが実証された。したがって炎症に関連するこれらの研究は、GLAおよびEPAを含んでなる油の有用性のさらなる支持を提供する (一方、EPA補給不在下でのGLA使用は禁忌であるかもしれない)。

【0350】

本発明では、本出願人らは、総脂質中に顕著な割合のGLAもまた生成する (すなわちGLA:EPA比が0.89~2.1:1の範囲である、表10参照) いくつかのEPA生成Y. リポリティカ (lipolytica) 株について述べる。EPA生成Y. リポリティカ (lipolytica) 株中の特異的脂質プロファイルの生成は、ここでの教

示に基づいて、遺伝子操作された $\omega-3/\omega-6$ 脂肪酸生合成経路で利用される各デサチュラーゼおよびエロンガーゼの発現レベルを操作することで容易に可能であり、将来の臨床研究がGLAおよびEPAの好ましい用量に関する定義を提供することが期待される。

【0351】

好ましい実施形態の説明

本発明は、油性酵母ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) の総脂質画分中に28%までのEPAの合成を実証する。図5に示すように、様々な遺伝子を野生型ATCC#20362 Y. リポリティカ (*lipolytica*) に組み込んで、多数のY. リポリティカ (*lipolytica*) 株が作り出され、各形質転換体株は (EPAをはじめとする) 異なる量のPUFAを生成できた。 $\omega-6\Delta6$ デサチュラーゼ/ $\Delta6$ エロンガーゼ経路を発現するいくつかの代表的な形質転換体生物の完全な脂質プロファイルを下の表10に示す。脂肪酸は16:0、16:1、18:0、18:1 (オレイン酸)、18:2 (LA)、GLA、DGLA、ARA、ETA、およびEPAとして同定され、それぞれの組成は、全脂肪酸の%で表される。「%dcw脂質」は、乾燥細胞重量で測定される細胞中の脂質の百分率を表す。

10

【0352】

【表 1 9】

表 10

ω -6 Δ 6 デサチュラーゼ/ Δ 6 エロンガーゼ経路を発現する代表的なヤロウアイア・リポリテイク株の脂質プロフィール

株	付加遺伝子数							遺伝子 KO	脂肪酸含量								%		
	Δ12	Δ6	ELO 1	ELO 2	Δ5	Δ17	C ₁₆ ELO		16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	GLA	DGLA	ARA		ETA	EPA
M4	1	1	1	1	-	-	-	<i>Ura</i>	15	4	2	5	27	35	8	0	0	0	-
EU	1	1	1	1	2	3	-	<i>Aco3</i> , <i>Ura</i>	19	10.3	2.3	15.8	12	18.7	5.7	0.2	3	10.3	36
Y2072	2	1	2	1	4	3	1	<i>Aco3</i> , Δ12	7.6	4.1	2.2	16.8	13.9	27.8	3.7	1.7	2.2	15	-
Y2102	3	2	3	1	3	3	2	<i>Aco3</i> , Δ12, <i>Lip1</i>	9	3	3.5	5.6	18.6	29.6	3.8	2.8	2.3	18.4	-
Y2088	3	2	3	1	4	3	1	"	17	4.5	3	2.5	10	20	3	2.8	1.7	20	-
Y2089	3	2	3	1	5	3	2	"	7.9	3.4	2.5	9.9	14.3	37.5	2.5	1.8	1.6	17.6	-
Y2095	3	2	3	1	6	3	1	"	13	0	2.6	5.1	16	29.1	3.1	1.9	2.7	19.3	-
Y2090	3	2	3	1	4	3	3	"	6	1	6.1	7.7	12.6	26.4	6.7	2.4	3.6	26.6	22.9
Y2096	3	2	3	1	5	3	2	"	8.1	1	6.3	8.5	11.5	25	5.8	2.1	2.5	28.1	20.8

上表に見られるように、 ω -6 Δ 6 デサチュラーゼ/ Δ 6 エロンガーゼ経路を発現し、最も多量の EPA を生成する株は、組換えヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) Y2096 株であった。この生物から得られた GC クロマトグラムを図 6 に示す。Y2096 株内に含有される遺伝的修正のより詳細な要約について下で述べる (完全な詳細は実施例で提供する)。

(1) FBA::F. Δ 12::LIP2 および TEF::F. Δ 12::PEX16 キメラ遺伝子内における、2 コピーのフザリウム・モニリフォルメ (*Fusarium moniliforme*) Δ 12 デサチュラーゼの発現、

(2) FBAIN::M. D12::PEX20 キメラ遺伝子内における、1 コピーのモルティエラ・イザベリナ (*Mortierella isabellina*) Δ 12 デサチュラーゼの発現、

10

(3) TEF:: Δ 6S::LIP1 および FBAIN:: Δ 6S::LIP1 キメラ遺伝子内における、モルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) Δ 6 デサチュラーゼ由来の 2 コピーの合成 Δ 6 デサチュラーゼ遺伝子 (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) の発現、

(4) FBAIN::MA Δ 5S::PEX20 および TEF::MA Δ 5S::LIP1 キメラ遺伝子内における、2 コピーのモルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) Δ 5 デサチュラーゼの発現、

(5) TEF::H. D5S::PEX16 および GPAT::H. D5S::PEX20 キメラ遺伝子内における、ヒト (*Homo sapiens*) Δ 5 デサチュラーゼ由来の 2 コピーの合成 Δ 5 デサチュラーゼ遺伝子 (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) の発現、

20

(6) TEF::I. D5S::PEX20 キメラ遺伝子内における、イソクリシス・ガルバナ (*Isochrysis galbana*) Δ 5 デサチュラーゼ由来の 1 コピーの合成 Δ 5 デサチュラーゼ遺伝子 (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) の発現、

(7) FBAIN:: Δ 17S::LIP2、TEF:: Δ 17S::PEX20、および FBAINm:: Δ 17S::PEX16 キメラ遺伝子内における、サプロレグニア・ディクリナ (*Saprolegnia diclina*) Δ 17 デサチュラーゼ由来の 3 コピーの合成 Δ 17 デサチュラーゼ遺伝子 (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) の発現、

30

(8) FBAIN::EL1S::PEX20、GPAT::EL1S::XPR、および GPDIN::EL1S::LIP2 キメラ遺伝子内における、モルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) 高親和力 C_{18/20} エロンガーゼ由来の 3 コピーの合成高親和力 C_{18/20} エロンガーゼ遺伝子 (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) の発現、

(9) TEF::EL2S::XPR キメラ遺伝子内における、スラウストキトリウム・アウレウム (*Thraustochytrium aureum*) C_{18/20} エロンガーゼ由来の 1 コピーの合成 C_{18/20} エロンガーゼ遺伝子 (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) の発現、

40

(10) TEF::rELO2S::PEX20 キメラ遺伝子内における、ドブネズミ (*Rattus norvegicus*) rELO 遺伝子由来の 2 コピーの合成 C_{16/18} エロンガーゼ遺伝子 (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) の発現、

(11) Δ 12 デサチュラーゼをコードする天然 Y. リポリティカ (*lipolytica*) 遺伝子の中断、

(12) アシル-CoA オキシダーゼ 3 をコードする天然 Y. リポリティカ (*lipolytica*) Pox3 遺伝子の中断、および

(13) リパーゼ 1 をコードする天然 Y. リポリティカ (*lipolytica*) Lip1 遺伝子の中断。

50

【0354】

同様に ω -6 Δ 9エロンガーゼ/ Δ 8デサチュラーゼ経路を発現し、最も多量のEPA（すなわち9%）を生成する株は、組換えヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）Y2201株であった。この株の完全な脂質プロファイルを下に示し、脂肪酸は16:0、16:1、18:0、18:1（オレイン酸）、18:2（LA）、20:2（EDA）、DGLA、ARA、ETA、およびEPAとして同定される（それぞれの組成は全脂肪酸の%で表される）。

【0355】

【表20】

10

表 11

ヤロウィア・リポリティカY2201 株の脂質プロファイル

	脂肪酸含量									
	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	20:2	DGLA	ARA	ETA	EPA
Y2201 株	11.0	16.1	0.7	18.4	27.0	3.3	3.3	1.0	3.8	9.0

【0356】

Y2201株内に含有される遺伝的修正のより詳細な要約について下で述べる（完全な詳細は実施例で提供する）。

20

（1）FBAIN::F.D12S::Pex20キメラ遺伝子内における、1コピーのフザリウム・モニリフォルメ（*Fusarium moniliforme*） Δ 12デサチュラーゼの発現、

（2）GPM/FBAイントロン::rELO2S::Octキメラ遺伝子内における、ドブネズミ（*Rattus norvegicus*）rELO遺伝子由来の1コピーの合成C_{16/18}エロンガーゼ遺伝子（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）の発現、

（3）GPAT::IgD9e::Pex20、TEF::IgD9e::Lip1、およびFBAINm::IgD9e::OCTキメラ遺伝子内における、イソクリシス・ガルバナ（*Isochrysis galbana*） Δ 9エロンガーゼ遺伝子由来の5コピーの合成 Δ 9エロンガーゼ遺伝子（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）の発現、

30

（4）FBAIN::D8SF::Pex16およびGPD::D8SF::Pex16キメラ遺伝子内における、ミドリムシ（*Euglena gracilis*） Δ 8デサチュラーゼ遺伝子由来の3コピーの合成 Δ 8デサチュラーゼ遺伝子（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）の発現、

（5）FBAIN::MA Δ 5::Pex20およびGPAT::MA Δ 5::Pex20キメラ遺伝子内における、2コピーのモルティエラ・アルピナ（*Mortierella alpina*） Δ 5デサチュラーゼの発現、

40

（6）GPM/FBAIN::I. Δ 5S::OctおよびYAT1::I.D5S::Lip1キメラ遺伝子内における、イソクリシス・ガルバナ（*Isochrysis galbana*） Δ 5デサチュラーゼ由来の2コピーの合成 Δ 5デサチュラーゼ遺伝子（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）の発現、

（7）YAT1::D17S::Lip2およびGPD::D17S::Lip2キメラ遺伝子内における、サプロレグニア・ディクリナ（*Saprolegnia diclina*） Δ 17デサチュラーゼ由来の2コピーの合成 Δ 17デサチュラーゼ遺伝子（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）の発現、

（8）アシルーCoAオキシダーゼ2をコードする、天然Y.リポリティカ（*lipol*

50

ytica) Pox2 遺伝子の中断、

(9) オロチジン⁻5'-リン酸デカルボキシラーゼをコードする天然 Y. リポリティカ (lipolytica) Ura3 遺伝子の中断および再組み込み、サッカロピンデヒドロゲナーゼをコードする天然 Y. リポリティカ (lipolytica) Lys5 遺伝子の中断、および

(10) イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼをコードする天然 Y. リポリティカ (lipolytica) Leu2 遺伝子の中断および再組み込み。

【0357】

最後に、 ω -3 Δ 9 エロンガーゼ/ Δ 8 デサチュラーゼ経路を発現し、最も多量の EPA (すなわち 1.3%) を生成する株は、組換えヤロウィア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) L116 株であった。この株に関する完全な詳細およびその完全な脂質プロファイルは実施例 18 で提供する。L116 株内に含有される遺伝的修正のより詳細な要約について下で述べる。

(1) FBAIN::Fmd15:Lip2 および GPD::Fmd15:XPR キメラ遺伝子内における、5 コピーのフザリウム・モニリフォルメ (Fusarium moniliforme) Δ 15 デサチュラーゼの発現、

(2) FBAIN::Fmd12::Lip2 キメラ遺伝子内における、1 コピーのフザリウム・モニリフォルメ (Fusarium moniliforme) Δ 12 デサチュラーゼの発現、

(3) GPAT::D9E::Lip1 キメラ遺伝子内における、イソクリシス・ガルバナ (Isochrysis galbana) Δ 9 エロンガーゼ遺伝子由来の 2 コピーの合成 Δ 9 エロンガーゼ遺伝子 (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) の発現、

(4) FBAIN::D8:Pex16 キメラ遺伝子内における、ミドリムシ (Euglena gracilis) Δ 8 デサチュラーゼ遺伝子由来の 2 コピーの合成 Δ 8 デサチュラーゼ遺伝子 (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) の発現、および

(5) FBAIN::DrD6:Pex20 キメラ遺伝子内のゼブラフィッシュ (Danio rerio) Δ 5/ Δ 6 デサチュラーゼ由来の 1 コピーの合成二機能 Δ 5/ Δ 6 デサチュラーゼ遺伝子の発現。

【0358】

本出願人らはこれらの特定のヤロウィア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) 組換え株において、28.1% の EPA、9% の EPA、および 1.3% の EPA の生成をそれぞれ実証するが、宿主細胞中の EPA 濃度は、ここでの本発明に従った追加的遺伝的修正を通じて顕著に増大できることが考察された。さらにここで述べる教示および結果に基づいて、当業者が、 ω -6 Δ 6 デサチュラーゼ/ Δ 6 エロンガーゼ経路および/または ω -3 Δ 6 デサチュラーゼ/ Δ 6 エロンガーゼ経路および/または ω -6 Δ 9 エロンガーゼ/ Δ 8 デサチュラーゼ経路および/または ω -3 Δ 9 エロンガーゼ/ Δ 8 デサチュラーゼ経路を使用した、様々な ω -3 および/または ω -6 PUFA 合成のための生産プラットホームとして油性酵母を使用してもたらされる、実行可能性および商業的有用性を認識することが期待される。

【実施例】

【0359】

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、本発明の好ましい実施形態を示しながら、例示のみの目的で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、その精神と範囲を逸脱することなく、本発明の様々な変更および修正を行って、それを様々な使用法および条件に適合できる。

【0360】

一般方法

実施例で使用する標準組換え DNA および分子クローニング技術は、技術分野でよく知

10

20

30

40

50

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. 著、「分子クローニング：実験室マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」、Cold Spring Harbor Laboratory: 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) 著、「遺伝子融合実験 (Experiments with Gene Fusions)」、Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY (1984年)、および3.) オースベル (Ausubel), F. M. 著、「分子生物学現代プロトコル (Current Protocols in Molecular Biology)」、Greene Publishing および Wiley-Interscience による出版 (1987年) で述べられる。

10

【0361】

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、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 (Phillipp 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、Washington, D. C. (1994年)、またはトーマス (Thomas), D. ブロック (Brock) 著、「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、Sinauer Associates: 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スバーグのギブコ/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。

20

30

【0362】

大腸菌 (*E. coli*) (XL1-Blue) コンピテント細胞は、カリフォルニア州サンディエゴのストラタジーン (Stratagene Company (San Diego, CA)) から購入した。大腸菌 (*E. coli*) 株は、典型的にルリア・ベルターニ (Luria Bertani) (LB) プレート上で37℃で生育させた。

【0363】

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)。オリゴヌクレオチドは、テキサス州スプリングのシグマジェノシス (Sigma-Genosys (Spring, TX)) によって合成された。特に断りのない限り、個々のPCR増幅反応は、以下を含んでなる50 μLの全容積で実施した。PCR緩衝液 (10 mMのKCl、10 mMの(NH₄)₂SO₄、20 mMトリス-HCl (pH 8.75)、2 mMのMgSO₄、0.1%トリトンX-100を含有する)、100 μg/mLのBSA (最終濃度)、各200 μMのデオキシリボヌクレオチド三リン酸、各10ピコモルのプライマー、およびカリフォルニア州サンディエゴのストラタジーン (Stratagene (San Diego, CA)) からの1 μLのPfu DNAポリメラーゼ。部位特異的変異誘発は、ストラタジーン (Stratagene) のクイ

40

50

ックチェンジ (QuickChange) (商標) 部位特異的変異誘発キットを使用して、製造業者の取扱説明書に従って実施した。PCRまたは部位特異的変異誘発がサブクローニングに伴う場合は、コンストラクトを配列決定して、配列にエラー導入されなかったことを確認した。PCR生成物はウィスコンシン州マディソンのプロメガ (Promega (Madison, WI)) からの pGEM-T-エージーベクター中にクローンした。

【0364】

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、EP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。ミシガン州アンアバーのジーン・コードス社 (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、DNA STAR (DNA STAR Inc.) からのDNASTARソフトウェアを使用して達成された。代案としては、ジェネティックス・コンピュータ・グループ (Genetics Computer Group Inc.) から入手できるプログラムスイート (ウィスコンシン・パッケージ (Wisconsin Package) バージョン9.0、ウィスコンシン州マディソンのジェネティックス・コンピュータ・グループ (Genetics Computer Group) (GCG) (Madison, WI)) を使用して、遺伝的配列の操作を達成した。GCGプログラム「パイルアップ (Pileup)」をギャップ創生デフォルト値12およびギャップ延長デフォルト値4で使

10

20

【0365】

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 (Altschul), S. F. ら著、「J. Mol. Biol.」215:403~410頁 (1993年) および「Nucleic Acids Res.」25:3389-3402頁 (1997年)) を実施して、BLAST「nr」データベース (全ての非冗長ジェンバンクCDS翻訳、3次元構造ブルックヘブタンパク質データベース由来配列、スイスPROTタンパク質配列データベース、EMBLおよびDDBJデータベースを含んでなる) に含まれる配列に対する類似性を有する単離配列を同定した。配列を全ての読み枠で翻訳し、NCBIによって提供されるBLASTXアルゴリズム (ギッシュ (Gish), W. およびステーツ (States), D. J. 著、「Nature Genetics」3:266~272頁 (1993年)) を使用して、「nr」データベースに含まれる全ての公共的に入手できるタンパク質配列との類似性について比較した。

30

【0366】

クエリー配列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」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」は、2つのタンパク質間で同一のまたは保存されたアミノ酸の百分率として定義される。「期待値」は、この大きさのデータベース検索で期待される、絶対的に偶然の特定スコアでのマッチ数を明記して、マッチの統計学的有意さを推定する。

40

【0367】

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、「μmole」はマイクロモルを意味し、「g」はグラムを意味し、「

50

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。

【0368】

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

ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) ATCC# 20362、#76982、および#90812株は、メリーランド州ロックビルの米国微生物系統保存機関から購入した。Y. リポリティカ (*Y. lipolytica*) 株は、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) 上において通常28℃で生育させた。代案としては「SD」培地は、以下を含んでなる。硫酸アンモニウム添加、アミノ酸無添加、および2%グルコース添加0.67%酵母窒素ベース。

10

【0369】

Y. リポリティカ (*lipolytica*) の形質転換は、特に断りのない限りチェン (Chen), D. C. ら著、「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33500の2.25mLの50%PEG、pH6.0の0.125mLの2M酢酸Li、0.125mLの2M DTT、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。

20

【0370】

形質転換体の選択のためには、一般にSD培地または最少培地 (「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%酵母窒素ベース、2%グルコース、0.1%プロリン、pH6.1。適切ならばアデニン、ロイシン、リジンおよび/または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「MMA」、「MML e」、「MML y」、および「MMU」選択培地を生成した)。

30

【0371】

代案としては形質転換体は、次を含んでなる5-フルオロオロチン酸 (「FOA」、また5-フルオロウラシル-6-カルボン酸一水和物とも) 選択培地上で選択された。DIFCOラボラトリーズ (DIFCO Laboratories) 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%酵母窒素ベース、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。

40

【0372】

最後に、油生成条件を促進するためにデザインされた「二段階生育条件」のために、次のようにして高グルコース培地 (「HGM」) を調製した。14g/LのKH₂PO₄、4g/LのK₂HPO₄、2g/LのMgSO₄・7H₂O、80g/Lグルコース (pH6.5)。以下のプロトコルに従った「二段階生育条件」下で株を培養した。最初に、250rpm/分間で48時間振盪しながら30℃の液体MM中で細胞を三連で生育させた。遠心分離によって細胞を収集し、液体上清を抽出した。ペレット化した細胞をHGMに再懸濁し、30℃において250rpm/分間で振盪しながら72時間または96時間のどちらかで生育させた。細胞を遠心分離によって再度収集し、液体上清を抽出した。

【0373】

50

「変性二段階生育条件」のために使用された変性培地は、以下から成る「SD+AA」培地であった。アミノ酸無添加であるが、硫酸アンモニウム、20 g グルコース、および1×アミノ酸ミクス(20 mg/mL 硫酸アデニン、20 mg/mL ウラシル、20 mg/mL のL-トリプトファン、20 mg/mL のL-ヒスチジン-HCl、20 mg/mL のL-アルギニン-HCl、20 mg/mL のL-メチオニン、30 mg/mL のL-チロシン、30 mg/mL のL-ロイシン、30 mg/mL のL-イソロイシン、30 mg/mL のL-リジン-HCl、50 mg/mL のL-フェニルアラニン、100 mg/mL のL-グルタミン酸、100 mg/mL のL-アスパラギン酸、150 mg/mL のL-バリン、200 mg/mL のL-スレオニン、および400 mg/mL のL-セリン)添加の6.7 g 酵母窒素ベース。

10

【0374】

ヤロウィア・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(Bligh), E. G. およびダイヤー(Dyer), W. J. 著、Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911~917頁(1959年)で述べられるように、細胞を遠心分離し収集して脂質を抽出した。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. 著、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30m×0.25mm(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。

20

【0375】

直接塩基エステル交換のために、ヤロウィア(*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。

【0376】

実施例1

ヤロウィア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)における高発現のためのプロモーター同定

各プロモーターと、レポーター遺伝子としてβ-グルクロニダーゼ(GUS)をコードする大腸菌(*E. Coli*)遺伝子とを含んでなるコンストラクトを合成して、TEF、GPD、GPDIN、GPM、GPAT、FBA、FBAIN、およびYAT1プロモーターのプロモーター活性を調べる比較研究を実施した(ジェファーソン(Jefferson), R. A. 著、Nature. 14(342): 837~838頁(1989年))。次に組織化学的および蛍光定量的アッセイによって(ジェファーソン(Jefferson), R. A. 著、「Plant Mol. Biol. Reporter」5: 387~405頁(1987年))、および/またはmRNA定量化のためのリアルタイムPCRを使用して、GUS活性を測定した。

30

40

【0377】

キメラプロモーター::GUS::XPR遺伝子を含んでなるプラスミドの構築

プラスミドpY5-30(図7A、配列番号126)は、以下を含んだ。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*)中で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*)中での選択のためのヤロウィア(*Yarrowia*)LEU2遺伝子、およびキメラTEF::GUS::XPR遺伝子。このプラスミドをベースとして、TEFプロモーターがその他の多様な天然Y. リポリティカ(*lipolytica*)

50

）プロモーターによって置換される、一連のプラスミドを作り出した。

【0378】

下の表12に示すプライマー、およびテンプレートとしてのゲノムY. リポリティカ (lipolytica) DNA、またはウィスコンシン州マディソンのプロメガ (Promega (Madison, WI)) からのpGEM-T-エージーベクター中にクローンされた適切なDNA領域を含有するゲノムDNA断片のどちらかを使用して、推定上のプロモーター領域をPCRによって増幅した。

【0379】

【表21】

表 12

キメラプロモーター::GUS::XPR 遺伝子を含んでなるプラスミドの構築

プロモーター	プライマー	遺伝子に対する位置	RE 部位	プラスミド名
GPD	YL211、YL212 (配列番号 184 および 185)	gpd 遺伝子の「ATG」翻訳開始 部位から-968bp (配列番号 173)	<i>Sall</i> および <i>NcoI</i>	pYZGDG
GPDIN	YL376、YL377 (配列番号 186 および 187)	gpd 遺伝子周辺の-973bp～ +201bp(したがって 146bp の イントロンを含み、イントロンは +49bp～+194bp に位置する) (配列番号 174)	<i>PstI/NcoI</i> (プロモーター) および <i>PstI/Sall</i> (ベクター)	pDMW222
GPM	YL203、YL204 (配列番号 188 および 189)	gpm 遺伝子の「ATG」翻訳開始 部位から-875bp (配列番号 175)	<i>NcoI</i> および <i>Sall</i>	pYZGMG
GPAT	GPAT-5-1、 GPAT-5-2 (配列番号 190 および 191)	gpat 遺伝子の「ATG」翻訳開始 部位から-1130bp (配列番号 179)	<i>Sall</i> および <i>NcoI</i>	pYGPAT-GU S
FBA	ODMW314、 YL341 (配列番号 192 および 193)	fba 遺伝子周辺の-1001bp～ -1bp (配列番号 176)	<i>NcoI</i> および <i>Sall</i>	pDMW212
FBAIN	ODMW320、 ODMW341 (配列番号 194 および 195)	fba 遺伝子周辺の-804bp～ +169bp(したがって 102bp の イントロンを含み、イントロンは +62bp～+165bp)に位置する (配列番号 177)	<i>NcoI</i> および <i>Sall</i>	pDMW214
YAT1	27203-F、27203-R (配列番号 196 および 197)	yat1 遺伝子周辺の-778bp～ -1bp (配列番号 180)	<i>HindIII</i> および <i>Sall</i> 、また <i>NcoI</i> および <i>HindIII</i>	pYAT-GUS

注記:「ATG」翻訳開始コドンの「A」ヌクレオチドを+1と命名した

【0380】

一般方法で述べられるようにして、GPD、GPDIN、GPM、FBA、およびFBAINについて個々のPCR増幅反応を50μLの全容積で実施した。サーモサイクラー条件は、次のように設定した。95℃で1分間、56℃で30秒間、および72℃で1分間を35サイクルと、それに続く72℃で10分間の最終延長。

【0381】

日本国滋賀県大津市520-2193のタカラバイオからのプレミクス2×PCR溶液の1:1希釈を使用して、GPATプロモーターのためのPCR増幅を50μLの全容積で実施した。最終組成物は以下を含有した。25mMのTAPS (pH9.3)、50mMのKCl、2mMのMgCl₂、1mMの2-メルカプトエタノール、各200μMの

10

20

30

40

50

デオキシリボヌクレオチド三リン酸、各10ピコモルのプライマー、50ngテンプレート、および1.25Uのウィスコンシン州マディソンのタカラミラスバイオ (Takara Mirus Bio (Madison, WI)) からのタカラ (TaKaRa) Ex Taq (商標) DNAポリメラーゼ。サーモサイクラー条件は、次のように設定した。94℃で2.5分間、55℃で30秒間、および72℃で2.5分間を30サイクルと、それに続く72℃で6分間の最終延長。

【0382】

YAT1プロモーターのPCR増幅を、GPATについて上述したのと比較できる組成物中で実施した。反応混合物を最初に94℃で150秒間加熱した。増幅は次のように実施した。94℃で30秒間、55℃で30秒間、および72℃で1分間を30サイクルと、それに続く72℃で7分間の最終延長。

【0383】

キアゲン (Qiagen) PCR精製キットを使用して各PCR生成物を精製し、次に(標準条件を使用して上表に従って)制限酵素で消化して1% (w/v) アガロース中でのゲル電気泳動法に続いて消化生成物を精製した。次に消化したPCR生成物(YAT1からのものを除く)を同様に消化したpY5-30ベクター中にライゲートした。次に各反応からのライゲートしたDNAを使用して、大腸菌 (E. coli) Top10、大腸菌 (E. coli) DH10Bまたは大腸菌 (E. coli) DH5αを個別に形質転換した。形質転換体をアンピシリン (100 μg/mL) 含有LB寒天上で選択した。

【0384】

YAT1は、pY5-30中へのクローニングに先だって追加的操作を必要とした。具体的にはYAT1PCR生成物をHindIIIおよびSalIで消化すると約600bpの断片が得られ、NcoIおよびHindIIIで消化すると約200bpの断片が得られた。双方の生成物を単離し精製した。次にプラスミドpYGPA-TGUSをSalIおよびNcoIで消化し、約9.5kBの断片を単離して精製した。3個のDNA断片を共にライゲートしてpYAT-TGUSを作り出した。

【0385】

各形質転換反応からのプラスミドDNAの分析は、予想されたプラスミドの存在を立証した。これらのプラスミドを次のように命名した。pYZGDG (GPD::GUS::XPRキメラ遺伝子を含んでなる)、pDMW222 (GPDIN::GUS::XPRキメラ遺伝子を含んでなる)、pYZGMG (GPM::GUS::XPRキメラ遺伝子を含んでなる)、pYGPA-TGUS (GPAT::GUS::XPRキメラ遺伝子を含んでなる)、pDMW212 (FBA::GUS::XPRキメラ遺伝子を含んでなる)、pDMW214 (FBAIN::GUS::XPRキメラ遺伝子を含んでなる)、およびpYAT-TGUS (YAT1::GUS::XPRキメラ遺伝子を含んでなる)。

【0386】

一般方法で述べられるようにして、上の各プラスミド、およびさらにプラスミドpY5-30 (TEF::GUS::XPRキメラ遺伝子を含んでなる)をY. リポリティカ (lipolytica) 中に別々に形質転換した。Y. リポリティカ (lipolytica) 宿主はY. リポリティカ (lipolytica) ATCC#76982またはY. リポリティカ (lipolytica) ATCC#20362、Y2034株(下記実施例4、Δ6デサチュラーゼ/Δ6エロンガーゼ経路によって10%のARAを生成できる)のいずれかであった。全ての形質転換された細胞をロイシンを欠く最小培地プレート上に播種し、30℃に2~3日間保った。

【0387】

GUS発現の組織化学的分析によるヤロウィア (Yarrowia) プロモーターの比較分析

プラスミドpY5-30、pYZGDG、pYZGMG、pDMW212、およびpDMW214を含有するヤロウィア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) ATCC#76982株を単一コロニーから3mLのMM中で30℃においてOD

10

20

30

40

50

約 1.0 に生育させた。次に 100 μ L の細胞を遠心分離によって収集し、100 μ L の組織化学的染色緩衝液に再懸濁して、30℃でインキュベートした。染色緩衝液は、5mg の 5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルグルクロニド (X-Gluc) を 50 μ L のジメチルホルムアミドに溶解し、続けて 5mL の 50mM NaPO₄、pH 7.0 を添加して調製した。組織化学的染色の結果 (図 7B) は、コンストラクト pY5-30 中の TEF プロモーター、コンストラクト pYZGDG 中の GPD プロモーター、コンストラクト pYZGMG 中の GPM プロモーター、コンストラクト pDMW212 中の FBA プロモーター、そしてコンストラクト pDMW214 中の FBAIN プロモーターが全て活性であることを示した。FBA および FBAIN プロモーターの双方が、その他の全プロモーターよりもはるかに強力であるように見え、FBAIN プロモーターが最も強いプロモーター活性を有した。

10

【0388】

別の実験で、プラスミド pY5-30、pYGPAAT-GUS、pYAT-GUS、および pDMW214 を含有する *Y. lipolytica* Y2034 株を単一コロニーから 5mL の SD 培地中で 30℃において OD₆₀₀ 約 8.0 に 24 時間生育させた。次に遠心分離によって 1mL の細胞を収集した。残る培養を遠心分離して HGM で 2 回洗浄し、各 5mL の HGM に再懸濁して、30℃でさらに生育させた。24 時間および 120 時間後に、約 0.25mL の各培養を遠心分離して細胞を収集した。細胞サンプルを 100 μ L の組織化学的染色緩衝液 (前出) 個別に再懸濁した。カリフォルニア州 コスタメサの ICN バイオメディカルズ (ICN Biomedicals (Costa Mesa, CA)) からの ザイモラーゼ (Zymolase) 20T (5 μ L の 1mg/mL) をそれぞれに添加して、混合物を 30℃でインキュベートした。

20

【0389】

組織化学的染色の結果は、SD 培地で 24 時間生育させると、コンストラクト pYGPAAT-GUS 中の GPAT プロモーターが活性であり、またコンストラクト pYAT-GUS 中の YAT1 プロモーターも活性であることを示した (図 7C、「SD 培地中 24 時間」)。比較すると、GPAT プロモーターは TEF プロモーターよりもはるかに強力であるように見え、FBAIN プロモーターと比べて活性減少を示した。同様に細胞を SD 培地で 24 時間生育させると、YAT1 プロモーターは TEF プロモーターよりも強力であるが、FBAIN プロモーターおよび GPAT プロモーターよりも顕著に弱いように見えた。しかし HGM 中で 24 時間生育させた細胞中では、YAT1 プロモーターは GPAT プロモーターよりも強力であり、FBAIN プロモーターと同程度であった (図 7C、「HGM 培地中 24 時間」)。これは HGM 中で 120 時間後も同じであった (図 7C、「HGM 培地中 120 時間」)。したがって YAT1 プロモーターは、窒素制限によって油性生育条件を促進する培地である HGM 中で、誘導されるように見えた。

30

【0390】

GUS 発現の蛍光定量的アッセイによる *Yarrowia* (Yarrowia) プロモーターの比較分析

GUS 活性もまた、対応する基質 β -グルクロニドからの 4-メチルウンベリフェロン (4-MU) 生成の蛍光定量的測定によってアッセイした (ジェファーソン (Jefferson), R. A. 著、「Plant Mol. Biol. Reporter」5: 387~405 頁 (1987 年))。

40

【0391】

プラスミド pY5-30、pYZGDG、pYZGMG、pDMW212、および pDMW214 を含有する *Yarrowia lipolytica* ATCC # 76982 株を単一コロニーから 3mL の MM 中で (上述のように) 30℃において OD₆₀₀ 約 1.0 に生育させた。次に各 3mL の培養を 50mL の MM を含有する 500mL フラスコに入れて、振盪培養器内で 30℃で約 24 時間生育させた。細胞を遠心分離によって収集し、プロメガ (Promega) 細胞溶解緩衝液に再懸濁して、カリフォルニア州 ビスタの バイオ 101 (BIO 101 (Vista, CA)) から

50

のバイオブレイザー (Biopulverizer) システムを使用して溶解した。遠心分離後、上清を除去して氷上に保存した。

【0392】

同様にプラスミド pY5-30、pYAT-GUS、pYGPA-T-GUS、および pDMW214 コンストラクトをそれぞれ含有する Y. リポリティカ (lipolytica) Y2034 株を単一コロニーから 10 mL の SD 培地中で 30 °C において OD₆₀₀ 約 5.0 に 48 時間生育させた。下で述べられるように、各 2 mL の培養を GUS 活性アッセイのために収集する一方、各 5 mL の培養を HGM に移した。

【0393】

具体的には、5 mL のアリコートからの細胞を遠心分離によって収集し、5 mL の HGM で 1 回洗浄して HGM 中に再懸濁した。次に HGM 中の培養を振盪培養器中で 30 °C において 24 時間生育させた。GUS 活性アッセイのために各 2 mL の HGM 培養を収集し、残る培養をさらに 96 時間生育させた後、さらに各 2 mL の培養をアッセイのために収集した。

【0394】

SD 培地中の各 2 mL の培養サンプルをプロメガ (Promega) からの 1 mL の 0.5 × 細胞培養溶解試薬に再懸濁した。再懸濁した細胞を 2.0 mL のゴムリング付きネジ口試験管内で、0.6 mL のガラスビーズ (0.5 mm 直径) と混合した。次に細胞をオクラホマ州バートルズビルのバイオスペック (BioSpec (Bartlesville, OK)) からのミニビーズビーター内で、最高設定で 90 秒間均質化した。均質化混合物をエッペンドルフ遠心機内で 14,000 rpm で 2 分間遠心分離して、細胞残骸およびビーズを除去した。上清を GUS アッセイおよびタンパク質測定のために使用した。

【0395】

各蛍光定量的アッセイでは、100 μL の抽出物を 700 μL の GUS アッセイ緩衝液 (抽出緩衝液中 2 mM の 4-メチルウンベリフェリル-β-D-グルクロニド (「MUG」)) に添加し、または 200 μL の抽出物を 800 μL の GUS アッセイ緩衝液に添加した。混合物を 37 °C に置いた。100 μL のアリコートを 0、30、および 60 分間の時点で採取して、900 μL の停止緩衝液 (1 M の Na₂CO₃) に入れた。励起波長 360 nm および発光波長 455 nm に設定した、マサチューセッツ州フレーミングハムのパーセプティブ・バイオシステムズ (PerSeptive Biosystems (Framingham, MA)) からのサイトフロー (CyttoFluor) シリーズ 4000 蛍光マルチウェルプレートリーダーを使用して、各時点を読み取った。10 μL の抽出物および 200 μL のバイオラッド・ブラッドフォード (BioRad Bradford) 試薬または 20 μL の抽出物および 980 μL のバイオラッド・ブラッドフォード (BioRad Bradford) 試薬を使用して、各サンプルの全タンパク質濃度を判定した (ブラッドフォード (Bradford), M. M. 著、Anal. Biochem. 72: 248~254 頁 (1976 年))。GUS 活性は、1 分あたりのタンパク質 1 mg あたりの 4-MU のナノモルとして表された。

【0396】

Y. リポリティカ (lipolytica) ATCC # 76982 株 T 中で、TEF、GPD、GPM、FBA、および FBAIN プロモーターを比較するようにデザインされた、これらの蛍光定量的アッセイの結果を図 8A に示す。具体的には Y. リポリティカ (lipolytica) 中で、FBA プロモーターは GPD プロモーターよりも 2.2 倍強力であった。さらに FBAIN プロモーターの GUS 活性は、GPD プロモーターよりも約 6.6 倍強力であった。

【0397】

Y. リポリティカ (lipolytica) Y2034 株中で TEF、GPAT、YAT1、および FBAIN プロモーターを比較するようにデザインされたこれらの蛍光定量的アッセイの結果を下の表に示す。

【0398】

【表22】

表 13

様々な生育条件下での TEF、FBAIN、YAT1、および GPAT プロモーター活性の比較

培養条件	プロモーター			
	TEF	FBAIN	YAT1	GPAT
48 時間 SD	0.401	43.333	0.536	5.252
24 時間 HGM	0.942	30.694	19.154	2.969
120 時間 HGM	0.466	17.200	13.400	3.050

10

【0399】

細胞抽出物の GUS 活性に基づいて YAT1 プロモーター活性が定量化された上のデータに基づいて、YAT1 プロモーター活性は、細胞を SD 培地から HGM に移して 24 時間生育させると約 37 倍増大した。HGM 中で 120 時間後、活性はいくらか低下したが、なおも SD 培地中での活性よりも 25 倍高かった。対照的に FBAIN プロモーターおよび GPAT プロモーター活性は、SD 培地から HGM に移すと 24 時間でそれぞれ 30% および 40% 低下した。TEF プロモーター活性は、HGM 中で 24 時間時間後に 2.3 倍増大した。したがって YAT1 プロモーターは油性条件下で誘導可能である。

20

【0400】

GUS 発現の定量的な PCR 分析によるヤロウィア (Yarrowia) プロモーターの比較分析

定量的 PCR 分析によって pY5-30、pYZGDG、pDMW222、pDMW212、および pDMW214 コンストラクトを含有する Y. リポリティカ (lipolytica) 中で、TEF、GPD、GPDIN、FBA、および FBAIN プロモーターの転写活性を判定した。これは RNA の単離およびリアルタイム RT-PCR を必要とした。

【0401】

30

より具体的には pY5-30、pYZGDG、pDMW222、pDMW212、および pDMW214 を含有する Y. リポリティカ (lipolytica) ATCC #76982 株を単一コロニーから 25 mL エルレンマイアーフラスコ内の 6 mL の MM 中で 30°C において 16 時間生育させた。次に各 6 mL のスターター培養を 140 mL の HGM を含有する個々の 500 mL フラスコに入れて、30°C で 4 日間インキュベートした。各 24 時間のインターバルで、1 mL の各培養を各フラスコから除去して光学濃度を測定し、27 mL を除去して (上述のように) 蛍光定量的 GUS アッセイのために使用し、1.5 mL の 2 つのアリコートで RNA 単離のために除去した。RNA 単離のための培養を遠心分離して細胞ペレットを生成した。

【0402】

40

カリフォルニア州サンディエゴのキアゲン (Qiagen (San Diego, CA)) からの修正キアゲン (Qiagen) RNeasy ミニプロトコルに従って、RNA をヤロウィア (Yarrowia) 株から単離した。簡単に述べると、各サンプルのための各時点で、340 µL のキアゲン (Qiagen) の緩衝液 RLT を使用して、2 個の各細胞ペレットを再懸濁した。2 本の各試験管からの緩衝液 RLT/細胞懸濁液混合物をカリフォルニア州サンディエゴのバイオ 101 (Bio 101 (San Diego, CA)) からのビーズビーティング試験管内で合わせた。約 500 µL の 0.5 mL ガラスビーズを試験管に添加して、カリフォルニア州サンディエゴのバイオ 101 社 (Bio 101 Company (San Diego, CA)) からのバイオプルベライザー (BioPulverizer) 中で設定 5 において 2 分間のビーズビーティングによって細

50

胞を破壊した。次に14,000rpmで1分間の遠心分離によって破壊細胞をペレット化して、350μLの上清を新しい微小遠心管に移した。各均質化した溶解産物にエタノール(350μLの70%)を添加した。穏やかな混合後、全サンプルを2mL収集試験管内のRNeasyミニカラムに入れた。サンプルを10,000rpmで15秒間遠心分離した。緩衝液RW1(350μL)をRNeasyミニカラムに添加して、カラムを10,000rpmで15秒間遠心分離し細胞を洗浄した。溶出液は廃棄した。キアゲン(Qiagen)のDNase1原液(10μL)を70μLの緩衝液RDDに添加して穏やかに混合した。この全DNase溶液をRNeasyミニカラムに入れて、室温で15分間インキュベートした。インキュベーションステップ後、350μLの緩衝液RW1をミニカラムに添加して、カラムを10,000rpmで15秒間遠心分離した。カラムを700μLの緩衝液RW1で2回洗浄した。RNA分解酵素フリーの水(50μL)をカラムに添加した。カラムを10,000rpmで1分間遠心分離してRNAを溶出した。

10

【0403】

全ヤロウィア(Yarrowia)RNAが最初にcDNAに転換され、次にリアルタイムPCRを使用してcDNAが分析される、二段階RT-PCRプロトコルを使用した。カリフォルニア州フォスターシティのアプライド・バイオシステムズ(Applied Biosystems(Foster City, CA))の高容量cDNAアーカイブキット(製品番号4322171)およびフロリダ州ホリーヒルのメディアテック(Media Tech, Inc.(Holly Hill, FL))からの分子生物学等級水(製品番号46-000-Con)を使用して、cDNAへの転換を実施した。ヤロウィア(Yarrowia)からの全RNA(100ng)を10μLのRT緩衝液、4μLの25×dNTPs、10μLの10×ランダム六量体プライマー、5μLのマルチスクライブ(Multiscribe)逆転写酵素、および0.005μLのRNA分解酵素阻害物質と合わせて、水で全反応容積を100μLにして、それをcDNAに転換した。反応をサーモサイクラー内で25℃で10分間、続いて37℃で2時間インキュベートした。リアルタイム分析に先だってcDNAを-20℃で保存した。

20

【0404】

アプライド・バイオシステムズ(Applied Biosystems)からのSYBRグリーンPCRマスターミクス(製品番号4309155)を使用して、リアルタイム分析を実施した。逆転写反応(2μL)を10μLの2×SYBR PCRミクス、URA(すなわちプライマーYL-URA-16FおよびYL-URA-78R[配列番号198および199])またはGUS(すなわちプライマーGUS-767FおよびGUS-891R[配列番号200および201])のどちらかのための0.2μLの100μM順方向および逆方向プライマー、および7.2μLの水に添加した。ABI 7900配列検出システム装置内で、反応を95℃で10分間、続いて95℃で5秒間および60℃で1分間を40サイクルのサーモサイクルにかけた。各サイクル中の60℃延長中に、リアルタイム蛍光データを収集した。

30

【0405】

10/2001更新のアプライド・バイオシステムズ(Applied Biosystems)ユーザー公報#2「遺伝子発現の相対定量化(Relative Quantitation of Gene Expression)」に従ってΔΔCT法を使用し、相対定量化を実施した。URA遺伝子をGUS発現の正規化のために使用した。正規子遺伝子としてのURAの使用を確認するために、GUSおよびURAのPCR効率を比較したところ、それぞれ1.04および0.99であった(1.00が100%効率と等しい)。PCR効率はどちらも100%近いので、GUS発現のための正規子としてのURAの使用が確認され、発現定量化のためのΔΔCT法の使用についても同様であった。正規化した量をΔCTと称する。

40

【0406】

異なる各株(すなわちpYZGDG、pDMW222、pDMW212、およびpDM

50

W214コンストラクトを含有するY. リポリティカ (*lipolytica*) ATCC #76982株)中のGUSmRNAをpY5-30 (TEF::GUS)で、株のmRNAレベルに定量化した。したがって発現の相対定量化は、TEF::GUSを標準試料として株のmRNAレベルを使用して計算した。GPD::GUS、GPDIN::GUS、FBA::GUS、およびFBAIN::GUSの正規化した値をTEF::GUS標準の正規化した値と比較した。この量を $\Delta\Delta CT$ と称する。次に式、 $2^{-\Delta\Delta CT}$ を使用して、 $\Delta\Delta CT$ 値を絶対値に変換する。これらの値は、キメラTEF::GUS遺伝子と比べた、キメラGPD::GUS、GPDIN::GUS、FBA::GUS、およびFBAIN::GUS遺伝子を含んでなる株中のGUSのmRNAレベルの増加倍数を指す。この方法を使用して、TEFプロモーターの活性をGPD、GPDIN、FBA、およびFBAINプロモーターと比較することが可能であった。

10

【0407】

各GUSキメラ遺伝子のmRNAの相対定量化の結果を図8Bに示す。より具体的には、アッセイは、HGM中で24時間後にFBAおよびFBAINプロモーターの転写活性が、TEFプロモーターよりもそれぞれ約3.3および6倍強力であったことを示した。同様にGPDおよびGPDINプロモーターの転写活性は、TEFプロモーターよりもそれぞれ約2および4.4倍強力であった。FBA::GUS、FBAIN::GUS、GPD::GUS、およびGPDIN::GUS遺伝子融合の転写活性が4日間の実験期間中に低下したのに対し、FBAINおよびGPDINプロモーターの転写活性は、実験最終日においてTEFプロモーターよりもなお約3および2.6倍強力であった。

20

【0408】

実施例2

ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) において遺伝子転写を増大するのに有用なエンハンサーの同定

FBAINおよびGPDINの強力なプロモーター活性（活性がFBAおよびGPDプロモーター活性をそれぞれ超える）、および各プロモーター領域内のイントロンの同定に基づいて、本研究を実施して各イントロン中にエンハンサーが存在するかどうかを判定した。

【0409】

具体的には、GPM::FBAINプロモーター融合およびGPM::GPDINプロモーター融合から成る2つのキメラプロモーターを発生させて、GUSレポーター遺伝子の発現を推進した。キメラプロモーター（「構成要素1」および「構成要素2」を含んでなる）については下の表14で述べる。

30

【0410】

【表23】

表14

キメラプロモーター内のキメラプロモーター::GUS::XPR 遺伝子を含んでなるプラスミドの構築

キメラ プロモーター	構成要素1	構成要素2	プラスミド 名
GPM::FBAIN (配列番号182)	GPMの-1bp~-843bp領域	FBAINの+1bp~+171bp領域、 イントロンは+62bp~+165bpに位置する	pDMW224
GPM::GPDIN (配列番号183)	GPMの-1bp~-843bp領域	GPDINの+1bp~+198bp領域、 イントロンは+49bp~+194bpに位置する	pDMW225

40

【0411】

キメラプロモーターは、それぞれがプラスミドpDMW224およびpDMW225中のGUSレポーター遺伝子の発現を推進するように配置される。

【0412】

50

(実施例1で述べられるような)組織化学的アッセイからの結果に基づいて、pY5-30、pYZGDG、pYZGMG、およびpDMW214コンストラクトを含んでなるY. リポリティカ (*lipolytica*) 株中のGUS活性とpDMW224およびpDMW225を含んでなるY. リポリティカ (*lipolytica*) 株のGUS活性とを比べることで、GPM::FBAINプロモーターおよびGPM::GPDINプロモーターの活性をTEF、FBAIN、GPDIN、およびGPMプロモーターと比較した。以前判定されたように、FBAINプロモーターは最強のプロモーターであった。しかしキメラGPM::FBAINプロモーターおよびキメラGPM::GPDINプロモーターは、どちらもGPMプロモーターよりもはるかに強力であり、GPDINプロモーターと活性が同等であるように見えた。したがってこれはGPDINプロモーターおよびFBAINプロモーターの双方におけるエンハンサーの存在を立証した。

10

【0413】

当業者はGPDINイントロンまたはFBAINイントロンのどちらかを使用して、同様のキメラプロモーターを容易に構築できるであろう。

【0414】

実施例3

スルホニル尿素選択

るヤロウィア (*Yarrowia*) の遺伝的改善は、適切な非抗生物質選択可能形質転換マーカーの欠如によって妨げられてきた。本実施例は、一般に、半数体、二倍体、異数体または異型接合性であってもよい工業酵母株にもまた適用できる、スルホニル尿素抵抗性に基づくY. リポリティカ (*lipolytica*) のための優勢な非抗生物質マーカーの開発について述べる。

