

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-184747

(P2017-184747A)

(43) 公開日 平成29年10月12日(2017. 10. 12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 P 7/64 (2006.01)	C 1 2 P 7/64 Z N A	2 B 0 3 0
A 2 3 L 5/00 (2016.01)	A 2 3 L 5/00 L	4 B 0 3 5
A O 1 H 5/00 (2006.01)	A O 1 H 5/00 A	4 B 0 6 4
A O 1 H 1/00 (2006.01)	A O 1 H 1/00 A	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	
審査請求 有 請求項の数 18 O L 外国語出願 (全 112 頁)		

(21) 出願番号	特願2017-98132 (P2017-98132)	(71) 出願人	501035309
(22) 出願日	平成29年5月17日 (2017. 5. 17)		ダウ アグロサイエンシズ エルエルシ
(62) 分割の表示	特願2014-523008 (P2014-523008)		ー
原出願日	平成24年7月26日 (2012. 7. 26)		アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 2
(31) 優先権主張番号	61/511, 878		6 8, インディアナポリス, ジオンス
(32) 優先日	平成23年7月26日 (2011. 7. 26)	(71) 出願人	503220392
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ディーエスエム アイビー アセツ ビ
			ー, プイ,
			オランダ国, 6 4 1 1 ティーイー ヘ
			ーレン, ヘット オーバールーン 1
		(74) 代理人	100092783
			弁理士 小林 浩
		(74) 代理人	100095360
			弁理士 片山 英二
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 植物におけるDHAおよび他のLC-PUFAの生成

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 遺伝子改変されたダイズ植物から得られた油の提供。

【解決手段】 遺伝子改変されたダイズ植物から得られた油であって、前記油が、DHA（ドコサヘキサエン酸（C22：6，n-3））またはDPA（ドコサペンタエン酸（C22：5，n-6またはn-3））を含み、前記油が、特定のアミノ酸配列を含む第1の多価不飽和脂肪酸（PUFA）シンターゼをコードする核酸分子、特定のアミノ酸配列を含む第2のPUFAシンターゼをコードする核酸分子、および特定のアミノ酸配列を含む第3のPUFAシンターゼをコードする核酸分子；特定のアミノ酸配列を含むホスホパンテティニルトランスフェラーゼ（PPTase）をコードする核酸分子、ならびに特定のアミノ酸配列を含むアシルCoAシンターゼ（ACoAS）をコードする核酸分子を含む、遺伝子改変されたダイズ植物から得られた油。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) 少なくとも 1 種の多価不飽和脂肪酸 (P U F A) を生成する P U F A シンターゼをコードする核酸配列を含む核酸分子；および

(i i) ホスホパンテテインルトランスフェラーゼ (P P T a s e) をコードする配列を含む核酸分子

を含む、遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部。

【請求項 2】

P U F A シンターゼが、配列番号 1 のアミノ酸配列に対して少なくとも 8 0 % 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部。

10

【請求項 3】

P U F A シンターゼが、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む、請求項 2 に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部。

【請求項 4】

P U F A シンターゼをコードする核酸配列が、配列番号 6 の核酸配列に対して少なくとも 8 0 % 同一な核酸配列を含む、請求項 1 に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部。

【請求項 5】

P U F A シンターゼをコードする核酸配列が、配列番号 6 の核酸配列を含む、請求項 4 に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部。

20

【請求項 6】

P U F A シンターゼが、配列番号 2 のアミノ酸配列に対して少なくとも 8 0 % 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部。

【請求項 7】

P U F A シンターゼが、配列番号 2 のアミノ酸配列を含む、請求項 6 に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部。

【請求項 8】

P U F A シンターゼをコードする核酸配列が、配列番号 7 の核酸配列に対して少なくとも 8 0 % 同一な核酸配列を含む、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部。

30

【請求項 9】

P U F A シンターゼをコードする核酸配列が、配列番号 7 の核酸配列を含む、請求項 8 に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部。

【請求項 1 0】

P U F A シンターゼが、配列番号 3 のアミノ酸配列に対して少なくとも 8 0 % 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部。

【請求項 1 1】

40

P U F A シンターゼが、配列番号 3 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 0 に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部。

【請求項 1 2】

P U F A シンターゼをコードする核酸配列が、配列番号 8 の核酸配列に対して少なくとも 8 0 % 同一な核酸配列を含む、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部。

【請求項 1 3】

P U F A シンターゼをコードする核酸配列が、配列番号 8 の核酸配列を含む、請求項 1 2 に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部。

【請求項 1 4】

50

P U F A シンターゼが、配列番号 1 ～ 3 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部。