20

【0415】

理論および初期感度スクリーニング

アセトヒドロキシ酸シンターゼ (AHAS) は、分枝鎖アミノ酸の生合成経路の最初の一般的な酵素である。これはスルホニル尿素およびイミダゾリノン除草剤の標的である。したがってスルホニル尿素除草剤抵抗性は、微生物および植物の双方において報告されている。例えばサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) においては、AHAS中の単一のW586L突然変異がスルホニル尿素除草剤に対する抵抗性を与える (ファルコ (Falco), S. C.、ら著、「Dev. Ind. Microbiol.」30:187~194頁 (1989年) ; ダグルビー (Duggleby), R. G. ら著、「Eur. J. Biochem.」270:2895頁 (2003年)) 。

30

【0416】

野性型AHAS Y. リポリティカ (*lipolytica*) (ジェンバンク登録番号XP_501277) およびS. セレビシエ (*cerevisiae*) (ジェンバンク登録番号P07342) 酵素のアミノ酸配列を比較すると、S. セレビシエ (*cerevisiae*) 酵素の586位のTrpアミノ酸残基は、Y. リポリティカ (*lipolytica*) 酵素497位のTrp残基と同等であった。したがって野性型細胞それ自身がスルホニル尿素に感応性であれば、Y. リポリティカ (*lipolytica*) 酵素中のW497L突然変異は、おそらくスルホニル尿素除草剤抵抗性を与えると仮定される。当業者によく知られている方法を使用して、スルホニル尿素 (クロリムロンエチル) は最小培地中に100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で、野性型Y. リポリティカ (*lipolytica*) 株ATCC#20362およびATCC#90812の生育を阻害するのに十分であることが判定された。

40

【0417】

突然変異W497L AHAS遺伝子の合成

W497L突然変異 (配列番号292) を含有するY. リポリティカ (*lipolytica*) AHAS遺伝子を二段階反応でゲノムDNAから作り出した。最初にストラタジェン (*Stratagene*) からのPfuウルトラ (商標) 高忠実度DNAポリメラー

50

ゼ（カタログ番号600380）およびプライマー410および411〔配列番号396および397〕を使用して、ゲノムDNAからAHAS遺伝子の5'部分を増幅し、同様にプライマー412および413〔配列番号398および399〕を使用して遺伝子の3'部分を増幅した。2対のプライマーは、重複領域がW497L突然変異（「CT」が「TG」に変化する突然変異）を含むように重複した。

【0418】

正確なサイズの5'および3'PCR生成物をゲル精製して第2回目のPCRのためのテンプレートとして使用し、プライマー414および415（配列番号400および401）および2つの主要PCR反応からの生成物の混合物を使用して、突然変異遺伝子全体を増幅した。この突然変異遺伝子は、それ自体の天然プロモーターおよびターミネーター配列を保有した。酵素SalI/BsiWIでの消化に続いて、正確なサイズの第2回目のPCR生成物をゲル精製し、インフュージョン（in-fusion）技術によってプラスミドpY35〔キメラTEF：：フザリウム・モニリフォルメ（Fusarium moniliforme）Δ12デサチュラーゼ（Fm2）遺伝子、大腸菌（E. Coli）複製起点、細菌アンピシリン抵抗性遺伝子、ヤロウィア（Yarrowia）Leu2遺伝子、およびヤロウィア（Yarrowia）自律複製配列（ARS）を含有する、さらに詳しくは国際公開第2005/047485号パンフレットを参照されたい〕のベクター主鎖中にクローンした。インフュージョン（in-fusion）反応混合物をインヴィトロジェン（Invitrogen）からのTOP10コンピテント（カタログ番号C4040-10）細胞に形質転換した。LB/Ampプレート上で1日間の選択後、8個のコロニーをDNAミニプレップによって分析した。制限酵素消化によって、7個のコロニーが正しいことが立証された。スルホニル尿素抵抗性遺伝子ならびにLEU遺伝子を含有するそれらの1つを「pY57」（または「pY57, Y1. AHAS, w4971」、図3B）と命名した。

【0419】

標準酢酸リチウム法によって、pY57および「空の」LEUで野性型Y. リポリティカ（lipolytica）株ATCC#90812および#20362を形質転換した。「No-DNA」を含んでなる形質転換調節もまた利用した。形質転換体をMM+スルホニル尿素（SU、100μg/mL）寒天プレートのどちらかの上に播種し、4日間の生育に続いてコロニーの存在または不在を評価した。

【0420】

【表24】

表 15

ヤロウィア・リポリティカにおけるAHAS選択

プラスミド	ATCC#90812		ATCC#20362	
	MM	MM+SU (100μg/mL)	MM	MM+SU (100μg/mL)
pY57	コロニー	コロニー	コロニー	コロニー
Leu ベクター 対照	コロニー	コロニーなし	コロニー	コロニーなし
DNA 対照なし	コロニーなし	コロニーなし	コロニーなし	コロニーなし

【0421】

上に示す結果に基づいて、AHAS W497LはY. リポリティカ（lipolytica）ATCC#90812および#20362の双方において、良好な非抗生物質選択マーカーであった。引き続いて本出願人らは、150μg/mLのスルホニル尿素濃度を使用した。この新しいマーカーは外来性遺伝子に依存しないが突然変異天然遺伝子に依存し、栄養要求性を必要とせず、また栄養要求性ももたらさないため、Y. リポリティカ

(*lipolytica*) を形質転換するのに有利である。除草剤はヒトおよび動物には無毒である。

【0422】

突然変異 A H A S 酵素がここで述べられるのと類似の様式で作られられる場合、この選択方法は、一般に、半数体、二倍体、異数体または異型接合性であってもよいその他の工業酵母株に適用できることが期待される。

【0423】

実施例 4

ω -6 Δ 6 デサチュラーゼ/ Δ 6 エロンガーゼ経路: Ura-表現型による全脂質の約 14% の EPA を生成する Y2067U 株の創出

10

本実施例は、総脂質に対して 14% の EPA を生成できるヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) ATCC # 20362 由来の Y2067U 株の構築について述べる (図 5)。この株を遺伝子操作して、 ω -6 Δ 6 デサチュラーゼ/ Δ 6 エロンガーゼ経路を発現した。実施例 20、21、22、および 27 (下記) でそれぞれ述べられるようにして、TAG 含量および/または組成の分析に基づいて、この EPA 生成株で M. アルピナ (*alpina*) LPAA T2、DGAT1 および DGAT2、および Y. リポリティカ (*lipolytica*) CPT1 遺伝子の過剰発現の効果を調べた。

【0424】

Y2067U 株の開発は、M4 株 (8% の DGLA を生成する)、Y2034 株 (10% の ARA)、E 株 (10% の EPA を生成する)、EU 株 (10% の EPA を生成する)、および Y2067 株 (15% の EPA を生成する) を作り出すことを要した。

20

【0425】

総脂質の約 8% の DGLA を生成する M4 株の構築

コンストラクト pKUNF12T6E (図 9A、配列番号 128) を生成して、野生型ヤロウィア (*Yarrowia*) ATCC # 20362 株の Ura3 遺伝子座に、4 個のキメラ遺伝子 (Δ 12 デサチュラーゼ、 Δ 6 デサチュラーゼ、および 2 つの $C_{18/20}$ エロンガーゼを含んでなる) を組み込み、それによって DGLA の生成を可能にした。pKUNF12T6E プラスミドは、以下の構成要素を含有した。

【0426】

30

【表 2 5】

表 16

プラスミド pKUNF12T6E(配列番号 128)の説明

配列番号 128 内の 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
AscI/BsiWI (9420~8629)	ヤロウィア Ura3 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AJ306421)の 784bp の 5' 部分
SphI/PacI (12128~1)	ヤロウィア Ura3 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AJ306421)の 516bp の 3' 部分
Swal/BsiWI (6380~8629)	以下を含んでなる FBAIN::EL1S::Pex20 ● FBAIN:FBAIN プロモーター(配列番号 177) ● EL1S: モルティエラ・アルピナ由来コドン最適化エロンガーゼ 1 遺伝子(配列番号 19)(ジェンバンク登録番号 AX464731) ● Pex20: ヤロウィア Pex20 遺伝子からの Pex20 ターミネーター 配列(ジェンバンク登録番号 AF054613)
BglII/Swal (4221~6380)	以下を含んでなる TEF::Δ6S::Lip1 ● TEF:TEF プロモーター(ジェンバンク登録番号 AF054508) ● Δ6S: モルティエラ・アルピナ由来コドン最適化 Δ6 デサチュ ラーゼ遺伝子(配列番号 3)(ジェンバンク登録番号 AF465281) ● Lip1: ヤロウィア Lip1 遺伝子からの Lip1 ターミネーター配列 (ジェンバンク登録番号 Z50020)
PmeI/ClaI (4207~1459)	以下を含んでなる FBA::F.Δ12::Lip2 ● FBA:FBA プロモーター(配列番号 176) ● F.Δ12: フザリウム・モノリフォルメ Δ12 デサチュラーゼ遺伝子 (配列番号 27) ● Lip2: ヤロウィア Lip2 遺伝子からの Lip2 ターミネーター配列 (ジェンバンク登録番号 AJ012632)
ClaI/PacI (1459-1)	以下を含んでなる TEF::EL2S::XPR ● TEF:TEF プロモーター(ジェンバンク登録番号 AF054508) ● EL2S: スラウストキトリウム・アウレウム由来コドン最適化エロン ガーゼ遺伝子(配列番号 22)(米国特許第 6,677,145 号明細書) ● XPR: ヤロウィア Xpr 遺伝子(ジェンバンク登録番号 M17741) の約 100bp の 3' 領域

10

20

30

【0 4 2 7】

p K U N F 1 2 T 6 E プラスミドを A s c I / S p h I で消化し、次に一般方法に従って使用して野生型 Y. リポリティカ (l i p o l y t i c a) A T C C # 2 0 3 6 2 を形質転換した。形質転換細胞を F O A 選択培地プレート上に播種して、30℃に2~3日間保った。F O A 抵抗性コロニーを拾って、M M および M M U 選択プレート上に画線培養した。M M U プレート上で生育できるが、M M プレート上で生育できないコロニーを U r a ー株として選択した。次に U r a ー株の単一コロニーを 30℃の液体 M M U 中に接種して、250rpm/分で2日間振盪した。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換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 (H e w l e t t - P a c k a r d) 6 8 9 0 G C で分析した。

40

【0 4 2 8】

G C 分析は、D G L A の存在を p K U N F 1 2 T 6 E の 4 個のキメラ遺伝子を含む

50

形質転換体中に示したが、野生型ヤロウィア（*Yarrowia*）対照株中には示さなかった。選択された32 Ura⁻株のほとんどは、全脂質の約6%のDGLAを生成した。全脂質の約8%のDGLAを生成する2つの株（すなわち株M4および13-8）があった。

【0429】

総脂質の約10%のARAを生成するY2034株の生成

コンストラクトpDMW232（図9B、配列番号129）を生成して、2つのΔ5キメラ遺伝子をヤロウィア（*Yarrowia*）M4株のLeu2遺伝子に組み込んだ。プラスミドpDMW232は、表17に述べる以下の構成要素を含有した。

【0430】

【表26】

表 17

プラスミド pDMW232(配列番号 129)の説明

配列番号 129 内の 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
Ascl/BsiWI (5550~4755)	ヤロウィアLeu2 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AF260230)の788bp の 5' 部分
SphI/PacI (8258~8967)	ヤロウィアLeu2 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AF260230)の703bp の 3' 部分
Swal/BsiWI (2114~4755)	以下を含んでなる FBAIN::MAΔ5::Pex20 ● FBAIN:FBAIN プロモーター(配列番号 177) ● MAΔ5: モルティエラ・アルピナΔ5 デサチュラーゼ遺伝子(配列番号 6)(ジェンバンク登録番号 AF067654) ● Pex20: ヤロウィアPex20 遺伝子の Pex20 ターミネーター配列(ジェンバンク登録番号 AF054613)
Swal/ClaI (2114~17)	以下を含んでなる TEF::MAΔ5::Lip1 ● TEF:TEF プロモーター(ジェンバンク登録番号 AF054508) ● MAΔ5:配列番号 6(前出) ● Lip1: ヤロウィアLip1 遺伝子の Lip1 ターミネーター配列(ジェンバンク登録番号 Z50020)
PmeI/ClaI (5550~4755)	ヤロウィアUra3 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AJ306421)

【0431】

プラスミドpDMW232をAscI/SphIで消化し、次に一般方法に従って使用してM4株を形質転換した。形質転換に続いて細胞をMMLeプレート上に播種して、30℃に2~3日間保った。MMLeプレート上に生育した各形質転換からの個々のコロニーを拾って、MMおよびMMLeプレート上に画線培養した。MMLeプレート上で生育できるが、MMプレート上で生育できないコロニーをLeu2⁻株として選択した。次にLeu2⁻株の単一コロニーを30℃の液体MMLe培地中に接種して、250rpm/分で2日間振盪した。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換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。

【0432】

GC分析は、ARAの存在をpDMW232形質転換体中に示したが、親M4株中には示さなかった。具体的には48個の選択されたpDMW232によるLeu2⁻形質転換体の内、34株が組換えヤロウィア（*Yarrowia*）中の全脂質の5%未満のARAを生成し、11株が6~8%のARAを生成し、3株が約10%のARAを生成した。10%のARAを生成する株の1つを「Y2034」と命名した。

【0433】

総脂質の約10%のEPAを生成するE株の生成

コンストラクト pZP3L37 (図9C、配列番号130) を作り出して、3個の合成 $\Delta 17$ デサチュラーゼキメラ遺伝子を Y2034 株のアシル-CoA オキシダーゼ3 遺伝子中に組み込んだ。プラスミド pZP3L37 は、以下の構成要素を含有した。

【0434】

【表27】

表 18

プラスミド pZP3L37(配列番号 130)の説明

配列番号 130 内の 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
AscI/BsiWI (6813~6043)	ヤロウィア Pox3 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AJ001301)の 763bp の 5' 部分
SphI/PacI (9521~10345)	ヤロウィア Pox3 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AJ001301)の 818bp の 3' 部分
Clal/BsiWI (4233~6043)	以下を含んでなる TEF:: $\Delta 17$ S::Pex20 ● TEF:TEF プロモーター(ジェンバンク登録番号 AF054508) ● $\Delta 17$S:S.ディクリナ(diclina)由来コドン最適化 $\Delta 17$ デサチュラーゼ遺伝子(配列番号 16)(米国特許出願公開第 2003/0196217 A1 号明細書) ● Pex20: ヤロウィア Pex20 遺伝子の Pex20 ターミネーター配列(ジェンバンク登録番号 AF054613)
Clal/PmeI (4233~1811)	以下を含んでなる FBAIN:: $\Delta 17$ S::Lip2 ● FBAIN:FBAIN プロモーター(配列番号 177) ● $\Delta 17$S:配列番号 16(前出) ● Lip2: ヤロウィア Lip2 遺伝子の Lip2 ターミネーター配列(ジェンバンク登録番号 AJ012632)
PmeI/SwaI (1811~1)	ヤロウィア Leu2 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AF260230)
PacI/SwaI (10345~1)	以下を含んでなる FBAINm:: $\Delta 17$ S::Pex16 ● FBAINm:FBAINm プロモーター(配列番号 178) ● $\Delta 17$S:配列番号 16(前出) ● Pex16: ヤロウィア Pex16 遺伝子の Pex16 ターミネーター配列(ジェンバンク登録番号 U75433)

【0435】

プラスミド pZP3L37 を AscI/SphI で消化し、次に一般方法に従って使用して Y2034 株を形質転換した。形質転換に続いて細胞を MM プレート上に播種して、30℃に2~3日間保った。MM プレート上に生育した全部で48個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。生育したらこれらの株を30℃の液体 MM 中に個別に接種して、250rpm/分で2日間振盪した。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換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。

【0436】

GC 分析は、EPA の存在を pZP3L37 による形質転換体中に示したが、親株(すなわち Y2034) 中には示さなかった。48 個の選択された pZP3L37 による形質転換体中に、組換えヤロウィア(Yarrowia) の全脂質の2%未満のEPAを生成した18株、2~3%のEPAを生成した14株、約7%のEPAを生成した1株があっ

た。

【0437】

一般方法で述べられるように「二段階生育条件」（すなわち48時間のMM、72時間のHGM）を使用して株を培養した後に、7%のEPAを生成した株をさらに分析した。GC分析は二段階生育後に全脂質約10%のEPAを生成した遺伝子操作された株を示した。株を「E」株と命名した。

【0438】

Ura⁻表現型による総脂質の約10%のEPAを生成するEU株の構築

5-FOA抵抗性であるE株の突然変異細胞を同定して、EU(Ura⁻)株を作り出した。具体的にはループ1つ分のヤロウィア(Yarrowia)E株細胞を3mLのYPD培地中に接種して、250rpm/分で振盪しながら30℃で24時間生育させた。培養をYPDでOD₆₀₀0.4に希釈して、次にさらに4時間インキュベートした。培養をMM+FOAプレート上に播種(100μL/プレート)して、30℃に2~3日間保った。全部で16個のFOA抵抗性コロニーを拾って、MMおよびMM+FOA選択プレート上に画線培養した。これらから10個のコロニーがFOA選択プレート上で生育したが、MMプレートでは生育せず、可能なUra⁻株として選択された。

【0439】

これらの株の1つをキメラGPD::フザリウム・モニリフォルメ(Fusarium moniliforme)Δ15::XPR2遺伝子、および選択マーカーとしてUra3遺伝子を含んでなるpY37/F15での形質転換のための宿主として使用した(図9D、配列番号131)。MMプレート上での3日間の選択後、数百のコロニーがプレート上に生育し、プラスミドを持たない形質転換対照コロニーの生育はなかった。この5-FOA抵抗性株を「EU」株と命名した。

【0440】

次にEU株の単一コロニーを0.1g/Lのウリジンを含める液体MMU中に接種して、250rpm/分で振盪しながら30℃で2日間培養した。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換によって脂肪酸メチルエステルを調製し、引き続きヒューレットパッカード(Hewlett-Packard)6890 GCで分析した。GC分析は、EU株が全脂質の約10%のEPAを生成したことを示した。

【0441】

全脂質の約15%のEPAを生成するY2067株の創出

プラスミドpKO2UF2PE(図9E、配列番号132)を作り出して、(異種性Δ12デサチュラーゼおよびC_{18/20}エロンガーゼを含んでなる)2つのキメラ遺伝子を含むクラスターおよびUra3遺伝子をEU株の天然ヤロウィア(Yarrowia)Δ12デサチュラーゼ遺伝子に組み込んだ。プラスミドpKO2UF2PEは、以下の構成要素を含有した。

【0442】

10

20

30

【表 2 8】

表 19
プラスミド pKO2UM26E (配列番号 132) の説明

配列番号 132 内の 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
AscI/BsiWI (3382~2645)	ヤロウィアΔ 12 デサチュラーゼ遺伝子 (配列番号 23) の 730bp の 5' 部分
SphI/EcoRI (6090~6646)	ヤロウィアΔ 12 デサチュラーゼ遺伝子 (配列番号 23) の 556bp の 3' 部分
Swal/BsiWI/ (1~2645)	以下を含んでなる FBAINm::F.Δ 12DS::Pex20 ● FBAINm: FBAINm プロモーター (配列番号 178) ● F.Δ 12: フザリウム・モニリフォルメΔ 12 デサチュラーゼ遺伝子 (配列番号 27) ● Pex20: ヤロウィアPex20 遺伝子の Pex20 ターミネーター配列 (ジェンバンク登録番号 AF054613)
Swal/PmeI (1~8525)	以下を含んでなる GPAT::EL1S::OCT ● GPAT: GPAT プロモーター (配列番号 179) ● EL1S: モルティエラ・アルピナ由来コドン最適化エロンガーゼ 1 遺伝子 (配列番号 19) (ジェンバンク登録番号 AX464731) ● OCT: ヤロウィアOCT 遺伝子の OCT ターミネーター配列 (ジェンバンク登録番号 X69988)
EcoRI/PacI (6646~8163)	ヤロウィアUra3 遺伝子 (ジェンバンク登録番号 AJ306421)

【0 4 4 3】

プラスミド pKO2UF2PE を AscI / SphI で消化し、次に一般方法に従って使用して EU 株を形質転換した (ただし EU 株は YPD プレート上に画線培養し、形質転換緩衝液中への懸濁に先だって [18 時間に対して] およそ 36 時間生育させた)。形質転換に続いて細胞を MM プレート上に播種して、30℃ に 2~3 日間保った。MM プレート上に生育した全部で 72 個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。生育したらこれらの株を 30℃ の液体 MM 中に個別に接種して、250 rpm / 分で 2 日間振盪した。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換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 (Hewlett-Packard) 6890 GC で分析した。

【0 4 4 4】

GC 分析は、pKO2UF2PE によるほとんど全ての形質転換体において EPA の存在を示した。より具体的には 72 個の選択された形質転換体中に、組換えヤロウィア (Yarrowia) 中の全脂質の 8~9.9% の EPA を生成した 17 株、10~10.9% の EPA を生成した 27 株、11~11.9% の EPA を生成した 16 株、12~12.7% の EPA を生成した 7 株があった。12.7% の EPA を生成した株を一般方法で述べられるように (すなわち 48 時間の MM、72 時間の HGM) 二段階生育条件を使用してさらに分析した。GC 分析は、組換え株が二段階生育後、全脂質の約 15% の EPA を生成したことを示した。株を「Y2067」株と命名した。

【0 4 4 5】

Ura-表現型による総脂質の約 14% の EPA を生成する Y2067U 株の構築

Y2067 株中の Ura3 遺伝子を中断するために、コンストラクト pZKUT16 (図 10A、配列番号 133) を作り出して、TEF::REL02S::Pex20 キメラ遺伝子を Y2067 株の Ura3 遺伝子に組み込んだ。REL02S は、16:0 を 18:0 (すなわち C_{16/18} エロンガーゼ) に延長するラット肝酵素をコードする、コドン

最適化 r E L O 遺伝子である。プラスミド p Z K U T 1 6 は、以下の構成要素を含有した。

【 0 4 4 6 】

【表 2 9】

表 20
プラスミド pZKUT16(配列番号 133)の説明

配列番号 133 内の 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
BsiWI/PacI (1~721)	ヤロウィア Ura3 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AJ306421)の 721bp の 5' 部分
Sall/Clal (3565~4289)	ヤロウィア Ura3 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AJ306421)の 724bp の 3' 部分
Clal/BsiWI (4289~1)	以下を含んでなる TEF::rELO2S::Pex20 ● TEF:TEF プロモーター(ジェンバンク登録番号 AF054508) ● rELO2S:ラット由来コドン最適化 rELO2 エロンガーゼ遺伝子(配列番号 65)(ジェンバンク登録番号 AB071986) ● Pex20: ヤロウィア Pex20 遺伝子の Pex20 ターミネーター配列(ジェンバンク登録番号 AF054613)

【 0 4 4 7 】

プラスミド p Z K U T 1 6 を S a l I / P a c I で消化し、次に一般方法に従って使用して Y 2 0 6 7 株を形質転換した。形質転換に続いて細胞を MM + 5 - F O A 選択プレート上に播種して、3 0 °C に 2 ~ 3 日間保った。

【 0 4 4 8 】

MM + 5 - F O A プレートプレート上に生育した全部で 2 4 個の形質転換体を拾って、MM プレートおよび MM + 5 - F O A プレート上に別個に再度画線培養した。MM + 5 - F O A 選択プレート上で生育できるが、MM プレートでは生育できない株を U r a - 株として選択した。全部で 1 0 個の U r a - 株を個別に 3 0 °C の液体 MMU 中に接種して、2 5 0 r p m / 分で振盪しながら 1 日間生育させた。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換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 (H e w l e t t - P a c k a r d) 6 8 9 0 G C で分析した。

【 0 4 4 9 】

G C 分析は、MMU 培地中での 1 日間の生育後に、p Z K U T 1 6 による全ての形質転換体中に 5 ~ 7 % の E P A の存在を示した。6 . 2 % の E P A を生成した株を二段階生育条件(すなわち 4 8 時間の MM、9 6 時間の HGM)を使用してさらに分析した。G C 分析は、組換え株が全脂質の約 1 4 % の E P A を生成したことを示した。株を「Y 2 0 6 7 U」株と命名した。

【 0 4 5 0 】

野生型ヤロウィア・リポリティカ (Y a r r o w i a l i p o l y t i c a) A T C C # 2 0 3 6 2 に関するこの株の最終遺伝子型は以下のとおり。U r a 3 -、P o x 3 -、Y . Δ 1 2 -、F B A : : F . Δ 1 2 : : L i p 2、F B A I N m : : F . Δ 1 2 : : P e x 2 0、T E F : : Δ 6 S : : L i p 1、F B A I N : : E 1 S : : P e x 2 0、G P A T : : E 1 S : : O c t、T E F : : E 2 S : : X p r、F B A I N : : Δ 5 : : P e x 2 0、T E F : : Δ 5 : : L i p 1、F B A I N : : Δ 1 7 S : : L i p 2、F B A I N m : : Δ 1 7 S : : P e x 1 6、T E F : : Δ 1 7 S、および T E F : : r E L O 2 S : : P e x 2 0。

【 0 4 5 1 】

実施例 5

ω -6 Δ 6 デサチュラーゼ/ Δ 6 エロンガーゼ経路：全脂質の約18%のEPAを生成するY2102株の創出

本実施例は、総脂質に対して18%のEPAを生成できる、ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) ATCC#20362由来Y2102株の構築について述べる(図5)。この株を遺伝子操作して ω -6 Δ 6 デサチュラーゼ/ Δ 6 エロンガーゼ経路を発現した。

【0452】

Y2102株の開発は、M4株(8%のDGLAを生成し、実施例4で述べられる)、Y2034株(10%のARAを生成し、実施例4で述べられる)、E株(10%のEPAを生成し、実施例4で述べられる)、EU株(10%のEPAを生成し、実施例4で述べられる)、Y2065株(14%のEPAを生成する)およびY2065U株(13%のEPAを生成する)の構築を要した。

10

【0453】

総脂質の14%のEPAを生成するY2065株の生成

コンストラクトpZKO2UM25E(図10B、配列番号134)を生成して、($C_{18/20}$ エロンガーゼ、 Δ 12 デサチュラーゼ、および Δ 5 デサチュラーゼを含んでなる)3個のキメラ遺伝子およびUra3遺伝子のクラスターをEU株(実施例4)の天然ヤロウィア (*Yarrowia*) Δ 12 デサチュラーゼ遺伝子部位に組み込んだ。プラスミドpKO2UM25Eは、以下の構成要素を含有した。

【0454】

20

【表 3 0】

表 21
プラスミド pKO2UM25E(配列番号 134)の説明

配列番号 134 内の 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
<i>HindIII</i> / <i>AscI</i> (1~728)	ヤロウィアΔ12 デサチュラーゼ遺伝子(配列番号 23)の 728bp の 5' 部分
<i>SphI</i> / <i>EcoRI</i> (3436~3992)	ヤロウィアΔ12 デサチュラーゼ遺伝子(配列番号 23)の 556bp の 3' 部分
<i>BsiWI</i> / <i>HindIII</i> (10437~1)	以下を含んでなる GPAT::EL1S::XPR ● GPAT: GPAT プロモーター(配列番号 179) ● EL1S: モルティエラ・アルピナ由来コドン最適化エロンガーゼ 1 遺伝子(配列番号 19)(ジェンバンク登録番号 AX464731) ● XPR: ヤロウィア Xpr 遺伝子(ジェンバンク登録番号 M17741)の約 100bp の 3' 領域
<i>BglIII</i> / <i>BsiWI</i> (7920~10437)	以下を含んでなる FBAIN::M.Δ12::Pex20 ● FBAIN: FBAIN プロモーター(配列番号 177) ● M.Δ12: モルティエラ・イザベリナΔ12 デサチュラーゼ遺伝子(ジェンバンク登録番号 AF417245、配列番号 25) ● Pex20: ヤロウィア Pex20 遺伝子の Pex20 ターミネーター配列(ジェンバンク登録番号 AF054613)
<i>Sall</i> / <i>PacI</i> (6046~7544)	ヤロウィア Ura3 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AJ306421)
<i>EcoRI</i> / <i>Sall</i> (3992~6046)	以下を含んでなる TEF::I.Δ5S::Pex20 ● TEF: TEF プロモーター(ジェンバンク登録番号 AF054508) ● I.Δ5S: イソクリシス・ガルバナ由来コドン最適化 Δ5 デサチュラーゼ遺伝子(配列番号 10)(国際公開第 2002/081668 号パンフレット) ● Pex20: ヤロウィア Pex20 遺伝子の Pex20 ターミネーター配列(ジェンバンク登録番号 AF054613)

10

20

30

【0455】

プラスミド pKO2UM25E を *SphI*/*AscI* で消化し、次に一般方法に従って使用して EU 株(実施例 4)を形質転換した。形質転換に続いて細胞を MM プレート上に播種して、30℃に2~3日間保った。

【0456】

MM プレート上に生育した全部で 48 個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。生育したらこれらの株を 30℃の液体 MM 中に個別に接種して、250rpm/分で振盪しながら1日間生育させた。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換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ダ(Hewlett-Packard)6890 GC で分析した。

40

【0457】

GC 分析は、MM 培地中での1日間の生育後に、pKO2UM25E によるほとんど全ての形質転換体において EPA が生成されたことを示した。48 個の選択された形質転換体中に、組換えヤロウィア(Yarrowia)中の全脂質の 4%未満の EPA を生成した 8 株、4~5%の EPA を生成した 12 株、5~6%の EPA を生成した 24 株があった。5.7%の EPA を生成した株を二段階生育手順(すなわち 48 時間の MM、96 時間の HGM)を使用したさらなる分析のために選択した。GC 分析は、組換え株が全脂質の約 14.3%の EPA を生成したことを示した。株を「Y2065」株と命名した。

50

【0458】

Ura-表現型による全脂質の約13%のEPA生成するY2065U株の創出

コンストラクトpZKUT16（図10A、実施例4）を使用して、TEF::rELO2S::Pex20キメラ遺伝子をY2065株のUra3遺伝子に組み込んだ。上に述べたようにプラスミドpZKUT16をSalI/PacIで消化し、次に一般方法に従って使用してY2065株を形質転換した。形質転換に続いて細胞をMM+5-FOA選択プレート上に播種して、30℃に2～3日間保った。

【0459】

MM+5-FOAプレートプレート上に生育した全部で48個の形質転換体を拾って、MMプレートおよびMM+5-FOAプレート上に別個に再度画線培養した。MM+5-FOA選択プレート上で生育できるが、MMプレートでは生育できない株をUra-株として選択した。これらのUra-株（全部で48株）を個別に30℃の液体MMU中に接種して、250rpm/分で振盪しながら1日間生育させた。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換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。

10

【0460】

GC分析は、MMU培地中での1日間の生育後に、13株が全脂質の5～6.9%のEPAを生成し、11株が7～8%のEPAを生成したことを示した。7.3%のEPAを生成した#11株を二段階生育条件（48時間MM、96時間のHGM）を使用してさらに分析した。GC分析は、組換え株が全脂質の約13.1%のEPAを生成したことを示した。株を「Y2065U」株と命名した。

20

【0461】

全脂質の約18%のEPAを生成するY2102株の創出

コンストラクトpDMW302T16（図10C、配列番号135）を作り出して、4個のキメラ遺伝子のクラスター（C_{16/18}エロンガーゼ、C_{18/20}エロンガーゼ、Δ6デサチュラーゼ、およびΔ12デサチュラーゼを含んでなる）およびUra3遺伝子をY2065U株のヤロウィア（Yarrowia）リパーゼ1遺伝子部位に組み込んだ。プラスミドpDMW302T16は、以下の構成要素を含有した。

【0462】

30

【表 3 1】

表 22
プラスミド pDMW302T16(配列番号 135)の説明

配列番号 135 内の 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
BsiWI/Ascl (1~817)	ヤロウリアリパーゼ 1 遺伝子(ジェンバンク登録番号 Z50020)の 817bp の 5' 部分
SphI/PacI 3525~4294	ヤロウリアリパーゼ 1 遺伝子(ジェンバンク登録番号 Z50020)の 769bp の 3' 部分
EcoRI/BsiWI (13328~1)	以下を含んでなる TEF::rELO2S::Pex20 ● TEF:TEF プロモーター(ジェンバンク登録番号 AF054508) ● rELO2S:ラット由来コドン最適化 rELO2 エロンガーゼ遺伝子(配列番号 65)(ジェンバンク登録番号 AB071986) ● Pex20: ヤロウリアPex20 遺伝子の Pex20 ターミネーター配列(ジェンバンク登録番号 AF054613)
BglII/EcoRI (10599~13306)	以下を含んでなる FBAIN::D6S::Lip1 ● FBAIN:FBAIN プロモーター(配列番号 177) ● Δ6S: モルティエラ・アルピナ由来コドン最適化 Δ6 デサチュラーゼ遺伝子(配列番号 3)(ジェンバンク登録番号 AF465281) ● Lip1: ヤロウリアLip1 遺伝子からの Lip1 ターミネーター配列(ジェンバンク登録番号 Z50020)
ClaI/PmeI (8078~10555)	以下を含んでなる GPDIN::EL1S::Lip2 ● GPDIN:GPDIN プロモーター(配列番号 174) ● EL1S: モルティエラ・アルピナ由来コドン最適化エロンガーゼ 1 遺伝子(配列番号 19)(ジェンバンク登録番号 AX464731) ● Lip2: ヤロウリアリパーゼ 2 遺伝子の Lip2 ターミネーター(ジェンバンク登録番号 AJ012632)
EcoRI/ClaI (6450~8078)	ヤロウリアUra3 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AJ306421)
PacI/EcoRI (4294~6450)	以下を含んでなる TEF::F.Δ12::Pex16 ● TEF:TEF プロモーター(ジェンバンク登録番号 AF054508) ● F.Δ12: フザリウム・モノリフォルメΔ12 デサチュラーゼ遺伝子(配列番号 27) ● Pex16: ヤロウリアPex16 遺伝子の Pex16 ターミネーター(ジェンバンク登録番号 U75433)

【0 4 6 3】

プラスミド pDMW302T16 を SphI/Ascl で消化し、次に一般方法に従って使用して Y2065U 株を形質転換した。形質転換に続いて細胞を MM プレート上に播種して、30℃ に 2~3 日間保った。MM プレート上で生育した全部で 48 個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。生育したらこれらの株を 30℃ の液体 MM 中に個別に接種して、250 rpm/分 で振盪しながら 2 日間培養した。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換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 (Hewlett-Packard) 6890 GC で分析した。

【0 4 6 4】

GC 分析は、MM 培地中での 2 日間の生育後に、pDMW302T16 による Y2065U の形質転換体のほとんど全てにおいて EPA の存在を示した。48 個の選択された形

10

20

30

40

50

質転換体中に、遺伝子操作されたヤロウィア (*Yarrowia*) 中の全脂質の10%未満のEPAを生成した12株、10~12.9%のEPAを生成した22株、13~15%のEPAを生成した12株、15.8%のEPAを生成した1株(すなわち#29)があった。二段階生育手順(すなわち48時間のMM、96時間のHGM)を使用したさらなる分析のために、株#29を選択した。GC分析は遺伝子操作された株が、全脂質の約18.3%のEPAを生成したことを示した。株#29を「Y2102」株と命名した。この株の野生型ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) ATCC#20362に対する最終遺伝子型は、次のとおりであった。Pox3-、LIP1-、Y. Δ 12-、FBA::F. Δ 12::Lip2、TEF::F. Δ 12::Pex16、FBA IN::MD12::Pex20、TEF:: Δ 6S::Lip1、FBA IN::D6S::Lip1、FBA IN::E1S::Pex20、GPAT::E1S::Oct、GPD IN::E1S::Lip2、TEF::E2S::Xpr、FBA IN::MA Δ 5::Pex20、TEF::MA Δ 5::Lip1、TEF::ID5S::Pex20、FBA IN:: Δ 17S::Lip2、FBA INm:: Δ 17S::Pex16、TEF:: Δ 17S、および2X TEF::rELO2S::Pex20。

【0465】

実施例6

ω -6 Δ 6 デサチュラーゼ/ Δ 6 エロンガーゼ経路: 全脂質の約20%のEPAを生成するY2088株の創出

本実施例は、総脂質に対して20%のEPAを生成できる、ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) ATCC#20362由来のY2088株の構築について述べる(図5)。この株を遺伝子操作して、 ω -6 Δ 6 デサチュラーゼ/ Δ 6 エロンガーゼ経路を発現した。

【0466】

Y2088株の開発は、M4株(8%のDGLAを生成し、実施例4で述べられる)、Y2034株(10%のARAを生成し、実施例4で述べられる)、E株(10%のEPAを生成し、実施例4で述べられる)、EU株(10%のEPAを生成し、実施例4で述べられる)、Y2065株(14%のEPAを生成し、実施例5で述べられる)およびY2065U株(13%のEPAを生成し、実施例5で述べられる)の構築を要した。

【0467】

全脂質の約20%のEPAを生成するY2088株の創出

コンストラクトpDMW303(図10D、配列番号136)を作り出して、4個のキメラ遺伝子クラスター($C_{18/20}$ エロンガーゼ、 Δ 6 デサチュラーゼ、 Δ 5 デサチュラーゼ、および Δ 12 デサチュラーゼを含んでなる)、およびUra3遺伝子をY2065U株(実施例5)のヤロウィア (*Yarrowia*) リパーゼ1遺伝子部位に組み込んだ。プラスミドpDMW303は、以下の構成要素を含有した。

【0468】

【表 3 2】

表 23
プラスミド pDMW303(配列番号 136)の説明

配列番号 136 内の 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
BsiWI/AscI (1~819)	ヤロウシアリパーゼ 1 遺伝子(ジェンバンク登録番号 Z50020)の 819bp の 5' 部分
SphI/PacI (35278~4297)	ヤロウシアリパーゼ 1 遺伝子(ジェンバンク登録番号 Z50020)の 769bp の 3' 部分
Swal/BsiWI (13300~1)	以下を含んでなる GPAT::H Δ 5S::Pex20 ● GPAT:GPAT プロモーター(配列番号 179) ● HΔ5S:ヒト由来コドン最適化Δ5 デサチュラーゼ遺伝子(配列番号 13)(ジェンバンク登録番号 NP_037534) ● Pex20: ヤロウシアPex20 遺伝子の Pex20 ターミネーター配列(ジェンバンク登録番号 AF054613)
BglII/Swal (10602-13300)	以下を含んでなる FBAIN::D6S::Lip1 ● FBAIN:FBAIN プロモーター(配列番号 177) ● Δ6S: モルティエラ・アルピナ由来コドン最適化Δ6 デサチュラーゼ遺伝子(配列番号 3)(ジェンバンク登録番号 AF465281) ● Lip1: ヤロウシアLip1 遺伝子からの Lip1 ターミネーター配列(ジェンバンク登録番号 Z50020)
Clal/PmeI (8081~10558)	以下を含んでなる GPDIN::EL1S::Lip2 ● GPDIN:GPDIN プロモーター(配列番号 174) ● EL1S: モルティエラ・アルピナ由来コドン最適化エロンガーゼ 1 遺伝子(配列番号 19)(ジェンバンク登録番号 AX464731) ● Lip2: ヤロウシアリパーゼ 2 遺伝子の Lip2 ターミネーター(ジェンバンク登録番号 AJ012632)
EcoRI/Clal (6453~8081)	ヤロウシアUra3 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AJ306421)
PacI/EcoRI (4297~6453)	以下を含んでなる TEF::F. Δ 12::Pex16 ● TEF:TEF プロモーター(ジェンバンク登録番号 AF054508) ● F.Δ12: フザリウム・モノリフォルメΔ12 デサチュラーゼ遺伝子(配列番号 27) ● Pex16: ヤロウシアPex16 遺伝子の Pex16 ターミネーター(ジェンバンク登録番号 U75433)

【0 4 6 9】

プラスミド pDMW303 を SphI/AscI で消化し、次に一般方法に従って使用して Y2065U 株(実施例 5)を形質転換した。形質転換に続いて細胞を MM プレート上に播種して、30℃に 2~3 日間保った。

【0 4 7 0】

MM プレート上に生育した全部で 48 個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。生育したらこれらの株を二段階生育手順(すなわち 48 時間の MM、96 時間の HGM)を使用して個別に培養した。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換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。

【0 4 7 1】

GC 分析は、二段階生育後に、pDMW303 による形質転換体のほとんど全てで EPA が生成されたことを示した。48 個の選択された形質転換体中に、全脂質の 11.6~

10

20

30

40

50

14. 9%のEPAを生成した25株、15~17. 9%のEPAを生成した17株、18~18. 7%のEPAを生成した2株、約20%のEPAを生成した1株（すなわち#38）があった。株#38を「Y2088」株と命名した。野生型ヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）ATCC#20362に対するこの株の最終遺伝子型は次のとおりであった。Pox3-、Lip1-、Y. Δ12-、FBA::F. Δ12::Lip2、TEF::F. Δ12::Pex16、FBAIN::MΔ12::Pex20、TEF::Δ6S::Lip1、FBAIN::D6S::Lip1、FBAIN::E1S::Pex20、GPAT::E1S::Oct、GPDIN::E1S::Lip2、TEF::E2S::Xpr、FBAIN::MAΔ5::Pex20、TEF::MAΔ5::Lip1、TEF::ID5S::Pex20、GPT::HD5S::Lip1、FBAIN::Δ17S::Lip2、FBAINm::Δ17S::Pex16、TEF::Δ17S、およびTEF::rELO2S::Pex20。

【0472】

実施例7

ω-6 Δ6 デサチュラーゼ／Δ6 エロンガーゼ経路：全脂質の約18%のEPAを生成するY2089株の創出

本実施例は、総脂質に対して18%のEPAを生成できる、ヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）ATCC#20362由来のY2089株の構築について述べる（図5）。この株を遺伝子操作して、ω-6 Δ6 デサチュラーゼ／Δ6 エロンガーゼ経路を発現した。

【0473】

Y2089株の開発は、M4株（8%のDGLAを生成し、実施例4で述べられる）、Y2047株（11%のARAを生成する）、Y2048株（11%のEPAを生成する）、Y2060株（13%のEPAを生成する）、Y2072株（15%のEPAを生成する）、およびY2072U1株（14%のEPAを生成した）の構築を要した。

【0474】

全脂質の約10%のARA生成するY2047株の創出

コンストラクトpDMW271（図10E、配列番号137）を発生させて、3個のΔ5キメラ遺伝子をヤロウィア（*Yarrowia*）M4株（実施例4）のLeu2遺伝子に組み込んだ。プラスミドpDMW271は、表24で述べられる以下の構成要素を含有した。

【0475】

10

20

30

【表 3 3】

表 24
プラスミド pDMW271(配列番号 137)の説明

配列番号 137 内の 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
AscI/BsiWI (5520～6315)	ヤロウィア Leu2 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AF260230)の 788bp の 5' 部分
SphI/PacI (2820～2109)	ヤロウィア Leu2 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AF260230)の 703bp の 3' 部分
Swal/BsiWI (8960～6315)	以下を含んでなる FBAIN::MAΔ5::Pex20 ● FBAIN:FBAIN プロモーター(配列番号 177) ● MAΔ5: モルティエラ・アルピナΔ5 デサチュラーゼ遺伝子(配列番号 6)(ジェンバンク登録番号 AF067654) ● Pex20: ヤロウィア Pex20 遺伝子の Pex20 ターミネーター配列(ジェンバンク登録番号 AF054613)
Swal/Clal (8960～11055)	以下を含んでなる TEF::MAΔ5::Lip1 ● TEF:TEF プロモーター(ジェンバンク登録番号 AF054508) ● MAΔ5: 配列番号 6(前出) ● Lip1: ヤロウィア Lip1 遺伝子の Lip1 ターミネーター配列(ジェンバンク登録番号 Z50020)
PmeI/Clal (12690～11055)	ヤロウィア Ura3 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AJ306421)
Clal/PacI (1～2109)	以下を含んでなる TEF::HΔ5S::Pex16 ● TEF:TEF プロモーター(ジェンバンク登録番号 AF054508) ● HΔ5S: ヒト由来コドン最適化 Δ5 デサチュラーゼ遺伝子(配列番号 13)(ジェンバンク登録番号 NP_037534) ● Pex16: ヤロウィア Pex16 遺伝子の Pex16 ターミネーター配列(ジェンバンク登録番号 U75433)

10

20

30

【0 4 7 6】

プラスミド pDMW271 を AscI / SphI で消化し、次に一般方法に従って使用して M4 株を形質転換した。形質転換に続いて細胞を MML e プレート上に播種して、30℃に2～3日間保った。MML e プレートに生育する個々のコロニーを拾って、MMおよびMML e プレート上に画線培養した。MML e プレート上で生育できるが、MMプレート上で生育できないコロニーを Leu2⁻株として選択した。次に Leu2⁻株の単一コロニーを30℃の液体MML e 培地中に接種して、250rpm/分で2日間振盪した。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換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 (Hewlett-Packard) 6890 GCで分析した。

40

【0 4 7 7】

GC分析は、ARAの存在を pDMW271 形質転換体中に示したが、親M4株中には示さなかった。具体的には48個の選択された pDMW271 による Leu2⁻形質転換体中に、組換えヤロウィア (Yarrowia) 中の全脂質の5%未満のARAを生成する35株があり、6～8%のARAを生成する12株があり、約11%のARAを生成する1株があった。11%のARAを生成する株を「Y2047」と命名した。

【0 4 7 8】

全脂質の約11%のEPA生成するY2048株の創出

プラスミド pZPL37 (実施例4) を AscI / SphI で消化し、次に一般方法

50

に従って使用してY2047株を形質転換した。形質転換に続いて細胞をMMプレート上に播種して、30℃に2～3日間保った。MMプレート上で生育した全部で96個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。生育したらこれらの株を30℃の液体MM中に個別に接種して、250rpm/分で2日間振盪した。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換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。

【0479】

GC分析は、EPAの存在をpZP3L37による形質転換体のほとんどで示したが、親Y2047株中には示さなかった。96個の選択されたpZP3L37による形質転換体中に、組換えヤロウィア (Yarrowia) の全脂質の2%未満のEPAを生成した20株、2～3%のEPAを生成した23株、3～4%のEPAを生成した5株、約6%のEPAを生成した2株 (すなわち株#71および株#94) があった。株#71 (6%のEPAを生成した) を二段階生育条件 (すなわち48時間のMM、72時間のHMG) で培養して、さらに分析した。GC分析は、株#71が全脂質の約11%のEPAを生成したことを示した。株を「Y2048」と命名した。

【0480】

Ura-表現型による全脂質の約13%のEPAを生成するY2060株の創出

コンストラクトpZKUT16 (図10A、配列番号133、実施例4参照) を使用して、TEF::RELO2S::Pex20キメラ遺伝子をY2048株のUra3遺伝子に組み込んだ。具体的にはプラスミドpZKUT16をSalI/PacIで消化し、次に一般方法に従って使用してY2048株を形質転換した。形質転換に続いて細胞をMM+5-FOA選択プレート上に播種し、30℃に2～3日間保った。

【0481】

MM+5-FOAプレート上に生育した全ての40形質転換体を拾って、MMプレートおよびMM+5-FOAプレート上にそれぞれ再度画線培養した。MM+5-FOAプレート上で生育できるが、MMプレート上では生育できない株をUra-株として選択した。これらの40個の各Ura-株を液体MMU中に個別に接種して、250rpm/分間で振盪しながら30℃で2日間生育させた。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換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。

【0482】

GC分析は、MMU培地中での2日間の生育後に、全脂質の5%未満のEPAを生成した14株、5～5.9%のEPAを生成した9株、6～6.9%のEPAを生成した15株、7～8%のEPAを生成した7株があったことを示した。7～8%のEPAを生成した株を二段階生育条件 (すなわち48時間のMM、96時間のHGM) を使用して、さらに分析した。GC分析は、これらの全ての株が10%を超えるEPAを生成したことを示し、それらの1つは総脂質の約13%のEPAを生成した。この株を「Y2060」株と命名した。

【0483】

全脂質の約15%のEPAを生成するY2072株の創出

コンストラクトpKO2UM25E (図10B、配列番号134、実施例5参照) を使用して、3個のキメラ遺伝子のクラスター (C_{18/20}エロンガーゼ、Δ12デサチュラーゼ、およびΔ5デサチュラーゼを含んでなる) およびUra3遺伝子をY2060株の天然ヤロウィア (Yarrowia) Δ12デサチュラーゼ遺伝子部位に組み込んだ。具体的にはプラスミドpKO2UM25EをSphI/AscIで消化し、次に一般方法に従って使用してY2060を形質転換した。形質転換に続いて細胞をMMプレート上に播種して、30℃に2～3日間保った。

【0484】

MMプレート上に生育した全部で63個の形質転換体を拾って、新鮮なMMプレート上

10

20

30

40

50

に再度画線培養した。生育したら、これらの株を 30℃ の液体 MM 中に個別に接種して、250 rpm / 分間で振盪しながら 2 日間培養した。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換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。

【0485】

GC 分析は、MM 培地中での 1 日間の生育後に、pKO2UM25E による形質転換体のほとんど全てで EPA の存在を示した。63 個の選択された形質転換体中に、6～8.9% の EPA を生成した 26 株、9% を超える EPA を生成した 46 株があった。二段階生育条件 (すなわち 48 時間の MM、96 時間の HGM) を使用したさらなる分析のために、9% を超える EPA を生成した株を選択した。GC 分析は二段階生育後に、46 個の選択された株の内 45 個が全脂質の 11～14.5% の EPA を生成し、一方培養 #2 は 15.1% の EPA を生成したことを示した。この株 (すなわち #2) を「Y2072」株と命名した。

【0486】

Ura- 表現型による全脂質の約 14% の EPA を生成する Y2072U1 および Y2072U2 株の創出

コンストラクト pZKUGPI5S (図 11A、配列番号 138) を作り出し、GPAT::I.Δ5S::Pex20 キメラ遺伝子を Y2072 株の Ura3 遺伝子に組み込んだ。より具体的にはプラスミド pZKUGPI5S は、以下の構成要素を含有した。

【0487】

【表 34】

表 25

プラスミド pZKUGPI5S (配列番号 138) の説明

配列番号 138 内の 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
BsiWI/PacI (318～1038)	ヤロウィア Ura3 遺伝子 (ジェンバンク登録番号 AJ306421) の 721bp の 5' 部分
Sall/Clal (3882～4606)	ヤロウィア Ura3 遺伝子 (ジェンバンク登録番号 AJ306421) の 724bp の 3' 部分
Clal/BsiWI (4606～318)	以下を含んでなる GPAT::I.Δ5S::Pex20 ● GPAT: GPAT プロモーター (配列番号 179) ● I.Δ5S: イソクリシス・ガルバナ由来コドン最適化 Δ5 デサチュラーゼ遺伝子 (配列番号 10) (国際公開第 2002/081668 号パンフレット) ● Pex20: ヤロウィア Pex20 遺伝子の Pex20 ターミネーター配列 (ジェンバンク登録番号 AF054613)

【0488】

プラスミド pZKUGPI5S を Sall / PacI で消化し、次に一般方法に従って使用して Y2072 株を形質転換した。形質転換に続いて細胞を MM+5-FOA 選択プレート上に播種し、30℃ に 3～4 日間保った。

【0489】

MM+5-FOA プレート上に生育した全部で 24 個の形質転換体を拾って、MM プレートおよび MM+5-FOA プレート上に別々に再度画線培養した。MM+5-FOA プレート上で生育できるが MM プレート上では生育できない株を Ura- 株として選択した。これらの 24 個の各 Ura- 株を液体 MMU 中に個別に接種し、250 rpm / 分間で振盪しながら 30℃ で 2 日間生育させた。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換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。

【0490】

GC分析は、MMU中での2日間の生育後に、全脂質の7.3～8.9%のEPAを生成した8株、9～9.9%のEPAを生成した14株、10.5%のEPAを生成した1株（すなわち#1）、10.7%のEPAを生成した1株（すなわち#23）があったことを示した。二段階生育条件（すなわち48時間のMM、96時間のHGM）を使用して、株#1および#23をさらに分析した。GC分析は、これらの2つの株が二段階生育後に全脂質の約14%のEPAを生成したことを示した。株#1を株「Y2072U1」と命名し、株#23を株「Y2072U2」と命名した。

【0491】

全脂質の約18%のEPAを生成するY2089株の創出

10

コンストラクトpDMW302T16（図10C、配列番号135、実施例5参照）を使用して、4個のキメラ遺伝子のクラスター（ $C_{16/18}$ エロンガーゼ、 $C_{18/20}$ エロンガーゼ、 $\Delta 6$ デサチュラーゼ、および $\Delta 12$ デサチュラーゼを含んでなる）およびUra3遺伝子をY2072U1株のヤロウィア（*Yarrowia*）リパーゼ1遺伝子部位に組み込んだ。プラスミドpDMW302T16をSphI/AseIで消化し、次に一般方法に従って使用してY2072U1株を形質転換した。形質転換に続いて細胞をMMプレート上に播種し、30℃に3～4日間保った。

【0492】

MMプレート上に生育した全部で48個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。生育したらこれらの株を液体MM中に個別に接種して、250rpm/分で振盪しながら30℃で2日間生育させた。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換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。

20

【0493】

GC分析は、MM培地中での2日間の生育後に、pDMW302T16によるY2072U1の形質転換体のほとんど全てでEPAが生成されたことを示した。48個の選択された形質転換体中に、10%未満のEPAを生成した27株、10～12.9%のEPAを生成した14株、13～13.9%のEPAを生成した5株があった。二段階生育手順（すなわち48時間のMM、96時間のHGM）を使用したさらになる分析のために、株#34（13.9%のEPAを生成する）を選択した。GC分析は、株#34が全脂質の約18%のEPAを生成したことを示した。株#34を「Y2089」株と命名した。野生型ヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）ATCC#20362に対するこの株の最終遺伝子型は、次のとおりであった。Pox3-、LIP1-、Y. $\Delta 12$ -、FBA::F. $\Delta 12$::Lip2、TEF::F. $\Delta 12$::Pex16、FBA IN::M $\Delta 12$::Pex20、TEF:: $\Delta 6$ S::Lip1、FBA IN:: $\Delta 6$ S::Lip1、FBA IN::E1S::Pex20、GPAT::E1S::Oct、GPD IN::E1S::Lip2、TEF::E2S::Xpr、FBA IN::MA $\Delta 5$::Pex20、TEF::MA $\Delta 5$::Lip1、TEF::H $\Delta 5$ S::Pex16、TEF::I $\Delta 5$ S::Pex20、GPAT::I $\Delta 5$ S::Pex20、FBA IN:: $\Delta 17$ S::Lip2、FBA INm:: $\Delta 17$ S::Pex16、TEF:: $\Delta 17$ S::Pex16、および2X TEF::rELO2S::Pex20。

30

40

【0494】

実施例8

ω -6 $\Delta 6$ デサチュラーゼ/ $\Delta 6$ エロンガーゼ経路：全脂質の約19%のEPAを生成するY2095株の創出

本実施例は、総脂質に対して19%のEPAを生成できる、ヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）ATCC#20362由来のY2095株の構築について述べる（図5）。この株を遺伝子操作して、 ω -6 $\Delta 6$ デサチュラーゼ/ $\Delta 6$ エロンガーゼ経路を発現した。

50

【0495】

Y2095株の開発は、M4株（8%のDGLAを生成し、実施例4で述べられる）、Y2047株（11%のARAを生成し、実施例で述べられる7）、Y2048株（11%のEPAを生成し、実施例7で述べられる）、Y2060株（13%のEPAを生成し、実施例7で述べられる）、Y2072株（15%のEPAを生成し、実施例7で述べられる）、およびY2072U1株（14%のEPAを生成し、実施例7で述べられる）の構築を要した。

【0496】

全脂質の約19%のEPAを生成するY2095株の創出

コンストラクトpDMW303（図10D、配列番号136、実施例6参照）もまた使用して、4個のキメラ遺伝子のクラスター（C_{18/20}エロンガーゼ、Δ6デサチュラーゼ、Δ5デサチュラーゼ、およびΔ12デサチュラーゼを含んでなる）およびUra3遺伝子をY2072U1株（実施例7）のヤロウィア（*Yarrowia*）リパーゼ1遺伝子部位に組み込んだ。一般方法に従って、SphI/AseIで消化したプラスミドをY2072U1株に形質転換した。形質転換に続いて細胞をMMプレート上に播種して、30℃に3～4日間保った。

【0497】

MMプレート上に生育した全部で48個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。生育したらこれらの株を液体MM中に個別に接種して、250rpm/分で振盪しながら30℃で2日間生育させた。細胞を遠心分離によって収集し、HGM中に再懸濁して、250rpm/分で振盪しながら30℃で5日間生育させた。二段階生育後、細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換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。

【0498】

GC分析は、二段階生育後に、pDMW303によるY2072U1の形質転換体のほとんど全てでEPAが生成されたことを示した。48個の選択された形質転換体中に、15%未満のEPAを生成した37株、15～16%のEPAを生成した8株、19%のEPAを生成した1株（すなわち#28）があった。株#28を「Y2095」株と命名した。

【0499】

野生型ヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）ATCC#20362に対するこの株の最終遺伝子型は、次のとおりであった。Pox3-、LIP1-、Y. Δ12-、FBA::F. Δ12::Lip2、TEF::F. Δ12::Pex16、FBA IN::MΔ12::Pex20、TEF::Δ6S::Lip1、FBA IN::Δ6S::Lip1、FBA IN::E1S::Pex20、GPAT::E1S::Oct、GPD IN::E1S::Lip2、TEF::E2S::Xpr、FBA IN::MAΔ5::Pex20、TEF::MAΔ5::Lip1、TEF::HΔ5S::Pex16、GPAT::HΔ5S::Pex20、TEF::IΔ5S::Pex20、GPAT::IΔ5S::Pex20、FBA IN::Δ17S::Lip2、FBA INm::Δ17S::Pex16、TEF::Δ17S::Pex16、およびTEF::rELO2S::Pex20。

【0500】

実施例9

ω-6 Δ6デサチュラーゼ/Δ6エロンガーゼ経路：全脂質の16%のEPAを生成するY2107U1株の創出

本実施例は、総脂質に対して16%のEPA生成できる、ヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）ATCC#20362由来のY2107U1株の構築について述べる（図5）。この株を遺伝子操作して、ω-6 Δ6デサチュラーゼ/Δ6エロンガーゼ経路を発現した。実施例23（下記）で述べられるようにして、TA

10

20

30

40

50

G 含量および／または組成の分析に基づいて、この E P A 生成株で M. アルピナ (a l p i n a) G P A T 遺伝子過剰発現の効果を調べた。

【0501】

Y 2 1 0 7 U 1 株の開発は、M 4 株 (8 % の D G L A を生成し、実施例 4 で述べられる)、Y 2 0 4 7 株 (11 % の A R A を生成し、実施例 7 で述べられる)、Y 2 0 4 8 株 (11 % の E P A を生成し、実施例 7 で述べられる)、Y 2 0 6 0 株 (13 % の E P A を生成し、実施例 7 で述べられる)、Y 2 0 7 2 株 (15 % の E P A を生成し、実施例 7 で述べられる)、Y 2 0 7 2 U 1 株 (14 % の E P A を生成し、実施例 7 で述べられる)、および Y 2 0 8 9 (18 % の E P A を生成し、実施例 7 で述べられる) の構築を要した。

【0502】

U r a ー表現型による全脂質の約 16 % の E P A 生成する Y 2 1 0 7 U 1 株の創出

コンストラクト p Z K U G P E 1 S (配列番号 139) を作り出して、G P A T : : E L 1 S : : P e x 2 0 キメラ遺伝子を Y 2 0 8 9 株の U r a 3 遺伝子に組み込んだ。より具体的にはプラスミド p Z K U G P E 1 S は、以下の構成要素を含有した。

【0503】

【表 35】

表 26

プラスミド pZKUGPE1S(配列番号 139)の説明

配列番号 139 内の 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
BsiWI/PacI (318~1038)	ヤロウィア Ura3 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AJ306421)の 721bp の 5' 部分
Sall/Clal (3882~4606)	ヤロウィア Ura3 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AJ306421)の 724bp の 3' 部分
Clal/BsiWI (4606~318)	以下を含んでなる GPAT::E1S::Pex20 ● GPAT:GPAT プロモーター(配列番号 179) ● EL1S: モルティエラ・アルピナ由来コドン最適化エロンガーゼ 1 遺伝子(配列番号 19)(ジェンバンク登録番号 AX464731) ● Pex20: ヤロウィア Pex20 遺伝子の Pex20 ターミネーター配列(ジェンバンク登録番号 AF054613)

【0504】

プラスミド p Z K U G P E 1 S を P s t I / P a c I で消化し、次に一般方法に従って使用して Y 2 0 8 9 株を形質転換した。形質転換に続いて細胞を MM+5-F O A 選択プレート上に播種し、30℃に3~4日間保った。

【0505】

MM+5-F O A プレート上に生育した全部で 8 個の形質転換体を拾って、MM プレートおよび MM+5-F O A プレート上に別々に再度画線培養した。MM+5-F O A プレート上で生育できるが MM プレート上では生育できない株を U r a ー株として選択した。これらの 8 個の各 U r a ー株を液体 MMU 中に個別に接種して、250 r p m / 分間で振盪しながら 30℃で 2 日間生育させた。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換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 (H e w l e t t - P a c k a r d) 6 8 9 0 G C で分析した。

【0506】

G C 分析は、MMU 中での 2 日間の生育後に全脂質の 6.6~8.7 % の E P A を生成する 6 株、および 9.4~10 % の E P A (すなわち # 4 および # 5) を生成する 2 株があったことを示した。二段階生育条件 (すなわち 48 時間の MM、96 時間の H G M) を使用して、株 # 4 および # 5 をさらに分析した。G C 分析はこれらの 2 つの株が二段階生

10

20

30

40

50

育後、全脂質の約16%のEPAを生成したことを示した。株#4を「Y2107U1」株と命名し、株#5を「Y2107U2」株と命名した。

【0507】

実施例10

ω -6 Δ 6デサチュラーゼ/ Δ 6エロンガーゼ経路：全脂質の約26%のEPAを生成するY2090株の創出

本実施例は、総脂質に対して26%のEPAを生成できるヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) ATCC#20362由来のY2090株の構築について述べる(図5)。この株を遺伝子操作して、 ω -6 Δ 6デサチュラーゼ/ Δ 6エロンガーゼ経路を発現した。

10

【0508】

Y2090株の開発は、M4株(8%のDGLAを生成し、実施例4で述べられる)、Y2047株(11%のARAを生成し、実施例7で述べられる)、Y2048株(11%のEPAを生成し、実施例7で述べられる)、Y2060株(13%のEPAを生成し、実施例7で述べられる)、Y2072株(15%のEPAを生成し、実施例7で述べられる)、およびY2072U3株(16%のEPAを生成する)の構築を要した。

【0509】

Ura-表現型による全脂質の約15~16%のEPAを生成するY2072U3およびY2072U4株の創出

コンストラクトpZKUT16(図10A、配列番号133、実施例4参照)を使用して、TEF::rELO2S::Pex20キメラ遺伝子をY2072株(実施例7)のUra3遺伝子に組み込んだ。具体的には、SalI/PacIで消化したプラスミドpZKUT16を一般方法に従って使用して、Y2072株を形質転換した。形質転換に続いて細胞をMM+5-FOA選択プレート上に播種し、30℃に3~4日間保った。

20

【0510】

MM+5-FOAプレート上に生育した全部で24個の形質転換体を拾って、MMプレートおよびMM+5-FOAプレート上に別々に再度画線培養した。MM+5-FOAプレート上には生育できるがMMプレート上に生育できない株をUra-株として選択した。これらの24個のUra-株を30℃の液体MMU中に個別に接種して、250rpm/分間で振盪しながら2日間培養した。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換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D(Hewlett-Packard)6890 GCで分析した。

30

【0511】

GC分析は、MMU培地中での2日間の生育後に、全脂質の8.9%未満のEPAを生成した14株、9~9.9%のEPAを生成した8株、および10.1%のEPAを生成した1株(すなわち#12)があったことを示した。二段階生育手順(すなわち48時間のMM、96時間のHGM)を使用して、株#12(10.1%のEPA)および#11(9.6%のEPA)をさらに分析した。GC分析は、株#12が約15%のEPAを生成したことを示し、この株は「Y2072U3」株と命名された。対照的に株#11は約16%のEPAを生成し、この株は「Y2072U4」株と命名された。

40

【0512】

全脂質の20%を超えるEPAを生成するY2090、Y2091、およびY2092株の創出

コンストラクトpDMW302T16(図10C、配列番号135、実施例5参照)もまた使用して、4個のキメラ遺伝子のクラスター($C_{16/18}$ エロンガーゼ、 $C_{18/20}$ エロンガーゼ、 Δ 6デサチュラーゼ、および Δ 12デサチュラーゼを含んでなる)およびUra3遺伝子をY2072U3株のヤロウィア(*Yarrowia*)リパーゼ1遺伝子部位に組み込んだ。具体的にはプラスミドpDMW302T16をSphI/AscIで消化し、次に一般方法に従って使用してY2072U3株を形質転換した。形質転換に続いて細胞をMMプレート上に播種して、30℃に2~3日間保った。

50

【0513】

MMプレート上に生育した全部で48個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。生育したらこれらの株を液体MM中に個別に接種して、250rpm/分で振盪しながら30℃で2日間生育させた。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換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。

【0514】

GC分析は、MM中での2日間の生育後に、pDMW302T16によるY2072U3の形質転換体のほとんど全てでEPAが生成されたことを示した。48個の選択された形質転換体中に、10%未満のEPAを生成した9株、10~11.9%のEPAを生成した26株、12~13%のEPAを生成した12株、および15.8%のEPAを生成した1株（すなわち#9）があった。

10

【0515】

二段階生育手順（すなわち48時間のMM、96時間のHGM）によるさらなる分析のために、株#9（15.8%のEPAを生成する）、#20（12.6%のEPAを生成する）、および#21（12.2%のEPAを生成する）を選択した。GC分析は、全脂質の約21%のEPAを生成した株#20株（引き続いて「Y2090」株と命名された）、約19%のEPAを生成した株#9（引き続いて「Y2091」株と命名された）および約20%のEPAを生成した株#21（引き続いて「Y2092」株と命名された）を示した。

20

【0516】

以下のような修正二段階生育手順を使用して、Y2090株中のEPAおよび全含油量をさらに分析した。30℃の3mLのSD+AA培地中で、250rpm/分間で振盪しながらY2090株を単一コロニーから生育させた。24時間の生育後、32mLのSD+AA培地を含有するエルレンマイヤーフラスコに3mLのスタータカルチャを添加した。250rpm/分間で振盪しながら30℃で48時間の追加的生育後、細胞をペレット化して上清を除去した。ペレットを250mLフラスコ中の35mLのHGMに再懸濁した。35mLの培養を30℃でインキュベートし、250rpm/分間で振盪しながらさらに4日間生育させた。このインキュベーション期間後、Y2090培養のOD₆₀₀は6.29であった。培養のアリコート（1mL）をGC分析のために使用し、30mLの培養を乾燥細胞重量測定のために使用した。

30

【0517】

エステル交換のために、（内部対照として使用するための）40μgのC15:0をナトリウムメトキシドに添加したこと以外は、一般方法で述べられたようにしてGC分析を実施した。30mL培養からのH₂O洗浄した細胞ペレットを凍結乾燥して乾燥細胞重量を判定した。GC分析は、Y2090が約22.8%の油/乾燥細胞重量で、全脂質の約26.6%のEPAを生成したことを示した。

【0518】

Y2090株は、野生型ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) ATCC#20362に対して以下の遺伝子型を有した。Pox3-、LIP1-、Y. Δ12-、FBA::F. Δ12::Lip2、TEF::F. Δ12::Pex16、FBA IN::MΔ12::Pex20、TEF::Δ6S::Lip1、FBA IN::Δ6S::Lip1、FBA IN::E1S::Pex20、GPAT::E1S::Oct、GPD IN::E1S::Lip2、TEF::E2S::Xpr、FBA IN::MAΔ5::Pex20、TEF::MAΔ5::Lip1、TEF::HΔ5S::Pex16、TEF::IΔ5S::Pex20、FBA IN::Δ17S::Lip2、FBA INm::Δ17S::Pex16、TEF::Δ17S::Pex16、および3X TEF::rELO2S::Pex20。

40

【0519】

実施例11

50

ω -6 Δ 6 デサチュラーゼ/ Δ 6 エロンガーゼ経路：全脂質の約28%のEPAを生成するY2096株の創出

本実施例は、総脂質に対して28%のEPAを生成できるヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) ATCC#20362由来のY2096株の構築について述べる(図5)。この株を遺伝子操作して、 ω -6 Δ 6 デサチュラーゼ/ Δ 6 エロンガーゼ経路を発現した。

【0520】

Y2090株の開発は、M4株(8%のDGLAを生成し、実施例4で述べられる)、Y2047株(11%のARAを生成し、実施例7で述べられる)、Y2048株(11%のEPAを生成し、実施例7で述べられる)、Y2060株(13%のEPAを生成し、実施例7で述べられる)、Y2072株(15%のEPAを生成し、実施例7で述べられる)、およびY2072U3株(16%のEPAを生成し、実施例10で述べられる)の構築を要した。

【0521】

全脂質の23~28%のEPAを生成するY2096、Y2097、Y2098、Y2099、Y2105およびY2106株の創出

コンストラクトpDMW303(図10D、配列番号136、実施例6を参照)を使用して、4個のキメラ遺伝子のクラスター($C_{18/20}$ エロンガーゼ、 Δ 6 デサチュラーゼ、 Δ 5 デサチュラーゼ、および Δ 12 デサチュラーゼを含んでなる)およびUra3遺伝子をY2072U3株(実施例10)のヤロウィア(*Yarrowia*)リパーゼ1遺伝子部位に組み込んだ。具体的には、一般方法に従ってSphI/AscIで消化したプラスミドをY2072U3株に形質転換した。形質転換に続いて細胞をMMプレート上に播種し、30℃に3~4日間保った。

【0522】

MMプレート上に生育した全部で48個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。生育したらこれらの株を30℃の液体MM中に個別に接種して、250rpm/分で振盪しながら2日間生育させた。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換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。

【0523】

GC分析は、MM中での2日間の生育後に、pDMW303によるY2072U3の形質転換体のほとんど全てでEPAが生成されたことを示した。48個の選択された形質転換体中に、全脂質の13.9%未満のEPAを生成した35株、14~16.9%のEPAを生成した8株、および17~18.3%のEPAを生成した4株があった。

【0524】

二段階生育手順(すなわち48時間のMM、96時間のHGM)を使用したさらなる分析のために、全脂質の14%を超えるEPAを生成する株(すなわちMM中で2日間後に)を選択した。GC分析は、全12株で全脂質の18%を超えるEPAが生成したことを示した。それらの中で、株#6(「Y2096」株と命名された)は約24%のEPAを生成し、株#43(「Y2097」株と命名された)は約22.3%のEPAを生成し、株#45(「Y2098」株と命名された)は約22.4%のEPAを生成し、株#47(「Y2099」株と命名された)は約22.6%のEPAを生成し、株#5(「Y2105」株と命名された)は約23.3%のEPAを生成し、株#48(「Y2106」株と命名された)は全脂質の約23%のEPAを生成した。

【0525】

実施例10で述べられる修正二段階手順を使用して、生育に続いてY2096株中のEPA含量および油量をさらに分析した。GC分析は、Y2096が約20.8%の油/乾燥細胞重量で、全脂質の約28.1%のEPAを生成したことを示した。

【0526】

Y2096株は、野生型ヤロウィア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)

10

20

30

40

50

t i c a) A T C C # 2 0 3 6 2 に対して以下の遺伝子型を有した。P O X 3 -、L I P 1 -、Y. Δ 1 2 -、F B A I N :: F. Δ 1 2 :: L i p 2、T E F :: F. Δ 1 2 :: P e x 1 6、F B A I N :: M Δ 1 2 :: P e x 2 0、T E F :: Δ 6 S :: L i p 1、F B A I N :: Δ 6 S :: L i p 1、F B A I N :: E 1 S :: P e x 2 0、G P A T :: E 1 S :: O c t、G P D I N :: E 1 S :: L i p 2、T E F :: E 2 S :: X p r、F B A I N :: M A Δ 5 :: P e x 2 0、T E F :: M A Δ 5 :: L i p 1、T E F :: H Δ 5 S :: P e x 1 6、T E F :: I Δ 5 S :: P e x 2 0、G P A T :: I D 5 S :: P e x 2 0、F B A I N :: Δ 1 7 S :: L i p 2、F B A I N m :: Δ 1 7 S :: P e x 1 6、T E F :: Δ 1 7 S :: P e x 1 6、および 2 X T E F :: r E L O 2 S :: P e x 2 0。

10

【0527】

実施例 12

ω-6 Δ6 デサチュラーゼ/Δ6 エロンガーゼ経路：全脂質の約 9～12% の EPA を生成する MU 株の創出

本実施例は、総脂質に対して 9～12% の EPA を生成できる、ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) A T C C # 2 0 3 6 2 由来の MU 株の構築について述べる (図 5)。この株を遺伝子操作して、ω-6 Δ6 デサチュラーゼ/Δ6 エロンガーゼ経路を発現させた。実施例 30 (下記) で述べられるようにして、TAG 含量および/または組成分析に基づいて、この EPA 生成株中で、様々な天然 Y. リポリティカ (*lipolytica*) アシルトランスフェラーゼノックアウトの効果を調べた。

20

【0528】

MU 株の開発は、M4 株 (8% の DGLA を生成し、実施例 4 で述べられる)、Y2034 株 (10% の ARA を生成し、実施例 4 で述べられる)、E 株 (10% の EPA を生成し、実施例 4 で述べられる)、EU 株 (10% の EPA を生成し、実施例 4 で述べられる)、および株 M26 (14% の EPA を生成する) の構築を要した。

【0529】

全脂質の 14% の EPA を生成する M26 株の創出

コンストラクト pZKO2UM26E (図 11B、配列番号 140) を使用して、3 個のキメラ遺伝子のクラスター ($C_{18/20}$ エロンガーゼ、Δ6 デサチュラーゼ、および Δ12 デサチュラーゼを含んでなる) および Ura3 遺伝子を EU 株 (実施例 4) のヤロウィア (*Yarrowia*) Δ12 デサチュラーゼ遺伝子部位に組み込んだ。プラスミド pKO2UM26E は、以下の構成要素を含有した。

30

【0530】

【表 3 6】

表 27
プラスミド pKO2UM26E(配列番号 140)の説明

配列番号 140 内の 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
<i>HindIII</i> / <i>Ascl</i> (1~728)	ヤロウィアΔ12 デサチュラーゼ遺伝子(配列番号 23)の 728bp の 5' 部分
<i>SphI</i> / <i>EcoRI</i> (3436~3992)	ヤロウィアΔ12 デサチュラーゼ遺伝子(配列番号 23)の 556bp の 3' 部分
<i>BsiWI</i> / <i>HindIII</i> (11095~1)	以下を含んでなる GPAT::EL1S::XPR ● GPAT: GPAT プロモーター(配列番号 179) ● EL1S: モルティエラ・アルピナ由来コドン最適化エロンガーゼ 1 遺伝子(配列番号 19)(ジェンバンク登録番号 AX464731) ● XPR: ヤロウィアXpr 遺伝子(ジェンバンク登録番号 M17741)の約 100bp の 3' 領域
<i>BglIII</i> / <i>BsiWI</i> (8578~11095)	以下を含んでなる FBAIN::M.Δ12::Pex20 ● FBAIN: FBAIN プロモーター(配列番号 177) ● M.Δ12: モルティエラ・イザベリナΔ12 デサチュラーゼ遺伝子(ジェンバンク登録番号 AF417245、配列番号 25) ● Pex20: ヤロウィアPex20 遺伝子の Pex20 ターミネーター配列(ジェンバンク登録番号 AF054613)
<i>Sall</i> / <i>PacI</i> (6704~8202)	ヤロウィアUra3 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AJ306421)
<i>EcoRI</i> / <i>Sall</i> (3992~6704)	以下を含んでなる FBAIN::M.Δ6B::Pex20 ● TEF: TEF プロモーター(ジェンバンク登録番号 AF054508) ● M.Δ6B: モルティエラ・アルピナΔ6 デサチュラーゼ遺伝子「B」(ジェンバンク登録番号 AB070555、配列番号 4) ● Pex20: ヤロウィアPex20 遺伝子の Pex20 ターミネーター配列(ジェンバンク登録番号 AF054613)

【0531】

プラスミド pKO2UM26E を *SphI*/*AscI* で消化し、次に一般方法に従って使用して EU 株(実施例 4)を形質転換した。形質転換に続いて細胞を MM プレート上に播種して、30℃に2~3日間保った。

【0532】

MM プレート上に生育した全部で 48 個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。生育したらこれらの株を 30℃の液体 MM 中に個別に接種して、250rpm/分で振盪しながら1日間生育させた。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換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。

【0533】

GC 分析は、MM 培地中での1日間の生育後に、pKO2UM26Eでの形質転換体のほとんど全てで EPA が生成されたことを示した。48 個の選択された形質転換体中では、遺伝子操作されたヤロウィア(*Yarrowia*)中で5株が全脂質の4%未満の EPA を生成し、23 株が 4~5.9% の EPA を生成し、9 株が 6~6.9% の EPA を生成し、11 株が 7~8.2% の EPA を生成した。二段階生育手順(すなわち 48 時間の MM、96 時間の HGM)を使用したさらなる分析のために、8.2% の EPA を生成した株を選択した。GC 分析は、遺伝子操作された株が全脂質の約 14% の EPA を生成し

10

20

30

40

50

たことを示した。株を「M26」株と命名した。

【0534】

野生型ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) ATCC #20362 に対するM26株の最終遺伝子型は次のとおり。Pox3⁻、Y. Δ12⁻、FBA::F. Δ12::Lip2、FBAIN::MΔ12::Pex20、TEF::Δ6S::Lip1、FBAIN::Δ6B::Pex20、FBAIN::E1S::Pex20、GPAT::E1S::Xpr、TEF::E2S::Xpr、FBAIN::MAΔ5::Pex20、TEF::MAΔ5::Lip1、TEF::HΔ5S::Pex16、FBAIN::Δ17S::Lip2、FBAINm::Δ17S::Pex16、TEF::Δ17S::Pex16、およびTEF::rELO2S::Pex20。

10

【0535】

全脂質の9～12%のEPAを生成するMU株の創出

MU株は、株M26のUra栄養要求株である。この株は、PacIおよびHincIIで消化された5μgのプラスミドpZKUM (配列番号141) で、M26株を形質転換して作られた。カリフォルニア州オレンジのザイモリサーチ社 (Zymo Research Corporation (Orange, CA)) からのフロズン (Frozen) -EZ酵母形質転換キットを使用して形質転換を実施し、以下の培地を含む寒天プレート上に100μLの形質転換された細胞ミクスを播種して、形質転換体を選択した。6.7g/Lの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、20g/Lのデキストロース、50mg/Lのウラシル、および800mg/LのFOA。7日後に小型コロニーが出現し、それをMMおよびMMU寒天プレート上に播種した。全てURA栄養要求株であった。株の1つを「MU」と命名した。

20

【0536】

実施例13

Ura⁻遺伝子型を有し、全脂質の45%のLAを生成する間性Y2031株の創出

プラスミドpKUNT2のTEF::Y. Δ12::Pex20キメラ遺伝子 (図11C) を野生型ヤロウィア (*Yarrowia*) ATCC #20362株のUra3遺伝子遺伝子座に組み込むことでUra⁻遺伝子型を発生させて、Y2031株を発生させた。

30

【0537】

具体的にはプラスミドpKUNT2は、以下の構成要素を含有した。

【0538】

【表37】

表 28

プラスミド pKUNT2 (配列番号 142) 説明

配列番号 142 内の 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
Ascl/BsiWI (3225～3015)	ヤロウィアUra3 遺伝子 (ジェンバンク登録番号 AJ306421) の 784bp の 5' 部分
SphI/PacI (5933～13)	ヤロウィアUra3 遺伝子 (ジェンバンク登録番号 AJ306421) の 516bp の 3' 部分
EcoRI/BsiWI (6380～8629)	以下を含んでなる TEF::Y. Δ12::Pex20 ● TEF: TEF プロモーター (ジェンバンク登録番号 AF054508) ● Y. Δ12: ヤロウィアΔ12 デサチュラーゼ遺伝子 (配列番号 23) ● Pex20: ヤロウィアPex20 遺伝子からの Pex20 ターミネーター配列 (ジェンバンク登録番号 AF054613)

40

【0539】

50

pKUNT2プラスミドをAscI/SphIで消化し、次に一般方法に従って、野性型Y. リポリティカ (lipolytica) ATCC#20362の形質転換のために使用した。形質転換細胞をFOA選択培地プレート上に播種し、30℃に2～3日間保った。FOA抵抗性コロニーを拾って、MMおよびMMU選択プレート上に画線培養した。MMUプレート上では生育できるがMMプレート上で生育できないコロニーをUra^r株として選択した。次にUra^r株の単一コロニー(5)を30℃の液体MMU中に接種し、250rpm/分間で2日間振盪した。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換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。

【0540】

GC分析は、野性型ATCC#20362中の約20%のLAに対して、約45%のLAが2つのUra^r株(すなわち株#2および#3)中にあったことを示した。形質転換体株#2を「Y2031」株と命名した。

【0541】

実施例14

ヤロウィア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) におけるコドン最適化Δ9エロンガーゼ遺伝子の合成および機能的発現

国際公開第2004/101753号パンフレットで述べられるのと同様にして、Y. リポリティカ (lipolytica) 中での発現のために、イソクリシス・ガルバナ (IsochrYSIS galbana) のΔ9エロンガーゼ遺伝子(ジェンバンク登録番号AF390174)のコドン使用頻度を最適化した。具体的には、ヤロウィア (Yarrowia) コドン使用頻度パターン、ATG翻訳開始コドン周辺の共通配列、およびRNA安定性の一般法則(グハニヨギ (Guhaniyogi), G. およびJ. ブルーアー (Brewer) 著, Gene 265 (1~2): 11~23頁 (2001年))に従って、I. ガルバナ (galbana) 遺伝子のDNA配列(配列番号49)に基づいて、コドン最適化Δ9エロンガーゼ遺伝子(配列番号51)をデザインした。翻訳開始部位の修正に加えて792bpのコード領域の126bpを修正し、123コドンを最適化した。コドン最適化遺伝子中のいずれの修正もコードされるタンパク質のアミノ酸配列(ジェンバンク登録番号AF390174、配列番号50)を変化させなかった。

【0542】

ヤロウィア (Yarrowia) ためのコドン最適化Δ9エロンガーゼ遺伝子の生体外 (in vitro) 合成

コドン最適化Δ9エロンガーゼ遺伝子を次のようにして合成した。最初に、8組のオリゴヌクレオチドをデザインし、I. ガルバナ (galbana) Δ9エロンガーゼ遺伝子のコドン最適化コード領域(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202~217に対応する)の全長を延長した。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。さらに引き続き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218~221)にもまた、NcoI、PstI、PstI、およびNotI制限部位を導入した。

【0543】

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の容積で、各オリゴヌクレオチド(100ng)を37℃で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

10

20

30

40

50

び4℃(15分間)。このようにIL3-1A(配列番号202)をIL3-1B(配列番号203)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204)をIL3-2B(配列番号205)にアニールして、二本鎖生成物「IL3-2AB」などを生成した。

【0544】

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の容積で、10UのT4DNAリガーゼと共に混合し、ライゲーション反応を16℃で一晩インキュベートした。

10

【0545】

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218および219)をプライマーとして使用し、コドン最適化Δ9エロンガーゼ遺伝子の第1の部分をPCRによって増幅した。一般方法で述べられるようにして、50μLの全容積でPCR増幅を実施した。増幅を次のようにして実施した。95℃で3分間の初期変性、続いて95℃で1分間、56℃で30秒間、72℃で40秒間を35サイクル。72℃で10分間の最終延長サイクルを実施し、4℃での反応終結がそれに続いた。417bpのPCR断片をプロメガプロメガ(Promega)からのpGEM-Tイージーベクター中にサブクローンして、pT9(1-4)を発生させた。

20

【0546】

ライゲートした「プール2」混合物(すなわち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220および221)をプライマーとして使用して、コドン最適化Δ9エロンガーゼ遺伝子の第2の部分を同様にPCRによって増幅し、pGEM-Tイージーベクター中にクローンして、pT9(5-8)を発生させた。

【0547】

大腸菌(E. coli)をpT9(1-4)およびpT9(5-8)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(配列番号222)、およびpT9(5-8)の377bpのPstI/NotI断片(配列番号223)を遊離した。次にこれらの2つの断片を組み合わせ、NcoI/NotIで消化したpZUF17(配列番号143、図11D)と共に一方向性にライゲートして、pDMW237(図14A、配列番号144)を発生させた。得られたpDMW237中の合成Δ9エロンガーゼ遺伝子(「IgD9e」)のDNA配列は、ヤロウィア(Yarrowia)の最初にデザインされたコドン最適化遺伝子(すなわち配列番号51)と全く同じであった。

30

40

【0548】

Y. リポリティカ(lipolytica)におけるコドン最適化Δ9エロンガーゼ遺伝子の発現

一般方法で述べられるようにして、キメラFBAIN::IgD9e::Pex20遺伝子を含んでなる自律複製プラスミドであるコンストラクトpDMW237(図14A)をY. リポリティカ(lipolytica)Y2031株(実施例13)に形質転換した。pDMW237によるY2031の3つの形質転換体をMM培地中で2日間にわたり個別に生育させ、細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換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。

50

【0549】

GC結果は、これらのpDMW237による形質転換体中に、約7.1%、7.3%、および7.4%のEDAがそれぞれ生成されたことを示した。これらのデータは、合成コドン最適化IgD9eが、C18:2をEDAに変換できることを実証した。コドン最適化遺伝子の「パーセント(%)基質変換」は、約13%と判定された。

【0550】

実施例15

ヤロウィア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)におけるコドン最適化Δ8デサチュラーゼ遺伝子の合成

国際公開第2004/101753号パンフレットおよび実施例14(前出)で述べられるのと同様にして、Y.リポリティカ(*lipolytica*)中での発現のために、ミドリムシ(*Euglena gracilis*)のΔ8デサチュラーゼ遺伝子(ジェンバンク登録番号AAD45877)のコドン使用頻度を最適化した。3個の異なるコドン最適化遺伝子(すなわち「D8S-1」、「D8S-2」、および「D8S-3」)の合成にもかかわらず、いずれの遺伝子もEDAをDGLAに不飽和化できなかった。したがって以前公開されたΔ8デサチュラーゼ配列は不正確であり、mRNA単離、cDNA合成、およびPCRに続いて、ミドリムシ(*Euglena gracilis*)からΔ8デサチュラーゼを直接単離することが必要であると仮定された。この結果、2つの同様の配列が得られ、ここでEg5(配列番号57および58)およびEg12(配列番号59および60)と同定された。

【0551】

遺伝子をサッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)酵母発現ベクター中にクローニングし、基質供給トライアルを行って、各遺伝子配列の機能分析を実施した。Eg5およびEg12のどちらもEDAおよびETRAをDGLAおよびETAにそれぞれ不飽和化できたが、Eg5はEg12よりも顕著に大きな活性を有した。

【0552】

Eg5の立証されたΔ8デサチュラーゼ活性に基づいて、配列をヤロウィア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)中での発現のためにコドン最適化し、それによって「D8SF」(配列番号61および62)と命名された合成機能性コドン最適化Δ8デサチュラーゼの合成をもたらした。

【0553】

コドン最適化Δ8デサチュラーゼ遺伝子の予備的生体外(*in vitro*)合成

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」翻訳開始コドン周辺の共通配列、およびRNA安定性の一般法則グハニヨギ(*Guhaniyogi*), G. およびJ. ブルーアー(*Brewer*)著、*Gene* 265(1~2):11~23頁(2001年))に従って、ミドリムシ(*Euglena gracilis*)の公開配列(配列番号52および53)に基づいて、コドン最適化Δ8デサチュラーゼ遺伝子(「D8S-1」と命名された、配列番号55)をデザインした。翻訳開始部位の修正に加えて1260bpのコード領域の200bp(15.9%)を修正した。第2のアミノ酸を「K」から「E」に変化させてNcoI部位を翻訳開始コドン周辺に付加させたことを除いて、コドン最適化遺伝子中のいずれの修正もコードされるタンパク質のアミノ酸配列(配列番号53)を変化させなかった。

【0554】

具体的には、コドン最適化Δ8デサチュラーゼ遺伝子を次のようにして合成した。最初に13組のオリゴヌクレオチドをデザインして、ミドリムシ(*E. gracilis*)Δ8デサチュラーゼ遺伝子のコドン最適化コード領域(例えばD8-1A、D8-1B、D8-2A、D8-2B、D8-3A、D8-3B、D8-4A、D8-4B、D8-5A、D8-5B、D8-6A、D8-6B、D8-7A、D8-7B、D8-8A、D8-

8 B、D 8-9 A、D 8-9 B、D 8-10 A、D 8-10 B、D 8-11 A、D 8-11 B、D 8-12 A、D 8-12 B、D 8-13 A、および D 8-13 B、配列番号 224~249 に対応する)の全長を延長した。各 5'-末端の 4 bp 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組は相補的であった。さらに引き続くサブクローニングのために、プライマー D 8-1 A、D 8-3 B、D 8-7 A、D 8-9 B、および D 8-13 B (配列番号 224、229、236、241、および 249) もまた、Nco I、Bgl II、Xho I、Sac I、および Not I 制限部位にそれぞれ導入された。

【0555】

実施例 14 で述べられるようにして、オリゴヌクレオチド (各 100 ng) をリン酸化し、次に各センスおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドの対を混合し、共にアニールした [例えば D 8-1 A (配列番号 224) を D 8-1 B (配列番号 225) にアニールして二本鎖生成物「D 8-1 A B」を生成し、D 8-2 A (配列番号 226) を D 8-2 B (配列番号 227) にアニールして二本鎖生成物「D 8-2 A B」などを生成した]。

【0556】

次にアニールされた二本鎖オリゴヌクレオチドの 4 つの別個のプールを以下に示すように共にライゲートした。プール 1 (D 8-1 A B、D 8-2 A B、および D 8-3 A B を含んでなる)、プール 2 (D 8-4 A B、D 8-5 A B、および D 8-6 A B を含んでなる)、プール 3 (D 8-7 A B、D 8-8 A B、および D 8-9 A B を含んでなる)、およびプール 4 (D 8-10 A B、D 8-11 A B、D 8-12 A B、および D 8-13 A B 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 20 μ L の容積で 10 U の T4 DNA リガーゼと共に混合し、ライゲーション反応を 16 $^{\circ}$ C で一晩インキュベートした。

【0557】

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 D 8-1 A B、D 8-2 A B、および D 8-3 A B) をテンプレートとして、オリゴヌクレオチド D 8-1 F および D 8-3 R (配列番号 250 および 251) をプライマーとして使用して、コドン最適化 Δ 8 デサチュラーゼ遺伝子の第 1 の部分を PCR によって増幅した。実施例 14 で述べられるようにして 50 μ L の全容積で PCR 増幅を実施した。309 bp の PCR 断片をプロメガプロメガ (Promega) からの pGEM-T イージーベクター中にサブクローンして pT8 (1-3) を発生させた。

【0558】

ライゲートした「プール 2」混合物 (すなわち D 8-4 A B、D 8-5 A B、および D 8-6 A B) をテンプレートとして、オリゴヌクレオチド D 8-4 F および D 8-6 R (配列番号 252 および 253) をプライマーとして使用して、コドン最適化 Δ 8 デサチュラーゼ遺伝子の第 2 の部分を PCR によって同様に増幅し、pGEM-T イージーベクター中にクローンして pT8 (4-6) を発生させた。ライゲートした「プール 3」混合物 (すなわち D 8-7 A B、D 8-8 A B、および D 8-9 A B) をテンプレートとして、オリゴヌクレオチド D 8-7 F および D 8-9 R (配列番号 254 および 255) をプライマーとして使用して、コドン最適化 Δ 8 デサチュラーゼ遺伝子の第 3 の部分を PCR によって同様に増幅し、pGEM-T イージーベクター中にクローンして pT8 (7-9) を発生させた。最後に「プール 4」ライゲーション混合物 (すなわち D 8-10 A B、D 8-11 A B、D 8-12 A B、および D 8-13 A B) をテンプレートとして、オリゴヌクレオチド D 8-10 F および D 8-13 R (配列番号 256 および 257) をプライマーとして使用して、コドン最適化 Δ 8 デサチュラーゼ遺伝子の第 4 の部分を PCR によって同様に増幅し、pGEM-T イージーベクター中にクローンして pT8 (10-13) を発生させた。

【0559】

大腸菌 (E. coli) を pT8 (1-3)、pT8 (4-6)、pT8 (7-9)、

10

20

30

40

50

および pT8 (10-13) で別々に形質転換して、アンピシリン抵抗性形質転換体からプラスミド DNA を単離した。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、pT8 (1-3) (配列番号 258) の 309 bp の NcoI/BglI 断片、pT8 (4-6) (配列番号 259) の 321 bp の BglII/XhoI 断片、pT8 (7-9) (配列番号 260) の 264 bp の XhoI/SacI 断片、および pT8 (10-13) (配列番号 261) の 369 bp の SacI/NotI 断片を遊離した。次にこれらの断片を組み合わせて、NcoI/NotI 消化 pY54PC (配列番号 145、国際公開第 2004/101757 号パンフレット) と共に一方向性にライゲートして、pDMW240 (図 14B) を発現させた。これによって pDMW240 中に合成 Δ8 デサチュラーゼ遺伝子 (「D8S-1」、配列番号 55) が得られた。

10

【0560】

公開されたミドリムシ (*E. gracilis*) の Δ8 デサチュラーゼアミノ酸配列 (配列番号 53) と比較して、D8S-1 の第 2 のアミノ酸では、NcoI 部位を翻訳開始コドン周辺に付加するために「K」を「E」に変化させた。pDMW240 (図 14B) をテンプレートとして、オリゴヌクレオチド ODMW390 および ODMW391 (配列番号 262 および 263) をプライマーとして使用して、生体外 (*in vitro*) 変異誘発によって (カリフォルニア州サンディエゴのストラタジーン (Stratagene (San Diego, CA)))、公開されたミドリムシ (*E. gracilis*) Δ8 デサチュラーゼ配列 (配列番号 53) と全く同じアミノ酸配列を有する合成遺伝子の別のバージョンを構築した。得られたプラスミドを pDMW255 と命名した。pDMW255 中の合成 Δ8 デサチュラーゼ遺伝子を「D8S-2」と命名し、アミノ酸配列は配列番号 53 で記載される配列と全く同じであった。

20

【0561】

非機能性コドン最適化 Δ8 デサチュラーゼ遺伝子

一般方法で述べられるようにして、ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 株 ATCC #76982 (Leu-) を pDMW240 および pDMW255 でそれぞれ形質転換した。組換えコンストラクトを含有する酵母を EDA [20:2 (11, 14)] で栄養強化された MM 中で生育させた。具体的には、pDMW240 (D8S-1 を含有する) または pDMW255 (D8S-2 を含有する) のどちらかを含有する形質転換体 Y. リポリティカ (*lipolytica*) の単一コロニーを 3 mL の MM 中で OD₆₀₀ 約 1.0 に 30℃ で生育させた。次に基質供給のために、10 μg の EDA 基質を含有する 3 mL の MM 中で、100 μL の細胞を 30℃ で約 24 時間継代培養した。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換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。

30

【0562】

どちらの形質転換体も EDA から DGLA を生成しなかったため、D8S-1 および D8S-2 は機能性でなく、EDA を不飽和化できなかった。キメラ D8S-1::XPR および D8S-2::XPR 遺伝子は、それぞれ配列番号 264 および 265 で示される。

40

【0563】

ジェンバンク (登録番号 AAD45877 [配列番号 53]) に寄託された Δ8 デサチュラーゼのタンパク質配列、および国際公開第 00/34439 号パンフレットまたはウォリス (Wallis) ら (Archives of Biochem. Biophys., 365:307~316 (1999 年)) (ここでの配列番号 54) の間に、3 個のアミノ酸の違いが見いだされた。具体的にはジェンバンク登録番号 AAD45877 には、3 個のアミノ酸が欠落しているように見えた。pDMW255 をテンプレートとして、ODMW392 および ODMW393 (配列番号 266 および 267) をプライマーとして使用して、生体外 (*in vitro*) 変異誘発 (カリフォルニア州サンディエゴのストラタジーン (Stratagene (San Diego, CA))) によって 9 bp

50

を合成D8S-2遺伝子に付加することで、国際公開第00/34439号パンフレットおよびウォリス (Wallis) ら (前出) (配列番号54) で述べられる配列と同一のタンパク質を生成した。得られたプラスミドをpDMW261と称した。pDMW261中の合成Δ8デサチュラーゼ遺伝子を「D8S-3」(配列番号56)と命名した。pDMW261コンストラクトのヤロウィア (Yarrowia) 中への形質転換に続いて、上述のようにEDAを使用して同様の供給実験を行った。D8S-3では、EDAのDGLAへの不飽和化は観察されなかった。