【請求項 1 5】

P U F A シンターゼをコードする核酸配列が、配列番号 6 ～ 8 の核酸配列を含む、請求項 1 に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部。

【請求項 1 6】

P P T a s e が、配列番号 5 に対して少なくとも 8 0 % 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 1 から 1 5 のいずれか一項に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部。

【請求項 1 7】

P P T a s e が、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 6 に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部。

【請求項 1 8】

P P T a s e をコードする核酸配列が、配列番号 1 0 の核酸配列に対して少なくとも 8 0 % 同一である、請求項 1 から 1 7 のいずれか一項に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部。

【請求項 1 9】

P P T a s e をコードする核酸配列が、配列番号 1 0 の核酸配列を含む、請求項 1 8 に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部。

【請求項 2 0】

(i) および (i i) の核酸配列が、単一の組換え発現ベクター中に含まれる、請求項 1 から 1 9 のいずれか一項に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部。

【請求項 2 1】

(i) または (i i) の核酸配列が、種子特異的プロモーターまたは葉特異的プロモーターに作動可能に連結されている、請求項 1 から 2 0 のいずれか一項に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部。

【請求項 2 2】

(i) または (i i) の核酸配列が、P v D l e c 2、L f K C S 3、F A E 1、B o A C P、B n a N a p i n C、ユビキチンまたはC s V M Vプロモーターに作動可能に連結されている、請求項 1 から 2 0 のいずれか一項に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部。

【請求項 2 3】

(i i i) アシル-C o A シンターゼ (A C o A S) をコードする核酸配列を含む核酸分子をさらに含む、請求項 1 から 2 2 のいずれか一項に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部。

【請求項 2 4】

A C o A S が、配列番号 4 に対して少なくとも 8 0 % 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 2 3 に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部。

【請求項 2 5】

A C o A S が、配列番号 4 のアミノ酸配列を含む、請求項 2 4 に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部。

【請求項 2 6】

A C o A S をコードする核酸配列が、配列番号 9 の核酸配列に対して少なくとも 8 0 % 同一な核酸配列を含む、請求項 2 3 に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部。

【請求項 2 7】

10

20

30

40

50

A C o A Sをコードする核酸配列が、配列番号9の核酸配列を含む、請求項26に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部。

【請求項28】

(i)、(ii)および(iii)の核酸配列が、単一の組換え発現ベクター中に含まれる、請求項23から27のいずれか一項に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部。

【請求項29】

(i)、(ii)または(iii)の核酸配列が、種子特異的プロモーターまたは葉特異的プロモーターに作動可能に連結されている、請求項23から27のいずれか一項に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部。

10

【請求項30】

(i)、(ii)または(iii)の核酸配列が、PvDlec2、LfKCS3、FAE1、BoACP、BnaNapinC、ユビキチンまたはCsVMVプロモーターに作動可能に連結されている、請求項23から27のいずれか一項に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部。

【請求項31】

アセチルCoAカルボキシラーゼ(ACCase)をコードする核酸配列または2型ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ(DGAT2)をコードする核酸配列をさらに含む、請求項1から30のいずれか一項に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部。

20

【請求項32】

pDAB7361、pDAB7362、pDAB7363、pDAB7368、pDAB7369、pDAB7370、pDAB100518、pDAB101476、pDAB101477、pDAB9166、pDAB9167、pDAB7379、pDAB7380、pDAB9323、pDAB9330、pDAB9337、pDAB9338、pDAB9344、pDAB9396、pDAB101412、pDAB7733、pDAB7734、pDAB101493、pDAB109507、pDAB109508、pDAB109509、pDAB9151、pDAB108207、pDAB108208、pDAB108209、pDAB9159、pDAB9147、pDAB108224、およびpDAB108225のうち少なくとも1つを含む、遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部。

30

【請求項33】

検出可能な量のDHA(ドコサヘキサエン酸(C22:6, n-3))、DPA(n-6)(ドコサペンタエン酸(C22:5, n-6))またはEPA(エイコサペンタエン酸(C20:5, n-3))を含む、請求項1から32のいずれか一項に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部。

【請求項34】

総脂肪酸の重量で0.01%~15%のDHAを含む、請求項33に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部。

【請求項35】

総脂肪酸の重量で0.05%~10%のDHAを含む、請求項34に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部。

40

【請求項36】

総脂肪酸の重量で0.05%~5%のDHAを含む、請求項35に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部。

【請求項37】

総脂肪酸の重量で0.01%~10%のEPAを含む、請求項1から36のいずれか一項に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部。