【0564】

ミドリムシ (*Euglena gracilis*) Δ8デサチュラーゼ遺伝子の単離
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 (Richard Triemer) 博士の研究室からミドリムシ (*Euglena gracilis*) を得た。10mLの活発に生育する培養から、1mLのアリコートをして500mLガラスびん中の250mLのミドリムシ (*Euglena gracilis*) (Eg) 培地に移した。970mLの水中で1g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1g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 (Detroit, MI)) からの2gのバクト (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 (Detroit, MI)) からの2g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30mLの土壌上清 (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 (*E. gracilis*) 培養物を23℃で16時間の照明、8時間の暗黒サイクルで攪拌せずに2週間生育させた。

【0565】

2週間後、脂質分析のために10mL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、100μL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、0.5mL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5μL) を分離して、スペルコ (Supelco Inc.) からのオメガワックス (Omegawax) 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。オーブ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。ヌチェック・プレップ (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12に示す。

【0566】

1,800×gで10分間の遠心分離によって残った2週間培養物 (240mL) をペレット化し、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ーテスト (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 (5mLの試薬を使用してRNAを0.5mLの水に溶解) に従って、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1mgの全RNA (2mg/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 (Amersham Biosciences (Piscataway, NJ)) からのmRNA精製キットを

10

20

30

40

50

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 μ g の mRNA を得た。

【0567】

カリフォルニア州カールズバッドのインビトロジェン・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、765 ng の mRNA から cDNA を合成した。合成された cDNA を 20 μ L の水に溶解した。

【0568】

下で述べられる条件を使用して、オリゴヌクレオチドプライマー Eg5-1 および Eg3-3 (配列番号 268 および 269) で、cDNA からミドリムシ (*E. gracilis*) Δ 8 デサチュラーゼを増幅した。具体的には、cDNA (1 μ L) を 50 ピコモルの Eg5-1、50 ピコモルの Eg3-3、ウイスコンシン州マディソンのプロメガ (Promega (Madison, WI)) からの 1 μ L の PCR ヌクレオチドミクス (10 mM)、インビトロジェン (Invitrogen) からの 5 μ L の 10 $\times$ PCR 緩衝液、インビトロジェン (Invitrogen) からの 1.5 μ L の MgCl₂ (50 mM)、インビトロジェン (Invitrogen) からの 0.5 μ L の Taq ポリメラーゼと合わせ、水で 50 μ L にした。反応条件は 94 $^{\circ}$ C で 3 分間、続いて 94 $^{\circ}$ C で 45 秒間、55 $^{\circ}$ C で 45 秒間および 72 $^{\circ}$ C で 1 分間を 35 サイクルであった。PCR を 72 $^{\circ}$ C で 7 分間で終了し、次に 4 $^{\circ}$ C に保った。5 μ L 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 1.3 kbp 前後の DNA バンドが観察された。残る 45 μ L 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 (Zymo Clean) (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 イージーベクター中にクローンした。T7、M13-28 Rev、Eg3-2、および Eg5-2 (それぞれ配列番号 270~273) を使用して複数クローンを配列決定した。

【0569】

このようにして、数 bp のみが異なる Eg5 (配列番号 57) および Eg12 (配列番号 59) の 2 つのクラスの DNA 配列が得られた。Eg5 および Eg12 の翻訳からは、それぞれ配列番号 58 および 60 の 1 個のアミノ酸のみが異なる、タンパク質配列が生じた。したがって Eg5 の DNA およびタンパク質配列はそれぞれ配列番号 57 および配列番号 58 で記載され、Eg12 の DNA およびタンパク質配列はそれぞれ配列番号 59 および配列番号 60 で記載される。

【0570】

単離されたミドリムシ (*E. gracilis*) Δ 8 デサチュラーゼ配列と公開されたミドリムシ (*E. gracilis*) Δ 8 デサチュラーゼ配列との比較

配列番号 58 (Eg5) および配列番号 60 (Eg12) に記載されるタンパク質配列とジェンバンク登録番号 AAD45877 (gi: 5639724、ここでの配列番号 53) からのタンパク質配列、およびウォリス (Wallis) ら (Archives of Biochem. Biophys., 365: 307~316 ページ (1999 年)、国際公開第 00/34439 号パンフレット) [ここでの配列番号 54] の公開されたタンパク質配列とのアラインメントを図 13 に示す。4 つの全配列で保存されたアミノ酸をアステリスク (*) で示した。ダッシュは、プログラムによって配列の整列化を最大化するために使用された。推定上のチトクローム b₅ 領域には下線を引いた。推定上の His box を太字で示す。% 同一性の計算からは、Eg5 Δ 8 デサチュラーゼタンパク質の配列が配列番号 53 と 95.5% 同一であり、配列番号 54 と 96.2% 同一であることが明らかになり、ここで「% 同一性」とは 2 つのタンパク質間で同一のアミノ酸の百

10

20

30

40

50

分率として定義される。アラインメントおよび%同一性の計算は、ウィスコンシン州マディソンのDNASTAR (DNASTAR, Inc. (Madison, WI))からのレーザージーン (LASERGENE) 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) プログラムを使用して実施した。配列の多重整列化は、デフォルトパラメーター (GAP PENALTY=10、GAP LENGTH PENALTY=10) のクラスタル (Clustal) アラインメント法 (ヒギンズ (Higgins) およびシャープ (Sharp) 著、CABIOS. 5:151~153頁 (1989年)) を使用して実施した。クラスタル (Clustal) 法を使用したペアワイズアラインメント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であった。様々なミドリムシ (*E. gracilis*) $\Delta 8$ デサチュラーゼ配列間の違いのより完全な分析については、同時係属米国特許出願第11/166993号を参照されたい。

【0571】

サッカロミセス・セレヴィシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 中のミドリムシ (*Euglena gracilis*) $\Delta 8$ デサチュラーゼ配列の機能分析

酵母エピソードのプラスミド (YEp) -タイプベクター pRS425 (クリスチャンソン (Christianson) ら著、Gene, 110:119~22頁 (1992年)) は、サッカロミセス・セレヴィシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 2 μ 内在性プラスミドからの配列、LEU2 選択マーカー、および多官能性ファージミド pBluescript II SK+ の主鎖ベースの配列を含有する。ジア (Jia) ら著、Physiological Genomics, 3:83~92頁 (2000年) で述べられるのと同様に、S. セレヴィシエ (*cerevisiae*) の強力な構成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 SacI と SpeI 部位の間にクロンして、pGPD-425 を生成した。NotI 部位を pGPD-425 の BamHI 部位に導入し (したがって BamHI 部位が側面にある NotI 部位を生成する)、それによってプラスミド pY-75 をもたらした。NotI で消化して、Eg5 (配列番号 57) および Eg12 (配列番号 59) を上述の pGEM (登録商標) -T イージーベクターから放出し、pY-75 の NotI 部位中にクロンして、pY89-5 (ATCC#PTA-6048 として寄託した) および pY89-12 をそれぞれ生成した。このようにして $\Delta 8$ デサチュラーゼ (すなわち Eg5 [配列番号 57] および Eg12 [配列番号 59]) を S. セレヴィシエ (*cerevisiae*) 中での発現のための強力な構成プロモーターの後方でクロンした。pY89-5 の遺伝子地図を図 14C に示す。

【0572】

標準酢酸リチウム形質転換手順を使用して、プラスミド pY89-5、pY89-12、および pY-75 をサッカロミセス・セレヴィシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) BY4741 (ATCC#201388) に形質転換した。カリフォルニア州カールズバッドのキュービオジーン (Qbiogene (Carlsbad, CA)) からの CSM-leu で栄養強化された DOBA 培地上で、形質転換体を選択した。各プレートからの形質転換体をキュービオジーン (Qbiogene) からの CSM-leu で栄養強化された 2 mL の DOB 培地中に接種し、30°C で 1 日間生育させ、その後 0.5 mL を 1 mM の EDTA または EtrA のどちらかで栄養強化された同一培地に移した。これらを 250 rpm、30°C で一晩インキュベートして、遠心分離によってペレットを得て真空下で乾燥させた。ペレットを 50 μ L の TMSH でエステル交換して、一般方法で述べられるようにして GC によって分析した。pY-75 (すなわちクロン 75-1 および 75-2) および pY89-5 (すなわちクロン 5-6-1 および 5-6-2) の 2 つのクロンをそれぞれ分析する一方、2 つの独立した形質転換からの pY89-12 の 2 揃いのクロン (すなわちクロン 12-8-1、12-8-2、12-9-1、および 12-9-2) を分析した。

【0573】

EDAを供給されたクローンのGC分析によって得られた脂質プロファイルを表29に示す。EtrAを供給されたクローンのGC分析によって得られた脂質プロファイルを表30に示す。脂肪酸は16:0（パルミチン酸）、16:1（パルミトレイン酸）、18:0、18:1（オレイン酸）、20:2 [EDA]、20:3（8, 11, 14）[DGLA]、20:3（11, 14, 17）[ETrA] および20:4（8, 11, 14, 17）[ETA] と同定され、それぞれの組成は全脂肪酸の%として表される。

【0574】

【表38】

10

表 29

ミドリムシΔ8 デサチュラーゼを過剰発現する形質転換 S.セレビシエの

脂質分析:EDA 基質供給

クローン	16:0	16:1	18:0	18:1	20:2	20:3 (8,11,14)	%20:2 転換
75-1(対照)	14	32	5	38	10	0	0
75-2(対照)	14	31	5	41	9	0	0
5-6-1(Eg5)	14	32	6	40	6	2	24
5-6-2(Eg5)	14	30	6	41	7	2	19
12-8-1(Eg12)	14	30	6	41	9	1	7
12-8-2(Eg12)	14	32	5	41	8	1	8
12-9-1(Eg12)	14	31	5	40	9	1	8
12-9-2(Eg12)	14	32	5	41	8	1	7

20

【0575】

【表39】

表 30

ミドリムシΔ8 デサチュラーゼを過剰発現する形質転換 S.セレビシエの

脂質分析:ETrA 基質供給

クローン	16:0	16:1	18:0	18:1	20:3 (11,14,17)	20:4 (8,11,14,17)	%20:3 転換
75-1(対照)	12	25	5	33	24	0	0
75-2(対照)	12	24	5	36	22	1	5
5-6-1(Eg5)	13	25	6	34	15	7	32
5-6-2(Eg5)	13	24	6	34	17	6	27
12-8-1(Eg12)	12	24	5	34	22	2	8
12-8-2(Eg12)	12	25	5	35	20	2	9
12-9-1(Eg12)	12	24	5	34	22	2	9
12-9-2(Eg12)	12	25	6	35	20	2	9

30

40

【0576】

表29および30中のデータは、クローンされたミドリムシ (*Euglena*) Δ8 デサチュラーゼがEDAおよびEtrAを不飽和化できたことを示した。配列番号60で記載される配列は、配列番号58で記載される配列と比べて1個のアミノ酸変化を有し、低下したΔ8 デサチュラーゼ活性を有する。

50

【0577】

表30中のクローン75-2によって発生した少量の20:4(8, 11, 14, 17)は、20:4(8, 11, 14, 17)の標準とは、わずかに異なる滞留時間を有した。このピークは、この実験中の野生型酵母によって発生した少量の異なる脂肪酸である可能性が高い。

【0578】

ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) のために最適化されたΔ8デサチュラーゼ遺伝子コドンのさらなる修正

pDMW261中の合成D8S-3遺伝子のアミノ酸配列は、機能性ミドリムシΔ8デサチュラーゼ(配列番号57および58)のアミノ酸配列に従って補正した。pDMW261をテンプレートとして、およびオリゴヌクレオチドODMW404(配列番号274)およびD8-13R(配列番号257)を使用して、合成D8S-3デサチュラーゼ遺伝子をコードするDNA断片を増幅した。得られたPCR断片をバイオ101(Bio101)のジーンクリーンキット(GeneClean kit)で精製し、引き続いてKpnIおよびNotIで消化した(プライマーODMW404がKpnI部位を導入したのに対し、プライマーD8-13RはNotI部位を導入した)。KpnI/NotI断片(配列番号275)をKpnI/NotI消化pKUNFmKF2(図14D、配列番号146)中にクローンして、pDMW277を生成した(図15A)。

【0579】

pDMW277がテンプレートとして使用される別のPCR反応において、D8S-3遺伝子の5'末端を増幅し補正するようにデザインされたオリゴヌクレオチドYL521およびYL522(配列番号276および277)をプライマーとして使用した。プライマーはそれぞれ5'および3'末端で、PCR断片中のNcoI部位およびBglII部位に導入された。318bp PCR生成物をバイオ101(Bio101)のジーンクリーンキットで精製し、引き続いてNcoIおよびBglIIで消化した。消化断片をpDMW277からの954bp BglII/NotI断片と共に使用して、pZF5T-PPCのNcoI/NotI断片と交換し(図15B、配列番号147)、pDMW287を形成した。合成D8S-3遺伝子の5'末端を補正するのに加えて、このクローニング反応はまた、合成Δ8デサチュラーゼ遺伝子をヤロウィア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*) FBAINプロモーター(配列番号177)の調節下に置いた。

【0580】

次に部位特異的変異誘発反応の最終シリーズの第1の反応をpDMW287で行った。第1の一揃いのプライマーであるYL525およびYL526(配列番号278および279)は、pDMW287中の合成D8S-3遺伝子アミノ酸をFからS(50位)に補正するようにデザインされた。次にこの変異誘発反応から得られたプラスミドが、プライマーYL527およびYL528(配列番号280および281)による次の部位特異的変異誘発反応のためのテンプレートになった。これらのプライマーは、D8S-3遺伝子のアミノ酸をFからS(67位)に補正するようにデザインされ、プラスミドpDMW287/YL527の創生をもたらした。

【0581】

遺伝子の第2の四半分内の配列補正を完了するために、遺伝子の第1の四半分に対する突然変異と同時に、以下の反応を実施した。pDMW287をテンプレートとして、オリゴヌクレオチドYL529およびYL530(配列番号282および283)をプライマーとして使用して、生体外(in vitro)変異誘発反応を実施して、合成D8S-3遺伝子のアミノ酸をCからW(177位)に補正した。プライマーYL531およびYL532(配列番号284および285)を使用する以下の反応において、この変異誘発反応の生成物(すなわちpDMW287/Y529)をテンプレートとして使用して、アミノ酸をPからL(213位)に補正した。この反応生成物をpDMW287/YL529-31と称した。

【0582】

遺伝子の第1および第2の四半分に対する突然変異と同時に、遺伝子の3'末端上で反応を同様に実施した。引き続き各変異誘発反応では、先行する反応からのプラスミド生成物を使用した。プライマーYL533およびYL534（配列番号286および287）をpDMW287上で使用して、アミノ酸をCからS（244位）に補正し、pDMW287/YL533を作り出した。プライマーYL535およびYL536（配列番号288および289）を使用して、pDMW287/YL533の合成D8S-3遺伝子中のアミノ酸をAからT（280位）に補正して、pDMW287/YL533-5を形成した。最後にpDMW287/YL533-5をテンプレートとして、YL537およびYL538（配列番号290および291）をプライマーとして使用して、合成D8S-3 10 遺伝子中で333位のアミノ酸PをSに補正した。得られたプラスミドをpDMW287/YL533-5-7と命名した。

【0583】

pDMW287/YL529-31のBglII/XhoI断片およびpDMW287/YL533-5-7のXhoI/NotI断片を使用して、pDMW287/YL257のBglII/NotI断片を変化させて、完全に補正された合成Δ8デサチュラーゼ遺伝子を含有するpDMW287Fを生成し（図15C）、D8SFと命名して配列番号61で記載した。配列番号62は、配列番号61のヌクレオチド2～1270によってコードされるアミノ酸配列を記載し、開始メチオニンに続いて追加的バリンがあること以外 20 は、これは配列番号58で記載される配列と本質的に同一である。

【0584】

実施例16

ヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）におけるコドン最適化Δ9エロンガーゼ遺伝子およびコドン最適化Δ8デサチュラーゼの機能性の発現

本実施例は、形質転換されて、実施例14および15からのコドン最適化Δ9エロンガーゼおよびコドン最適化Δ8デサチュラーゼを同時発現するヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）における、DGLA生合成および蓄積について述べる。これによってこの実験は、Δ9エロンガーゼ/Δ8デサチュラーゼ経路を発現する遺伝子の活性およびY. リポリティカ（*lipolytica*）の能力の双方を立証 30 した。

【0585】

具体的にはコンストラクトpDMW287FのキメラFBAIN::D8SF::Pex16遺伝子を含んでなるClaI/PacI断片（実施例15）をpDMW237のClaI/PacI部位に挿入し（実施例14）、コンストラクトpDMW297（図15D、配列番号148）を発生させた。

【0586】

プラスミドpDMW297は、以下の構成要素を含有した。

【0587】

【表 4 0】

表 31
プラスミド pDMW297(配列番号 148)の説明

配列番号 148 内の 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/ClaI (9053~10448)	ARS18 配列(ジェンバンク登録番号 A17608)
ClaI/PacI (1~2590)	以下を含んでなる FBAIN::D8SF::Pex16 ● FBAIN:FBAIN プロモーター(配列番号 177) ● D8SF: ミドリムシ由来コドン最適化 $\Delta 8$ デサチュラーゼ遺伝子(配列番号 61)(ジェンバンク登録番号 AF139720) ● Pex16:of ヤロウィア Pex16 遺伝子の Pex16 ターミネーター配列(ジェンバンク登録番号 U75433)
PacI/SalI (2590~4082)	ヤロウィア Ura3 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AJ306421)
SalI/BsiWI (4082~6257)	以下を含んでなる FBAIN::lgD9e::Pex20 ● FBAIN:FBAIN プロモーター(配列番号 177) ● lgD9e: イソクリシス・ガルバナ由来コドン最適化 $\Delta 9$ エロンガーゼ遺伝子(配列番号 51)(ジェンバンク登録番号 390174) ● Pex20: ヤロウィア Pex20 遺伝子の Pex20 ターミネーター配列(ジェンバンク登録番号 AF054613)

10

20

【0 5 8 8】

次に一般方法に従って、コンストラクト pDMW297 を Y2031 株(実施例 13)の形質転換のために使用した。形質転換細胞を MM 選択培地プレート上に播種し、2~3 日間 30℃ に保った。MM プレート上に生育した全部で 8 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。生育したらこれらの株を 30℃ の液体 MM 中に個別に接種して、250 rpm/分で 2 日間振盪した。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換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。

30

【0 5 8 9】

GC 分析は、DGLA が分析した全ての形質転換体中で生成されたことを示した。1 株は約 3.2% を生成し、4 株は 4.3~4.5% を生成し、2 株は 5.5~5.8% を生成し、1 株は 6.4% の DGLA を生成した(ここで「Y0489」株と命名した)。コドン最適化 Y0489 株中の D8SF 遺伝子の「パーセント(%) 基質変換」は 75% と判定された。

【0 5 9 0】

実施例 17

ω -6 $\Delta 9$ エロンガーゼ/ $\Delta 8$ デサチュラーゼ経路: 全脂質の約 9% の EPA を生成する Y2201 および Y2203 株の創出

40

本実施例は、ヤロウィア・リポリティカ(Yarrowia lipolytica) ATCC # 20362 に由来して、総脂質に対して約 9% の EPA を生成できる Y2201 および Y2203 株の構築について述べる(図 5)。この株は遺伝子操作されて、 ω -6 $\Delta 9$ エロンガーゼ/ $\Delta 8$ デサチュラーゼ経路を発現する。したがって最終 EPA 含有油中で GLA の同時合成を示さない Y2201 および Y2203 株の完全な脂質プロファイルの分析が期待される。

【0 5 9 1】

ここでの Y2201 および Y2203 株の開発は、Y2152 および Y2153 株(約

50

3. 5%のDGLAを生成する)、Y2173株(14%のDGLAを生成する)、およびY2189株(5%のEPAを生成する)の構築を要した。

【0592】

全脂質の約3.5%のDGLAを生成するY2152およびY2153株の創出

コンストラクトpZP2C16M899(図16A、配列番号149)を使用して、4個のキメラ遺伝子クラスター(2つの $\Delta 9$ エロンガーゼ、合成 $C_{16/18}$ 脂肪酸エロンガーゼ、および $\Delta 8$ デサチュラーゼを含んでなる)、ならびに単一アミノ酸突然変異を含有するヤロウィア(*Yarrowia*) AHAS遺伝子(アセトヒドロキシ酸シンターゼ)を組み込んだ。ヤロウィア(*Yarrowia*)中の突然変異AHAS酵素は、スルホニル尿素抵抗性を与え、それを陽性スクリーニングマーカーとして使用した。プラスミドpZP2C16M899は、ヤロウィア(*Yarrowia*) ATCC#20362株のPox2遺伝子部位に組み込まれるようにデザインされたので、以下の構成要素を含有した。

【0593】

【表 4 1】

表 32
プラスミド pZP2C16M899(配列番号 149)の説明

配列番号 149 内の 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
BsiWI/AscI (6152～6962)	ヤロウィア Aco2 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AJ001300)の 810bp の 5' 部分
SphI/EcoRI (9670～10325)	ヤロウィア Aco2 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AJ001300)の 655bp の 3' 部分
EcoRV がある BsiWI/PmeI (929～3195)	以下を含んでなる GPM/FBA イントロン::rELO2S::Oct ● GPM/FBAIN:GPM::FBAIN キメラプロモーター(配列番号 182) ● rELO2S:ラット由来コドン最適化 rELO2 エロンガーゼ遺伝子 (配列番号 65)(ジェンバンク登録番号 AB071986) ● OCT:ヤロウィア OCT 遺伝子の OCT ターミネーター配列 (ジェンバンク登録番号 X69988)
BsiWI/EcoRI (929～14447、 逆転)	以下を含んでなる GPAT::lgD9e::Pex20 ● GPAT:GPAT プロモーター(配列番号 179) ● lgD9e:l.ガルバナ(galbana)由来コドン最適化 Δ9 エロンガーゼ 遺伝子(配列番号 51) ● Pex20:ヤロウィア Pex20 遺伝子の Pex20 ターミネーター配列 (ジェンバンク登録番号 AF054613)
EcoRI/SwaI (14447～12912)	以下を含んでなる TEF::lgD9e::Lip1 ● TEF:TEF プロモーター(ジェンバンク登録番号 AF054508) ● lgD9e:配列番号 51(前出) ● Lip1:ヤロウィア Lip1 遺伝子の Lip1 ターミネーター配列(ジェ ンバンク登録番号 Z50020)
SwaI/PacI (12912～10325)	以下を含んでなる FBAIN::D8SF::Pex16 ● FBAIN:FBAIN プロモーター(配列番号 177) ● D8SF:ミドリムシ由来コドン最適化 Δ8 デサチュラーゼ遺伝子 (配列番号 61)(ジェンバンク登録番号 AF139720) ● Pex16:ヤロウィア Pex16 遺伝子の Pex16 ターミネーター配列 (ジェンバンク登録番号 U75433)遺伝子
EcoRV/BsiWI が ある PmeI (3195～6152)	W497L 突然変異を含んでなるヤロウィア・リポリテカ AHAS 遺伝子 (配列番号 292)

10

20

30

【0594】

40

プラスミド pZP2C16M899 を SphI / AscI で消化し、次に一般方法に従って使用して ATCC # 20362 を形質転換した。形質転換に続いて細胞を 150 mg のスルホニル尿素を含有する MM プレート上に播種し、30℃に2～3日間保った。スルホニル尿素抵抗性コロニーを拾って、スルホニル尿素添加 MM 選択プレート上に画線培養した。次に全部で96個の形質転換体をスルホニル尿素添加液体 MM 中に接種し、30℃および250 rpm/分で2日間振盪した。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換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。

【0595】

GC 分析は、pZP2C16M899 の4個のキメラ遺伝子を含有する形質転換体中に

50

D G L A の存在を示したが、野性型ヤロウィア (Y a r r o w i a) 対照株中には示さなかった。選択された 96 株のほとんどは、全脂質の 2%未満の D G L A を生成した。全脂質の 2 ~ 2.9% の D G L A を生成した 28 株があった。全脂質の約 3.5% の D G L A を生成した 2 株があった。株 # 65 および # 73 をここで「Y 2 1 5 2」および「Y 2 1 5 3」株とそれぞれ命名した。

【0596】

全脂質の約 14 ~ 16% の D G L A を生成する Y 2 1 7 3 および Y 2 1 7 5 株の創出

コンストラクト p D M W 3 1 4 (図 16 B、配列番号 150) を使用して、4 個のキメラ遺伝子のクラスター (2 つの Δ 9 エロンガーゼ、Δ 8 デサチュラーゼ、および Δ 12 デサチュラーゼを含んでなる) をヤロウィア (Y a r r o w i a) Y 2 1 5 2 および Y 2 1 5 3 株の U r a 3 遺伝子部位中に組み込み、それによって D G L A 生成を増強した。プラスミド p D M W 3 1 4 は、以下の構成要素を含有した。

【0597】

【表 42】

表 33

プラスミド pDMW314(配列番号 150)の説明

配列番号 150 内の 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
AscI/BsiWI (10066~9275)	ヤロウィア Ura3 遺伝子 (ジェンバンク登録番号 AJ306421) の 784bp の 5' 部分
SphI/PacI (12774~1)	ヤロウィア Ura3 遺伝子 (ジェンバンク登録番号 AJ306421) の 516bp の 3' 部分
Swal/BsiWI (6582~9275)	以下を含んでなる FBAIN::F.D12S::Pex20 ● FBAIN:FBAIN プロモーター (配列番号 177) ● F.Δ 12: フザリウム・モノリフォルメ Δ 12 デサチュラーゼ遺伝子 (配列番号 27) ● Pex20: ヤロウィア Pex20 遺伝子の Pex20 ターミネーター配列 (ジェンバンク登録番号 AF054613)
Clal/EcoRI (6199~4123)	pZP2C16M899(前出)について述べられるのと同様の GPAT::lgD9E::Pex20
EcoRI/Swal (4123~2588)	pZP2C16M899(前出)について述べられるのと同様の TEF::lgD9E::Lip1
Swal/PacI (2588~1)	pZP2C16M899(前出)について述べられるのと同様の FBAIN::D8SF::Pex16

【0598】

プラスミド p D M W 3 1 4 を A s c I / S p h I で消化し、次に一般方法に従って使用して Y. リポリティカ (l i p o l y t i c a) Y 2 1 5 2 および Y 2 1 5 3 株を形質転換した。形質転換細胞を F O A 選択培地プレート上に播種し、30℃に 2 ~ 3 日間保った。F O A 抵抗性コロニーを拾って、MM および MMU 選択プレート上に画線培養した。MMU プレート上で生育できるが MM プレート上では生育できないコロニーを U r a 株として選択した。次に U r a 株の単一コロニーを液体 MMU 中に接種し、30℃および 250 r p m / 分で 2 日間振盪した。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換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 (H e w l e t t - P a c k a r d) 6890 GC で分析した。

【0599】

G C 分析は、p D M W 3 1 4 の 4 つのキメラ遺伝子を含有するほとんど全ての形質転換体において、D G L A の生成増大を示した。48 個の選択された p D M W 3 1 4 による Y

10

20

30

40

50

2152のUra⁻株のほとんどは、全脂質の約6～8%のDGLAを生成した。全脂質の約13.9%のDGLAを生成した1株（すなわち#47、ここで「Y2173」と命名される）があった。

【0600】

同様に、24個の選択されたpDMW314によるY2153のUra⁻株のほとんどは、全脂質の約6～8%のDGLAを生成した。全脂質の約16.3%および17.2%のDGLAをそれぞれ生成した2株があった（すなわち#6および#11、ここで「Y2175」および「Y2176」株と命名される）。

【0601】

全脂質の約4.8%のEPAを生成するY2189株の創出

10

コンストラクトpDMW325（図16C、配列番号151）を使用して、4個のキメラ遺伝子（2つのΔ5デサチュラーゼおよび2つのΔ17デサチュラーゼを含んでなる）のクラスターをヤロウィア（Yarrowia）Y2173株のLeu2遺伝子部位中に組み込み、それによってEPAの生成を可能にした。プラスミドpDMW325は、以下の構成要素を含有した。

【0602】

【表 4 3】

表 34
プラスミド pDMW325(配列番号 151)の説明

配列番号 151 内の 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
AscI/BsiWI (4837～5632)	ヤロウィアLeu2 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AF260230)の 788bp の 5' 部分
SphI/PacI (2137～1426)	ヤロウィアLeu2 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AF260230)の 703bp の 3' 部分
Pme/BsiWI がある Swal (8277～5632)	以下を含んでなる FBAIN::MAΔ5::Pex20 ● FBAIN:FBAIN プロモーター(配列番号 177) ● MAΔ5: モルティエラ・アルピナΔ5 デサチュラーゼ遺伝子 (配列番号 6)(ジェンバンク登録番号 AF067654) ● 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
PmeI がある EcoRI/Swal (10876～8278)	以下を含んでなる GPM/FBAIN::I.Δ5S::Oct ● GPM/FBAIN:GPM::FBAIN キメラプロモーター(配列番号 182) ● I.Δ5S: イソクリシス・ガルバナ由来コドン最適化Δ5 デサチュラーゼ 遺伝子(配列番号 10)(国際公開第 2002/081668 号パンフレット) ● OCT: ヤロウィアOCT 遺伝子の OCT ターミネーター配列 (ジェンバンク登録番号 X69988)
EcoRI/PmeI (10876～12497)	ヤロウィアUra3 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AJ306421)
PmeI/Clal (12497～14651)	以下を含んでなる YAT::D17S::Lip2 ● YAT:YAT1 プロモーター(配列番号 180) ● Δ17S:S.ディクリナ(diclina)由来コドン最適化Δ17 デサチュラーゼ 遺伝子(配列番号 16) ● Lip2: ヤロウィアリパーゼ 2 遺伝子の Lip2 ターミネーター (ジェンバンク登録番号 AJ012632)
Clal/PacI (14651～1426)	以下を含んでなる GPD::D17S::Pex16 ● GPD:GPD プロモーター(配列番号 173) ● Δ17S:配列番号 16(前出) ● Pex16: ヤロウィアPex16 遺伝子の Pex16 ターミネーター配列 (ジェンバンク登録番号 U75433)

10

20

30

【0603】

プラスミド pDMW325 を AscI / SphI で消化し、次に一般方法に従って使用
して Y2173 株を形質転換した。形質転換に続いて細胞を MML e プレート上に播種し
て、30℃ に 2～3 日間保った。各形質転換から MML e プレート上に生育した個々のコ
ロニーを拾って、MM および MML e プレート上に画線培養した。MML e プレート上に
生育できるが、MM プレート上に生育できないコロニーを Leu2⁻ 株として選択した。
次に Leu2⁻ 株の単一コロニーを液体 MML e 培地中に接種して、30℃ および 250
rpm / 分で 2 日間振盪した。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル
交換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 (He
wlett-Packard) 6890 GC で分析した。

40

【0604】

GC 分析は、pDMW325 形質転換体中に EPA の存在を示したが、親 Y2173 株

50

中には示さなかった。具体的には48個の選択されたpDMW325によるY2173のLeu2⁻形質転換体の内、ほとんどの株が全脂質の3%未満のEPAを生成した。それぞれ全脂質の約4.8%および3.4%のEPAを生成した2つの株（すなわち#21および#46、ここで「Y2189」および「Y2190」と命名される）があった。

【0605】

約9%のEPA全脂質を生成するY2201およびY2203株の創出

コンストラクトpZKSL5598（図16D、配列番号152）を使用して、4個のキメラ遺伝子のクラスター（ $\Delta 9$ エロンガーゼ、 $\Delta 8$ デサチュラーゼ、および2つの $\Delta 5$ デサチュラーゼを含んでなる）をヤロウィア（*Yarrowia*）Y2189株のLys5遺伝子（ジェンバンク登録番号M34929）部位に組み込み、それによってEPA生

10

【0606】

【表 4 4】

表 35
プラスミド pZKSL5598(配列番号 152)の説明

配列番号 152 内の 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
AscI/BsiWI (10409~9573)	ヤロウィア Lys5 遺伝子(ジェンバンク登録番号 M34929)の 794bp の 5' 部分
SphI/PacI (13804~13117)	ヤロウィア Lys5 遺伝子(ジェンバンク登録番号 M34929)の 687bp の 3' 部分
BsiWI/SwaI (7150~9573)	以下を含んでなる NT::I.D5S::Lip1 ● NT: YAT1 プロモーター(配列番号 180) ● I.Δ5S: イソクリシス・ガルバナ由来コドン最適化 Δ5 デサチュラーゼ 遺伝子(配列番号 10)(国際公開第 2002/081668 号パンフレット) ● Lip1: ヤロウィア Lip1 遺伝子の Lip1 ターミネーター配列 (ジェンバンク登録番号 Z50020)
Sall/BsiWI (4537~7150)	以下を含んでなる GPAT::MAΔ5::Pex20 ● GPAT: GPAT プロモーター(配列番号 179) ● MAΔ5: モルティエラ・アルピナ Δ5 デサチュラーゼ遺伝子 (配列番号 6)(ジェンバンク登録番号 AF067654) ● Pex20: ヤロウィア Pex20 遺伝子からの Pex20 ターミネーター配列 (ジェンバンク登録番号 AF054613)
SwaI/PmeI (2381~348)	以下を含んでなる FBAINm::Igd9e::OCT ● FBAINm: FBAINm プロモーター(配列番号 178) ● Igd9e: I.ガルバナ(galbana)由来コドン最適化 Δ9 エロンガーゼ 遺伝子(配列番号 51) ● OCT: ヤロウィア OCT 遺伝子の OCT ターミネーター配列 (ジェンバンク登録番号 X69988)
Clal/PacI (1~13804)	以下を含んでなる GPD::D8SF::Pex16 ● GPD: GPD プロモーター(配列番号 173) ● D8SF: ミドリムシ由来コドン最適化 Δ8 デサチュラーゼ遺伝子 (配列番号 61)(ジェンバンク登録番号 AF139720) ● Pex16: ヤロウィア Pex16 遺伝子の Pex16 ターミネーター配列 (ジェンバンク登録番号 U75433)
Sall/PmeI (4537~2417)	ヤロウィア Leu2 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AF260230)

【0607】

プラスミド pZKSL5598 を AscI / SphI で消化し、次に一般方法に従って
使用して Y2189 株を形質転換した。形質転換に続いて細胞を MMLys プレート上に
播種して、30℃に2~3日間保った。各形質転換から MMLys プレート上に生育した
個々のコロニーを拾って、MM および MMLys プレート上に画線培養した。MMLys
プレート上で生育できたが、MM プレート上では生育できないコロニーを Lys⁻ 株とし
て選択した。次に Lys⁻ 株の単一コロニーを液体 MMLys 培地中に接種して、30℃
および 250 rpm/分 で 2 日間振盪した。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出
してエステル交換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。

【0608】

10

20

30

40

50

GC分析は、pZKSL5598形質転換体におけるEPAの生成増大を示した。96個の選択されたpZKSL5598によるY2189のLys-形質転換体の内、ほとんどの株は全脂質の4~8%のEPAを生成した。全脂質の約9%および8.7%のEPAをそれぞれ生成した2つの株（すなわち#34および#77、ここで「Y2201」および「Y2203と命名される」）があった。

【0609】

実施例18

ω -3 Δ 9エロンガーゼ/ Δ 8デサチュラーゼ経路：ヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）中に約1.3%のEPAを生成するL116株の創出

本実施例は、総脂質に対して約1.3%のEPAを生成できる、ヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）ATCC#20362由来のL116株の構築について述べる（図5）。この株を遺伝子操作して ω -3 Δ 9エロンガーゼ/ Δ 8デサチュラーゼ経路を発現した。このようにして最終EPA含有油中にGLAの同時合成を示さない、L116株の完全な脂質プロファイルの分析が期待された。

【0610】

L116株の開発は、L98株（ALAを生成する）、L103株（増大したALAを生成する）、およびL115株（約4%のETAを生成する）の構築を要した。さらにL116株は、ここで ω -3特異性のみ（または強力な ω -3特異性）を有するとして特徴づけられる、ゼブラフィッシュ（*Danio rerio*）由来の新規二機能 Δ 5/ Δ 6デサチュラーゼ（ジェンバンク登録番号BC068224）の合成および発現を必要とした。本発明で教示されるような発現経路最適化に向けた追加的遺伝子操作努力によって、ここで実証される ω -3 Δ 9エロンガーゼ/ Δ 8デサチュラーゼ経路を通じて、高濃度のEPAを容易に生成できることが考察された。

【0611】

リサイクル可能な選択のためのLoxP::Ura3/HPT::LoxP組み込みコンストラクトおよびCre-SU複製プラスミドの創生

ヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）中に Δ 15デサチュラーゼの複数コピーを導入するために利用される戦略は、リサイクル可能な選択マーカーおよび部位特異的遺伝子組換えシステム（すなわちCre/Lox）に依存する。簡単に述べると、標的遺伝子（すなわちフザリウム・モニリフォルメ（*Fusarium moniliforme*） Δ 15デサチュラーゼ〔配列番号39〕）を選択マーカー（例えばUra3およびハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ〔HPT〕）に隣接させてクローンし、組み込みコンストラクト中ではLoxP部位は選択マーカーのみの側面に位置した。形質転換および形質転換体の選択に続いて、スルホニル尿素抵抗性（SU）遺伝子およびCreリコンビナーゼ遺伝子を保有する複製型プラスミドの導入によって、選択マーカー（すなわちUra3およびハイグロマイシン抵抗性）を染色体から切除した。Ura3およびハイグロマイシン選択マーカー損失後、Creプラスミドをキュアリングした。このようにして入手されたキュアリング株は、別の形質転換の一巡のために使用できる。

【0612】

より具体的にはプラスミドpY72（図17A、配列番号390）は、1コピーのフザリウム・モニリフォルメ（*Fusarium moniliforme*） Δ 15デサチュラーゼおよびLoxP部位が側面に位置するUra3/HPT選択マーカーを含んでなる、組み込みコンストラクトであった。コンストラクトpY72は以下の構成要素を含んだ。

【0613】

10

20

30

40

【表 4 5】

表 36
プラスミド pY72(配列番号 390)の説明

配列番号 390 内の 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
6763～7643	ヤロウシア Lip1 遺伝子(ジェンバンク登録番号 Z50020)の 881bp の 5' 部分
9422～10184	ヤロウシア Lip1 遺伝子(ジェンバンク登録番号 Z50020)の 763bp の 3' 部分
Swal/SbfI (16～2522)	以下を含んでなる FBAIN::FmD15:Lip2 ● FBAIN:FBAIN プロモーター(配列番号 177) ● FmD15: フザリウム・モニリフォルメ Δ15 デサチュラーゼ遺伝子 (配列番号 39) ● Lip2: ヤロウシア Lip2 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AJ012632) からの Lip2 ターミネーター配列
2531～2564	LoxP 配列(配列番号 407)
2566～4184	ヤロウシア Ura3 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AJ306421)
4198～5861	以下を含んでなる TEF::HPT::XPR ● TEF:TEF プロモーター(ジェンバンク登録番号 AF054508) ● HPT:ハイグロマイシン抵抗性を保有する大腸菌(Escherichia coli) ハイグロマイシンホストランスフェラーゼコード領域(カスター (Kaster),K.R.ら著, Nucleic Acids Res.11:6895～6911 頁(1983 年)) ● XPR: ヤロウシア Xpr 遺伝子(ジェンバンク登録番号 M17741)の 約 100bp の 3' 領域
5862～5895	LoxP 配列(配列番号 407)

【0 6 1 4】

同様に、プラスミド pY80 (図 17B、配列番号 391) を使用して、2 コピーのフザリウム・モニリフォルメ (*Fusarium moniliforme*) Δ15 デサチュラーゼおよび Lox P 部位が側面に位置する Ura3/HPT 選択マーカーを含んでなる、組み込みコンストラクトを作り出した。プライマー 436 および 437 (配列番号 408 および 409) を使用して、PCR を使用して、8878bp のプラスミド pY34 からの GPD::Fm1::XPR2 を含んでなる PacI/FseI 断片を増幅した(国際公開第 2005/047480 号パンフレット)。カリフォルニア州マウンテンビューのクローンテックラボラトリーズ (Clontech Laboratories, Inc. (Mountain View, CA)) からのインフュージョン (in-fusion) クローニングによって、PacI/FseI で消化したベクター pY72 中にこの PacI/FseI 断片をクローンし、メリーランド州ベセズダの BRL (BRL (Bethesda, MD)) からの XL-2 ウルトラコンピテント細胞に形質転換した。PacI/FseI 消化に続いて、ミニプレップ分析によって同定された 10 個の陽性形質転換体の内、クローン #3 および #4 のみが正確であった。正確なクローンの 1 つを「pY80」と命名した。したがってコンストラクト pY80 は以下の構成要素を含んだ。

【0 6 1 5】

【表 4 6】

表 37
プラスミド pY80(配列番号 391)の説明

配列番号 391 内の 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
PacI/FseI (4~2375)	以下を含んでなる GPD::FmD15:XPR ● GPD:GPD プロモーター(配列番号 173) ● FmD15:フザリウム・モノリフォルメΔ 15 デサチュラーゼ遺伝子(配列番号 39) ● XPR:ヤロウィアXpr 遺伝子(ジェンバンク登録番号 M17741)の約 100bp の 3' 領域
FseI/SbfI 2385~4891	pY72(前出)について述べられるのと同様の FBAIN::FmD15:Lip2
4900~4933	LoxP 配列(配列番号 407)
4935~6533	ヤロウィア Ura3 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AJ306421)
6567~8230	pY72(前出)について述べられるのと同様の TEF::HPT::XPR
8231~8264	LoxP 配列(配列番号 407)
8271~9079	ヤロウィア Lip1 遺伝子(ジェンバンク登録番号 Z50020)の 809bp の 5' 部分
11791~12553	ヤロウィア Lip1 遺伝子(ジェンバンク登録番号 Z50020)の 763bp の 3' 部分

10

20

【0 6 1 6】

コンストラクト p Y 7 9 (図 1 7 C、配列番号 3 9 2) は、スルホニル尿素抵抗性 (S U) 遺伝子 (すなわち A H A S) および T E F : : C r e リコンビナーゼ遺伝子を保有する複製型プラスミドであった。具体的には、コンストラクト p Y 7 9 は、以下の構成要素を含有した。

【0 6 1 7】

30

【表 4 7】

表 38
プラスミド pY79(配列番号 392)の説明

配列番号 392 内の 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
4329~7315	W497L 突然変異を含んでなるヤロウィア・リポリティカ AHAS 遺伝子(配列番号 292)
7362~1	以下を含んでなる TEF::Cre::XPR ● TEF:TEF プロモーター(ジェンバンク登録番号 AF054508) ● Cre:リコンビナーゼタンパク質の腸内細菌ファージ P1 Cre 遺伝子(ジェンバンク登録番号 X03453) ● XPR:ヤロウィアXpr 遺伝子(ジェンバンク登録番号 M17741)の約 100bp の 3' 領域

40

【0 6 1 8】

A L A を生成する L 9 8 株の創出

プラスミド p Y 7 2 (配列番号 3 9 0) を A s c I / S p h I で消化し、次に標準酢酸リチウム法を使用した野性型ヤロウィア・リポリティカ (Y a r r o w i a l i p o l

50

y t i c a) A T C C # 2 0 3 6 2 の形質転換のために使用した。形質転換に続いて細胞を Y P D + ハイグロマイシン (250 μ g/mL) プレート上に播種した。2 日後、20 個の形質転換体を拾って新鮮な Y P D + ハイグロマイシン (250 μ g/mL) プレート上に画線培養し、30 $^{\circ}$ C で一晚インキュベートした。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換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 (Hewlett-Packard) 6890 GC で分析した。

【0619】

GC 分析は p Y 7 2 形質転換体中に A L A の存在を示したが、野性型ヤロウィア (Yarrowia) 対照株中には示さなかった。最良クローンは全脂質の約 27% の A L A を生成し、80% の基質変換を示した。

10

【0620】

A T C C # 2 0 3 6 2 / p Y 7 2 形質転換体を p Y 7 9 (配列番号 392、スルホニル尿素 (S U) 抵抗性マーカーを保有する) で形質転換し、M M + S U (150 μ g/mL) プレート上で3日間にわたり形質転換体を選択して、p Y 7 2 中で L o x P 部位が側面に位置する U r a 3 / H P T マーカーをゲノムから切除した。S U 抵抗性 (S U^R) 形質転換体を新鮮な M M + S U (150 μ g/mL) プレート上で1日間、再度画線培養し、次に Y P D + ハイグロマイシン (250 μ g/mL) プレート上に複製播種した。(クローン # 1 を除く) 全てのクローンがハイグロマイシン感受性 (H y g^S) であり、H P T 抵抗性遺伝子が C r e リコンビナーゼによって成功裏に切除されたことが示唆された。

【0621】

20

細胞を Y P D 中で選択なしに 30 $^{\circ}$ C で一晚生育させて、H y g^S クローン # 6 および # 14 からプラスミド p Y 7 9 をキュアリングした。培養 (0.1 mL) を 1 mL の Y P D に希釈して使用し、最高希釈 20,000 倍で連続希釈を作製した。次に各希釈を新しい Y P D プレート上に播種し、30 $^{\circ}$ C で一晚インキュベートした。プレートを M M + S U (150 μ g/mL) プレート上に複製播種した。全てのクローンが S U 感受性 (S U^S) であり、したがってそれらが p Y 7 9 から成功裏にキュアリングされたことが示唆された。クローン # 6-1 を追加的な形質転換のために使用した。

【0622】

具体的には上述の方法を使用して、プラスミド p Y 8 0 (配列番号 391) を A s c I / S p h I で消化し、次にそれを使用して株 # 6-1 を形質転換した。Y P D + ハイグロマイシン (250 μ g/mL) プレート上での選択、全脂質の GC 分析、プラスミド p Y 7 9 (配列番号 392) での形質転換、S U^R および H y g^S クローンの同定、およびプラスミド p Y 7 9 のキュアリングに続いて、株 # 1 を同定した。したがってこの株は 3 コピーの F m Δ 15 を保有し、L A から A L A への基質変換は 96.1% であった。

30

【0623】

上述のようにして、株 # 1 を p Y 8 0 で、引き続いて p Y 7 9 で形質転換した。これは 5 コピーの F m Δ 15 を有する L 98 株の創生をもたらした。しかし不十分な基質 (すなわち L A) の結果として、この株における Δ 15 不飽和化は、株 # 1 (3 コピーの F m Δ 15 を有する) と比べて顕著に改善されなかった。

【0624】

40

増大した A L A を生成する L 103 株の創出

プラスミド p Y 86 (図 17D、配列番号 393) は、1 コピーのフザリウム・モニリフォルメ (*Fusarium moniliforme*) Δ 12 デサチュラーゼおよび L o x P 部位が側面に位置する U r a 3 / H P T 選択マーカーを含んでなる、組み込みコンストラクトであった。具体的には p Y 86 は、以下の構成要素を含有した。

【0625】

【表 4 8】

表 39
プラスミド pY86(配列番号 393)の説明

配列番号 393 内の 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
3399～4207	ヤロウィア Lip1 遺伝子(ジェンバンク登録番号 Z50020)の 809bp の 5' 部分
6919～7681	ヤロウィア Lip1 遺伝子(ジェンバンク登録番号 Z50020)の 763bp の 3' 部分
28～61	LoxP 配列(配列番号 407)
63～1681	ヤロウィア Ura3 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AJ306421)
1695～3358	以下を含んでなる TEF::HPT::XPR ● TEF:TEF プロモーター(ジェンバンク登録番号 AF054508) ● HPT:ハイグロマイシン抵抗性を保有する大腸菌(<i>Escherichia coli</i>) ハイグロマイシンホストランスフェラーゼコード領域(カスター (Kaster), K.R.ら著、Nucleic Acids Res.11:6895～6911 頁 (1983 年)) ● XPR: ヤロウィア Xpr 遺伝子(ジェンバンク登録番号 M17741)の 約 100bp の 3' 領域
3359～3392	LoxP 配列(配列番号 407)
PacI/FseI (7690～7)	以下を含んでなる FBAIN::FmD12::Lip2 ● FBAIN:FBAIN プロモーター(配列番号 177) ● FmD12: フザリウム・モニリフォルメΔ 12 デサチュラーゼ遺伝子 (配列番号 27) ● Lip2: ヤロウィア Lip2 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AJ012632) からの Lip2 ターミネーター配列

10

20

30

【0 6 2 6】

上述の方法を使用して、プラスミド pY86 を *AscI*/*SphI* で消化し、次にそれを使用して L98 株を形質転換した。YPD+ハイグロマイシン (250 μg/mL) プレート上での選択、全脂質の GC 分析、プラスミド pY79 (配列番号 392) での形質転換、および *SUR* および *Hyg^S* クローンの同定に続いて、L103 株を同定した。したがってこの株は 5 コピーの FmΔ15、1 コピーの FmΔ12 およびを保有し、Ura3-であった。L98 株と比べて、L103 株中の 18:1 の量 (全脂肪酸の百分率として) は 42% から約 10% に低下し、L103 株中の 18:2 の量 (全脂肪酸の百分率として) は 2% から約 10% に増大し、L103 株中の ALA の量 (全脂肪酸の百分率として) は 22% から約 47% に増大した。

40

【0 6 2 7】

全脂質の約 4% の ETA を生成する L115 株の創出

プラスミド pY94 (図 18A、配列番号 394) は、1 コピーの Δ8 デサチュラーゼ、1 コピーの Δ9 エロンガーゼ、および *LoxP* 部位が側面に位置する *Ura3* 選択マーカーを含んでなる組み込みコンストラクトであった。このプラスミドは以下の構成要素を含んだ。

【0 6 2 8】

【表 4 9】

表 40
プラスミド pY94 (配列番号 394) の説明

配列番号 394 内の 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
PacI/SwaI (1~2587)	以下を含んでなる FBAIN::D8:Pex16 ● FBAIN:FBAIN プロモーター (配列番号 177) ● D8: ミドリムシ由来コドン最適化 Δ8 デサチュラーゼ遺伝子 (配列番号 61) (ジェンバンク登録番号 AF139720) ● Pex16: ヤロウィア Pex16 遺伝子 (ジェンバンク登録番号 U75433) の Pex16 ターミネーター配列
2592~4684	以下を含んでなる GPAT::D9E::Lip1 ● GPAT:GPAT プロモーター (配列番号 179) ● D9E:I.ガルバナ (galbana) 由来コドン最適化 Δ9 エロンガーゼ遺伝子 (配列番号 51) ● Lip1: ヤロウィア Lip1 遺伝子 (ジェンバンク登録番号 Z50020) の Lip1 ターミネーター配列
4714~4747	LoxP 配列 (配列番号 407)
4761~6378	ヤロウィア Ura3 遺伝子 (ジェンバンク登録番号 AJ306421)
6380~6413	LoxP 配列 (配列番号 407)
6470~7253	ヤロウィア Ura3 遺伝子 (ジェンバンク登録番号 AJ306421) の 784bp の 5' 部分
9965~10480	ヤロウィア Ura3 遺伝子 (ジェンバンク登録番号 AJ306421) の 516bp の 3' 部分

【0 6 2 9】

標準酢酸リチウム法を使用してプラスミド pY94 を L103 株に形質転換した。形質転換に続いて細胞を MM プレート上に播種し、3 日間保った。次に 22 個のコロニーを拾って、新鮮な MM プレート上に画線培養し、30℃で一晩生育させた。細胞を遠心分離によって収集し、脂質を抽出してエステル交換によって脂肪酸メチルエステルを調製し、引き続きヒューレットパッカー (Hewlett-Packard) 6890 GC で分析した。クローン #8 (ここで L104 株と命名される) は、最も高い Δ9 エロンガーゼおよび Δ8 デサチュラーゼ % 基質変換を有した。

【0 6 3 0】

L104 株の対数期細胞を 1 μL (約 0.5 μg/μL) の pY79 (配列番号 392) で形質転換し、MMU+SU (100 μg/mL) プレート上で 4 日間にわたり形質転換体を選択して、pY94 中で LoxP 部位が側面に位置する Ura3 マーカーをゲノムから切除した。12 個の SU^R 形質転換体を 2 日間にわたり新鮮な MM および MMU プレート上に再度画線培養した。(1 個を除く) 全てのクローンは URA 栄養要求性 (すなわち Ura^s) であり、したがって Cre リコンビナーゼによって Ura3 抵抗性遺伝子が成功裏に切除されたことが示唆された。

【0 6 3 1】

白金耳 3 分の 1 の細胞から、MMU 中で 1:10, 000 ~ 1:50, 000 倍の希釈を作製して、1 個の URA 栄養要求株からプラスミド pY79 をキュアリングした。希釈物 (100 μL/プレート) を YPD プレート上に播種し、30℃で 2 日間インキュベートした。8 個のコロニーを YPD プレートから拾って、MMU プレートおよび MMU+SU プレート上に画線培養し、30℃で 24 時間インキュベートした。全てのクローンは SU 感受性 (SU^s) であり、したがってそれらが pY79 から成功裏にキュアリングされ

たことが示唆された。これらの1つをL111と命名し、したがってそれは5コピーのFmΔ15、1コピーのFmΔ12、1コピーのΔ8デサチュラーゼ、1コピーのΔ9エロンガーゼを保有するUra3-であった。

【0632】

上述の方法を使用して、L111株をpY94（配列番号394）で形質転換し、L115株（5コピーのFmΔ15、1コピーのFmΔ12、2コピーのΔ8デサチュラーゼ、2コピーのΔ9エロンガーゼを有し、Ura3-として特徴づけられる）を作り出した。GC分析はL115株が全脂質の約4%EPAを生成したことを示した（完全な脂質プロフィール、下記）。

【0633】

10

全脂質の約1.3%のEPAを生成するL116株の創出

ジェンバンク登録番号AF309556として同定されたゼブラフィッシュ（*Danio rerio*）デサチュラーゼ（ヘースティングス（Hastings）ら著、PNAS 98（25）：14304～14309（2001年））は、サッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）中で、（1）ω-6基質と比べて明確なω-3基質に対する好み、および（2）Δ5デサチュラーゼ活性と比べてわずかにより高いΔ6デサチュラーゼ活性がある、Δ6およびΔ5デサチュラーゼ活性の二機能を示すことが報告された。

【0634】

本出願人らは、ジェンバンク登録番号BC068224をORFの984位における1bp（T）欠失（ヌル突然変異をもたらす）および1171位における1bpの変化（「G」から「A」、「V」から「M」へのアミノ酸変化をもたらす）が異なるジェンバンク登録番号AF309556の相同体として同定した。

20

【0635】

次にV1171M突然変異以外は、ジェンバンク登録番号AF309556（ここで「Drd6/d5（V）」として同定される、配列番号370）と同一の突然変異タンパク質（ここで「Drd6/d5（M）」として同定される、配列番号373）を作り出した。具体的にはプライマー対475および477（配列番号410および411）および478および476（配列番号412および413）〔ここでプライマー477および478は、「欠損したT」を有する〕を使用して、ジェンバンク登録番号BC068224 cDNAファージミドから2つの重複断片を最初に増幅した。次にプライマー475および476、およびテンプレートとして2つの重複断片を使用して、Drd6/d5（M）ORF全体を増幅した。以下の構成要素を含有し、ここでプラスミド「pY91M」として同定される複製型プラスミドにORFを入れた（図18B）。

30

【0636】

【表 50】

表 41
プラスミド pY91M(配列番号 395)の説明

配列番号 395 内の 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
2866~4170	ARS18 配列(ジェンバンク登録番号 A17608)
4216~5703	ヤロウィア Ura3 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AJ306421)
<i>Sall</i> // <i>Bsi</i> Wl (5705~8423)	以下を含んでなる FBAIN::DrD6:Pex20 ● FBAIN:FBAIN プロモーター(配列番号 177) ● DrD6:ゼブラフィッシュ $\Delta 5/\Delta 6$ デサチュラーゼ由来 Drd6/d5(M) 遺伝子(配列番号 372)(ジェンバンク登録番号 BC068224) ● 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

10

【0637】

ストラタジーン (Stratagene) からのクイックチェンジ (QuickChange) (登録商標) II 部位特異的変異誘発キット (カタログ番号 200523) およびプライマー 505 および 506 (配列番号 414 および 127) を使用して、部位特異的

20

【0638】

標準酢酸リチウム法を使用して、プラスミド pY91M および pY91V、ならびに対照の役割をする空ベクターをそれぞれ L115 株の対数期細胞に形質転換した。形質転換に続いて細胞を MM プレート上に播種し、3日間保った。次にコロニーを拾って新鮮な MM プレート上に画線培養し、30℃で一晩生育させた。各クローンから白金耳 3 分の 1 の細胞を 3 mL の MM 中に接種して、振盪機内で 30℃で 24 時間生育させた。代案としては細胞を MM 中で 24 時間生育させ、次に HGM 中で 3 日間培養した。全細胞を採取して

30

【0639】

空ベクター (対照)、pY91M、および pY91V で形質転換された L115 株 (ω -3 $\Delta 9$ エロンガーゼ/ $\Delta 8$ デサチュラーゼ経路の結果として Fm $\Delta 15$ 、Fm $\Delta 12$ 、 $\Delta 8$ デサチュラーゼ、および $\Delta 9$ エロンガーゼキメラ遺伝子を発現する) の完全な脂質プロファイルを下の表 42 に示す。脂肪酸は 16:0、16:1、17:1、18:0、18:1 (オレイン酸)、18:2 (LA)、GLA、20:2 (EDA)、DGLA、ARA、ALA、STA、20:3 (ETRA)、ETA、および EPA として同定され、それぞれの組成は全脂肪酸の % として表される。「実験番号」と題された欄で実験番号 1、2、および 3 として同定される、3 つの別個の実験を実施した。さらに ω -6 および ω -3 基質の双方を使用した活性に関する、各株の $\Delta 6$ および $\Delta 5$ の % 基質変換を報告する (表 43)。

40

【0640】

【表 5 1】

表 42
pY91M および pY91V で形質転換したヤロウニア・リボリディカ L115 株の脂質プロフィール

実験 番号	株	時間/培地	16:0%	16:1%	18:0%	18:1%	18:2%	GLA%	20:2%	DGLA %	ARA%	ALA%	STA%	20:3%	ETA%	EPA%
1	L115+pY91M(クローン 11)	1D MM	16	10	2	8	11	0.0	0	1	0.0	40	3.2	1.1	4.2	1.3
1	L115+対照	1D MM	18	9	5	18	12	0.0	0	1	0.0	31	0.0	0.9	3.9	0.0
2	L115+pY91M(クローン 11)	1D MM/ 3D HGM	14	11	6	26	15	0.5	1	2	0.0	18	2.4	1.0	2.9	0.6
2	L115+対照	1D MM/ 3D HGM	13	11	6	26	15	0.2	1	2	0.0	20	0.0	1.5	4.1	0.2
3	L115+pY91V(クローン 10)	1D MM	17	8	6	20	15	0.0	0	1	0.0	27	0.0	0.9	3.9	0.0
3	L115+pY91M(クローン 11)	1D MM	17	9	3	11	11	0.0	0	0	0.0	38	2.6	1.1	4.4	1.2
3	L115+対照	1D MM	17	8	6	21	13	0.0	0	1	0.0	28	0.0	1.1	4.0	0.0

* クローン#11 として同定される L115/pY91M 形質転換体を ヤロウニア・リボリディカ「L116」株と命名した

【表 5 2】

表 43
Drd6/d5M および Drd6/d5V による基質転換百分率

実験番号	株	ω -3/ ω -6	$\Delta 6(\omega$ -6)	$\Delta 6(\omega$ -3)	$\Delta 5(\omega$ -6)	$\Delta 5(\omega$ -3)
1	L115+pY91M(クローン 11)	4.2	0	7	0	23
1	L115+対照	2.8	0	0	0	0
2	L115+pY91M(クローン 11)	1.3	3	12	0	16
2	L115+対照	1.5	1	0	0	5
3	L115+pY91V(クローン 10)	2.0	0	0	0	0
3	L115+pY91M(クローン 11)	4.4	0	7		21
3	L115+対照	2.5	0	0	0	0

【0 6 4 2】

上の結果で実証されるように、ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) における Drd6/d5 (M) の発現 (すなわち L115 株 + pY91M) からは、 $\Delta 6$ デサチュラーゼ活性 (すなわち ALA から STA) よりも $\Delta 5$ デサチュラーゼ活性 (すなわち ETA から EPA) の方が % 基質変換が高く、 $\Delta 6$ および $\Delta 5$ デサチュラーゼ活性のどちらも ω -3 基質に対する好みはるかにより高い、 $\Delta 6$ および $\Delta 5$ デサチュラーゼ活性の双方を有する二機能酵素が確かに生じた。意外にも Drd6/d5 (V) (すなわち L115 株 + pY91V) の予試験結果は、 $\Delta 6$ または $\Delta 5$ 活性を示さなかったのに対し、Drd6/d5 (M) は ω -6 基質に対する $\Delta 5$ 活性を欠いてきた。したがって Drd6/d5 (M) は、Drd6/d5 (V) とは異なる特性を有した。公開された研究との Drd6/d5 (V) 活性の違いは、おそらくその中でタンパク質が発現した異なる宿主生物および/または基質の起源 (すなわち基質供給 [ヘースティングス (Hastings) ら、前出] または基質生合成 [ここで実証される]) に関係がある

10

20

30

40

50

と思われる。

【0643】

Drd6/d5 (M) および Drd6/d5 (V) の基質特異性をより良く理解するために、FBAIN::Drd6/d5 (M) : : Pex20 および FBAIN::Drd6/d5 (V) : : Pex20 キメラ遺伝子を LEU 選択があるヤロウィア (Yarrowia) 複製型プラスミド中に転移し、それによってプラスミド pY102 (M) および pY102 (V) の創生をそれぞれもたらした。次にこれらのプラスミドを $\Delta 12$ デサチュラーゼノックアウトを含んでなる Y. リポリティカ (lipolytica) 株である Q-d12D 株に形質転換した (国際公開第 2004/104167 号パンフレット)。形質転換体を 0.5 mM の LA、ALA、ETrA [20:3 (11, 14, 17)]、EDA、DGLA または ETA のいずれかの存在下で、MM 中で 1 日間生育させて % 基質転換を試験した。結果を下の表 44 に示す。

【0644】

【表 53】

表 44

形質転換体 ヤロウィア Q-d12D 株における Drd6/d5(M) および Drd6/d5(V) による基質転換百分率

プラスミド	脂肪酸	基質転換 (%)					
		$\Delta 6$ (ω -6)	$\Delta 6$ (ω -3)	$\Delta 8$ (ω -6)	$\Delta 8$ (ω -3)	$\Delta 5$ (ω -6)	$\Delta 5$ (ω -3)
pY102(M)	LA	17	-	-	-	-	-
pY102(V)	LA	4	-	-	-	-	-
pY102(M)	ALA	-	24	-	-	-	-
pY102(V)	ALA	-	6	-	-	-	-
pY102(M)	EDA	17	-	0	-	-	-
pY102(V)	EDA	0	-	0	-	-	-
pY102(M)	ETrA	-	30	-	13	-	-
pY102(V)	ETrA	-	9	-	0	-	-
pY102(M)	DGLA	-	-	-	-	12	-
pY102(V)	DGLA	-	-	-	-	0	-
pY102(M)	ETA	-	-	-	-	-	34
pY102(V)	ETA	-	-	-	-	-	0

【0645】

結果は、新規 Drd6/d5 (M) デサチュラーゼが、(公開された Drd6/d5 (V) デサチュラーゼと比べて) 以下を有することを示した。(1) 試験された全基質に対するより高い % 基質変換、(2) ω -6 脂肪酸と比べて ω -3 脂肪酸に対するより高い選択性 [しかし Drd6/d5 (V) 中には ω -3 または ω -6 基質のどちらについても $\Delta 5$ 活性はなかった]、および (3) 予想外の $\Delta 8$ デサチュラーゼ活性。

【0646】

Q-d12D 形質転換体と L115 形質転換体との % 基質転換の違いは、おそらく基質供給の結果であった。Drd6/d5 は アシル-CoA 基質に作用することが報告されているので、デサチュラーゼ活性は、脂肪酸供給、またはヤロウィア (Yarrowia) 宿主による新規 (de novo) 合成の結果として異なることができる。別の予想外の観察は、Drd6/d5 (M) が ETrA [20:3 (11, 14, 17)] を ETA に変換したが、EDA [20:2 (11, 14)] を DGLA に変換しなかったことであり

、すなわちタンパク質は ω -3基質に対してのみ $\Delta 8$ デサチュラーゼ活性を有した。

【0647】

このDr d6/d5 (M) デサチュラーゼは、ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 中で発現させると、経路エンジニアリングのためにユニークな利点を提供できる特性を有することが明らかである。

【0648】

実施例19

モルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) ゲノムDNAおよびcDNAの調製

本実施例は、モルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) (ATCC #16266) からのゲノムDNAおよびcDNAの調製について述べる。これは実施例20、21、22、23、および24でそれぞれ述べられるように、M. アルピナ (*alpina*) LPAAT2、DGAT1、DGAT2、GPAT、およびELO3の単離を可能にする。

【0649】

モルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) からのゲノムDNAの調製

キアゲン (Qiagen) からのキアプレップ (QiaPrep) スピンミニプレップキット (カタログ番号627106) を使用してモルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) (ATCC #16266) からゲノムDNAを単離した。YPD寒天プレート (2%バクトイースト抽出物、3%バクトペプトン、2%グルコース、2.5%バクト寒天) 上に生育した細胞をこすり取り1.2 mLのキット緩衝液P1に再懸濁した。再懸濁した細胞をそれぞれ0.6 mLのガラスビーズ (0.5 mm径) を含有する2本の2.0 mLネジ蓋管に入れた。オクラホマ州バートルズビルのバイオスベック (Biospec (Bartlesville, OK)) からのミニビーズビーターの均質化 (HOMOGENIZE) 設定において、細胞を2分間均質化した。次に管をエッペンドルフ (Eppendorf) 微量遠心管内で14,000 rpmで2分間遠心分離した。上清 (0.75 mL) を3本の1.5 mL微量遠心管に移した。各管に等容積のキット緩衝液P2を添加した。管を3回反転して混合した後、0.35 mLの緩衝液N3を各管に添加した。各管の内容物を全部で5回反転させて、再度混合した。混合物をエッペンドルフ (Eppendorf) 微量遠心管中で14,000 rpmで5分間遠心分離した。各管からの上清を3本の別々のキットスピンカラムに個別に移した。次にカラムに以下の処理を行った。遠心分離 (14,000 rpmで1分間)、緩衝液PEで1回洗浄、遠心分離 (14,000 rpmで1分間)、次に最終遠心分離 (14,000 rpmで1分間)。各カラムに緩衝液EB (50 μ L) を添加して、1分間静置した。次にゲノムDNAを14,000 rpmで1分間の遠心分離によって溶出した。

【0650】

モルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) からのcDNAの調製

カナダ国オンタリオ州ミシサーガのBDクロンテック (BD-Clontech (Mississauga, ON, Canada)) からのクリエイター・スマート (Creator Smart) (登録商標) cDNAライブラリーキットを使用して、製造業者のプロトコルに従ってモルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) cDNAを調製した。

【0651】

具体的にはM. アルピナ (*alpina*) ATCC #16266株を60 mLのYPD培地 (2%バクトイースト抽出物、3%バクトペプトン、2%グルコース) 中で3日間23°Cで生育させた。ベックマン (Beckman) GH3.8ローター内での3750 rpmで10分間の遠心分離によって細胞をペレット化し、インビトロジェン (Invitrogen) からの6 $\times$ 0.6 mLのトリゾール試薬中に再懸濁した。再懸濁した細胞を

それぞれ0.6 mLの0.5 mmガラスビーズを含有する6本の2 mLネジ蓋管に移した。バイオスベック (BioSpec) ミニビーズビーターの均質化設定において、細胞を2分間均質化した。管を短時間遠沈して、ビーズを沈下させた。液体を4本の新鮮な1.5 mL微量遠心管に移して、各管に0.2 mLのクロロホルム／イソアミルアルコール (24:1) を添加した。管を手で1分間振盪し、3分間静置した。次に管を4℃において14,000 rpmで10分間遠沈した。上層を4本の新しい管に移した。各管にイソプロピルアルコール (0.5 mL) を添加した。管を室温で15分インキュベートし、続いて4℃において14,000 rpmで10分間遠心分離した。ペレットをRNA分解酵素を含まない水で作った75%エタノール各1 mLで洗浄し風乾した。次に全RNAサンプルを500 µLの水に再溶解し1:50希釈RNAサンプルを使用して、A260 nmでRNA量を測定した。全部で3.14 mgのRNAが得られた。

10

【0652】

この全RNAサンプルをキアゲン (Qiagen) RNeasy全RNAミディ (Mid) キットで、製造業者のプロトコルに従ってさらに精製した。このようにして全RNAサンプルを2 mLに希釈して、80 µLのβ-メルカプトエタノールおよび5.6 mLの100%エタノールを添加した8 mLのRLT緩衝液と混合した。サンプルを4つの部分に分割し、4本のRNeasyミディ (Mid) カラムに装入した。次にカラムを5分間4500×gで遠心分離した。カラムを洗浄するために2 mLのRPE緩衝液を装入し、カラムを2分間4500×gで遠心分離した。洗浄ステップを1回繰り返したが、遠心分離時間は5分間に延長した。各カラムに250 µLのRNA分解酵素を含まない水を添加して全RNAを溶出し、1分間待って4500×gで3分間遠心処理した。

20

【0653】

次にアマシャム・バイオサイエンス (Amersham Biosciences) のmRNA精製キットのプロトコルに従って、上の全RNAサンプルからPoly A (+) RNAを単離した。簡単に述べると、2オリゴ-dT-セルロースカラムを使用した。カラムを各1 mLの高塩濃度緩衝液で2回洗浄した。前段階からの全RNAサンプルを2 mLの全容積に希釈して、10 mMトリス/HCl、pH 8.0、1 mM EDTAに調節した。サンプルを65℃で5分間加熱し、次に氷上にのせた。サンプル緩衝液 (0.4 mL) を添加して、次にサンプルを重力供給法下で2本のオリゴ-dT-セルロースカラムに装入した。カラムを350×gで2分間遠心分離し、各0.25 mLの高塩濃度緩衝液で2回洗浄し、毎回それに350×gで2分間の遠心分離が続いた。同一の遠心分離ルーチンに従って、カラムを低塩濃度緩衝液でさらに3回洗浄した。カラムを65℃に予熱された溶出緩衝液各0.25 mLで4回洗浄して、Poly (A) + RNAを溶出し、同一の遠心分離手順がそれに続いた。精製プロセス全体をもう1回繰り返した。精製poly (A) + RNAを30.4 ng/µLの濃度で得た。

30

【0654】

BDクローンテック (BD-Clontech) によって規定されるLD-PCR法、および0.1 µgのpoly A (+) RNAサンプルを使用して、cDNAを発生させた。具体的には第1ストランドcDNA合成のために、3 µLのpoly (A) + RNAサンプルと、1 µLのSMART IVオリゴヌクレオチド (配列番号293) および1 µLのCDS III / 3' PCRプライマー (配列番号294) とを混合した。混合物を72℃に2分間加熱して、氷上で2分間冷却した。2 µLの第1ストランド緩衝液、1 µLの20 mM DTT、1 µLの10 mM dNTPミクス、および1 µLのパワースクリプト (PowerScript) 逆転写酵素を管に添加した。混合物を42℃で1時間インキュベートし、氷上で冷却した。

40

【0655】

第1ストランドcDNA合成混合物をPCR反応のためのテンプレートとして使用した。具体的には反応混合物は次を含有した。2 µLの第1ストランドcDNA混合物、2 µLの5' - PCRプライマー (配列番号295)、2 µLのCDS III / 3' - PCRプライマー (配列番号294)、80 µLの水、10 µLの10×アドバンテージ (Ad

50

vantage) 2 PCR緩衝液、2 μ Lの50 $\times$ dNTPミクス、および2 μ Lの50 $\times$ アドバンテージ (Advantage) 2ポリメラーゼミクス。サーモサイクラー条件をGenAmp 9600装置上において次のように設定した。95 $^{\circ}$ Cで20秒間と、それに続く95 $^{\circ}$ Cで5秒間および68 $^{\circ}$ Cで6分間を14~20サイクル。PCR生成物をアガロースゲル電気泳動法および臭化エチジウム染色によって定量した。

【0656】

上の75 μ LのPCR生成物 (cDNA) と、キットで提供される3 μ Lの20 μ g/ μ Lタンパク質分解酵素Kとを混合した。混合物を45 $^{\circ}$ Cで20分間インキュベートし、次に75 μ Lの水を添加して、混合物を150 μ Lのフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール混合物 (25：24：1) で抽出した。水相を150 μ Lのクロロホルム：イソアミルアルコール (25：1) でさらに抽出した。次に水相を15 μ Lの3M酢酸ナトリウム、2 μ Lの20 μ g/ μ Lのグリコーゲン、および400 μ Lの100%エタノールと混合した。混合物を即座に微量遠心管中で、室温において14000 rpmで20分間遠心分離した。ペレットを150 μ Lの80%エタノールで1回洗浄し、風乾させて79 μ Lの水に溶解した。

【0657】

溶解したcDNAを引き続いてSfiIで消化した (79 μ LのcDNAと、10 μ Lの10 $\times$ SfiI緩衝液、10 μ LのSfiI酵素、および1 μ Lの100 $\times$ BSAとを混合し、混合物を50 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートした)。キシレンシアノール染料 (2 μ Lの1%) を添加した。次に製造業者の手順に正確に従って、混合物をキットで提供されるクロマスピ (Chromaspin) 400カラム上で分画した。画分をカラムから収集し、アガロースゲル電気泳動法で分析した。cDNAを含有する第1の3つの画分をプールして、cDNAをエタノールで沈殿した。沈殿したcDNAを7 μ Lの水に再溶解して、キットで提供されるpDNR-LIBにライゲートした。

【0658】

ライブラリー配列決定

ライゲーション生成物を使用して、ストラタジーン (Stratagene) からの大腸菌 (E. Coli) XL-1ブルー電気穿孔コンピテント細胞を形質転換した。推定総数2 $\times$ 10⁶個のコロニーが得られた。マサチューセッツ州ベバリーのアージンコート・バイオサイエンス社 (Agencourt Bioscience Corporation (Beverly, MA)) によってM13順方向プライマー (配列番号296) を使用して、cDNAライブラリーの配列決定を実施した。

【0659】

実施例20

パーセントPUFAを増大させるモルティエラ・アルピナ (Mortierella alpina) LPAAT2の発現

本実施例は、M. アルピナ (alpina) LPAAT2 (配列番号82および83) を同時発現するように形質転換された、ヤロウィア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) Y2067U株 (実施例4) における増大するEPA生合成および蓄積について述べる。 Δ 6デサチュラーゼ/ Δ 6エロンガーゼ経路または Δ 9エロンガーゼ/ Δ 8デサチュラーゼ経路のどちらかを通じてEPAを生成するように遺伝子操作されたY. リポリティカ (lipolytica) 宿主株は、M. アルピナ (alpina) LPAAT2がそこで (例えば株Y2088、Y2089、Y2090、Y2095、Y2096、Y2102、Y2201および/またはY2203) 同様に同時発現されれば、増大するEPA生合成および蓄積を実証できることが考察される。

【0660】

M. アルピナ (alpina) LPAAT2 ORFを次のようにしてクローニングした。プライマーMLPAT-FおよびMLPAT-R (配列番号297および298) を使用して、PCRによってM. アルピナ (alpina) cDNA (実施例19) からLPAAT2 ORFを増幅した。反応混合物は、1 μ LのcDNA、各1 μ Lのプライマー、22

μLの水、および日本国滋賀県大津市520-2193のタカラバイオからの25μLのExTaqプレミクス2×Taq PCR溶液を含有した。増幅を次のようにして実施した。94℃で150秒間の初期変性、続いて94℃で30秒間の変性、55℃で30秒間のアニーリング、および72℃で90秒間の延長を30サイクル。72℃で10分間の最終延長サイクルを実施し、続いて4℃での反応終結。約950bpのDNA断片がPCR反応から得られた。これをカリフォルニア州バレンシアのキアゲン (Qiagen (Valencia, CA)) のPCR精製キットを使用して、製造業者のプロトコルに従って精製した。精製されたPCR生成物をNcoIおよびNotIで消化し、Y. リポリティカ (lipolytica) 中での発現のために、遺伝子が、自律複製ベクター中のY. リポリティカ (lipolytica) FBAINプロモーターおよびPEX20-3'ターミネーター領域の制御下にあるようにして、NcoI-NotI切断pZUF17ベクター (配列番号143、図11D) 中にクローンした。正確な形質転換体をミニプレップDNAの制限酵素分析によって確認し、得られたプラスミドを「pMLPAT-17」 (配列番号153) と命名した。

10

【0661】

M. アルピナ (alpina) LPAAAT2をヤロウィア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) ゲノム中に組み込むために、プラスミドpMLPAT-Intを作り出した。プライマーLPAT-Re-5-1およびLPAT-Re-5-2 (配列番号299および300) を使用して、Y. リポリティカ (lipolytica) LPAAAT1 (配列番号84) のAUGのすぐ上流にあるY. リポリティカ (lipolytica) ゲノムの1103bpの断片を含有する、1129bpのDNA断片であるYLPAT-5' (配列番号301) を増幅した。反応混合物は、1μLのY. リポリティカ (lipolytica) ゲノムDNA、各1μLのプライマー、22μLの水、およびタカラ (Takara) からの25μLのExTaqプレミクス2×Taq PCR溶液を含有した。増幅を上述のように実施した。PCR反応から約1130bpのDNA断片が得られた。それをキアゲン (Qiagen) のPCR精製キットを使用して、製造業者のプロトコルに従って精製した。精製されたPCR生成物をSalIおよびClaIで消化し、SalI-ClaI切断pBluescript SK (-) ベクター中にクローンして、プラスミド「pYLPAT-5」をもたらした。

20

【0662】

次に上と同じ条件を使用して、プライマーLPAT-Re-3-1およびLPAT-Re-3-2 (配列番号302および303) を使用して、Y. リポリティカ (lipolytica) LPAAAT1の停止コドンのすぐ後ろにあるY. リポリティカ (lipolytica) ゲノムの903bpの断片を含有する938bpの断片であるYLPAT-3' (配列番号304) を増幅した。精製されたPCR生成物をClaIおよびXhoIで消化し、ClaI-XhoI消化pYLPAT-5'中にクローンした。正確な形質転換体をミニプレップ分析で確認し、得られたプラスミドを「pYLPAT-5'-3'」と命名した。

30

【0663】

次にpMLPAT-17 (配列番号153) をClaIおよびNotIで消化し、キアゲン (Qiagen) QiaexII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、Y. リポリティカ (lipolytica) URA3遺伝子、Y. リポリティカ (lipolytica) FBAINプロモーター、およびM. アルピナ (alpina) LPAAAT2遺伝子を含有する約3.5kbの断片を単離した。この断片をClaI-NotI消化pYLPAT-5'-3'中にクローンした。正確な形質転換体をミニプレップおよび制限酵素分析によって確認した。得られたプラスミドを「pMLPAT-Int」 (配列番号154) と命名した。

40

【0664】

「対照」ベクターpZUF-MOD-1 (配列番号155) を次のようにして調製した。最初にプライマーpzuf-mod1およびpzuf-mod2 (配列番号305およ

50

び306)を使用し、カリフォルニア州パロアルトのクローンテック (ClonTech (Pal Alto, CA)) からのpDNR-LIBをテンプレートとして使用して、252bpの「スタッファー」DNA断片を増幅した。増幅された断片をキアゲン (Qiagen) キアクイック (QiaQuick) PCR精製キットによって精製し、標準条件を使用してNcoIおよびNotIで消化して、次にキアクイック (QiaQuick) PCR精製キットによって再度精製した。この断片を同様に消化されたNcoI／NotI切断pZUF17ベクター (配列番号143、図11D) にライゲートして、得られたライゲーション混合物を使用してインビトロゲン (Invitrogen) からの大腸菌 (E. Coli) Top10細胞を形質転換した。得られた4個のコロニーからキアゲン (Qiagen) キアプレップ (QiaPrep) スピンミニプレップキットを使用して、プラスミドDNAを精製した。精製プラスミドをNcoIおよびNotIで消化して、約250bpの断片の存在を確認した。得られたプラスミドを「pZUF-MOD-1」と命名した (配列番号155、図18C)。

【0665】

一般方法に従って、Y. リポリティカ (lipolytica) Y2067U株 (実施例4、全脂質の14%のEPAを生成する) をプラスミドpMLPAT-17、プラスミドpZUF-MOD-1 (対照)、およびSpeI／XbaI消化プラスミドpMLPAT-Intで個々に形質転換した。形質転換体をアミノ酸強化した合成MM中で2日間生育させ、HGM中での4日間がそれに続いた。(一般方法で述べられるような) GC分析に基づく、pZUF-MOD-1を含有する2つの形質転換体、pMLPAT-17を含有する2つの形質転換体、およびゲノムに組み込まれたpMLPAT-Intを有する2つの形質転換体の脂肪酸プロファイルを下の表に示す。脂肪酸は18:0、18:1 (オレイン酸)、18:2 (LA)、GLA、DGLA、ARA、ETA、およびEPAとして同定され、それぞれの組成は、全脂肪酸の%で表される。

【0666】

【表54】

表 45

M. アルピナLPAAT2を過剰発現するように遺伝子操作された
ヤロウィアY2067U株の脂質組成

株	全脂肪酸							
	18:0	18:1	18:2	GLA	DGLA	ARA	ETA	EPA
Y2067U+pZUF-MOD-1 #1	1.1	4.7	10.9	19.4	6.3	0.9	3.9	13.8
Y2067U+pZUF-MOD-1 #2	0.9	4.4	9.5	19.3	6.6	0.9	4.0	14.1
Y2067U+pMLPAT-17 #1	1.0	4.4	9.8	18.6	5.9	0.8	3.4	15.5
Y2067U+pMLPAT-17 #2	0.7	3.5	8.4	16.7	6.2	1.0	2.9	16.0
Y2067U+pMLPAT-Int #1	1.9	4.9	13.9	21.1	4.8	1.1	2.7	16.6
Y2067U+pMLPAT-Int #2	1.7	4.2	12.1	21.3	5.2	1.2	2.9	17.3

【0667】

上で実証されたように、pMLPAT-17からのM. アルピナ (alpina) LPAAT2の発現は、%EPAを「対照」株中の約14%から15.5～16%に増大させた。16.6～17.3%へのEPAの追加的増大は、M. アルピナ (alpina) LPAAT2をpMLPAT-Intがあるゲノムに組み込むと達成された。例えばY2067U株+pMLPAT-Intにおいて、天然ヤロウィア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) LPAAT1 (配列番号84および85) および／またはLPAAT2 (配列番号87および88) をノックアウトすれば、追加的増大が期待される。

【0668】

実施例21

パーセントPUFAを増大させるモルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) DGAT1の発現

本実施例は、M. アルピナ (*alpina*) DGAT1 cDNA (配列番号96)を同時発現するように形質転換された、ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) Y2067U株 (実施例4) における増大するEPA生合成および蓄積について述べる。Δ6デサチュラーゼ/Δ6エロンガーゼ経路またはΔ9エロンガーゼ/Δ8デサチュラーゼ経路のどちらかを通じてEPAを生成するように遺伝子操作されたY. リポリティカ (*lipolytica*) 宿主株は、M. アルピナ (*alpina*) DGAT1がそこで (例えばY2088、Y2089、Y2090、Y2095、Y2096、Y2102、Y2201および/またはY2203株) 同様に同時発現されれば、増大するEPA生合成および蓄積を実証できることが考察される。

10

【0669】

M. アルピナ (*alpina*) DGAT1 ORFを次のようにしてクローンした。最初にcDNAのクローニングを助けるために、DGAT1の第2のコドン配列を「ACA」から「GCA」に変化させ、スレオニンからアラニンへのアミノ酸変化がもたらされた。これは、M. アルピナ (*alpina*) DGAT1 ORFの完全なコード領域をプライマーMACAT-F1およびMACAT-R (それぞれ配列番号307および308) で増幅して達成された。具体的にはPCR反応混合物は、20 μMのプライマーMACAT-F1およびMACAT-R溶液各1 μL、1 μLのM. アルピナ (*alpina*) cDNA (前出、実施例19)、22 μLの水、および日本国滋賀県大津市520-2193のタカラバイオからの25 μLのExTaqプレミクス2×Taq PCR溶液を含有した。増幅を次のようにして実施した。94℃で150秒間の初期変性、続いて94℃で30秒間の変性、55℃で30秒間のアニーリング、および72℃で90秒間の延長を30サイクル。72℃で10分間の最終延長サイクルを実施し、続いて4℃での反応終結。約1600 bpのDNA断片がPCR反応から得られた。これをキアゲン (Qiagen) のPCR精製キットを使用して、製造業者のプロトコルに従って精製した。

20

【0670】

FBAINプロモーターおよびPEX20-3'ターミネーター領域の制御下でORFがクローンされるように、M. アルピナ (*alpina*) DGAT1 ORFをNco IおよびNot I消化プラスミドpZUF17 (配列番号143、図11D) に挿入した。しかしDGAT1 ORFは内部Nco I部位を含有したので、クローニングのために2つの別々の制限酵素消化を実施することが必要であった。最初に約2 μgの精製PCR生成物をBamHIおよびNco Iで消化した。反応混合物は全容積60 μL中に、プロメガ (Promega) からの各20 Uの酵素、および6 μLの制限緩衝液Dを含有した。混合物を37℃で2時間インキュベートした。約320 bpの断片をアガロースゲル電気泳動法によって分離し、キアゲン (Qiagen) キアエクス (Qiaex) IIゲル精製キットを使用して精製した。Nco IをNot Iで置換したこと以外は、上と同一の反応条件を使用して、別々に約2 μgの精製PCR生成物をBamHIおよびNot Iで消化した。上記のように約1280 bpの断片が単離され、精製された。最後に約3 μgのpZUF17を上述のようにNco IおよびNot Iで消化し精製して、約7 k Bの断片を生じさせた。

30

40

【0671】

約7 k BのNco I/Not I pZUF17断片、約320 bpのNco I/BamHI DGAT1断片、および約1280 bpのBamHI/Not I DGAT1断片を三元ライゲーションで共にライゲートし、室温で一晩インキュベートした。ライゲーション混合物は全容積20 μL中に、100 ngの7 k Bの断片、各200 ngの320 bpおよび1280 bpの断片、2 μLのリガーゼ緩衝液、およびプロメガ (Promega) からの2 U T4 DNAリガーゼを含有した。ライゲーション生成物を使用

50

して、製造業者のプロトコルに従ってインビトロゲン（Invitrogen）からの大腸菌（E. Coli）Top10化学コンピテント細胞を形質転換した。

【0672】

ミニプレップ分析のために、形質転換からの個々のコロニー（総計12個）を使用して培養を接種した。制限酵素地図および配列決定は、12個のコロニー中5個が「pMDGAT1-17」と命名された所望のプラスミドを持つことを示した（図18D、配列番号156）。

【0673】

Y. リポリティカ（lipolytica）Y2067U株（実施例4）を一般方法に従って、それぞれpMDGAT1-17およびpZUF-MOD-1（前出、実施例20）で形質転換した。形質転換体をアミノ酸強化した合成MM中で2日間生育させ、HGM中での4日間がそれに続いた。（一般方法で述べられるような）GC分析に基づく、pMDGAT1-17を含有する2つの形質転換体、およびpZUF-MOD-1を含有する2つの形質転換体の脂肪酸プロファイルを下の表46に示す。脂肪酸は18:0、18:1（オレイン酸）、18:2（LA）、GLA、DGLA、ARA、ETA、およびEPAとして同定され、それぞれの組成は、全脂肪酸の%で表される。

【0674】

【表55】

表 46

M. アルピナDGAT1を過剰発現するように遺伝子操作された
ヤロウィアY2067U株の脂質組成

株	全脂肪酸							
	18:0	18:1	18:2	GLA	DGLA	ARA	ETA	EPA
Y2067U+pZUF-MOD-1 #1	1.31	6.92	12.03	23.11	5.72	1.05	3.80	13.20
Y2067U+pZUF-MOD-1 #2	1.39	6.83	12.15	21.99	5.83	1.07	3.82	13.47
Y2067U+pMDGAT1-17 #1	0.89	7.13	10.87	24.88	5.82	1.19	3.97	14.09
Y2067U+pMDGAT1-17 #2	0.86	7.20	10.25	22.42	6.35	1.26	4.38	15.07

【0675】

上で実証されたように、プラスミドpMDGAT1-17からのM. アルピナ（alpina）DGAT1の発現は、%EPAを「対照」株中での約13.3%から、約14.1%（「Y2067U+pMDGAT1-17 #1」）および約15.1%（「Y2067U+pMDGAT1-17 #2」）にそれぞれを増大させた。例えばY2067U株+pMDGAT1-17において、天然ヤロウィア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）DGAT1（配列番号94および95）をノックアウトすれば、EPAの追加的増大が期待される。

【0676】

実施例22

パーセントPUFAを増大させるモルティエラ・アルピナ（Mortierella alpina）DGAT2

本実施例は、M. アルピナ（alpina）DGAT2 cDNA（配列番号108）を同時発現するように形質転換された、ヤロウィア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）Y2067U株（実施例4）における増大するEPA生合成および蓄積について述べる。 $\Delta 6$ デサチュラーゼ/ $\Delta 6$ エロンガーゼ経路または $\Delta 9$ エロンガーゼ/ $\Delta 8$ デサチュラーゼ経路のどちらかを通じてEPAを生成するように遺伝子操作されたY. リポリティカ（lipolytica）宿主株は、M. アルピナ（alpina）DGAT2がそこで（例えば株Y2088、Y2089、Y2090、Y2095、Y2

096、Y2102、Y2201および／またはY2203)同様に同時発現されれば、増大するEPA合成および蓄積を実証できることが考察される。

【0677】

M. アルピナ (alpina) DGAT2 ORFを次のようにしてプラスミド pZUF17中にクローンした。最初にM. アルピナ (alpina) cDNA (前出、実施例19)からのプライマーMDGAT-FおよびMDGAT-R1 (配列番号309および310)を使用して、ORFをPCR増幅した。予測された1015bpの断片を単離して精製し、Nco IおよびNot Iで消化して、遺伝子がY. リポリティカ (lipolytica) FBAINプロモーターおよびPEX20-3'ターミネーター領域の制御下にあるように、Nco I-Not I切断pZUF17ベクター (配列番号143; 図11D)中にクローンした。正確な形質転換体をミニプレップDNAの制限酵素分析によって確認し、得られたプラスミドを「pMDGAT2-17」 (配列番号157)と命名した。

【0678】

一般方法に従って、Y. リポリティカ (lipolytica) Y2067U株 (実施例4)をそれぞれpMDGAT2-17およびpZUF-MOD-1 (前出、実施例20)で形質転換した。形質転換体をアミノ酸強化合成MM中で2日間生育させ、HGM中での4日間がそれに続いた。(一般方法で述べられるような)GC分析に基づく、pMDGAT2-17を含有する2つの形質転換体、およびpZUF-MOD-1を含有する2つの形質転換体の脂肪酸プロファイルを下に示す。脂肪酸は18:0、18:1 (オレイン酸)、18:2 (LA)、GLA、DGLA、ARA、ETA、およびEPAとして同定され、それぞれの組成は、全脂肪酸の%で表される。

【0679】

【表56】

表 47

M.アルピナDGAT2を過剰発現するように遺伝子操作された
ヤロウィアY2067U株の脂質組成

株	全脂肪酸							
	18:0	18:1	18:2	GLA	DGLA	ARA	ETA	EPA
Y2067U+pZUF-MOD-1 #1	1.31	6.92	12.03	23.11	5.72	1.05	3.80	13.20
Y2067U+pZUF-MOD-1 #2	1.39	6.83	12.15	21.99	5.83	1.07	3.82	13.47
Y2067U+pMDGAT2-17 #1	0.00	7.47	10.77	25.30	5.70	1.43	3.45	15.12
Y2067U+pMDGAT2-17 #2	1.45	7.79	9.96	25.16	6.06	1.25	3.99	15.37

【0680】

プラスミド pMDGAT2-17からのM. アルピナ (alpina) DGAT2の発現は、%EPAを「対照」株中の約13.3%から約15.25% (「Y2067U+pMDGAT2-17」)に増大させた。例えばY2067U株+pMDGAT2-17中で天然ヤロウィア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) DGAT2 (配列番号102-107)をノックアウトすれば、EPAの追加的増大が期待される。

【0681】

実施例23

パーセントPUFAを増大させるモルティエラ・アルピナ (Mortierella alpina) GPAT

本実施例は、M. アルピナ (alpina) GPAT ORF (配列番号110)を同時発現するように形質転換された、ヤロウィア・リポリティカ (Yarrowia li

polytica) Y2107U1株(実施例9)における増大したDGLA生合成および蓄積(および18:1量の減少)について述べる。Δ6デサチュラーゼ/Δ6エロンガーゼ経路またはΔ9エロンガーゼ/Δ8デサチュラーゼ経路のどちらかを通してEPAを生成するように遺伝子操作されたY. リポリティカ(lipolytica)宿主株は、M. アルピナ(alpina)GPATがそこで(例えばY2088、Y2089、Y2090、Y2095、Y2096、Y2102、Y2201および/またはY2203株)同様に同時発現されれば、増大するEPA生合成および蓄積を実証できることが考察される。

【0682】

縮重PCRプライマーを使用したM. アルピナ(alpina)GPATの同定

10

アスペルギルス・ニデュランス(*Aspergillus nidulans*) (ジェンバンク登録番号EAA62242)、およびニューロスボラ・クラッサ(*Neurospora crassa*) (ジェンバンク登録番号XP_325840)からのGPAT配列に基づいて、縮重PCRのために以下のプライマーをデザインした。

MGPAT-N1 (配列番号311) CCNCA YGCNAAYCARTTYGT

MGPAT-NR5 (配列番号312) TTCCANGTNGCCATNTCTCTC

[注記: 配列番号311および312のために使用される核酸縮重コードは次のとおり。

R = A/G、Y = C/T、およびN = A/C/T/G]

【0683】

日本国滋賀県大津市のタカラバイオからのタカラ(TaKaRa)ExTaqプレミクスTaqポリメラーゼを使用して、パーキン・エルマー(Perkin Elmer)GeneAmp 9600 PCRマシン内でPCR増幅を実施した。増幅を次のように実施した。94℃で30秒間の変性、55℃で30秒間のアニーリング、および72℃で90秒間の延長を30サイクルと、それに続く72℃で7分間の最終延長サイクル。

20

【0684】

約1.2kBの断片(配列番号112)が得られた。この断片をキアゲン・キアクイック(Qiagen QiaQuick)PCR精製キットで精製し、インビトロジェン(Invitrogen)からのTOPO(登録商標)クローニングベクターpCR2.1-TOPO中にクローンして配列決定した。翻訳すると得られた配列は、BLASTプログラム分析に基づいて既知のGPATと相同性を有した。

30

【0685】

1212bpのcDNA断片配列に基づいて、M. アルピナ(alpina)GPATの5'および3'末端領域をPCR増幅およびゲノム歩行技術によってクローンした。これによってM. アルピナ(alpina)GPAT(配列番号113)の-1050bp~+2885bp領域に対応するコンティグのアセンブリーが可能になった。このコンティグはGPATのコード領域全体、および4個のイントロン(配列番号117、118、119、および120)を含んだ。

【0686】

具体的にはGPATの3'-末端増幅のためのテンプレートとして、実施例19で述べられるM. アルピナ(alpina)cDNAサンプル(1μL)を使用した。MGPAT-5N1(配列番号313)およびCDSIII/3'(配列番号294)をプライマーとして使用した。日本国滋賀県大津市のタカラバイオからのタカラ(TaKaRa)ExTaqプレミクスTaqポリメラーゼを使用して、パーキン・エルマー(Perkin Elmer)GeneAmp 9600 PCRマシン内でPCR増幅を実施した。増幅を次のように実施した。94℃で30秒間の変性、55℃で30秒間のアニーリング、および72℃で120秒間の延長を30サイクルと、それに続く72℃で7分間の最終延長サイクル。

40

【0687】

PCR生成物を1:10に希釈し、MGPAT-5N2(配列番号314)およびCDSIII/3'をプライマーとして使用した第2回目の増幅のテンプレートとして、1μ

50

Lの希釈PCR生成物を使用した。条件は上で述べたのと全く同じであった。第2回目のPCR生成物を1:10に再度希釈し、MGPA T-5N3 (配列番号315) およびCDS I I I / 3' をプライマーとして使用した第3回目のPCRのテンプレートとして、1 μ Lの希釈PCR生成物を使用した。PCR条件はここでも上で述べたのと全く同じであった。

【0688】

第3回目のPCRにおいて約1 k Bの断片が生じた。この断片をキアゲン (Q i a g e n) PCR精製キットで精製し、配列分析のためにpCR2. 1-TOPOベクター中にクローンした。配列分析からの結果は、この965 b pの断片 (配列番号114) がGPAT遺伝子の3' -末端に相当したことを示した。

10

【0689】

クローンテック (C l o n t e c h) からのユニバーサル・ゲノム歩行 (商標) キットを利用して、M. アルピナ (a l p i n a) GPATの5' 末端領域に対応する1片のゲノムDNAを得た。簡単に述べると、各2. 5 μ gのM. アルピナ (a l p i n a) ゲノムDNAをDra I、Eco R V、Pvu IIまたはStu Iで個別に消化し、キアゲン (Q i a g e n) キアクイック (Q i a Q u i c k) PCR精製キットを使用して、消化DNAサンプルを精製して各30 μ Lのキット緩衝液EBで溶出し、次に精製サンプルを下に示すようなゲノム歩行アダプター (配列番号316 [上のストランド] および317 [下のストランド]) にライゲートした。