【請求項38】

総脂肪酸の重量で0.05%~5%のEPAを含む、請求項37に記載の遺伝子改変さ

50

れたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部。

【請求項 39】

総脂肪酸の重量で 0.05%～1%の EPA を含む、請求項 38 に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部。

【請求項 40】

総脂肪酸の重量で 0.01%～10%の DPA (n-6) を含む、請求項 1 から 39 のいずれか一項に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部。

【請求項 41】

総脂肪酸の重量で 0.01%～5%の DPA (n-6) を含む、請求項 40 に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部。

10

【請求項 42】

総脂肪酸の重量で 0.01%～1%の DPA (n-6) を含む、請求項 1 から 34 および 39 から 47 のいずれか一項に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部。

【請求項 43】

総脂肪酸の重量で 1:1～1:30 の比率の EPA : DHA を含む、請求項 1 から 33 のいずれか一項に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部。

【請求項 44】

総脂肪酸の重量で 1:1～1:3 の比率の EPA : DHA を含む、請求項 43 に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部。

20

【請求項 45】

総脂肪酸の重量で 1:1～1:10 の比率の DPA (n-6) : DHA を含む、請求項 1 から 33 のいずれか一項に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部。

【請求項 46】

総脂肪酸の重量で 1:1～1:3 の比率の DPA (n-6) : DHA を含む、請求項 45 に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部。

【請求項 47】

請求項 1 から 46 のいずれか一項に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部から得られた油。

30

【請求項 48】

請求項 1 から 46 のいずれか一項に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織またはそれらの一部から得られた種子。

【請求項 49】

請求項 1 から 46 のいずれか一項に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子もしくはそれらの一部から得られた油、または請求項 1 から 46 のいずれか一項に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織もしくはそれらの一部から得られた種子を含む食物製品。

40

【請求項 50】

請求項 1 から 46 のいずれか一項に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子もしくはそれらの一部から得られた油、または請求項 1 から 46 のいずれか一項に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織もしくはそれらの一部から得られた種子を含む機能性食物。

【請求項 51】

請求項 1 から 46 のいずれか一項に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子もしくはそれらの一部から得られた油、または請求項 1 から 46 のいずれか一項に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織もしくはそれらの一部から得られた種子を含む医薬製品。

50

【請求項 5 2】

請求項 1 から 4 6 のいずれか一項に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子もしくはそれらの一部から、または請求項 1 から 4 6 のいずれか一項に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織もしくはそれらの一部の種子から油を回収する工程を含む、少なくとも 1 種の P U F A を含む油を生成する方法。

【請求項 5 3】

請求項 1 から 4 6 のいずれか一項に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部を成長させる工程を含む、少なくとも 1 種の P U F A を含む油を生成する方法。

【請求項 5 4】

請求項 1 から 4 6 のいずれか一項に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織またはそれらの一部の種子から油を回収する工程を含む、種子油中の少なくとも 1 種の P U F A を生成する方法。

【請求項 5 5】

請求項 1 から 4 6 のいずれか一項に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部を成長させる工程を含む、種子油中の少なくとも 1 種の P U F A を生成する方法。

【請求項 5 6】

請求項 1 から 4 6 のいずれか一項に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子もしくはそれらの一部、請求項 4 7 に記載の油、請求項 4 8 に記載の種子、請求項 4 9 に記載の食物製品、請求項 5 0 に記載の機能性食物、または請求項 5 1 に記載の医薬製品を個体に提供する工程を含む、少なくとも 1 種の P U F A を含むサプリメントまたは治療用製品を個体に提供する方法。

【請求項 5 7】

P U F A が D H A である、請求項 5 3 から 5 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 8】

P U F A が E P A である、請求項 5 3 から 5 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 9】

P U F A が D P A (n - 6) である、請求項 5 3 から 5 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 0】

ダイズ植物または植物細胞を、(i) 藻類 P U F A シンターゼをコードする配列を含む核酸分子；および (i i) ホスホバンテイニルトランスフェラーゼ (P P T a s e) をコードする配列を含む核酸分子で形質転換する工程を含む、請求項 1 から 4 6 のいずれか一項に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織またはそれらの一部を生成する方法。

【請求項 6 1】

ダイズ植物または植物細胞を、(i i i) アシル- C o A シンテターゼ (A C o A S) をコードする配列を含む核酸分子で形質転換する工程をさらに含む、請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 2】