【化1】

20

5' -GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGTCGACGGCCCGGGCTGGT-3'

3' -H2N-CCCGACCA-5'

【0690】

各ライゲーション反応混合物は、1. 9 μ Lの25 μ Mゲノム歩行アダプター、1. 6 μ Lの10 $\times$ ライゲーション緩衝液、0. 5 μ LのT4 DNAリガーゼ、および4 μ Lの精製消化ゲノムDNAサンプルの1つを含有した。反応混合物を16 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。反応を70 $^{\circ}$ Cで5分間のインキュベーションによって終結した。次に72 μ Lの10 mMトリスHCl、1 mM EDTA、pH 7. 4の緩衝液を各ライゲーション反応ミクスに添加した。

30

【0691】

それぞれ4つのライゲーション混合物の1つをテンプレートとして使用して、4つの別々のPCR反応を実施した。PCR反応混合物は、1 μ Lのライゲーション混合物、0. 5 μ Lの20 μ M MGPA T-5-1A (配列番号318)、1 μ Lの10 μ MキットプライマーAP1 (配列番号319)、22. 5 μ Lの水、およびタカラからの25 μ LのEx Taq プレミクスTaq 2 $\times$ PCR溶液を含有した。PCR反応を以下の条件を使用して32サイクル実施した。94 $^{\circ}$ Cで30秒間の変性、55 $^{\circ}$ Cで30秒間のアニーリング、および72 $^{\circ}$ Cで180秒間の延長。72 $^{\circ}$ Cで7分間の最終延長サイクルを実施し、4 $^{\circ}$ Cでの反応終結がそれに続いた。

【0692】

40

各PCR反応の生成物を個々に1:50に希釈し、第2の回目のPCRテンプレートとして使用した。各反応混合物は、テンプレートとしての1 μ Lの希釈PCR生成物の1つ、0. 5 μ Lの20 μ M MGPA T-3N1 (配列番号320)、21 μ Lの10 μ MキットプライマーAP2 (配列番号321)、22. 5 μ Lの水、およびタカラ (T a K a R a) からの25 μ LのEx Taq プレミクスTaq 2 $\times$ PCR溶液を含有した。上述したのと同じサーモサイクラー条件を使用して、PCR反応を32サイクル実施した。

【0693】

第2回目のPCRからDNA断片を得た。この断片を精製してpCR2. 1-TOPO中にクローンして配列決定した。配列分析は、1908 b pの断片 (配列番号115) がM. アルピナ (a l p i n a) GPAT遺伝子の5' -末端であったことを示した。

50

【0694】

同様に、プライマーMGPA T-5N1を第1回目のPCRのための遺伝子特異的プライマーとして、およびプライマーMGPA T-5N2を第2回目のための遺伝子特異的プライマーとして使用したこと以外は、上述のような2回のゲノム歩行から966bpの断片（配列番号116）が得られた。この断片もまた精製してPCR2.1-TOPO中にクローンし、配列決定した。配列分析は、これがGPA T遺伝子の一部を含有したことを示した。しかし断片は、遺伝子のどちらの端を延長するのにも、長さが足りなかった。3' cDNA配列（配列番号114）との比較は、ORFの最後の171bpが含まれていなかったことを示した。

【0695】

モルティエラ・アルピナ（*Mortierella alpina*）からの全長GPA T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112）、3' cDNA断片（配列番号114）、内部ゲノムの断片（配列番号116）、および上述の5'ゲノムの断片（配列番号115）（図19に示される）配列から、完全なGPA T遺伝子（GPA T翻訳開始「ATG」コドン上流に1050個の塩基延びる領域、およびGPA T終止コドンを超えて22個の塩基延びる領域を含んでなる）を含有する3935bpの配列（配列番号113）をアセンブルした。この領域には2151bpのGPA T ORFが含まれる。「ATG」から停止コドン「TAG」までのM. アルピナ（*alpina*）GPA T ORFの完全なヌクレオチド配列は、配列番号110として提供される（配列番号113の塩基1050～2863に対応し、4個のイントロン（すなわち配列番号113の塩基1195～1469に対応するイントロン1〔配列番号117〕、配列番号113の塩基1585～1839に対応するイントロン2〔配列番号118〕、配列番号113の塩基2795～2877に対応するイントロン3〔配列番号119〕、および配列番号113の塩基2940～3038に対応するイントロン4〔配列番号120〕を除く）。翻訳されたアミノ酸配列（配列番号111）は、いくつかの真菌、植物、および動物GPA Tと相同性を示した。

【0696】

より具体的には、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（Altschul）, S. F. 著、J. Mol. Biol. 215:403～410頁（1993年））検索を実施して、配列の同一性を判定した。ここで配列番号111として述べられるアミノ酸断片は、トウモロコシ黒穂菌（*Ustilago maydis*）の推定上のGPA Tのタンパク質配列（ジェンバンク登録番号EAK84237）と期待値 $1e-152$ で47%の同一性および65%の類似性を有し、さらに配列番号111は、アスペルギルス・フミガーツス（*Aspergillus fumigatus*）のGPA T（ジェンバンク登録番号EAL20089）と期待値 $1e-142$ で47%の同一性および62%の類似性を有した。

【0697】

FBA IN::MGPA T::PEX20-3'キメラ遺伝子を含んでなるプラスミドpMGPA T-17の構築

M. アルピナ（*alpina*）GPA T ORFを次のようにしてクローンした。プライマーMGPA T-cDNA-5およびMGPA T-cDNA-R（配列番号322および323）を使用して、PCRによってM. アルピナ（*alpina*）のcDNAからのGPA T ORFを増幅した。反応混合物は、1μLのcDNA、各1μLのプライマー、22μLの水、および日本国滋賀県大津市520-2193のタカラバイオからの25μLのExTaq プレミクス2×Taq PCR溶液を含有した。増幅を次のように実施した。94℃で150秒間の初期変性と、それに続く94℃で30秒間の変性、55℃で30秒間のアニーリング、および72℃で120秒間の延長を30サイクル。72℃で10分間の最終延長サイクルを実施し、4℃での反応終結がそれに続いた。PCR反応から

約 2.2 k B の DNA 断片を得た。キアゲン (Q i a g e n) P C R 精製キットを使用して製造業者のプロトコルに従って、それを精製した。

【0698】

精製された P C R 生成物を B a m H I および E c o R I で消化して、ゲルアガロース電気泳動法によって約 470 b p の断片を単離し、キアゲン (Q i a g e n) ゲル精製キットを使用して精製した。別に、P C R 生成物を E c o R I および N o t I でも切断し、上と同様にして 1.69 k B の断片を単離して精製した。Y. リポリティカ (l i p o l y t i c a) 中での発現のために、遺伝子が自律複製ベクター中の Y. リポリティカ (l i p o l y t i c a) F B A I N 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して、2つの断片を B a m H I および N o t I 切断 p Z U F-M O D-1 ベクター (配列番号 155、図 18 C) 中にライゲートした。正確な形質転換体をミニプレップ DNA の制限酵素分析によって確認し、得られたプラスミドを「p M G P A T-17」 (配列番号 158、図 18 E) と命名した。

【0699】

M. アルピナ (a l p i n a) G P A T を過剰発現する形質転換体 Y. リポリティカ (l i p o l y t i c a) 中の脂質組成分析

一般方法に従って、Y. リポリティカ (l i p o l y t i c a) Y2107U1 株 (実施例 9 からの) をプラスミド p M G P A T-17 およびプラスミド p Z U F-M O D-1 (前出、実施例 20) でそれぞれ形質転換した。形質転換体をアミノ酸で栄養強化された合成 MM 中で 2 日間、続いて H G M 中で 4 日間生育させた。(一般方法で述べられるような) G C 分析に基づいた、p Z U F-M O D-1 を含有する 2つの形質転換体および p M G P A T-17 を含有する 4つの形質転換体の脂肪酸プロファイルを下の表に示す。脂肪酸は 18:0、18:1 (オレイン酸)、18:2 (L A)、G L A、D G L A、A R A、E T A、および E P A として同定され、それぞれの組成は全脂肪酸の % として表される。

【0700】

【表 57】

表 48

M. アルピナ GPAT を過剰発現するように遺伝子操作された
ヤロウィア Y2107U1 株の脂質組成

株	全脂肪酸							
	18:0	18:1	18:2	GLA	DGLA	ARA	ETA	EPA
Y2107U1+pZUF-MOD-1 #1	2.8	22.7	9.8	28.5	2.7	1.7	0.4	17.4
Y2107U1+pZUF-MOD-1 #2	2.5	23.4	10.3	28.7	2.5	1.5	0.3	16.8
Y2107U1+pMGPAT-17 #1	3.2	14.8	11.7	29.8	5.6	2.0	0.3	18.4
Y2107U1+pMGPAT-17 #2	2.9	16.3	11.7	28.3	6.1	1.8	0.4	16.9
Y2107U1+pMGPAT-17 #3	2.1	14.3	10.8	27.5	7.2	1.4	0.4	17.4
Y2107U1+pMGPAT-17 #4	2.7	15.7	11.5	29.1	6.3	1.7	0.4	17.3

【0701】

上で実証されたように、p M G P A T-17 からの M. アルピナ (a l p i n a) G P A T の発現は % D G L A を中の「対照」株約 2.5 % から 6.5 % に増大させた。18:1 のレベルは約 23 % から約 16 % に低下した。p M G P A T-17 を発現する形質転換株において天然ヤロウィア・リポリティカ (Y a r r o w i a l i p o l y t i c a) G P A T がノックアウトされれば、D G L A (またはその他のいずれかの下流 P U F A) の追加的増大が期待される。

【0702】

実施例 24

パーセント PUF A を増大させるモルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) 脂肪酸エロンガーゼ「ELO3」

本実施例は、M. アルピナ (*alpina*) C_{16/18} 脂肪酸エロンガーゼ (「ELO3」、配列番号 66) を同時発現するように形質転換されたヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) Y2031 株 (実施例 13) における、対照株と比べて 35% 多い C18 脂肪酸 (18:0、18:1、18:2、および GLA) および 31% 少ない C16 脂肪酸について述べる。ELO3 (場合により発現増大のためにコドン最適化できる) は、所望の PUF A、すなわち EPA 生成を増大する手段として、炭素流動を遺伝子操作された $\Delta 6$ デサチュラーゼ/ $\Delta 6$ エロンガーゼ経路または $\Delta 9$ エロンガーゼ/ $\Delta 8$ デサチュラーゼ経路のどちらかに進めることができると考察される。例えばこの C_{16/18} 脂肪酸エロンガーゼを含んでなるキメラ遺伝子を例えば Y2088、Y2089、Y2090、Y2095、Y2096、Y2102、Y2201 および/または Y2203 株に容易に導入できる。

【0703】

M. アルピナ (*alpina*) C_{16/18} 脂肪酸エロンガーゼの配列の同定

M. アルピナ (*alpina*) 脂肪酸エロンガーゼ一部をコードする cDNA 断片 (配列番号 68) を 9,984 個の M. アルピナ (*alpina*) cDNA 配列 (実施例 19) から同定した。この断片 (配列番号 68) はいくつかの脂肪酸エロンガーゼと顕著な相同性を持ち、したがってエロンガーゼと仮に同定された。

【0704】

それに対して配列番号 68 が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。具体的には翻訳された配列番号 68 のアミノ酸配列が、カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) SC5314 (ジェンバンク登録番号 EAL04510.1、そこで S. セレヴィシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) EUR4、FEN1、および ELO1 と類似した 3 つの有望な脂肪酸エロンガーゼ遺伝子の 1 つとして注釈される) からの有望な脂肪酸エロンガーゼのタンパク質配列と、期待値 $4e-13$ で 32% の同一性および 46% の類似性を有した。さらに配列番号 68 は、サッカロミセス・セレヴィシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) (ジェンバンク登録番号 NC_001142、染色体 X の塩基 67849~68781) からの ELO1 と 35% の同一性および 53% の類似性を有した。S. セレヴィシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) ELO1 は、不飽和 C12~C16 脂肪酸アシル CoAs から C16~C18 脂肪酸へのカルボキシ終末延長を触媒する、中鎖アシルエロンガーゼとして述べられる。

【0705】

上で報告される相同性に基づいて、配列番号 68 のヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 遺伝子産物をここで「エロンガーゼ 3」または「ELO3」と命名する。

【0706】

部分的脂肪酸エロンガーゼ cDNA 配列 (配列番号 68) の分析は、5' および 3' 末端がどちらも不完全であることを示唆した。M. アルピナ (*alpina*) ELO3 の失われた 3' 領域を得るために、(実施例 23 で述べられるようにして) クローンテック (Clontech) ユニバーサル・ゲノムウォーカー (商標) キットを使用した。具体的には、プライマーとして MA_Elong_3'1 (配列番号 324) および AP1 を使用した (すなわちプライマー MGPA_T-5-1A および AP1 の代わりに) こと以外は、前述したのと同じ構成要素および条件を使用して、同一の 4 つのライゲーション混合物セットを第 1 回目の PCR のために使用した。第 2 回目の PCR は、プライマーとして MA_Elong_3'2 (配列番号 325) および AP2 を使用した。第 2 回目の PCR から 1042 bp の DNA 断片が得られた (配列番号 69)。この断片を精製し、PCR2.1-TOPO 中にクローンして配列決定した。配列分析は、断片が遺伝子の「TA

A」停止コドンの約640bpの下流を含むELO3の3'末端を含有したことを示した。

【0707】

クローンテック (Clontech) 3'末端RACE (前出) で使用したのと同じ
の4つのライゲーション混合物セットをM. アルピナ (alpina) ELO3の5'
末端領域を得るためにも使用した。具体的には、プライマーとしてMA Elong 5'
1 (配列番号326、5'末端で入れ子) およびAP1を使用した (すなわちプライ
マーMA Elong 3'1およびAP1の代わりに) こと以外は、上述したのと同じ構
成要素および条件を使用して、第1回目のPCRを実施した。第2回目のPCRは、プ
ライマーとしてMA Elong 5'2 (配列番号327、5'末端で入れ子) およびA
P2を使用した。2223bpのDNA断片 (配列番号70) を得た。これを精製し、p
CR2.1-TOPPO中にクローンして配列決定した。配列分析は、これがELO3遺伝
子の5'領域を含有したことを示した。

10

【0708】

したがってオリジナルの部分的cDNA配列 (配列番号68) と、ゲノム歩行によって
得られた重複5'および3'配列 (それぞれ配列番号70および69、図20に示す) と
を組み合わせ、M. アルピナ (alpina) ELO3 (配列番号71) のcDNA配
列全体を得た。これはELO3の推定上の「ATG」翻訳開始コドンの2091bp上流
、828bpのELO3 ORF (すなわち配列番号66、配列番号71の塩基2092
~2919に対応する)、およびELO3停止コドンの638bp下流 (配列番号71の
塩基2920~3557に対応する) を含んでなる、ここで配列番号71として同定され
た3557bpの配列を生じた。

20

【0709】

M. アルピナ (alpina) ELO3の対応ゲノムの配列は、配列番号71として提
供されるcDNA断片よりも長い。具体的にはORFの318bpにELO3遺伝子を含
有するゲノムDNA中に、542bpのイントロン (配列番号72) が見いだされた。し
たがってここで配列番号73として提供されるゲノムDNA断片は4,099bpである
(図20)。

【0710】

翻訳されたELO3タンパク質配列 (配列番号67) は、BLASTプログラム分析に
基づいて以下の相同性を有した。カンジダ・アルビカンス (Candida albicans)
SC5314からの有望な脂肪酸エロンガーゼ (ジェンバンク登録番号EAL0
4510.1) と、期待値4e-43で37%の同一性および51%の類似性。さらに翻
訳されたELO3は、ニューロスポラ・クラッサ (Neurospora crassa)
からのタンパク質配列XP_331368 (そこで「仮説的タンパク質」として注釈さ
れる) と、期待値3e-44で、33%の同一性および44%の類似性を共有した。

30

【0711】

FBAIN::ELO3::PEX16-3'キメラ遺伝子を含んでなるプラスミドpZ
UF6S-E3WTの構築

M. アルピナ (alpina) 脂肪酸ELO3 ORFを次のようにしてクローンした
。プライマーMA Elong 5' NcoI 3およびMA Elong 3' N
otI (配列番号328および329) を使用して、PCRによってM. アルピナ (al
pina) のcDNA (実施例19) からELO3 ORFを増幅した。反応混合物は、
1μLのcDNA、各1μLのプライマー、22μLの水、およびタカラ (TaKaRa)
からの25μLのExTaqプレミクス2×Taq PCR溶液を含有した。増幅を次
のように実施した。94℃で30秒間の初期変性と、それに続く94℃で30秒間の変性
、55℃で30秒間のアニーリング、および72℃で120秒間の延長を32サイクル。
72℃で7分間の最終延長サイクルを実施して、それに4℃での反応終結が続いた。PC
R反応から約830bpのDNA断片を得た。それを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精製キットを使用して、

40

50

製造業者のプロトコルに従って精製した。精製されたPCR生成物を2つのアリコートに分割し、1つをNcoIおよびNspIで、もう1つをNspIおよびNotIで消化した。Y. リポリティカ (lipolytica) における発現のために、遺伝子が自律複製ベクター中でY. リポリティカ (lipolytica) FBAINプロモーターおよびPEX16-3'ターミネーター領域 (ジェンバンク登録番号U75433) の制御下にあるようにして、三点ライゲーションによって、約270bpのNcoI-NspIおよび約560bpのNspI-NotI断片をNcoI-NotI切断pZUF5T-PPCベクター中にクローンした (図15B、配列番号147)。正確な形質転換体をミニプレップ分析によって確認し、得られたプラスミドを「pZUF5T-PPC-E3」 (配列番号159) と命名した。

10

【0712】

プラスミドpZUF5T-PPC-E3をClaIおよびPacIで消化し、キアゲン (Qiagen) ゲル抽出キット使用して、アガロースゲルから約2.2kBのバンド (すなわちFBAIN::ELO3::PEX16-3'断片) を精製した。断片をFBAINプロモーター制御下にあるモルティエラ・アルピナ (Mortierella alpina) Δ6デサチュラーゼORF (「D6S」、ジェンバンク登録番号AF465281) を含有する自律複製プラスミドであるClaI-PacI切断pZUF6S中に、Pex20-3'ターミネーター (すなわちFBAIN::D6S::Pex20キメラ遺伝子) およびUra3遺伝子と共にクローンした (図21A、配列番号160)。正確な形質転換体をミニプレップ分析によって確認し、得られたプラスミドを「pZUF6S-E3WT」 (図21B、配列番号161) と命名した。

20

【0713】

M. アルピナ (alpina) ELO3を過剰発現する形質転換Y. リポリティカ (lipolytica) 中の脂質組成の分析

一般方法に従って、Y. リポリティカ (lipolytica) Y2031株 (実施例13) をプラスミドpZUF6S (対照、FBAIN::D6S::Pex20キメラ遺伝子を含んでなる) およびプラスミドpZUF6S-E3WT (FBAIN::D6S::Pex20キメラ遺伝子およびFBAIN::ELO3::PEX16キメラ遺伝子を含んでなる) で形質転換した。形質転換体をアミノ酸で栄養強化された合成MM中で2日間、続いてHGM中で4日間生育させた。(一般方法で述べられるような) GC分析に基づいて、pZUF6Sを含有する6個のクローン (単一形質転換からのクローン#1~6)、およびpZUF6S-E3WTを含有する22個のクローン (4つの異なる形質転換 [すなわち#3、5、6、および7] からの) の脂肪酸プロファイルを下の表49に示す。脂肪酸を16:0 (パルミチン酸)、16:1 (パルミトレイン酸)、18:0、18:1 (オレイン酸)、18:2 (LA)、およびGLAとして同定し、それぞれの組成は全脂肪酸の%として表される。

30

【0714】

【表 5 8】

表 49

M. アルピナ ELO3 を過剰発現するように遺伝子操作された
ヤロウィア Y2031 株の脂質組成

Y.リボリティカ Y2031 株形質転換体および/または クローン番号	脂肪酸組成(全脂肪酸の%)					
	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	GLA
pZUF6S #1(対照)	9.0	23.2	1.2	38.2	19.8	6.9
pZUF6S #2(対照)	10.1	23.4	1.4	39.0	17.5	7.1
pZUF6S #3(対照)	9.7	22.7	1.4	39.0	20.2	7.0
pZUF6S #4(対照)	8.5	24.1	0.0	40.8	19.8	6.9
pZUF6S #5(対照)	9.8	22.4	1.7	39.1	20.2	6.8
pZUF6S #6(対照)	9.1	22.7	1.9	39.9	19.7	6.6
pZUF6S-E3WT #3-1	8.9	17.3	4.1	36.5	21.6	11.6
pZUF6S-E3WT #3-2	8.8	17.8	3.7	36.9	21.3	11.5
pZUF6S-E3WT #3-3	8.9	18.3	3.5	33.8	35.4	0.0
pZUF6S-E3WT #3-6	8.5	19.9	4.4	37.8	17.1	12.3
pZUF6S-E3WT #5-1	8.6	17.6	4.0	37.6	21.1	11.1
pZUF6S-E3WT #5-2	8.8	17.1	3.9	37.6	21.3	11.2
pZUF6S-E3WT #5-3	9.1	17.1	3.5	37.6	21.5	11.1
pZUF6S-E3WT #5-4	8.8	17.9	4.3	38.0	19.3	11.7
pZUF6S-E3WT #5-5	9.2	16.1	4.4	37.0	21.6	11.7
pZUF6S-E3WT #5-6	8.7	21.5	4.2	30.3	35.3	0.0
pZUF6S-E3WT #6-1	9.4	16.9	4.6	36.6	21.5	11.0
pZUF6S-E3WT #6-2	9.8	16.2	4.1	36.5	21.9	11.6
pZUF6S-E3WT #6-3	9.4	17.0	4.4	36.2	21.8	11.3
pZUF6S-E3WT #6-4	8.3	16.6	4.2	36.9	21.9	12.2
pZUF6S-E3WT #6-5	8.8	18.5	5.5	36.0	17.8	13.4
pZUF6S-E3WT #6-6	8.7	19.5	5.2	35.4	18.1	13.2
pZUF6S-E3WT #7-1	0.0	30.6	0.0	35.5	18.2	15.8
pZUF6S-E3WT #7-2	8.0	17.7	4.0	37.7	20.9	11.7
pZUF6S-E3WT #7-3	0.0	26.7	4.2	36.0	21.4	11.7
pZUF6S-E3WT #7-4	0.0	28.1	4.3	37.0	16.9	13.6
pZUF6S-E3WT #7-5	8.3	17.0	4.7	36.7	21.2	12.1
pZUF6S-E3WT #7-6	8.0	18.0	4.8	36.3	20.8	12.1

【0 7 1 5】

サンプルのいくつか(斜体の太字でラベルした)は、期待される読み取りから外れていた。具体的には Y 2 0 3 1 + p Z U F 6 S - E 3 W T # 3 - 3 または Y 2 0 3 1 + p Z U F 6 S - E 3 W T # 5 - 6 のいずれも G L A を生成しなかった。同様に Y 2 0 3 1 + p Z U F 6 S - E 3 W T # 7 - 1、# 7 - 3、および # 7 - 4 は G C エラーを有し、1 6 : 0 および 1 6 : 1 のピークが G C によって単一ピークとして読み取られた。これらの様々な結果を受けて、表 5 0 は、対照および E L O 3 を発現する形質転換体株中の平均脂質を報告する。具体的には表 5 0 は表 4 9 中の脂肪酸プロファイルからの平均を示すが、表 4 9 中で不正確であるとして斜体の太字で示唆した行は、これらの平均を計算する際に含めなかった。「全 C 1 6」が 1 6 : 0 および 1 6 : 1 の平均面積の合計を表すのに対し、「全 C 1 8」は 1 8 : 0、1 8 : 1、1 8 : 2、および G L A の平均面積の合計を反映する。

【0716】

【表59】

表 50

M. アルピナ ELO3 を過剰発現するように遺伝子操作された
ヤロウィア Y2031 株の平均脂質組成

Y. リポリティカ Y2031 株形質転換体	平均脂肪酸組成(全脂肪酸の%)						全 C16	全 C18
	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	GLA		
pZUF6S(対照)	9.4	23.1	1.3	39.3	19.5	6.9	32.4	67.1
pZUF6S-E3WT #3	8.7	18.3	4.1	37.1	20.0	11.8	27.0	73.0
pZUF6S-E3WT #5	8.9	17.2	4.0	37.6	21.0	11.4	26.1	73.9
pZUF6S-E3WT #6	9.1	17.5	4.6	36.3	20.5	12.1	26.5	73.5
pZUF6S-E3WT #7	8.1	17.6	4.5	36.9	21.0	12.0	25.6	74.4

10

【0717】

上で報告されるデータに基づいて、*M. アルピナ* (*alpina*) ELO3 の過剰発現は、ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) Y2031 株中で *M. アルピナ* (*alpina*) $\Delta 6$ デサチュラーゼと同時発現すると、*M. アルピナ* (*alpina*) $\Delta 6$ デサチュラーゼのみを過剰発現する Y2031 対照株と比べて、C18 の百分率増大および C16 の百分率低下をもたらした。これは *M. アルピナ* (*alpina*) ELO3 が、確かに C_{16/18} 脂肪酸エロンガーゼであったことを示唆した。

20

【0718】

実施例 25

パーセント PUFA を増大させるヤロウィア (*Yarrowia*) C_{16/18} 脂肪酸エロンガーゼ「YE2」

本実施例は、Y. リポリティカ (*lipolytica*) C_{16/18} 脂肪酸エロンガーゼ（「YE2」、配列番号 74）を同時発現するように形質転換されたヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) Y2031 株（実施例 13）における、増大する GLA 生合成および蓄積について述べる。YE2 エロンガーゼは、所望の PUFA、すなわち EPA 生成を増大する手段として、炭素流動を遺伝子操作された $\Delta 6$ デサチュラーゼ/ $\Delta 6$ エロンガーゼ経路または $\Delta 9$ エロンガーゼ/ $\Delta 8$ デサチュラーゼ経路のどちらかに進めることができると考察される。例えばこの C_{16/18} 脂肪酸エロンガーゼを含んでなるキメラ遺伝子は、例えば Y2088、Y2089、Y2090、Y2095、Y2096、Y2102、Y2201 および／または Y2203 株中に容易に導入される。

30

【0719】

ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) C_{16/18} 脂肪酸エロンガーゼ配列の同定

40

クエリー配列としてラット Elo2 C_{16/18} 脂肪酸エロンガーゼタンパク質配列（ジェンバンク登録番号 AB071986、配列番号 64）を使用して、アラインメントによって Y. リポリティカ (*lipolytica*) からの新規脂肪酸エロンガーゼ候補を同定した。具体的にはこの rElo2 クエリー配列を使用して、ジェンバンクおよび「酵母菌プロジェクト・ジェノレビュー（Genolevures）」（バイオインフォマティクス・センター、LaBRI、フランス国タランスセデックス（Talence Cedex））の公共 Y. リポリティカ (*lipolytica*) タンパク質データベースを検索した（ドゥジョン（Dujon），B. ら著、Nature 430（6995）：35～44 頁（2004 年）も参照されたい）。これは相同配列であるジェンバンク登録番号 CAG77901（配列番号 74 および 75、「無名タンパク質生成物」と注釈される

50

) の同定をもたらした。この遺伝子を Y E 2 と命名した。

【0720】

B L A S T アルゴリズム (アルトシュール (A l t s c h u l), S. F. 著、N u c l e i c A c i d s R e s. 25: 3389~3402 頁 (1997 年)) を使用した、ヤロウィア (Y a r r o w i a) Y E 2 アミノ酸配列と公共データベースとの比較は、最もよく似ている既知のアミノ酸配列が、有望な脂肪酸エロンガーゼとして注釈されるカンジダ・アルビカンス (C a n d i d a a l b i c a n s) S C 5314 (配列番号 76、ジェンバンク登録番号 E A L 04510) からのものであることを明らかにした。タンパク質は約 40% の同一性を共有し、7 e - 61 の E 値で 236 をスコアした。

【0721】

ヤロウィア (Y a r r o w i a) Y E 2 遺伝子の単離

テンプレートとしてヤロウィア (Y a r r o w i a) ゲノム DNA を、およびプライマーとしてオリゴヌクレオチド Y L 597 および Y L 598 (配列番号 330 および 331) を使用して、Y E 2 遺伝子のコード領域を P C R によって増幅した。一般方法で述べられるようにして、P C R 反応を 50 μ L の全容積で実施した。サーモサイクラー条件を次のように設定した。95 $^{\circ}$ C で 1 分間、56 $^{\circ}$ C で 30 秒間、72 $^{\circ}$ C で 1 分間を 35 サイクルと、それに続く 72 $^{\circ}$ C で 10 分間の最終延長。Y E 2 コード領域の P C R 生成物を精製して N c o I / N o t I で消化し、次に N c o I / N o t I 消化 p Z K U G P Y E 1 - N とライゲートして (下記の実施例 26、図 21C の配列番号 162 も参照されたい)、p Z K U G P Y E 2 (図 21D、配列番号 163) を生じさせた。「A T G」翻訳開始コドン周辺への N c o I 部位の添加は、Y E 2 の第 2 のアミノ酸を L から V に変化させた。

【0722】

p Z K U G P Y E 2 の C l a I / N o t I 断片 (G P A T プロモーターおよび Y E 2 コード領域を含有する) および A c o ターミネーターを含有する N o t I / P a c I 断片 (A C O 3' ターミネーターをプライマー Y L 325 および Y L 326 [配列番号 402 および 403] で増幅し次に N o t I / P a c I で消化して、P C R によって調製された) を C l a I / P a c I 消化ベクター p Z U F 6 S と一方向性にライゲートし、p Z U F 6 Y E 2 を生成した。p Z K U T 16 の C l a I / N c o I 断片 (T E F プロモーターを含有する) および p Z U F 6 Y E 2 の N c o I / P a c I 断片 (Y E 2 のコード領域および A c o ターミネーターを含有する) を引き続いて C l a I / P a c I 消化ベクター p Z U F 6 S と一方向性にライゲートし、p Z U F 6 T Y E 2 (配列番号 164) を生成した。

【0723】

Y E 2 を過剰発現する形質転換 Y. リポリティカ (l i p o l y t i c a) 中の脂質組成の分析

プラスミド p Z U F 6 S (図 21A、配列番号 160) および p Z U F 6 T Y E 2 (配列番号 164) を使用して、ヤロウィア (Y a r r o w i a) Y 2031 株を別々に形質転換した。これらの 2 つのプラスミドの構成要素については、表 51 および 52 で述べられる。

【0724】

10

20

30

【表 6 0】

表 51

プラスミド pZUF6S(配列番号 160)の説明

配列番号 160 内の 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/ClaI (3114~4510)	ヤロウィア自律複製配列 18(ARS18、ジェンバンク登録番号 M91600)
Sall/PacI (6022~4530)	ヤロウィア Ura3 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AJ306421)
EcoRI/BsiWI (6063~318)	以下を含んでなる FBAIN::Δ6S::Pex20 ● FBAIN:FBAIN プロモーター(配列番号 177) ● Δ6S: モルティエラ・アルピナ由来コドン最適化 Δ6 デサチュラーゼ遺伝子(配列番号 3)、(ジェンバンク登録番号 AF465281) ● Pex20: ヤロウィア Pex20 遺伝子からの Pex20 ターミナー配列(ジェンバンク登録番号 AF054613)

10

20

【0 7 2 5】

【表 6 1】

表 52

プラスミド pZUF6TYE2(配列番号 164)の説明

配列番号 164 内の 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/ClaI (7461~8857)	ヤロウィア自律複製配列 18(ARS18、ジェンバンク登録番号 M91600)
Sall/PacI (1907~415)	ヤロウィア Ura3 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AJ306421)
EcoRI/BsiWI (1948~4665)	pZUF6(前出)について述べられるのと同様の FBAIN:: Δ6S::Pex20
ClaI/PacI (8857~415)	以下を含んでなる TEF::YE2::Aco ● TEF:TEF プロモーター(ジェンバンク登録番号 AF054508) ● YE2: ヤロウィア YE2 遺伝子のコード領域(配列番号 74、ジェンバンク登録番号 CAG77901) ● Aco: ヤロウィア Aco3 遺伝子の Aco3 ターミナー配列(ジェンバンク登録番号 AJ001301)

30

40

【0 7 2 6】

一般方法に従って、Y. リポリティカ (l i p o l y t i c a) Y 2 0 3 1 株 (実施例 1 3) をプラスミド p Z U F 6 S (対照) およびプラスミド p Z U F 6 T Y E 2 で形質転換した。形質転換体を液体 MM 中で 2 日間生育させた。(一般方法で述べられるような) G C 分析に基づいた、p Z U F 6 S または p Z U F 6 Y E 2 をそれぞれ含有する 8 個のコ

50

ロニーの脂肪酸プロファイルを下の表 5 3 に示す。脂肪酸は、16:0（パルミチン酸）、16:1（パルミトレイン酸）、18:0、18:1（オレイン酸）、18:2（L A）、および G L A と同定され、それぞれの組成は全脂肪酸の % として表される。

【0727】

【表62】

表 53

pZUF6S および pZUF6TYE2 で形質転換された
ヤロウィア Y2031 株の脂肪酸組成の比較

Y.リポリチカ Y2031 株形質転換体	脂肪酸組成(全脂肪酸の%)					
	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	GLA
pZUF6S #1(対照)	15.4	13.8	2.5	34.1	16.8	8.3
pZUF6S #2(対照)	15.2	12.8	3.0	36.5	16.4	8.3
pZUF6S #3(対照)	15.1	12.2	3.2	36.5	17.1	8.5
pZUF6S #4(対照)	15.2	12.8	3.1	36.3	16.6	8.4
pZUF6S #5(対照)	14.9	10.9	3.6	37.4	18.0	8.7
pZUF6S #6(対照)	14.8	10.1	4.2	37.6	18.7	8.6
pZUF6S #7(対照)	14.7	11.9	3.0	36.0	17.8	9.1
pZUF6S #8(対照)	14.9	12.6	2.9	35.9	17.3	8.8
平均	15.0	12.1	3.2	36.3	17.3	8.6
pZUF6TYE2 #1	13.1	8.4	4.4	42.4	16.8	9.7
pZUF6TYE2 #2	13.1	7.6	5.3	40.8	18.6	9.8
pZUF6TYE2 #3	13.5	8.1	4.6	39.2	19.0	10.6
pZUF6TYE2 #4	13.4	7.4	5.7	39.9	18.7	9.8
pZUF6TYE2 #5	13.4	8.4	5.5	45.2	14.3	7.6
pZUF6TYE2 #6	13.4	7.4	5.5	39.3	19.2	10.5
pZUF6TYE2 #7	13.4	8.6	4.4	40.6	17.9	9.9
pZUF6TYE2 #8	13.2	7.5	5.4	41.2	18.0	9.7
平均	13.3	8.0	5.0	41.1	17.8	9.7

【0728】

G C 分析は、p Z U F 6 S による Y 2 0 3 1 形質転換体中で、全脂質の約 27.1% の C 16（C 16:0 および C 16:1）および 62.2% の C 18（C 18:0、C 18:1、C 18:2 および G L A）が生成し、p Z U F 6 T Y E 2 による Y 2 0 3 1 形質転換体中で、約 21.3% の C 16 および 73.6% の C 18 が生成したことを示した。したがって p Z U F 6 T Y E 2 形質転換体中では C 16 の総量が約 21.4% 低下し、C 18 の総量は約 18% 増大した（p Z U F 6 S での形質転換体と比較して）。これらのデータは、ヤロウィア（Y a r r o w i a）中で Y E 2 が C_{16/18} 脂肪酸エロンガーゼとして機能して、C 18 脂肪酸を生成することを実証した。さらに p Z U F 6 S 形質転換体中で生成した G L A に比べて、p Z U F 6 T Y E 2 形質転換体中では約 12.8% より多くの G L A が生成した。これらのデータは、Y E 2 エロンガーゼが炭素流動を遺伝子操作された P U F A 経路に進めて、より多くの最終生成物（すなわち G L A）を生成できることを提案した。

【0729】

実施例 26

パーセント P U F A を増大させるヤロウィア（Y a r r o w i a）C_{14/16} 脂肪酸エロン

10

20

30

40

50

ガーゼ「YE1」

本実施例は、Y. リポリティカ (*lipolytica*) C_{14/16} 脂肪酸エロンガーゼ (「YE1」、配列番号77) を同時発現するように形質転換された、Y. リポリティカ (*lipolytica*) Y2031株 (実施例13) 中の増大するGLA生合成および蓄積について述べる。YE1エロンガーゼは、所望のPUFA、すなわちEPA生成を増大する手段として、炭素流動を遺伝子操作されたΔ6デサチュラーゼ/Δ6エロンガーゼ経路またはΔ9エロンガーゼ/Δ8デサチュラーゼ経路のどちらかに進めることができると考察される。具体的には、このC_{14/16}脂肪酸エロンガーゼ含んでなるキメラ遺伝子を例えばY2088、Y2089、Y2090、Y2095、Y2096、Y2102、Y2201および/またはY2203株中に容易に導入できる。

10

【0730】

ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) C_{14/16} 脂肪酸エロンガーゼ配列の同定

実施例25で使用したと同様の様式で、クエリー配列としてラットElo2 C_{16/18} 脂肪酸エロンガーゼタンパク質配列 (ジェンバンク登録番号AB071986、配列番号64) を使用して、アラインメントによって、ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) からの新規脂肪酸エロンガーゼ候補を同定した。これは相同配列であるジェンバンク登録番号CAG83378 (配列番号77および78、「無名タンパク質生成物」と注釈される) の同定をもたらした。この遺伝子を「YE1」と命名した。

20

【0731】

BLASTアルゴリズム (アルトシュール (Altschul), S. F. ら著、*Nucleic Acids Res.* 25:3389~3402頁 (1997年)) を使用した、ヤロウィア (*Yarrowia*) YE1アミノ酸配列と公共データベースとの比較は、最もよく似ている既知の配列が、有望な脂肪酸エロンガーゼであり、YE1と約60%の同一性を共有するニューロスポラ・クラッサ (*Neurospora crassa*) (ジェンバンク登録番号CAD70918、配列番号79) からのFEN1であることを明らかにした。

【0732】

ヤロウィア (*Yarrowia*) YE1 遺伝子の単離

30

YE1 遺伝子 (配列番号77) のDNA配列は、内部NcoI部位を有する。YE1 遺伝子の「ATG」翻訳開始コドン周辺にヤロウィア (*Yarrowia*) 翻訳モチーフを組み込むために、二段階ストラテジーを用いて、ヤロウィア (*Yarrowia*) からのYE1 遺伝子全体をPCRした。具体的にはテンプレートとしてヤロウィア (*Yarrowia*) ゲノムDNAを使用して、プライマーとしてオリゴヌクレオチドYL567およびYL568 (配列番号332および333) を使用して、YE1の最初の半分をPCRによって増幅する一方、YE1 遺伝子の残り半分は、プライマーとしてオリゴヌクレオチドYL569およびYL570 (配列番号334および335) を使用して、同様に増幅した。一般方法で述べられるようにして、PCR反応を50 μLの全容積で実施した。サーモサイクラー条件を次のように設定した。95℃で1分間、56℃で30秒間、72℃で1分間を35サイクルと、それに続く72℃で10分間の最終延長。YE1の5'部分に対応するPCR生成物を精製し、次にNcoIおよびSacIで消化してYE1-1断片を生じさせる一方、YE1の3'部分のPCR生成物を精製し、SacIおよびNotIで消化してYE1-2断片を生じさせた。YE1-1およびYE1-2断片をNcoI/NotI消化pZKUGPE1S (前出、実施例9) と直接ライゲートして、pZKUGPYE1 (図22A、配列番号165) を生じさせた。次にテンプレートとしてpZKUGPYE1、およびプライマーとしてオリゴヌクレオチドYL571およびYL572 (配列番号336および337) を使用して、YE1の内部NcoI部位を部位特異的変異誘発によって変異させ、pZKUGPYE1-N (配列番号162) を生じさせた。配列分析は、突然変異がYE1のアミノ酸配列を変化させなかったことを示した。ATG翻

40

50

訳開始コドン周辺へのNcoI部位の添加は、YE1の第2のアミノ酸をSからAに変化させた。

【0733】

pZUF5T-PPCのClaI/NcoI断片(FBAINプロモーターを含有する)およびpZKUGPYE1-NのNcoI/PacI断片(YE1のコード領域およびAcoターミネーターを含有する)をClaI/PacI消化ベクターpZUF6Sと一方向性にライゲートして、pZUF6FYE1(配列番号166)を生成した。

【0734】

YE1を過剰発現する形質転換体Y. リポリティカ(lipolytica)中の脂質組成の分析

一般方法に従って、プラスミドpZUF6およびpZUF6FYE1(配列番号166)を使用して、ヤロウィア(Yarrowia)Y2031株(実施例13から)を別々に形質転換した。対照プラスミドpZUF6S(図21A、配列番号160、FBAIN::D6S::Pex20キメラ遺伝子を含んでなる)の構成要素については実施例25で述べられる。pZUF6FYE1の構成要素(図22B、配列番号166、FBAIN::D6S::Pex20キメラ遺伝子およびFBAIN::YE1::Acoキメラ遺伝子を含んでなる)については、下の表54で述べられる。

【0735】

【表63】

表 54

プラスミド pZUF6FYE1(配列番号 166)の説明

配列番号 166 内の 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/ClaI (7047~8445)	ヤロウィア 自律複製配列 18(ARS18、ジェンバンク登録 番号 M91600)
Sall/PacI (1493~1)	ヤロウィア Ura3 遺伝子(ジェンバンク登録番号 AJ306421)
EcoRI/BsiWI (1534~4251)	pZUF6(前出、実施例 25)について述べられるのと同様の FBAIN::Δ6S::Pex20
ClaI/PacI (8443~1)	以下を含んでなる FBAIN::YE1::Aco ● FBAIN:FBAIN プロモーター(配列番号 177) ● YE1: ヤロウィア YE1 遺伝子のコード領域(配列番号 77、ジェンバンク登録番号 CAG83378) ● Aco: ヤロウィア Aco3 遺伝子からの Aco3 ターミネーター 配列(ジェンバンク登録番号 AJ001301)

【0736】

形質転換に続いて、形質転換体をアミノ酸で栄養強化された合成MM中で2日間、続いてHGM中で4日間生育させた。(一般方法で述べられるような)GC分析に基づいた、pZUF6Sを含有する6個のクローン、およびpZUF6FYE1を含有する5個のクローンの脂肪酸プロファイルを下の表55に示す。脂肪酸は、16:0(パルミチン酸)、16:1(パルミトレイン酸)、18:0、18:1(オレイン酸)、18:2(LA)、およびGLAとして同定され、それぞれの組成は全脂肪酸の%として表される。

【0737】

【表 6 4】

表 55
pZUF6S および pZUF6FYE1 で形質転換した
ヤロウィア Y2031 株脂肪酸組成の比較

形質転換体	脂肪酸組成(全脂肪酸の%)				
	16:0	16:1	18:1	18:2	GLA
pZUF6S #1(対照)	12.9	18.2	29.6	23.5	10.7
pZUF6S #2(対照)	12.6	18.6	29.6	23.8	10.3
pZUF6S #3(対照)	13.0	17.8	29.8	23.9	10.6
pZUF6S #4(対照)	13.1	18.9	30.1	22.3	10.3
pZUF6S #5(対照)	13.0	17.8	29.6	23.4	10.9
pZUF6S #6(対照)	12.0	18.7	30.4	23.2	10.4
平均	12.8	18.3	29.9	23.4	10.5
pZUF6FYE1 #1	17.4	21.9	20.4	19.2	16.9
pZUF6FYE1 #2	16.7	22.8	21.1	19.1	16.1
pZUF6FYE1 #3	19.8	20.7	22.8	17.0	15.8
pZUF6FYE1 #4	16.8	22.4	23.7	16.1	16.8
pZUF6FYE1 #5	17.7	21.6	21.2	18.0	17.2
平均	17.7	21.9	21.9	17.9	16.5

【0738】

GC 分析は、pZUF6S による Y2031 形質転換体中で全脂質の約 31.1% の C16 (C16:0 + C16:1) が生成した一方、pZUF6FYE1 による Y2031 形質転換体中では約 39.6% の C16 が生成したことを測定した。pZUF6S による形質転換体と比べて、pZUF6FYE1 形質転換体中では C16 の総量が約 26.7% 増大した。したがってこれらのデータはヤロウィア (Yarrowia) 中で YE1 が C_{14/16} 脂肪酸エロンガーゼとして機能し、C16 脂肪酸を生成することを実証した。さらに pZUF6FYE1 形質転換体中では pZUF6S 形質転換体中よりも 57% より多くの GLA が生成し、YE1 エロンガーゼが、炭素流動を遺伝子操作された経路に進めて、より多くの最終生成物 (すなわち GLA) を生成することを提案した。

【0739】

実施例 27

パーセント PUFA を増大させるヤロウィア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) の CPT1 過剰発現

本実施例は、Y. リポリティカ (lipolytica) CPT1 cDNA (配列番号 122) を過剰発現するように形質転換された、ヤロウィア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) Y2067U 株 (実施例 4) における増大する EPA 生合成および蓄積について述べる。EPA 合成をもたらし PUFA もまた増大した。Δ6 デサチュラーゼ/Δ6 エロンガーゼ経路または Δ9 エロンガーゼ/Δ8 デサチュラーゼ経路のどちらかを通じて EPA を生成するように遺伝子操作された Y. リポリティカ (lipolytica) 宿主株は、Y. リポリティカ (lipolytica) CPT1 が、(例えば Y2088、Y2089、Y2090、Y2095、Y2096、Y2102、Y2201 および/または Y2203 株中で) 同様に同時発現されれば、増大する EPA 生合成および蓄積を実証できることが考察される。

【0740】

10

20

30

40

50

Y. リポリティカ (lipolytica) 株 ATCC # 20326 cDNA を以下の手順を使用して調製した。細胞を 200 mL の YPD 培地 (2 % バクトイースト抽出物、3 % バクトペプトン、2 % グルコース) 中で 1 日間 30 °C で生育させ、次にベックマン (Beckman) GH3. 8 ローター内で 3750 rpm で 10 分間の遠心分離によってペレット化し、HGM で 2 回洗浄した。洗浄した細胞を 200 mL の HGM に再懸濁し、さらに 4 時間 30 °C で生育させた。次に細胞を 3750 rpm で 10 分間の遠心分離によって 4 × 50 mL 試験管内に採取した。

【0741】

キアゲン (Qiagen) RNeasy 全 RNA ミディ (Mid) キットを使用して全 RNA を単離した。細胞を破壊するために、採取した細胞を 4 × 600 μL のキット緩衝液 RLT (製造業者の指定通りに β-メルカプトエタノールで栄養強化した) に再懸濁し、4 本の 2 mL ネジ口試験管内で、等容積の 0.5 mm ガラスビーズと混合した。バイオスペック (Biospec) ミニビーズビーターを使用して、均質化設定で細胞を 2 分間破壊した。追加的な 4 × 600 μL の緩衝液 RLT を添加した。ガラスビーズおよび細胞残骸を遠心分離によって除去し、製造業者のプロトコルに従って、上清を使用して全 RNA を単離した。

10

【0742】

キアゲンオリゴテックス (Qiagen Oligotex) mRNA 精製キットを使用して、製造業者のプロトコルに従って、上の全 RNA サンプルからポリ A (+) RNA を単離した。mRNA サンプルの純度を確証するために、単離されたポリ A (+) RNA を同一キットでさらにもう 1 回精製した。最終精製ポリ (A) + RNA は 30.4 ng / μL の濃度を有した。

20

【0743】

第 1 の cDNA 鎖合成のために使用される PCR サーマサイクラー条件が、95 °C で 20 秒間と、それに続く 95 °C で 5 秒間および 68 °C で 6 分間を 20 サイクルに設定されたこと以外は、実施例 19 で述べられるようにして、BD クローンテック (BD-Clontech) が指定する LD-PCR 法、および 0.1 μg のポリ A (+) RNA サンプルを使用して cDNA を生じさせた。PCR 生成物は、アガロースゲル電気泳動法および臭化エチジウム染色によって定量化した。

【0744】

30

Y. リポリティカ (lipolytica) CPT1 cDNA を次のようにしてクローンした。プライマー CPT1-5'-NcoI および CPT1-3'-NotI (配列番号 338 および 339) を使用して、PCR によって、Y. リポリティカ (lipolytica) の cDNA から Y. リポリティカ (lipolytica) ORF を増幅した。反応混合物は、0.5 μL の cDNA、各 0.5 μL のプライマー、11 μL の水、および日本国滋賀県大津市 520-2193 のタカラバイオからの 12.5 μL の ExTaq プレミクス 2 × Taq PCR 溶液を含有した。増幅を次のように実施した。94 °C で 300 秒間の初期変性と、それに続く 94 °C で 30 秒間の変性、55 °C で 30 秒間のアニーリング、および 72 °C で 60 秒間の延長を 30 サイクル。最終延長サイクルを 72 °C で 10 分間実施し、4 °C で反応終結がそれに続いた。約 1190 bp の DNA 断片が PCR 反応から得られた。それをキアゲン (キアゲン (Qiagen)) の PCR 精製キットを使用して、製造業者のプロトコルに従って精製した。精製された PCR 生成物を NcoI および NotI 消化し、遺伝子が Y. リポリティカ (lipolytica) FBAIN プロモーターおよび PEX20-3' ターミネーター領域の制御下にあるように、NcoI-NotI 切断 pZUF17 ベクター (配列番号 143; 図 11D) 中にクローンした。正確な形質転換体をミニプレップ分析によって確認し、得られたプラスミドを「pYCPT1-17」(配列番号 167) と命名した。

40

【0745】

キメラ FBAIN::CPT1::PEX20 遺伝子をヤロウィア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) のゲノム中に組み込むために、pYCPT1-

50

17をNcoIおよびNotIで消化してプラスミドpYCPT1-ZP217を作り出し、CPT1 ORFを含有する約1190bpの断片を単離した。次にこの断片をNcoIおよびNotIで消化したpZP217+Ura（配列番号168）中にクローンした。図22Cに示すように、プラスミドpZP217+Uraは、キメラTEF：：合成 Δ 17デサチュラーゼ（Y. リポリティカ（lipolytica）のためにコドン最適化された）：：Pex20-3' 遺伝子、および選択マーカーとして使用するためのUra3遺伝子を含んでなる、Y. リポリティカ（lipolytica）組み込みプラスミドである。正確な形質転換体をミニプレップ分析によって確認し、得られたプラスミドを「pYCPT1-ZP217」（配列番号169）と命名した。

【0746】

一般方法に従って、Y. リポリティカ（lipolytica）Y2067U株（実施例4から）をBssHII/BbuI消化pYCPT1-ZP217およびpZUF-MOD-1（前出、実施例20）によってそれぞれ形質転換した。形質転換体をアミノ酸で栄養強化された合成MM中で2日間、続いてHGM中で4日間生育させた。（一般方法で述べられるような）GC分析に基づいた、pZUF-MOD-1を含有する2つの形質転換体、およびゲノム中にpYCPT1-ZP217が組み込まれた4つの形質転換体の脂肪酸プロファイルを下の表に示す。脂肪酸は18:0、18:1（オレイン酸）、18:2（LA）、GLA、DGLA、ARA、ETA、およびEPAとして同定され、それぞれの組成は全脂肪酸の%として表される。

【0747】

【表65】

表 56

Y.リポリティカCPT1を過剰発現するように遺伝子操作された
ヤロウィアY2067U 株の脂質組成

株	全脂肪酸							
	18:0	18:1	18:2	GLA	DGLA	ARA	ETA	EPA
Y2067U+pZUF-MOD-1 #1	1.3	6.9	12.0	23.1	5.7	1.1	3.8	13.2
Y2067U+pZUF-MOD-1 #2	1.4	6.8	12.1	22.0	5.8	1.1	3.8	13.5
Y2067U+pYCPT1-ZP217 #1	0.6	8.0	8.2	27.4	7.1	1.6	4.1	15.7
Y2067U+pYCPT1-ZP217 #2	0.6	8.1	8.2	27.2	7.0	1.6	4.0	15.7
Y2067U+pYCPT1-ZP217 #3	1.0	7.9	8.0	24.7	6.1	1.6	3.2	15.5
Y2067U+pYCPT1-ZP217 #4	0.6	7.1	8.6	25.5	6.9	1.8	4.0	16.0

【0748】

上に示されるように、ゲノム組み込みによる、強力なFBAINプロモーター制御下にあるY. リポリティカ（lipolytica）CPT1の発現は、%EPAを「対照」株中の13.4%から15.7～16%に増大させた。さらにGLA、DGLA、およびARAレベルもまた増大した。

【0749】

実施例28

パーセントPUFAを増大させるサッカロミセス・セレヴィシエ（Saccharomyces cerevisiae）ISC1

本実施例は、S. セレヴィシエ（cerevisiae）ISC1遺伝子（配列番号124）を同時発現するように形質転換された、ヤロウィア・リポリティカ（Yarrowia lipolytica）M4株（実施例4）における増大するEPA生合成および蓄積について述べる。 Δ 6デサチュラーゼ/ Δ 6エロンガーゼ経路または Δ 9エロンガーゼ/ Δ 8デサチュラーゼ経路のどちらかを通じてEPAを生成するように遺伝子操作され

たY. リポリティカ (lipolytica) 宿主株は、S. セレヴィシエ (cerevisiae) ISC1が (例えばY2088、Y2089、Y2090、Y2095、Y2096、Y2102、Y2201および／またはY2203株中で) 同様に同時発現されれば、増大するEPA生合成および蓄積を実証できることが考察される。

【0750】

S. セレヴィシエ (cerevisiae) ISC1 ORFを次のようにしてプラスミドpZP217+Ura中にクローンした。最初にウィスコンシン州マディソンのプロメガ (Promega (Madison, WI)) からのS. セレヴィシエ (cerevisiae) 株S288CからのゲノムDNA、およびプライマーペアIsc1FおよびIsc1R (配列番号340および341) を使用して、ORFをPCR増幅した。NcoI部位を組み込み、それによってISC1をフレーム内に留めることが必要であったために、プライマーIsc1Fは、増幅されたORF中でISC1の野生型5'配列を「ATGTACAA」から「ATGGACAA」に変性した。増幅を次のように実施した。94℃で120秒間の初期変性と、それに続く94℃で30秒間の変性、50℃で30秒間のアニーリング、および68℃で120秒間の延長を35サイクル。最終延長サイクルを68℃で10分間実施し、4℃での反応終結がそれに続いた。1455bpのDNA断片がISC1のPCR反応から得られ、カリフォルニア州カールズバッドのインビトロジェン (Invitrogen (Carlsbad, CA)) からの1%アガロースゲル (120Vで30分間) および1kBのDNA標準ラダーを使用した電気泳動法によって、PCR生成物サイズを確認した。

【0751】

カリフォルニア州オレンジのザイモ・リサーチ社 (Zymo Research Corporation (Orange, CA)) からのDNAクリーン&コンセントレーター5 (Clean & Concentrator-5) キットを使用して、製造業者の使用説明書に従ってDNAを精製し、次にNcoI/NotIで消化した。次にISC1断片を個別にpZP217+Ura (配列番号168、図22C) 中にクローンし、NcoIおよびNotIで消化した。正確な形質転換体をゲル電気泳動法によって確認し、得られたプラスミドを「pTEF::ISC1」 (配列番号170) と命名した。したがってこのプラスミドは、3'-POX2、URA3、TEF::ISC1::Pex20、およびPOX2プロモーター領域を含んでなるDNAカセットを含有した。

【0752】

「対照」ベクターを次のようにして調製した。最初にS. セレヴィシエ (cerevisiae) S288C株からのゲノムDNA、およびプライマーペアPcl1FおよびPcl1R (配列番号342および343) を使用して、S. セレヴィシエ (cerevisiae) pcl1 ORF (有糸分裂細胞サイクルへの侵入および形態形成制御に関するタンパク質をコードする) をPCR増幅した。上述のように増幅を実施した。pcl1のPCR反応から861bpのDNA断片が得られた (電気泳動法によって確認された、前出)。DNAクリーン&コンセントレーター5 (Clean & Concentrator-5) キットを使用してDNAを精製し、次にNcoI/NotIで消化した。次に断片を同様に消化されたpZP217+Ura中にクローンした。正確な形質転換体をゲル電気泳動法によって確認し、得られたプラスミドを「pTEF::pcl1」と命名した。次にプラスミドpTEF::pcl1をHincIIで消化して、pcl1 ORFを除去した。残りのプラスミドをAscI/SphIでの消化に際して、3'-POX2、URA3、TEF::Pex20およびPOX2プロモーター領域を含んでなる直鎖DNAカセットがもたらされるように、再度ライゲートした。

【0753】

コンピテントY. リポリティカ (lipolytica) M4株細胞 (実施例4から) をAscI/SphI消化pTEF::ISC1および「対照」でそれぞれ形質転換した (各5μgのプラスミドが消化された)。ザイモ・リサーチ (Zymo Research) からのフロズン (Frozen) EZ酵母形質転換IIキットを使用して形質転換

を達成し、アミノ酸なしのYNB（6.7 g/L、メリーランド州スパークスのベクトン・ディキンソン社（Becton, Dickinson & Co. (Sparks, MD)）〔カタログ番号291940〕）、グルコース（20 g/L）、および寒天（20 g/L）を含んでなるプレート上で形質転換体を選択した。数百個の形質転換体コロニーが得られた。5個の独立したISC1の形質転換体からのゲノムDNAを使用して、ヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）POX2遺伝子座中への各DNAカセットの組み込みをPCRによって確認した。

【0754】

形質転換体を2%グルコースを含有するアミノ酸非含有YNB中で2日間生育させた。細胞を遠心分離によって採取し、100 g/Lデキストロース、2 g/LのMgSO₄、およびpH 6.5の50 mMリン酸緩衝液を含んでなる培地に再懸濁して、さらに5日間生育させた。0.75 mLの各培養からの細胞を遠心分離によって採取して、それらの脂肪酸組成を分析した。（一般方法で述べられるような）GC分析に基づいた、「対照」ベクターを含んでなる3つの形質転換体およびpTEF::ISC1を含んでなる5つの形質転換体の脂肪酸プロファイルを下に示す。脂肪酸は、16:0、16:1、18:0、18:1（オレイン酸）、18:2（LA）、GLA、DGLA、ARA、ETA、およびEPAとして同定され、それぞれの組成は全脂肪酸の%として表される。

【0755】

【表66】

表 57

S.セレビシエISC1を過剰発現するように遺伝子操作された
ヤロウィアM4株の脂質組成

株	全脂肪酸									
	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	GLA	DGLA	ARA	ETA	EPA
M4+「対照」	14.7	7.2	2.1	13.5	8.7	21.8	8.9	0.9	4.1	9.3
M4+pTEF::ISC1	13.5	8.5	1.7	15.6	8.1	21.3	7.5	0.7	3.9	10.7

【0756】

S.セレビシエ（*cerevisiae*）ISC1遺伝子の発現は、パーセントEPAを「対照」株中の9.3%から10.7%（「M4+pTEF::ISC1」）に改善し、14.5%の増大を示した。

【0757】

実施例 29

ヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）アシルトランスフェラーゼノックアウトの創出

本実施例は、PDAT、DGAT2、DGAT1、PDATおよびDGAT2、PDATおよびDGAT1、DGAT1およびDGAT2、またはPDAT、DGAT1およびDGAT2遺伝子のいずれかで中断された、ヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）の単一、二重、および三重ノックアウト株の創生について述べる。各ノックアウト株の遺伝子の中断が確認され、実施例30の全脂質のGC分析によって、脂肪酸含量および組成に対する各中断の分析が判定された。

【0758】

ヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）DGAT2遺伝子の標的を定めた中断

プラスミドpY21DGAT2と称される標的カセットによる内在性DGAT2遺伝子の相同的遺伝子組換え媒介置換によって、Y.リポリティカ（*lipolytica*）ATCC#90812中のDGAT2遺伝子の標的を定めた中断を実施した。pY21DGAT2は、プラスミドpY20から誘導された（図22D、配列番号171）。具体的

には pY21DGAT2 は、570bp の Hind III / Eco RI 断片を同様に直線化された pY20 中に挿入して作り出された。この 570bp の DNA 断片は (5' から 3' に向けて) 次を含有した。(配列番号 102 中のコード配列 (ORF) の) 位置 +1090 ~ +1464 の 3' 相同配列、(配列番号 102 中のコード配列 (ORF) の) 位置 +906 から +1089 の Bgl II 制限部位および 5' 相同配列。2 組の PCR プライマー P95 および P96 (配列番号 344 および 345)、そして P97 および P98 (配列番号 346 および 347) をそれぞれ使用して、PCR 増幅によって断片を調製した。

【0759】

pY21DGAT2 を Bgl II 制限酵素消化によって直線化し、一般方法に従って対数増殖中期の Y. リポリティカ (*lipolytica*) ATCC #90812 細胞中に形質転換した。YPD ハイグロマイシン選択プレート上に細胞を播種して、30℃ に 2 ~ 3 日間保った。

10

【0760】

14 個の Y. リポリティカ (*lipolytica*) ATCC #90812 ハイグロマイシン抵抗性コロニーが単離され、PCR によって標的を定めた中断についてスクリーニングした。1 対の PCR プライマー (P115 および P116 [配列番号 348 および 349]) をデザインし、相同的組換えに続いて特定の接合部断片を増幅した。別の 1 対の PCR プライマー (P115 および P112 [配列番号 350]) をデザインして、天然遺伝子を検出した。

20

【0761】

ATCC #90812 株の 14 個のハイグロマイシン抵抗性コロニー中の 2 個が、接合部断片について陽性であり、天然断片について陰性であった。したがってこれらの 2 菌株において標的を定めた組み込みが確認され、その 1 つを「S-D2」と命名した。

【0762】

ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) PDAT 遺伝子の標的を定めた中断

pLV13 (図 22E、配列番号 172) と称される標的カセットによる、内在性 PDAT 遺伝子の相同的組換え媒介置換によって、Y. リポリティカ (*Y. lipolytica*) ATCC #90812 における PDAT 遺伝子の標的を定めた中断を実施した。pLV13 はプラスミド pY20 (図 22D、配列番号 171) から誘導された。具体的には pY20 のハイグロマイシン抵抗性遺伝子をヤロウィア (*Yarrowia*) Ura3 遺伝子で置き換えて、プラスミド pLV5 を作り出した。次に、992bp の Bam HI / Eco RI 断片を同様に直線化された pLV5 に挿入して、pLV13 を作り出した。992bp の DNA 断片は、(5' から 3' に向けて) 次を含有した。(配列番号 89 中のコード配列 (ORF) の) 位置 +877 ~ +1371 の 3' 相同配列、Bgl II 制限部位、および (配列番号 89 中のコーディング配列 (ORF) の) 位置 +390 ~ +876 の 5' 相同配列。PCR プライマー P39 および P41 (配列番号 351 および 352)、そして P40 および P42 (配列番号 353 および 354) をそれぞれ使用して、PCR 増幅によって断片を調製した。

30

40

【0763】

pLV13 を Bgl II 制限消化によって直線化し、一般方法に従って対数増殖中期の Y. リポリティカ (*Y. lipolytica*) ATCC #90812 細胞中に形質転換した。細胞を Bio101 DOB / CSM-Ura 選択プレート上に播いて、2 ~ 3 日間 30℃ に保った。

【0764】

10 個の Y. リポリティカ (*Y. lipolytica*) ATCC #90812 コロニーが単離され、PCR によって標的を定めた中断についてスクリーニングした。1 対の PCR プライマー (P51 および P52 [配列番号 355 および 356]) をデザインし、標的カセットを増幅した。別の 1 対の PCR プライマー (P37 および P38 [配列番号

50

357および358]) をデザインし、天然遺伝子を検出した。10菌株中の10菌株が接合部断片について陽性であり、10菌株中の3菌株が天然断片について陰性であったので、これらの3菌株における標的を定めた組み込みの成功が確認された。これらの菌株の1つを「S-P」と命名した。

【0765】

ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) DGAT1 遺伝子の標的を定めた中断

縮重PCRプライマーP201およびP203 (それぞれ配列番号359および360) 、およびテンプレートとしてY. リポリティカ (*lipolytica*) ATCC#76982ゲノムDNAを使用して、PCRによって全長Y1 DGAT1 ORFをクローンした。Y1 DGAT1をコードするヌクレオチド配列が分かっていなかったので、縮重プライマーが必要であった。

10

【0766】

ロボサイクラー・グラディエント (RoboCycler Gradient) 40PCRマシン内でPCRを実施し、増幅を次のように実施した。95℃で1分間の初期変性と、それに続く95℃で30秒間の変性、55℃で1分間のアニーリング、および72℃で1分間の延長を30サイクル。最終延長サイクルを72℃で10分間実施し、4℃での反応終結がそれに続いた。アガロースゲル電気泳動法によって予期されたPCR生成物 (約1.6kB) を検出し、単離して精製し、インビトロジェン (Invitrogen) からのTOPO (登録商標) クローニングベクター中にクローンして、部分的に配列決定してその同一性を確認した。

20

【0767】

(上でDGAT2について述べられる方法を使用して) 内在性DGAT1 遺伝子の標的カセットとの相同的組換え媒介置換によって、Y. リポリティカ (*lipolytica*) ATCC#90812中の推定上のDGAT1 遺伝子の標的を定めた中断を実施した。具体的には1.6kBの単離されたY1 DGAT1 ORF (配列番号94) をPCRテンプレート分子として使用し、5' 相同的Y1 DGAT1 配列 (プライマーP214およびP215 (配列番号361および362) によって増幅された) 、ヤロウィア (*Yarrowia*) ロイシン2 (Leu2、ジェンバンク登録番号AAA35244) 遺伝子、および3' 相同的Y1 DGAT1 配列 (プライマーP216およびP217 (配列番号363および364) で増幅された) からなるY1 DGAT1 標的カセットを構築した。ストラタジーン (Stratagene) からのPfuウルトラポリメラーゼ (カタログ番号600630) および上述のサーモサイクラー条件による標的カセットの個々の各部分の増幅に続いて、各断片を精製した。PCRプライマーP214およびP219 (配列番号365) を使用した2回目のPCR反応のためのテンプレート分子として、3個の正確なサイズの精製断片を共に混合して、Y1 DGAT1 中断カセットを得た。

30

【0768】

標的カセットをゲル精製して使用し、対数増殖中期の野生型Y. リポリティカ (*lipolytica*) (ATCC#90812) を形質転換した。一般方法で述べられるようにして形質転換を実施した。形質転換体をBio101 DOB/CSM-Leu選択プレート上に播種して、30℃に2~3日間保った。いくつかのロイシン原栄養株をPCRによってスクリーンし、標的を定めたDGAT1 中断を確認した。具体的には1対のPCRプライマー (P226およびP227 [配列番号366および367]) をデザインして、中断カセットと天然標的遺伝子間の接合部を増幅した。別の1対のPCRプライマー (P214およびP217 [それぞれ配列番号361および364]) をデザインして、天然遺伝子を検出した。

40

【0769】

全てのロイシン原栄養株コロニーは、接合部断片について陽性であり、天然断片について陰性であった。したがってこれらの株において、標的を定めた組み込みが確認され、その1つを「S-D1」と命名した。

50

【0770】

PDA Tおよび／またはDGA T 2および／またはDGA T 1 遺伝子の中断を含有するヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 二重および三重ノックアウト株の創生

単一PDA T中断について述べられたようにして、Y. リポリティカ (*lipolytica*) ATCC # 90812 ハイグロマイシン抵抗性「S-D 2」突然変異体 (DGA T 2 中断を含有する) をプラスミド pLV13 (PDA T 中断を含有する) で形質転換し、PCRによって形質転換体をスクリーニングした。12個の形質転換体の内2つは、DGA T 2 およびPDA T 遺伝子の双方が中断されていることが確認された。これらの株の1つを「S-D 2-P」と命名した。

10

【0771】

同様にして、DGA T 1 およびPDA T (「S-D 1-P」)、DGA T 2 およびDGA T 1 (「S-D 2-D 1」) に二重ノックアウトがある株、DGA T 2、DGA T 1、およびPDA T (「S-D 2-D 1-P」) に三重ノックアウトがある株を作った。

【0772】

実施例 30

脂質含量を減少させパーセントPUFAを増大させるヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) アシルトランスフェラーゼノックアウト

本実施例は、脂肪酸含量および組成の変化によって測定される、野生型ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) およびEPAを生成するようにあらかじめ遺伝子操作されたY. リポリティカ (*lipolytica*) 株における、単一および／または二重および／または三重アシルトランスフェラーゼノックアウトの効果を分析する。 $\Delta 6$ デサチュラーゼ／ $\Delta 6$ エロンガーゼ経路または $\Delta 9$ エロンガーゼ／ $\Delta 8$ デサチュラーゼ経路のどちらかを通じてEPAを生成するように遺伝子操作されたY. リポリティカ (*lipolytica*) 宿主株は、宿主の天然アシルトランスフェラーゼに対する同様の操作が行われれば (例えばY2088、Y2089、Y2090、Y2095、Y2096、Y2102、Y2201および／またはY2203株内で)、増大するEPA生合成および蓄積を実証できることが考察される。

20

【0773】

アシルトランスフェラーゼ中断があるY. リポリティカ (*lipolytica*) ATCC # 90812 におけるTAG含量減少

30

最初に、野生型および次を含有する突然変異Y. リポリティカ (*lipolytica*) ATCC # 90812 中のTAG含量を比較した。(1) PDA T、DGA T 2、およびDGA T 1 中の単一中断、(2) PDA T およびDGA T 2、DGA T 1 およびPDA T、およびDGA T 1 およびDGA T 2 中の二重中断、および(3) PDA T、DGA T 2、およびDGA T 1 中の三重中断。

【0774】

具体的には、野生型および突然変異Y. リポリティカ (*lipolytica*) ATCC # 90812 (すなわちS-D 1、S-D 2、S-P、S-D 1-D 2、S-D 1-P、S-D 2-P、およびS-D 1-D 2-P株) を含有するプレートからのループ1つ分の細胞を3mLのYPD培地中にそれぞれ別々に接種して、振盪機 (300 rpm) 上で一晩30℃で生育させた。細胞を採取して0.9% NaClで1回洗浄し、50mLのHGMに再懸濁した。次に振盪機上で細胞を48時間生育させた。細胞を水で洗浄し、細胞ペレットを凍結乾燥した。TLC (下記) およびGC分析に続く、GC分析による全脂肪酸および油分画のために、20mgの乾燥細胞重量を使用した。

40

【0775】

TLCのために使用される方法は、以下の5段階で述べられる。1) 内部標準15:0 脂肪酸 (10 μ Lの10mg/mL) を2~3mgの乾燥細胞塊に添加し、メタノール／クロロホルム法を使用した総脂質の抽出がそれに続いた。2) 25~50 μ Lの微量ピペットを使用して、5×20cmシリカゲル60プレートの下端からおよそ1インチのどこ

50

ろに鉛筆で薄く描いた線を横切って、抽出した脂質（50 μ L）をブロットした。3）次にTLCプレートをN₂下で乾燥させ、約100mLの80：20：1のヘキサン：エチルエーテル：酢酸溶剤を含有するタンクに挿入した。4）バンドの分離後、プレートの片面にヨウ素蒸気を吹き付けてバンドを同定した。これによってさらなる分析のために、カミソリの刃を使用してプレートのもう一方の面のサンプルがこすり取れるようになった。5）こすり取ったサンプルの塩基性エステル交換反応、およびGC分析を一般方法で述べられるようにして実施した。

【0776】

GC結果を下の表58に示す。培養は次のように記述される。「S」株（野生型）、「S-P」（PDATノックアウト）、「S-D1」（DGAT1ノックアウト）、「S-D2」（DGAT2ノックアウト）、「S-D1-D2」（DGAT1およびDGAT2ノックアウト）、「S-P-D1」（PDATおよびDGAT1ノックアウト）、「S-P-D2」（PDATおよびDGAT2ノックアウト）、および「S-P-D1-D2」（PDAT、DGAT1およびDGAT2ノックアウト）。使用した略語は次の通り。「WT」=野生型、「FA」=脂肪酸、「dcw」=乾燥細胞重量、および「FA%dcw」、「%WT」=野生型中の%に対するFA%、「S」株は野生型である。

【0777】

【表67】

表 58

PDAT、DGAT2、および DGAT1 に単一、二重、または三重中断がある
ヤロウィア ATCC#90812 株の脂質含量

株	残留 DAG AT	dcw, mg	全脂肪酸			TAG 画分		
			FA, μ g	FA%dc w	FA%dcw, %WT	FA, μ g	FA% dcw	FA%dcw, %WT
S	D1、D2、P	32.0	797	15.9	100	697	13.9	100
S-D1	D2、P	78.8	723	13.6	86	617	11.6	83
S-D2	D1、P	37.5	329	6.4	40	227	4.4	32
S-P	D1、D2	28.8	318	6.0	38	212	4.0	29
S-D1-D2	P	64.6	219	4.1	26	113	2.1	15
S-D1-P	D2	76.2	778	13.4	84	662	11.4	82
S-D2-P	D1	31.2	228	4.3	27	122	2.3	17
S-D1-D2-P	なし	52.2	139	2.4	15	25	0.4	3

【0778】

表58の結果は、3つのDAG ATの油生合成に対する相対的貢献度を示唆する。DGAT2の貢献度が最も高いのに対し、PDATおよびDGAT1は貢献度は等しいがDGAT2よりも少ない。三重ノックアウト株中の約3%の残留含油量は、ARE2（配列番号91および92）によってコードされるヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）のアシル-CoA：ステロール-アシルトランスフェラーゼ酵素の貢献によるものかもしれない。

【0779】

DGAT2 遺伝子中断があるヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）EU株におけるTAG含量減少およびパーセントEPA増大

野生型Y. リポリティカ（*lipolytica*）ATCC#90812（前出）における様々なアシルトランスフェラーゼノックアウトの効果調べた後、次にEU株のDGAT2ノックアウト株（すなわち10%のEPAを生成するように遺伝子操作された、実施例4）においてTAG含量および脂肪酸組成物を調べた。

【0780】

具体的には、実施例 29 で S 株 (A T C C # 9 0 8 1 2) について述べられたように、E U 株中の D G A T 2 遺伝子を中断した。D G A T 2 中断株を E U - D 2 と命名した。2 つの異なる条件に従った生育に続いて、E U および E U - D 2 株を採取し分析した。下の表で「3 m L」と称される条件では、細胞を 3 m L の M M 培地中で 1 日間生育させ、洗浄して、次に 3 m L の H G M 中で 3 日間生育させた。代案としては、下の表で「5 1 m L」と称される条件では、細胞を 5 1 m L の M M 培地中で 1 日間生育させ、洗浄して、次に 5 1 m L の H G M 中で 3 日間生育させた。T L C 分離 (「分画」) に続いて、5 1 m L 培養の抽出物中でホスファチジルコリン (P C)、ホスファチジルエタノールアミン (P E)、およびトリアシルグリセロール (T A G または油) の脂肪酸組成を判定した。

【0781】

G C 結果を下の表 59 に示す。培養は「E U」株 (野生型) および「E U - D 2」株 (D G A T 2 ノックアウト) として記述される。脂肪酸は 16:0、16:1、18:0、18:1 (オレイン酸)、18:2 (L A)、G L A、D G L A、A R A、E T A、および E P A として同定され、それぞれの組成は全脂肪酸の % として表される。

【0782】

【表 68】

表 59
DGAT2 に中断があるヤロウィア EU 株の脂質含量および組成

株 および 生育	画分	TFA % dcw	% 16:0	% 16:1	% 18:0	% 18:1	% 18:2	% GLA	% DGLA	% ARA	% ETA	% EPA
EU, 3mL	全部		19	10	2	16	12	19	6	0	3	10
EU-D2, 3mL	全部		17	10	1	6	7	24	5	0	6	19
EU, 51mL	全部	37	18	11	3	19	31	5	1		1	4
	PC	2	12	9	1	8	43	7	3		5	4
	PE	1	24	14	0	14	37	5	0		0	1
	TAG	34	18	12	3	21	29	5	1		1	4
EU-D2, 51mL	全部	18	18	8	1	5	7	25	5		5	20
	PC	1	18	6	1	2	4	26	5		11	22
	PE	1	25	7	0	2	5	14	2		3	8
	TAG	15	16	9	1	6	5	26	6		5	21

【0783】

結果は、D G A T 2 ノックアウトが、% E P A (全脂肪酸の) の倍増および脂質含量 (% d c w として) の半減をもたらすことを示す。さらに脂質含量に観察されたほとんど全ての変化は、T A G 画分中の変化によるものである。E U 株の 5 1 m L 培養中の期待されたよりも低い % E P A は、おそらく不安定性によるものであろう。

【0784】

アシルトランスフェラーゼ遺伝子中断があるヤロウィア・リポリティカ (Y a r r o w i a l i p o l y t i c a) M U 株における T A G 含量低下およびパーセント E P A 増大
最後に、E U 株 - D 2 中の単一 D G A T 2 ノックアウトからもたらされる % E P A 増大および脂質含量低下に基づいて、次に M U 株 (14 % の E P A を生成するように遺伝子操作された、実施例 12 参照) の様々なアシルトランスフェラーゼノックアウト株において、T A G 含量および脂肪酸組成を調べた。具体的には M U 株において、P D A T、D G A T 2、および D G A T 1 中の単一中断、P D A T および D G A T 2 中の二重中断が作り出された。4 つの異なる生育条件での生育に続いて、これらの各株中で脂質含量および組成物を比較した。

【0785】

より具体的には（D G A T 1 中断の選択が U R A 3 遺伝子に依存したこと以外は）実施例 29 で述べられる方法を使用して、M U 株において、P D A T、D G A T 2、D G A T 1 中の単一中断を作り出した。これは「M U-D 1」（D G A T 1 中断）、「M U-D 2」（D G A T 2 中断）、および「M U-P」（P D A T 中断）として同定された単一ノックアウト株をもたらした。個々のノックアウト株は、P C R によって確認された。さらに M U-D 2 株を同じ方法で P D A T 遺伝子について中断し、中断を P C R によって確認した。得られた二重ノックアウト株を「M U-D 2-P」と命名した。

【0786】

下で述べるように、M U-D 1、M U-D 2、M U-P、および M-D 2-P ノックアウト株を分析して、脂質含量および組成物に対する各ノックアウトの効果を判定した。さらに油脂生成を促進する生育条件もまた考察して、全脂質含量に対するそれらの効果を判定した。したがって「実験 A」、「実験 B」、「実験 C」、および「実験 E」と同定される全部で 4 つの異なる実験を行った。具体的には上の各株を含有するプレートからループ 3 つ分の細胞を M M U 培地〔実験 B および C では 3 m L、実験 A および E では 50 m L〕中に接種して、24 時間（実験 A、B、および C）または 48 時間（実験 E）振盪しながら 30℃ で生育させた。細胞を採取して H G M 中で 1 回洗浄し、H G M 培地（実験 A および E では 50 m L、実験 B では 3 m L）またはウラシル添加 H G M 培地（「H G M U」）（実験 C では 3 m L）のいずれかに再懸濁し、上記のように 4 日間培養した。一般方法で述べられたように、1 つのアリコート（1 m L）を G C による脂質分析のために使用する一方、第 2 のアリコートを 600 n m で培養 O D を測定するために使用した。実験 A および E の残る培養物を採取して水で 1 回洗浄し、乾燥細胞重量（d c w）測定のために凍結乾燥した。対照的に実験 B および C の d c w は、それらの関係を示す式を使用してそれらの O D₆₀₀ から判定された。実験 A、B、C、および E の異なる各株の脂肪酸組成もまた判定した。

【0787】

結果を下の表 60 に示す。培養物は、「M U」株（親 E P A 生成株）、「M U-P」（P D A T ノックアウト）、「M U-D 1」（D G A T 1 ノックアウト）、「M U-D 2」（D G A T 2 ノックアウト）、および「M U-D 2-P」（D G A T 2 および P D A T ノックアウト）として表現される。使用した略語は以下のとおり。「W T」= 野生型（すなわち M U）、「O D」= 光学濃度、「d c w」= 乾燥細胞重量、「T F A」= 全脂肪酸、および「T F A % d c w、重量 %」= 野生型（「M U」）株と比較した T F A % d c w。脂肪酸は 16:0、16:1、18:0、18:1（オレイン酸）、18:2（L A）、G L A、D G L A、A R A、E T A、および E P A として同定される。各組成は全脂肪酸の % として表される。

【0788】

10

20

30

【表 6 9】

表 60
様々なアシルトランスフェラーゼ中断があるヤロウイアMU株の脂質含量および組成

実施例	株	残留 DAG AT	第 1 相生育 条件	第 2 相生育 条件	OD	dcw (mg)	TFA (μg)	TFA %dcw	TFA% dcw, %WT	% 16:0	% 16:1	% 18:0	% 18:1	% 18:2	% GLA	% DGLA	% ARA	% ETA	% EPA
A	MU	D1,D2,P	1 日間、 50mL の MMU	4 日間、 50mL の HGM	4.0	91	374	20.1	100	17	10	2	18	10	22	7	1	3	9.7
A	MU-D2	D1,P			3.1	75	160	10.4	52	16	12	0	8	9	23	7	0	8	17.4
A	MU-D1	D2,P			4.3	104	217	10.2	51	15	10	2	11	10	22	7	0	7	17.4
A	MU-P	D1,D2			4.4	100	238	11.7	58	16	9	2	11	7	24	7	1	6	17.5
B	MU	D1,D2,P	1 日間、 3mL の MMU	4 日間、 3mL の HGM	5.9	118	581	24.1	100	17	9	3	18	10	22	8	1	3	9.1
B	MU-D2	D1,P			4.6	102	248	11.9	50	16	10	0	7	10	24	7	1	7	17.8
B	MU-D1	D2,P			6.1	120	369	15.0	62	18	9	3	14	11	20	7	1	5	12.0
B	MU-P	D1,D2			6.4	124	443	17.5	72	15	8	3	16	10	25	6	1	4	11.9
C	MU	D1,D2,P	1 日間、 3mL の MMU	4 日間、 3mL の HGMU	6.8	129	522	19.9	100	16	10	2	13	11	21	10	1	4	12.6
C	MU-D2	D1,P			5.6	115	239	10.2	51	17	9	1	6	11	21	8	1	7	18.9
C	MU-D1	D2,P			6.9	129	395	15.0	75	15	9	2	12	12	20	10	1	5	13.5
C	MU-P	D1,D2			7.1	131	448	16.8	84	17	8	3	14	11	20	10	1	4	11.3
E	MU	D1,D2,P	2 日間、 50mL の MM	4 日間、 50mL の HGM	4.6	89	314	17.3	100	16	12	2	18	9	22	7	1	4	11.2
E	MU-D2	D1,P			2.8	62	109	8.5	49	14	12	1	6	8	25	6	0	7	20.0
E	MU-P	D2,P			5.0	99	232	11.5	66	16	10	2	14	7	24	7	1	5	15.8
E	MU-D2-P	D1			4.2	98	98	4.9	28	18	10	0	7	12	20	5	0	6	22.5

【 0 7 8 9 】

10

20

30

40

50

データは形質転換した細胞内の脂質含量が、生育条件次第で変動することを示した。さらに脂質含量に対する各アシルトランスフェラーゼの貢献もまた、変動した。具体的には実験B、C、およびEでは、D G A T 2が、P D A TまたはD G A T 1のどちらよりも油合成により大きく貢献した。対照的に実験Aで実証されたように、D G A T 2、D G A T 1、およびP D A T中の単一ノックアウトは、脂質含量にほぼ同等の損失をもたらした（すなわちそれぞれ48%、49%、および42%の損失[「T F A % d c w、重量%」を参照されたい]）。

【0790】

脂肪酸組成については、データは、個々の各D A G A T遺伝子のノックアウトが含油量低下および% E P A増大をもたらすことを示す。例えばD G A T 2ノックアウトは脂質含量のほぼ半減、全脂肪酸中の% E P Aのほぼ倍増をもたらす（E U株-D 2で観察された結果に類似、前出）。D A G A T 2およびP D A Tの双方のノックアウトは、最少の油と最多の% E P Aをもたらす。

【0791】

ここで報告された結果に基づいて、天然D G A T 2および／またはD G A T 1および／またはP D A Tの中断は、E P Aをはじめとする高濃度のP U F Aを生成するように遺伝子操作されたヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）株において（例えばY 2 0 8 8、Y 2 0 8 9、Y 2 0 9 0、Y 2 0 9 5、Y 2 0 9 6、Y 2 1 0 2、Y 2 2 0 1および／またはY 2 2 0 3株内で）、% P U F Aを実質的に増大させる有用な手段であることが考察される。事実、Y. リポリティカ（*lipolytica*）株Y 2 2 1 4（ $\Delta 9$ エロンガーゼ／ $\Delta 8$ デサチュラーゼ経路を通じて、14%のARAを生成し、野生型Y. リポリティカ（*lipolytica*）ATCC # 2 0 3 6 2に対する最終遺伝子型は、A c o 2⁻、L y s 5⁻、2 X G P A T::I g D 9 e::P E X 2 0、2 X T E F::I g D 9 e::L I P 1、F B A I N m::I g D 9 e::O C T、2 X F B A I N::D 8 S F::P E X 1 6、G P D::D 8 S F::P E X 1 6、G P A T::M A Δ 5::P E X 2 0、F B A I N::M A Δ 5::P E X 2 0、Y A T 1::I. D 5 S::L I P 1、G P M/F B A I N::I. D 5 S::O C T、F B A I N::F. D 1 2 S::P E X 2 0、およびG P M/F B A I N::r E L O 2 S::O C T）中の天然D G A T 2遺伝子の中断は、パーセントARAの1.7倍の増大をもたらす（データ示さず）。本発明の主な特徴または態様を次に記載する。

態様1. a) $\Delta 6$ デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、

b) $C_{18/20}$ エロンガーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、

c) $\Delta 5$ デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、および

d) $\Delta 17$ デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子

の $\omega-3/\omega-6$ 脂肪酸合成経路遺伝子を含んでなる遺伝子プールを含んでなる、背景ヤロウィア（*Yarrowia*）種を含んでなるエイコサペンタエン酸生成のための組換え生産宿主細胞。

態様2. a) $\Delta 15$ デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、

b) $\Delta 6$ デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、

c) $C_{18/20}$ エロンガーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、および

d) $\Delta 5$ デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子

の $\omega-3/\omega-6$ 脂肪酸合成経路遺伝子を含んでなる遺伝子プールを含んでなる、背景ヤロウィア（*Yarrowia*）種を含んでなるエイコサペンタエン酸生成のための組換え生産宿主細胞。

態様3. a) $\Delta 9$ エロンガーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、

b) $\Delta 8$ デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、

c) $\Delta 5$ デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、および

d) $\Delta 17$ デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子

の $\omega-3/\omega-6$ 脂肪酸合成経路遺伝子を含んでなる遺伝子プールを含んでなる、背景ヤロウィア（*Yarrowia*）種を含んでなるエイコサペンタエン酸生成のための組換え

10

20

30

40

50

え生産宿主細胞。

態様4. a) $\Delta 15$ デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、

b) $\Delta 9$ エロンガーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、

c) $\Delta 8$ デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子、および

d) $\Delta 5$ デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子

の $\omega-3/\omega-6$ 脂肪酸生合成経路遺伝子を含んでなる遺伝子プールを含んでなる、背景ヤロウィア (Yarrowia) 種を含んでなるエイコサペンタエン酸生成のための組換え生産宿主細胞。

態様5. 遺伝子プールが、場合により $\Delta 12$ デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子を含んでなる態様1、2、3または4のいずれか一項に記載の組換え生産宿主

10

細胞。

態様6. 背景ヤロウィア (Yarrowia) 種が、 $\Delta 12$ 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あらゆる天然遺伝子を欠いている態様5に記載の組換え生産宿主。

態様7. 前記 $\omega-3/\omega-6$ 脂肪酸生合成経路遺伝子の少なくとも1つが、配列番号173~183および389よりなる群から選択される核酸配列を有するプロモーター配列の制御下にある態様1、2、3または4のいずれか一項に記載の組換え生産宿主。

態様8. 前記 $\Delta 12$ デサチュラーゼが、配列番号24、26、28、30、31、32、34、36、38、375、376、および378~380よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有する態様5に記載の組換え生産宿主。

20

態様9. 前記 $\Delta 6$ デサチュラーゼが配列番号2および5よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、前記 $C_{18/20}$ エロンガーゼが配列番号18および21よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、前記 $\Delta 5$ デサチュラーゼが配列番号7、9、12、370、および373よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、前記 $\Delta 17$ デサチュラーゼが配列番号15に記載のアミノ酸配列を有する態様1または2のいずれかに記載の組換え生産宿主細胞。

態様10. 前記 $\Delta 9$ エロンガーゼが配列番号50および18よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、前記 $\Delta 8$ デサチュラーゼが配列番号58、60、および62よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有する態様3または4のいずれかに記載の組換え生産宿主細胞。

30

態様11. 前記 $\Delta 5$ デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子が、酵素基質として、

a) リノレン酸およびジホモ γ -リノレン酸、

b) α -リノレン酸およびエイコサテトラエン酸、および

c) リノレン酸、ジホモ γ -リノレン酸、 α -リノレン酸、およびエイコサテトラエン酸

よりなる群から選択される少なくとも2つの脂肪酸を結合する二機能 $\Delta 5/\Delta 6$ デサチュラーゼポリペプチドをコードする態様1、2、3または4のいずれか一項に記載の組換え生産宿主。

態様12. 前記二機能 $\Delta 5/\Delta 6$ デサチュラーゼポリペプチドが、配列番号370および373よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有する態様11に記載の組換え生産宿主。

40

態様13. 前記 $\Delta 5$ デサチュラーゼが、配列番号7、9、12、370、および373よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有する態様1、2、3または4のいずれか一項に記載の組換え生産宿主細胞。

態様14. 前記 $\Delta 17$ デサチュラーゼが、配列番号15に記載のアミノ酸配列を有する態様3に記載の組換え生産宿主細胞。

態様15. 遺伝子プールが、場合により $\Delta 15$ デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子を含んでなる態様1または3のいずれかに記載の組換え生産宿主細胞。

態様16. 前記 $\Delta 15$ デサチュラーゼをコードする少なくとも1つの遺伝子が、酵素基

50

質としてオレイン酸およびリノール酸の双方を結合する二機能 $\Delta 15 / \Delta 12$ デサチュラーゼポリペプチドをコードする態様 2 または 4 のいずれかに記載の組換え生産宿主。

態様 17. 前記二機能 $\Delta 15 / \Delta 12$ デサチュラーゼポリペプチドが、配列番号 40 に記載のアミノ酸配列を有する態様 16 に記載の組換え生産宿主。

態様 18. 前記 $\Delta 15$ デサチュラーゼが、配列番号 40、42、44、46、48、382、および 384～388 よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有する態様 2 または 4 のいずれかに記載の組換え生産宿主。

態様 19. 遺伝子プールが、場合により

a) $\Delta 9$ デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、

b) $C_{16/18}$ エロンガーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、および

c) $C_{14/16}$ エロンガーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子

よりなる群から選択される $\omega-3 / \omega-6$ 脂肪酸生合成経路遺伝子を含んでなる態様 1、2、3 または 4 のいずれか一項に記載の組換え生産宿主。

態様 20. 前記 $C_{16/18}$ エロンガーゼが配列番号 64、67、および 75 よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、前記 $C_{14/16}$ エロンガーゼが配列番号 78 に記載のアミノ酸配列を有する態様 19 に記載の組換え生産宿主。

態様 21. 遺伝子プールが、場合により

(1) ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ (DGAT1)、

(2) ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ (DGAT2)、

(3) リン脂質：ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ (PDAT)、

(4) アシル-CoA：1-アシルリゾホスファチジルコリンアシルトランスフェラーゼ (LPCAT)、

(5) グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ (GPAT)、および

(6) リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ (LPAAT)

よりなる群から選択されるアシルトランスフェラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子を含んでなる態様 1、2、3 または 4 のいずれか一項に記載の組換え生産宿主。

態様 22. 前記ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ (DGAT1) が配列番号 95 および 97～101 よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、前記ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ (DGAT2) が配列番号 103、105、107、および 109 よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、前記リン脂質：ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ (PDAT) が配列番号 90 に記載のアミノ酸配列を有し、前記グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ (GPAT) が配列番号 111 に記載のアミノ酸配列を有し、前記リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ (LPAAT) が配列番号 81、83、85、および 88 よりなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、前記アシル-CoA：1-アシルリゾホスファチジルコリンアシルトランスフェラーゼ (LPCAT) が配列番号 93 に記載のアミノ酸配列を有する態様 21 に記載の組換え生産宿主。

態様 23. a) $\Delta 6$ デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、

b) $C_{18/20}$ エロンガーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、

c) $\Delta 5$ デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、

d) $\Delta 17$ デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、

e) $C_{16/18}$ エロンガーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、および

f) $\Delta 12$ デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子

の $\omega-3 / \omega-6$ 脂肪酸生合成経路の遺伝子を含んでなる遺伝子プールを含んでなる、背景ヤロウィア (Yarrowia) 種を含んでなるエイコサペンタエン酸生成のための組換え生産宿主細胞であって、

背景ヤロウィア (Yarrowia) 種が、ペルオキシソームアシル-CoA オキシダーゼ ACO3 (Pox3)、リパーゼ 1 (Lip1)、および $\Delta 12$ デサチュラーゼよりなる群から選択される酵素をコードするあらゆる天然遺伝子を欠いている組換え生産宿主細胞。

10

20

30

40

50

態様 24. a) $\Delta 9$ エロンガーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、
 b) $\Delta 8$ デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、
 c) $\Delta 5$ デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、
 d) $\Delta 17$ デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、
 e) $C_{16/18}$ エロンガーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、および
 f) $\Delta 12$ デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子

の $\omega-3/\omega-6$ 脂肪酸生合成経路の遺伝子を含んでなる遺伝子プールを含んでなる、背景ヤロウィア (Yarrowia) 種を含んでなる、エイコサペンタエン酸生成のための組換え生産宿主細胞であって、

背景ヤロウィア (Yarrowia) 種が、アシル-CoA オキシダーゼ 2 (Pox 2-)、およびサッカロピンデヒドロゲナーゼ (Lys 5-) よりなる群から選択される酵素をコードするあらゆる天然遺伝子を欠いている組換え生産宿主細胞。

10

態様 25. a) $\Delta 15$ デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、
 b) $\Delta 9$ エロンガーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、
 c) $\Delta 8$ デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、
 d) $\Delta 5$ デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、および
 e) $\Delta 12$ デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子

の $\omega-3/\omega-6$ 脂肪酸生合成経路の遺伝子を含んでなる遺伝子プールを含んでなる、背景ヤロウィア (Yarrowia) 種を含んでなるエイコサペンタエン酸生成のための組換え生産宿主細胞。

20

態様 26. a) (1) $\Delta 6$ デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、 $C_{18/20}$ エロンガーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、 $\Delta 5$ デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、および $\Delta 17$ デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、

(2) $\Delta 9$ エロンガーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、 $\Delta 8$ デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、 $\Delta 5$ デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、および $\Delta 17$ デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、

(3) $\Delta 15$ デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、 $\Delta 6$ デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、 $C_{18/20}$ エロンガーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、および $\Delta 5$ デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、

30

(4) $\Delta 15$ デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、 $\Delta 9$ エロンガーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、 $\Delta 8$ デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子、 $\Delta 5$ デサチュラーゼをコードする少なくとも 1 つの遺伝子よりなる群から選択される少なくとも 1 組の遺伝子、および

b) (1) $\Delta 12$ デサチュラーゼ、

(2) $\Delta 9$ デサチュラーゼ、

(3) $C_{14/16}$ エロンガーゼ、

(4) $C_{16/18}$ エロンガーゼ

よりなる群から選択される酵素をコードする少なくとも 1 つの遺伝子、および

c) (i) DGAT1、DGAT2、および PDAT よりなる群から選択されるジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ、

40

(ii) アシル-CoA:1-アシルリゾホスファチジルコリンアシルトランスフェラーゼ (LPCAT)、

(iii) グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ (GPAT)、

(iv) リゾホスファチジン酸アシルトランスフェラーゼ (LPAAT)、

(v) ホスホリパーゼ C、および

(vi) ホスホリパーゼ A₂

よりなる群から選択される酵素をコードする少なくとも 1 つの遺伝子の $\omega-3/\omega-6$ 脂肪酸生合成経路の遺伝子を含んでなる遺伝子プールを含んでなる、背景ヤロウィア (Yarrowia) 種を含んでなる、エイコサペンタエン酸生成のための組換え生産宿主細胞

50

であって、

(1) 背景ヤロウィア (*Yarrowia*) 種が、 $\Delta 12$ 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あらゆる天然遺伝子を欠いており、

(2) 背景ヤロウィア (*Yarrowia*) 種が、リパーゼ 1 (*Lip1*)、ペルオキシソームアシル CoA オキシダーゼ ACO3 (*Pox3*)、アシル CoA オキシダーゼ 2 (*Pox2*)、オロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ (*Ura3*)、サッカロビンデヒドロゲナーゼ (*Lys5*)、リパーゼ 2 (*Lip2*)、およびイソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ (*Leu2*) よりなる群から選択される酵素をコードするあらゆる天然遺伝子を欠いている組換え生産宿主細胞。

態様 27. 宿主が全脂肪酸の%として少なくとも約 5% のエイコサペンタエン酸を含んでなる微生物油を生成する態様 1、2、3 または 4 のいずれか一項に記載の組換え生産宿主。

10

態様 28. 宿主がエイコサペンタエン酸を含んでなる微生物油を生成し、微生物油があらゆる γ -リノール酸を欠いている態様 1、2、3 または 4 のいずれか一項に記載の組換え生産宿主。

態様 29. 宿主がエイコサペンタエン酸を含んでなる微生物油を生成し、微生物油があらゆるドコサヘキサエン酸を欠いている態様 1、2、3 または 4 のいずれか一項に記載の組換え生産宿主。

態様 30. 宿主がエイコサペンタエン酸および γ -リノール酸の双方を含んでなる微生物油を生成し、エイコサペンタエン酸および γ -リノール酸の比率が約 1 : 1 である態様 1、2、3 または 4 のいずれか一項に記載の組換え生産宿主。

20

態様 31. a) 態様 1、2、3、または 4 のいずれか一項に記載の生産宿主を培養して、エイコサペンタエン酸を含んでなる微生物油が生成され、

b) 場合によりステップ (a) の微生物油を回収することを含んでなるエイコサペンタエン酸を含んでなる微生物油の生成方法。

態様 32. 態様 31 に記載の方法によって生成される微生物油。

態様 33. 油が少なくとも約 5% のエイコサペンタエン酸を含有する態様 32 に記載の微生物油。

態様 34. 油があらゆる γ -リノール酸を欠いている態様 32 に記載の微生物油。

態様 35. 油があらゆるドコサヘキサエン酸を欠いている態様 32 に記載の微生物油。

30

態様 36. 油がリノール酸、 γ -リノレン酸、エイコサジエン酸、ジホモ γ -リノール酸、アラキドン酸、 α -リノレン酸、ステアリドン酸、エイコサトリエン酸、エイコサテトラエン酸、ドコサペンタエン酸、およびドコサヘキサエン酸よりなる群から選択される脂肪酸を含んでなる態様 33 に記載の混合油。

態様 37. 態様 31 に記載の方法によって生成される有効量の微生物油を含んでなる食品。

態様 38. 類似食品、肉製品、穀物製品、ベーカリー食品、スナック食品、および乳製品よりなる群から選択される態様 37 に記載の食品。

態様 39. 態様 31 に記載の方法によって生成される有効量の微生物油を含んでなる、メディカルフード、栄養補助食品、乳児用調製粉乳、および医薬品よりなる群から選択される製品。

40

態様 40. 態様 31 に記載の方法によって生成される有効量の微生物油を含んでなる動物飼料。

態様 41. ペットフード、反芻動物飼料、家禽飼料、および水産養殖飼料よりなる群から選択される態様 40 に記載の動物飼料。

態様 42. 有効量の微生物油を含んでなり、場合により態様 1、2、3 または 4 のいずれか一項に記載の組換え宿主を含んでなる酵母バイオマスを含んでなる動物飼料。

態様 43. 酵母バイオマスが、タンパク質、脂質、炭水化物、ビタミン、ミネラル、および核酸よりなる群から選択される飼料栄養素を含んでなる態様 42 に記載の動物飼料。

態様 44. 態様 31 に記載の方法によって生成される微生物油と食品とを組み合わせる

50

ことを含んでなるエイコサペンタエン酸で栄養強化された食品の製造方法。

態様４５．メディカルフード、栄養補助食品、乳児用調製粉乳、および医薬品よりなる群から選択される製品の製造方法であって、態様３１に記載の方法によって生成される微生物油と製品とを組み合わせることを含んでなるエイコサペンタエン酸で製品が栄養強化される方法。

態様４６．態様３１に記載の方法によって生成される微生物油と動物飼料とを組み合わせることを含んでなるエイコサペンタエン酸で栄養強化された動物飼料の製造方法。

態様４７．態様４６に記載の動物飼料と飼料栄養素を含んでなる酵母バイオマスとを組み合わせることを含んでなるエイコサペンタエン酸を含んでなる動物飼料を飼料栄養素で栄養強化する方法。

態様４８．飼料栄養素が、タンパク質、脂質、炭水化物、ビタミン、ミネラル、および核酸よりなる群から選択される態様４７に記載の方法。

態様４９．態様３１に記載の方法によって生成される微生物油を消費可能形態でヒトまたは動物に提供して臨床症状が処置されることを含んでなるヒトまたは動物における臨床症状の処置方法。

態様５０．臨床症状が、冠動脈心疾患、高血圧、炎症性疾患、タイプⅡ糖尿病、潰瘍性大腸炎、クローン病、神経性食欲不振症、火傷、骨関節炎、骨粗鬆症、異脂肪血症、および注意欠陥／多動性障害よりなる群から選択される態様４９に記載の方法。

態様５１．ヒトまたは動物によって消費可能または使用可能な形態でエイコサペンタエン酸を含有する態様３１に記載の方法によって生成される微生物油を提供することを含んでなるエイコサペンタエン酸で強化された栄養補助食品をヒト、動物または水産養殖生物に提供する方法。

態様５２．エイコサペンタエン酸の欠乏症を処置するために、ヒトまたは動物によって消費可能または使用可能な形態でエイコサペンタエン酸を含有する態様３１に記載の方法によって生成される微生物油を提供することを含んでなる動物またはヒトにおけるエイコサペンタエン酸（EPA）の欠乏症の処置方法。

態様５３．ATCC名称ATCC 25693を有するヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）Y2047、ATCC名称ATCC 25693を有するヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）Y2201、およびATCC名称ATCC 25693を有するヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）Y2096よりなる群から選択されるエイコサペンタエン酸生成に有用な組換え生産宿主。

【図面の簡単な説明】

【0792】

【図１】 $\omega-3/\omega-6$ 脂肪酸生合成経路を図示する。

【図２】油性酵母における脂質蓄積のための生化学的機序の概略図である。

【図３Ａ】メガライン（Megalign）DNASTARソフトウェアを使用して作り出された、異なる糸状菌類からの $\Delta 12$ デサチュラーゼおよび $\Delta 15$ デサチュラーゼタンパク質の系統樹を示す。

【図３Ｂ】pY57、Y1、AHAS、w4971のプラスミドマップを提供する。

【図４】油性酵母中の脂質蓄積における様々なアシルトランスフェラーゼの役割を示す概略図である。

【図５Ａ】総脂質画分中に（EPAをはじめとする）様々な脂肪酸を生成する、本発明のいくつかのヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）株の開発を図示する。

【図５Ｂ】総脂質画分中に（EPAをはじめとする）様々な脂肪酸を生成する、本発明のいくつかのヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）株の開発を図示する。

【図６】総脂質画分中に28%のEPAを生成するヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）Y2096株の脂肪酸プロファイルを示すGCクロマ

10

20

30

40

50

トグラフである。

【図7A】pY5-30のプラスミドマップを提供する。

【図7B】組織化学的染色によって判定された、ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) ATCC#76982株中のTEF、GPD、GPM、FBA、およびFBAINの相対プロモーター活性を図示する。

【図7C】組織化学的染色によって判定された、様々な培地中で生育させたY. リポリティカ (*lipolytica*) 中のYAT1、TEF、GPAT、およびFBAINの相対プロモーター活性を図示する。

【図8A】蛍光定量的に判定されたヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) ATCC#76982株中のGPD、GPM、FBA、およびFBAINのプロモーター活性を比較するグラフである。

【図8B】ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) ATCC#76982株中のGUS mRNA (すなわちGPD::GUS、GPDIN::GUS、FBA::GUSまたはFBAIN::GUSキメラ遺伝子を発現する) をpY5-30 (すなわちキメラTEF::GUS遺伝子) を発現するY. リポリティカ (*lipolytica*) 株のmRNAレベルと比べて定量化する、リアルタイムPCR相対計量の結果を図表を用いて要約する。

【図9A】pKUNF12T6Eのプラスミドマップを提供する。

【図9B】pDMW232のプラスミドマップを提供する。

【図9C】pZP3L37のプラスミドマップを提供する。

【図9D】pY37/F15のプラスミドマップを提供する。

【図9E】pKO2UF2PEのプラスミドマップを提供する。

【図10A】pZKUT16のプラスミドマップを提供する。

【図10B】pKO2UM25Eのプラスミドマップを提供する。

【図10C】pDMW302T16のプラスミドマップを提供する。

【図10D】pDMW303のプラスミドマップを提供する。

【図10E】pDMW271のプラスミドマップを提供する。

【図11A】pZKUGPI5Sのプラスミドマップを提供する。

【図11B】pKO2UM26Eのプラスミドマップを提供する。

【図11C】pKUNT2のプラスミドマップを提供する。

【図11D】pZUF17のプラスミドマップを提供する。

【図12】ミドリムシ (*Euglena gracilis*) 細胞抽出物の脂質プロフィールのクロマトグラムを示す。

【図13】様々なミドリムシ (*Euglena gracilis*) Δ8デサチュラーゼポリペプチド配列のアラインメントを示す。使用したアラインメント法は「クラスタル (Clustal) Vアラインメント法」に相当する。

【図14A】pDMW237のプラスミドマップを提供する。

【図14B】pDMW240のプラスミドマップを提供する。

【図14C】酵母発現ベクターpY89-5のプラスミドマップを提供する。

【図14D】酵母発現ベクターpKUNFmKF2のプラスミドマップを提供する。

【図15A】pDMW277のプラスミドマップを提供する。

【図15B】pZF5T-PPCのプラスミドマップを提供する。

【図15C】pDMW287Fのプラスミドマップを提供する。

【図15D】pDMW297のプラスミドマップを提供する。

【図16A】pZP2C16M899のプラスミドマップを提供する。

【図16B】pDMW314のプラスミドマップを提供する。

【図16C】pDM325のプラスミドマップを提供する。

【図16D】pZKL5598のプラスミドマップを提供する。

【図17A】pY72 [または「pY72. 2loxP. Hyg. Fba. F15」] のプラスミドマップを提供する。

10

20

30

40

50

【図17B】 pY80 [または「pY80. loxp. 2F15」] のプラスミドマップを提供する。

【図17C】 pY79 [または「pY79. Cre. AHASw497L」] のプラスミドマップを提供する。

【図17D】 pY86 [または「pY86. loxp. Ura3. Hyg. F12」] のプラスミドマップを提供する。

【図18A】 pY94 [または「pY94. loxp. D9ED8. Ura3」] のプラスミドマップを提供する。

【図18B】 pY91M [または「pY91. Dr. D6M (天然)」] のプラスミドマップを提供する。

10

【図18C】 pZUF-Mod-1 のプラスミドマップを提供する。

【図18D】 pMDAGAT1-17 のプラスミドマップを提供する。

【図18E】 pMGPAT-17 のプラスミドマップを提供する。

【図19】 それぞれモルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) 中のグリセロール-3-リン酸- α -アシルトランスフェラーゼ (GPAT) に関与する、配列番号110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、および120の間の関係を図表を用いて表す。

【図20】 それぞれモルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) 中の $C_{16/18}$ 脂肪酸エロンガーゼ酵素 (ELO3) に関わる、配列番号66、67、68、69、70、71、72、および73の間の関係を図表を用いて表す。

20

【図21A】 pZUF6S のプラスミドマップを提供する。

【図21B】 pZUF6S-E3WT のプラスミドマップを提供する。

【図21C】 pZKUGPYE1-N のプラスミドマップを提供する。

【図21D】 pZKUGPYE2 のプラスミドマップを提供する。

【図22A】 pZKUGPYE1 のプラスミドマップを提供する。

【図22B】 pZUF6FYE1 のプラスミドマップを提供する。

【図22C】 pZP217+Ura のプラスミドマップを提供する。

【図22D】 pY20 のプラスミドマップを提供する。

【図22E】 pLV13 のプラスミドマップを提供する。

【図 4】

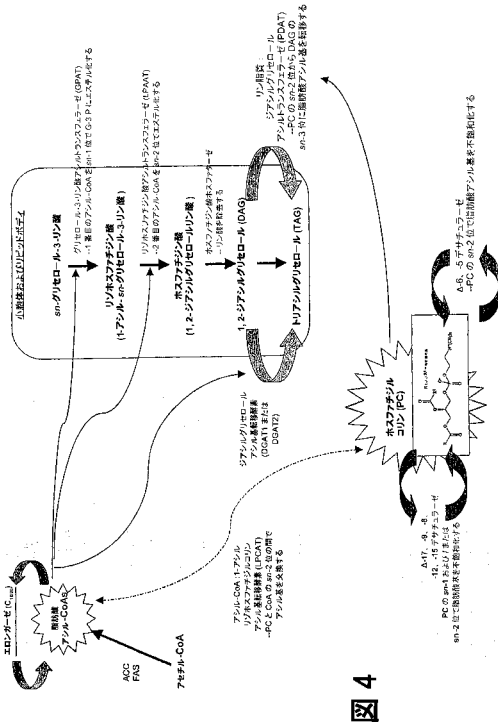


図 4

【図 5 A】

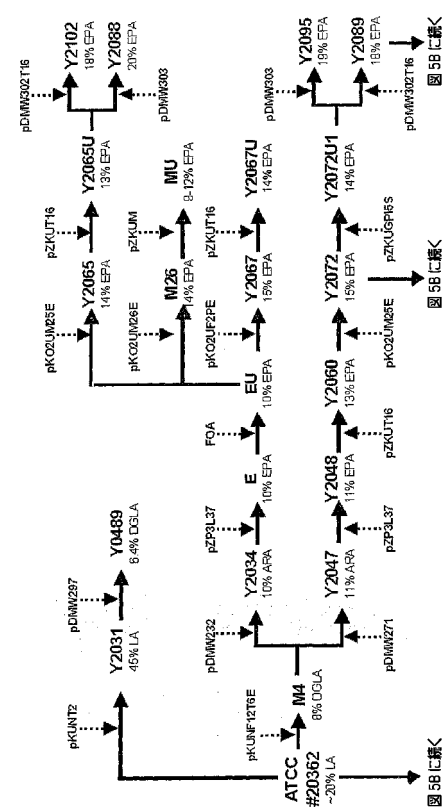


図 5A

【図 5 B】

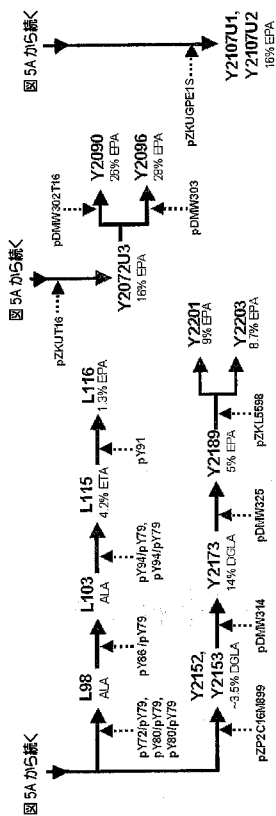


図 5B

【図 6】

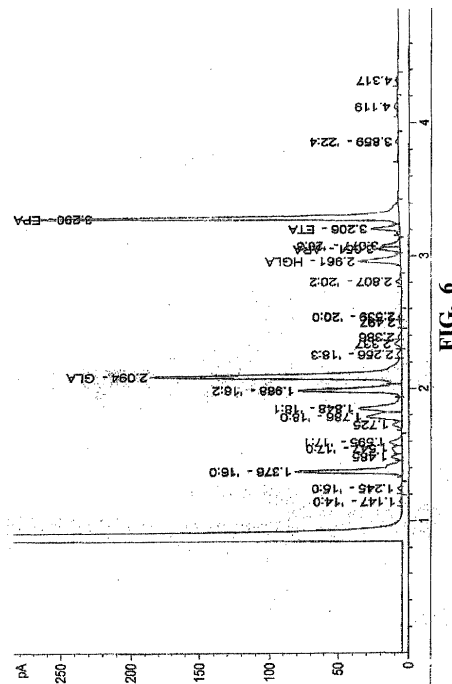
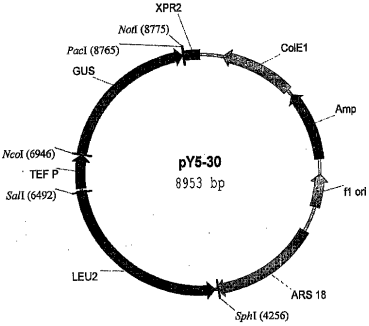
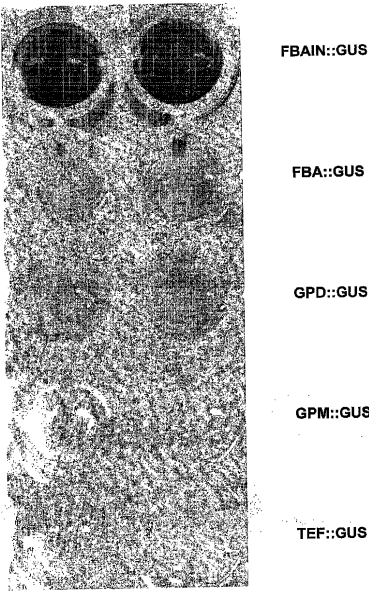


FIG. 6

【図 7 A】



【図 7 B】



【図 7 C】

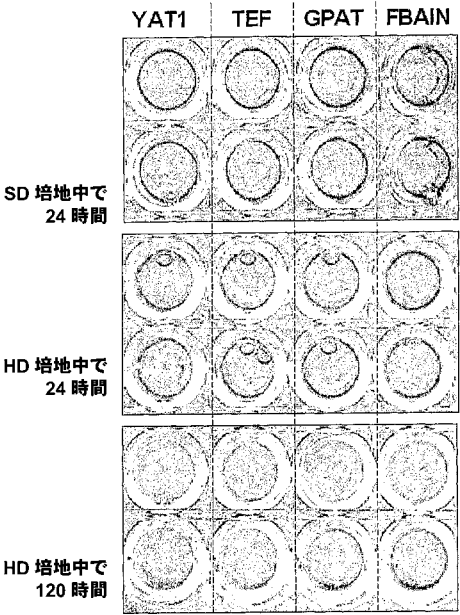
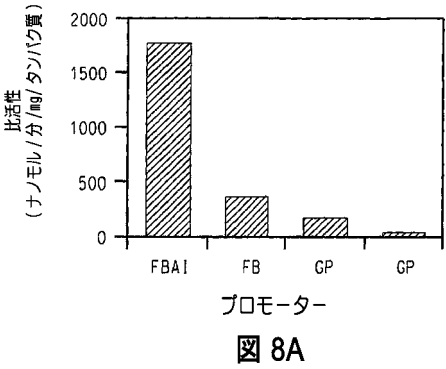


図 7C

【図 8 A】



【図 8 B】

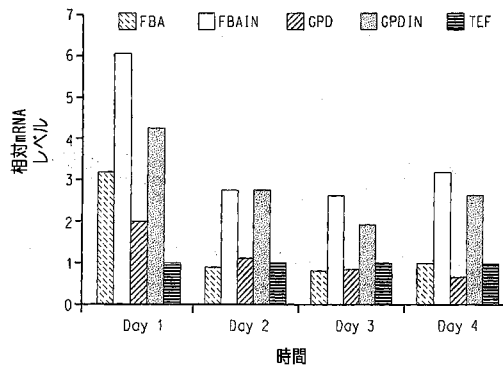


図 8B

【図 9 A】

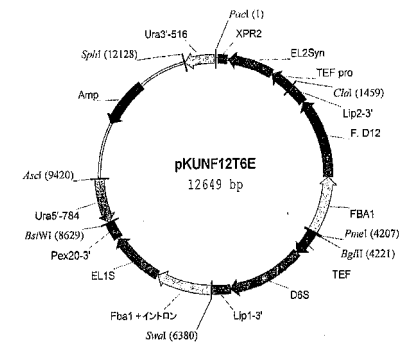


図 9A

【図 9 B】

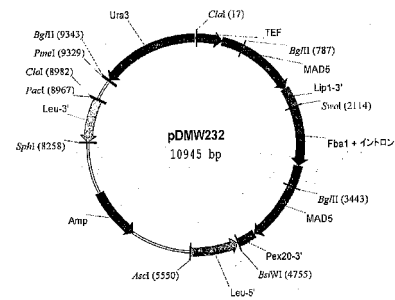


図 9B

【図 9 C】

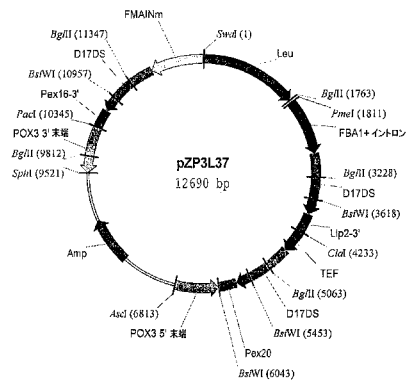


図 9C

【図 9 E】

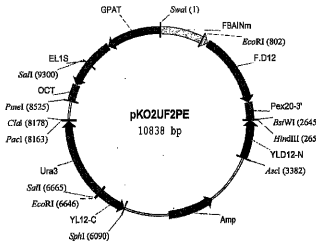


FIG. 9E

【図 10 A】

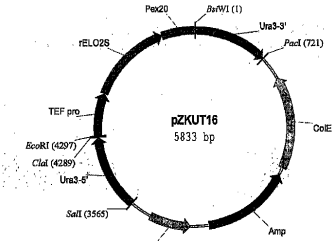


FIG. 10A

【図 9 D】

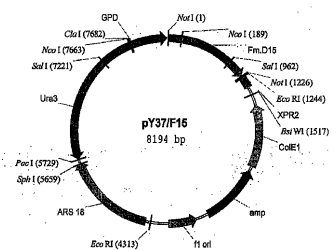


FIG. 9D

【図 10 D】

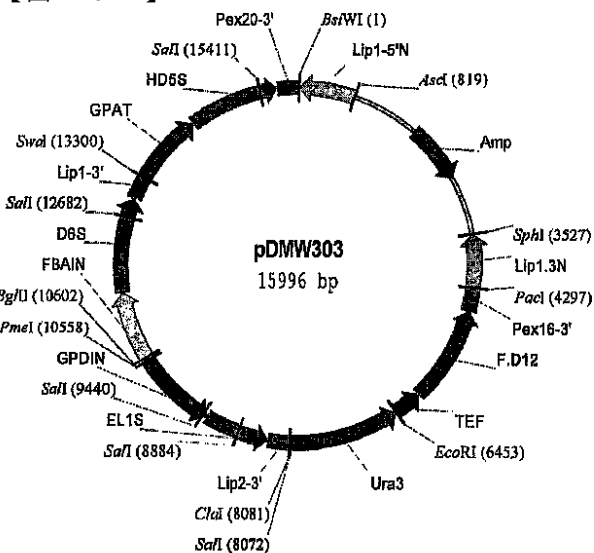


FIG. 10D

FIG. 10C

【図 1 1 A】

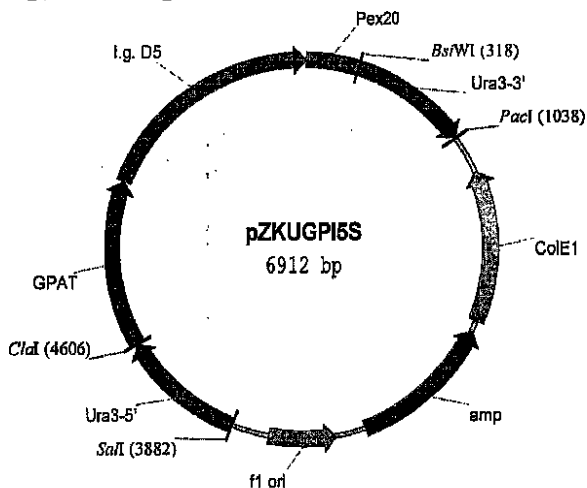


FIG. 11A

FIG. 11B

【図 1 1 C】

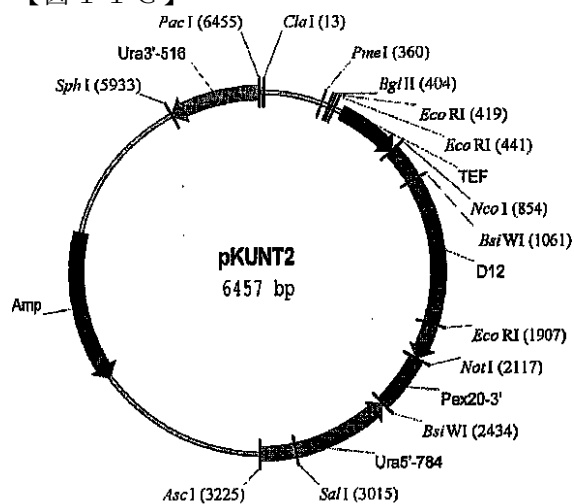


FIG. 11C

【図 1 1 D】

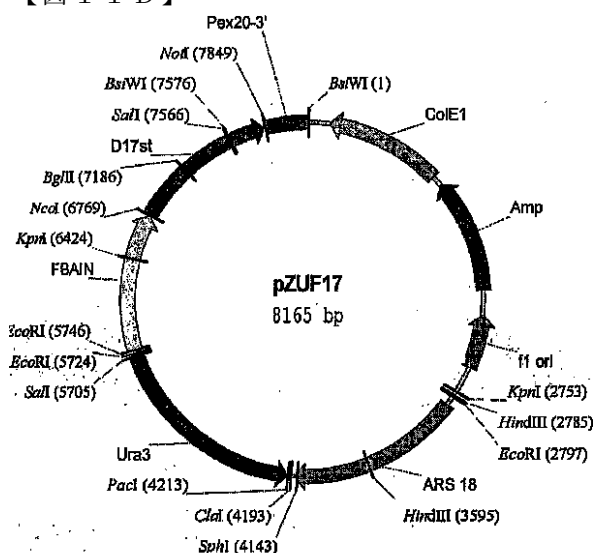
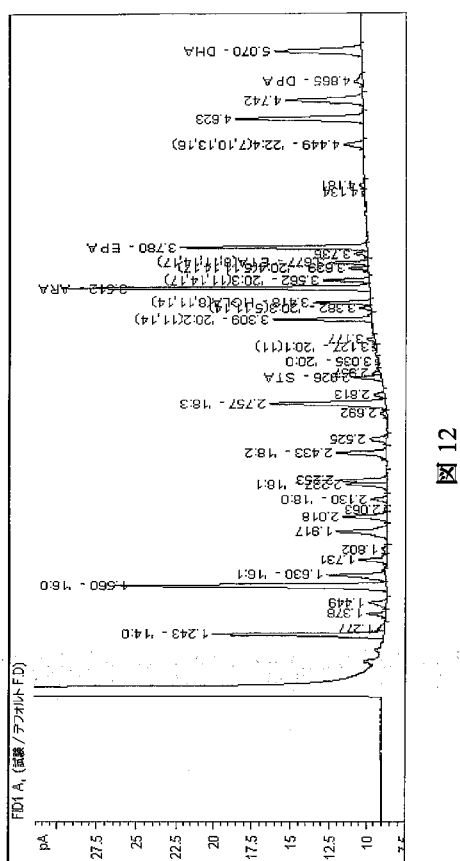


FIG. 11D

【図 1 2】



【图 13】

配列番号: 68 MKSKKQAL-PLTIDGTDYVSAMVNFHGGAGI1ENYQGRDATAFMWHGQBAFQPKLKR
 配列番号: 69 MKSKKQAL-PLTIDGTDYVSAMVNFHGGAGI1ENYQGRDATAFMWHGQBAFQPKLKR
 配列番号: 70 MKSKKQALSPLOMQEYDVV-VNFHGGAGI1ENYQGRDATAFMWHGQBAFQPKLKR
 配列番号: 71 MKSKKQALSPLOMQEYDVVSAMVNFHGGAGI1ENYQGRDATAFMWHGQBAFQPKLKR

 配列番号: 68 MPKINFSEDLPPQAVNAQGFQFKRLREGIATCMFADSPWLYSVK1ITTLGLGVGVGF
 配列番号: 69 MPKINFSEDLPPQAVNAQGFQFKRLREGIATCMFADSPWLYSVK1ITTLGLGVGVGF
 配列番号: 70 MPKINFSEDLPPQAVNAQGFQFKRLREGIATCMFADSPWLYSVK1ITTLGLGVGVGF
 配列番号: 71 MPKINFSEDLPPQAVNAQGFQFKRLREGIATCMFADSPWLYSVK1ITTLGLGVGVGF

 配列番号: 68 MVQYQYFICAVLGHMVQYQGNWLSHIDCHQTFERNRNWNLVGLVFNQGLQFSVTWKK
 配列番号: 69 MVQYQYFICAVLGHMVQYQGNWLSHIDCHQTFERNRNWNLVGLVFNQGLQFSVTWKK
 配列番号: 70 MVQYQYFICAVLGHMVQYQGNWLSHIDCHQTFERNRNWNLVGLVFNQGLQFSVTWKK
 配列番号: 71 MVQYQYFICAVLGHMVQYQGNWLSHIDCHQTFERNRNWNLVGLVFNQGLQFSVTWKK

 配列番号: 68 DRHNHAHSATNVGQHDID1DNFLPMSMDSDTRASPIRKLQFOQYFVVLICLLRF1
 配列番号: 69 DRHNHAHSATNVGQHDID1DNFLPMSMDSDTRASPIRKLQFOQYFVVLICLLRF1
 配列番号: 70 DRHNHAHSATNVGQHDID1DNFLPMSMDSDTRASPIRKLQFOQYFVVLICLLRF1
 配列番号: 71 DRHNHAHSATNVGQHDID1DNFLPMSMDSDTRASPIRKLQFOQYFVVLICLLRF1

 配列番号: 68 WCFCQVLTVRSKLDKRNQYRSQYKKAIGALANTLKAFLHFFPMS1LSLTVLFFVS
 配列番号: 69 WCFCQVLTVRSKLDKRNQYRSQYKKAIGALANTLKAFLHFFPMS1LSLTVLFFVS
 配列番号: 70 WCFCQVLTVRSKLDKRNQYRSQYKKAIGALANTLKAFLHFFPMS1LSLTVLFFVS
 配列番号: 71 WCFCQVLTVRSKLDKRNQYRSQYKKAIGALANTLKAFLHFFPMS1LSLTVLFFVS

 配列番号: 68 LVVGGF1ATVFNHMYPLSKI1GDSVNDHGFSVQI1HETNMIRG1ITDWFQGLNYQIE
 配列番号: 69 LVVGGF1ATVFNHMYPLSKI1GDSVNDHGFSVQI1HETNMIRG1ITDWFQGLNYQIE
 配列番号: 70 LVVGGF1ATVFNHMYPLSKI1GDSVNDHGFSVQI1HETNMIRG1ITDWFQGLNYQIE
 配列番号: 71 LVVGGF1ATVFNHMYPLSKI1GDSVNDHGFSVQI1HETNMIRG1ITDWFQGLNYQIE

 配列番号: 68 HNLWPLPRNLTAVSVQVQGLQKRNHLPNHPH3PHEGVL1LYL1YAVFARAKAQPAK3
 配列番号: 69 HNLWPLPRNLTAVSVQVQGLQKRNHLPNHPH3PHEGVL1LYL1YAVFARAKAQPAK3
 配列番号: 70 HNLWPLPRNLTAVSVQVQGLQKRNHLPNHPH3PHEGVL1LYL1YAVFARAKAQPAK3
 配列番号: 71 HNLWPLPRNLTAVSVQVQGLQKRNHLPNHPH3PHEGVL1LYL1YAVFARAKAQPAK3

 配列番号: 68 AL.
 配列番号: 69 AL.
 配列番号: 70 A-L
 配列番号: 71 A-L

图 13

【図 14 A】

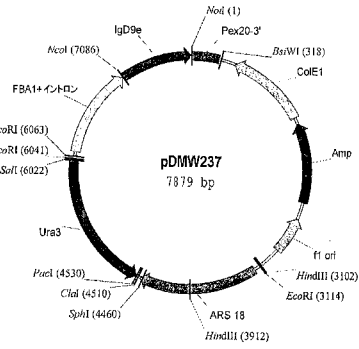


図 14A

【図 14 C】

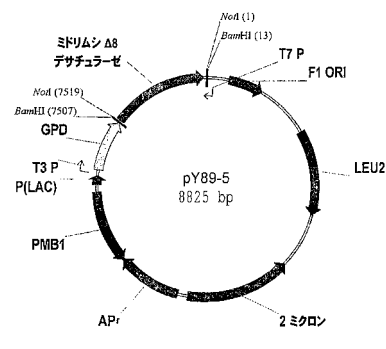


図 14C

【図 14 B】

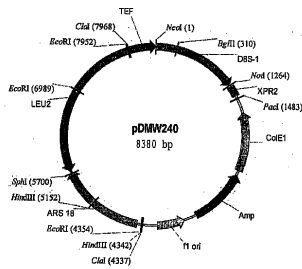


FIG. 14B

【図 14 D】

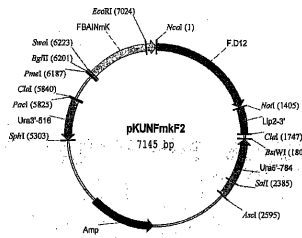


FIG. 14D

【図 15 A】

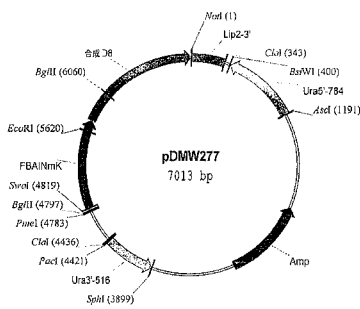


図 15A

【図 15 C】

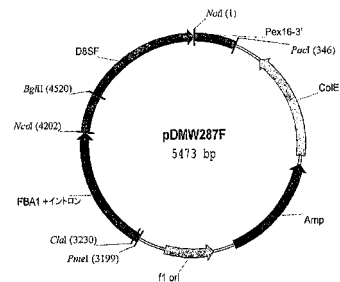


図 15C

【図 15 B】

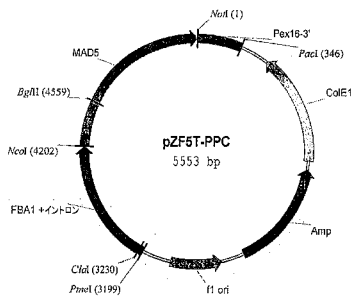


図 15B

【図 15 D】

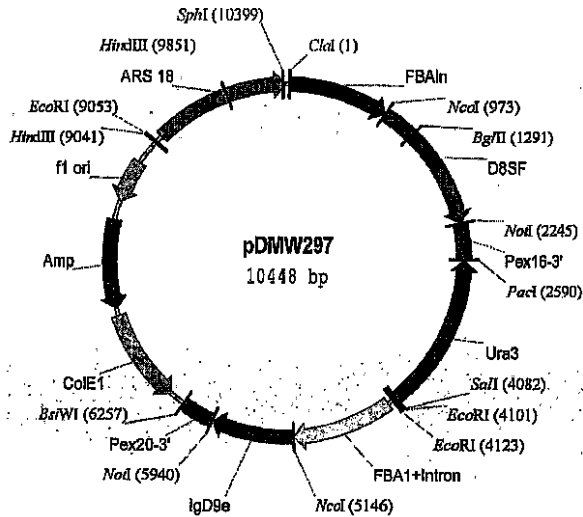


FIG. 15D

【図 16 A】

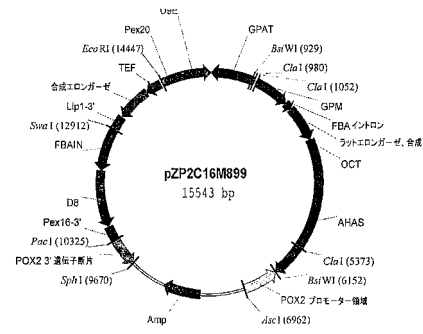


図 16A

【図 16 B】

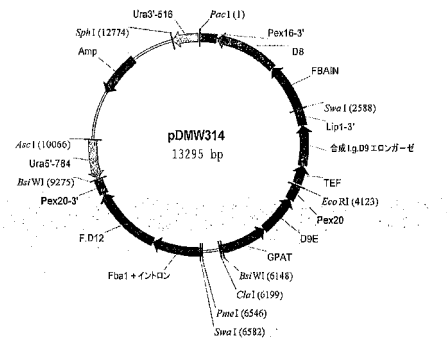


図 16B

【図 16 C】

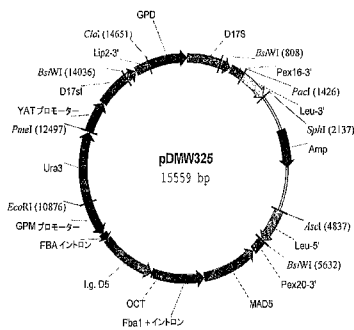


図 16C

【図 16 D】

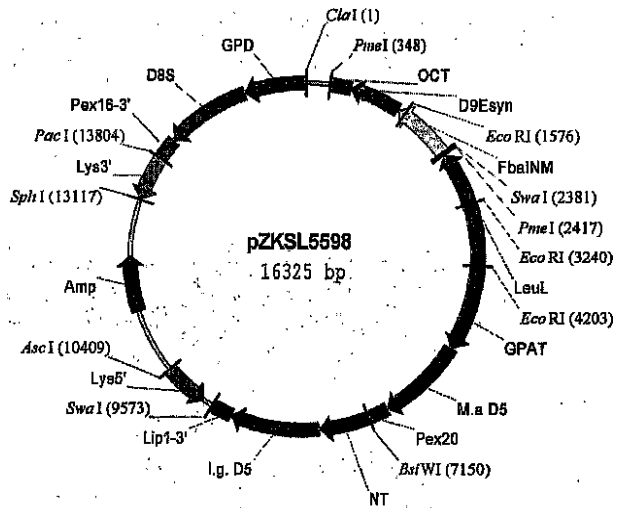


FIG. 16D

【図 17 A】

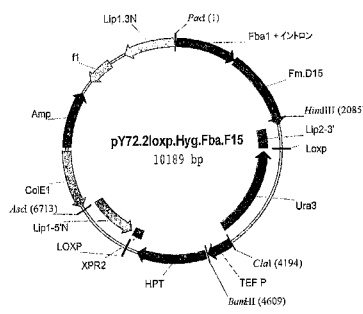


図 17A

【図 17 B】

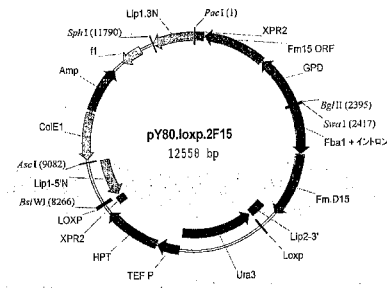


図 17B

【図 17 D】

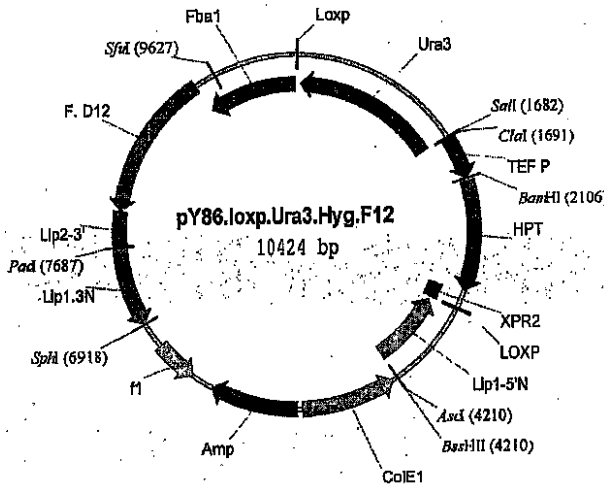


FIG. 17D

【図 17 C】

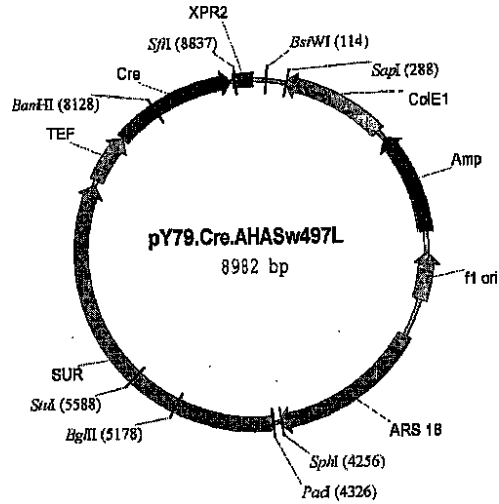


FIG. 17C

【図 18 A】

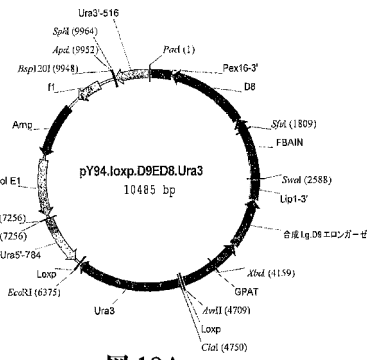


図 18A

【図 18 B】

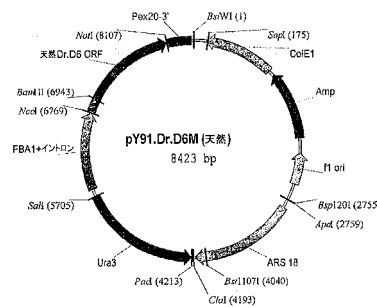


図 18B

【図 18 C】

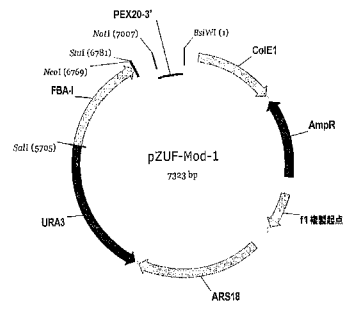


FIG. 18C

【図 18 E】

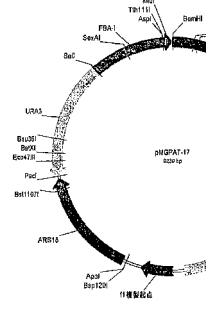


図 18E

【図 18 D】

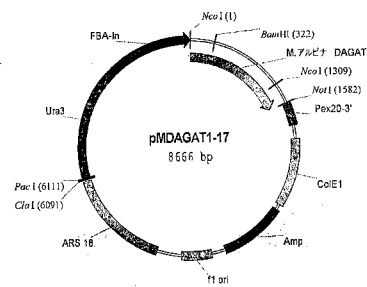


図 18D

【図 19】

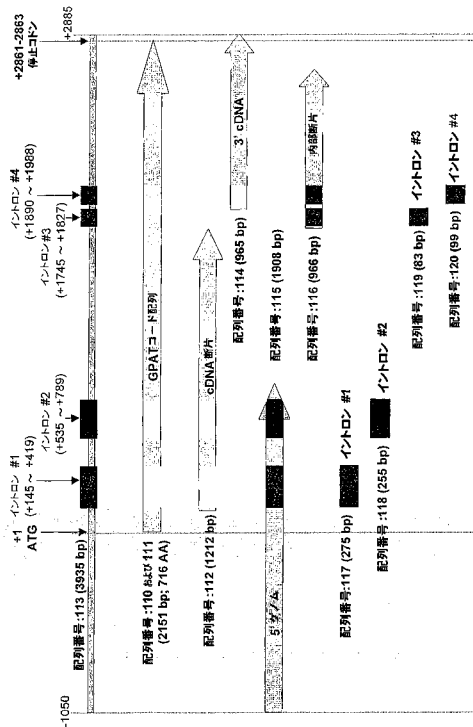


図 19

【図 20】

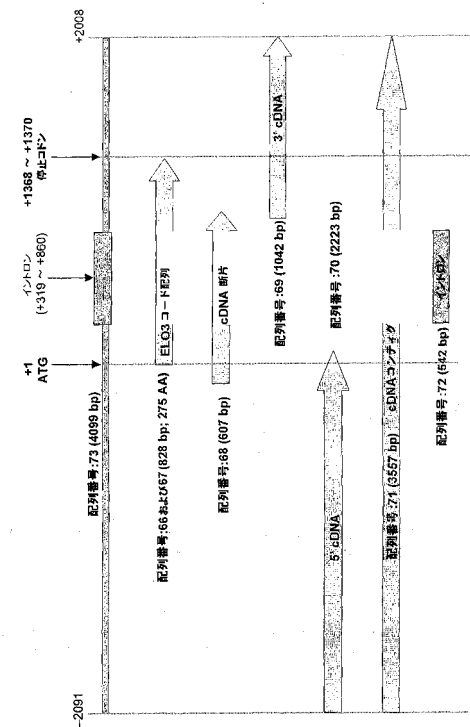


図 20

【図 2 1 B】

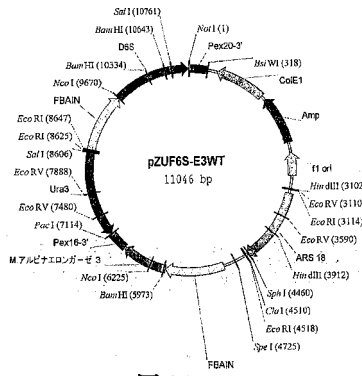


FIG. 21A

A circular map of the pZKUGPYE2 plasmid, which is 6498 bp in size. The map shows various restriction sites and genes. Clockwise from the top: NotI (1), PstI 20, InrW1 (218), Ura3-3', PstI (1038), CoIE1, amp, ori, SufI (3882), Ura3-5', ClnI (4606), GPAT, and NotI (5581). The plasmid is labeled pZKUGPYE2 6498 bp.

FIG. 22A

FIG. 22B

图 22C

【図 2 2 E】

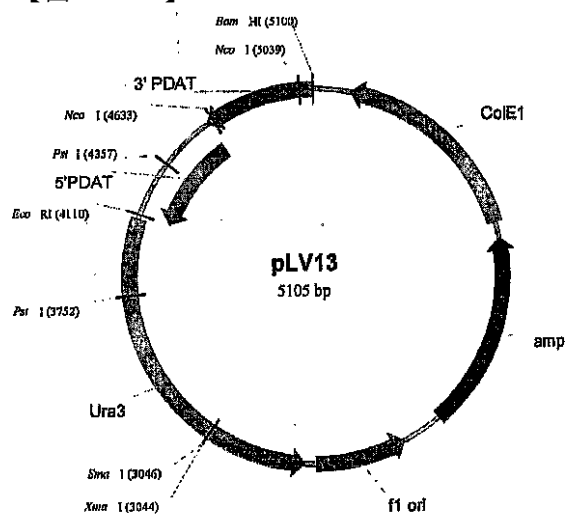


FIG. 22E

0005129574000001.xml

フロントページの続き

- (72)発明者 ダムド, ハワード・ジー
アメリカ合衆国デラウェア州19707 ホツケシン・ケンウイクロード4
- (72)発明者 ギリーズ, ピーター・ジョン
アメリカ合衆国ペンシルベニア州19350 ランデナーグ・ポートロイヤルコート501
- (72)発明者 マクル, ダニエル・ジョセフ
アメリカ合衆国ペンシルベニア州19130 フィラデルフィア・メレディスストリート2525
- (72)発明者 ピカタジオ, スチーブン・ケイ
アメリカ合衆国ペンシルベニア州19350 ランデンバーグ・メドーウツドレーン17
- (72)発明者 ポラク, ダナ・ウォルターズ・エム
アメリカ合衆国ペンシルベニア州19063 メディア・イーストベーカーズストリート123シー
- (72)発明者 ラギアンティ, ジェイムズ・ジョン
アメリカ合衆国デラウェア州19701 ベア・デサイデドリレーン15
- (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 ヤダブ, ナレンドラ・エス
アメリカ合衆国ペンシルベニア州19317 チヤズフォード・ノルレーン3704
- (72)発明者 ツアング, ホンシアング
アメリカ合衆国ペンシルベニア州19317 チヤズフォード・ロサーフイーールドレーン3808
- (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 ウェストチエスター・リベアロード544

審査官 小倉 梢

- (56)参考文献 国際公開第00/040705 (WO, A1)
特表2001-523092 (JP, A)
特表2000-508888 (JP, A)
特開平10-070992 (JP, A)
特表2004-521608 (JP, A)
米国特許出願公開第2003/0157144 (US, A1)
国際公開第03/064596 (WO, A1)
特表2004-530418 (JP, A)
特表2003-523746 (JP, A)
国際公開第2004/057001 (WO, A1)
Biochimie, 2004年10月, Vol. 86, p. 793-798

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-90
C12N 1/19
C12P 7/00-66
CA/BIOSIS/MEDLINE(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq
PubMed
WPI