総脂肪酸の重量で 0 . 0 5 % ~ 1 5 % の D H A を含むダイズ油。

【請求項 6 3】

総脂肪酸の重量で 0 . 0 5 % ~ 5 % の E P A をさらに含む、請求項 6 2 に記載のダイズ油。

【請求項 6 4】

総脂肪酸の重量で 0 . 0 1 % ~ 5 % の D P A (n - 6) をさらに含む、請求項 6 2 または 6 3 に記載のダイズ油。

【請求項 6 5】

総脂肪酸の重量で 1 : 1 ~ 1 : 3 0 の比率の E P A : D H A を含むダイズ油。

10

20

30

40

50

【請求項 66】

総脂肪酸の重量で 1 : 1 ~ 1 : 3 の比率の EPA : DHA を含む、請求項 65 に記載のダイズ油。

【請求項 67】

総脂肪酸の重量で 1 : 1 ~ 1 : 10 の比率の DPA (n-6) : DHA を含むダイズ油。

【請求項 68】

総脂肪酸の重量で 1 : 1 ~ 1 : 3 の比率の DPA (n-6) : DHA を含む、請求項 67 に記載のダイズ油。

【請求項 69】

請求項 47 および 58 から 68 のいずれか一項に記載の油を含む組成物。

【請求項 70】

ダイズ植物または植物細胞を、(i) PUFA シンターゼをコードする核酸配列を含む核酸分子；(ii) アシル-CoA シンターゼ (ACoAS) をコードする核酸配列を含む核酸分子；および (iii) ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ (PPase) をコードする配列を含む核酸分子を含む発現カセットで形質転換する工程を含む、請求項 1 から 42 のいずれか一項に記載の遺伝子改変されたダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部を生成する方法。

【請求項 71】

請求項 47 および 58 から 68 のいずれか一項に記載の油、ならびに別の油を含む油ブレンド。

【請求項 72】

別の油が、植物油、魚油、微生物油またはそれらの混合物である、請求項 71 に記載の油ブレンド。

【請求項 73】

請求項 47 および 58 から 68 のいずれか一項に記載の油を含む餌または食事組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、宿主生物における多価不飽和脂肪酸 (PUFA) の生成を可能にしかつ／または改善する、PUFA シンターゼ系および 1 つまたは複数のアクセサリータンパク質で遺伝子改変された組換え宿主生物 (例えば植物) に一般に関する。本発明は、かかる生物を作製および使用する方法 (例えば、PUFA を得るため) ならびにかかる生物から得られた製品 (例えば、油および種子) にも関する。

【背景技術】

【0002】

多価不飽和脂肪酸 (PUFA) は、栄養学的適用、医薬適用、産業適用および他の目的のために有用であるとみなされている。しかし、天然供給源 (例えば魚油) からおよび化学合成からの PUFA の現在の供給は、長期の商業的要求には不十分である。

【0003】

植物 (例えば、油糧種子作物) から誘導される植物油は、比較的安価であり、魚油に付随する汚染問題を有さない。しかし、商業的に開発された植物および植物油中に見出される PUFA には、より飽和したまたはより長い鎖の PUFA は典型的には含まれず、リノール酸 (18 炭素、 $\Delta 9$ 位および 12 位に 2 つの二重結合を有する 18 : 2 $\Delta 9, 12$) およびリノレン酸 (18 : 3 $\Delta 9, 12, 15$) などの脂肪酸が典型的に含まれるに過ぎない。

【0004】

植物によって内因的に生成される脂肪酸の改変による、植物におけるより不飽和のまたはより長い鎖の PUFA の生成が記載されている。例えば、脂肪酸エロンガーゼおよび／またはデサチュラーゼをコードする種々の個々の遺伝子による植物の遺伝子改変が、顕著

10

20

30

40

50

なレベルのより長い鎖およびより不飽和の P U F A、例えばエイコサペンタエン酸 (E P A) を含むが、顕著なレベルのより短い鎖のおよび不飽和度が低い混合型の P U F A もまた含む、葉または種子の生成を生じるとして記載されている (Qiら、Nature Biotech. 22:739 (2004); W O O 4 / 0 7 1 4 6 7 ; Abbadira、Plant Cell 16:1 (2004); NapierおよびSayanova、Proceedings of the Nutrition Society 64:387-393 (2005); Robertら、Functional Plant Biology 32:473-479 (2005); 米国出願公開番号 2 0 0 4 / 0 1 7 2 6 8 2、米国出願番号 6 1 / 3 4 5, 5 3 7、2 0 1 0 年 5 月 1 7 日出願)。

【0005】

マメ科 (Fabaceae) (またはマメ科 (Leguminosae)) は、マメ科植物 (legume) 科、エンドウマメ (pea) 科、マメ (bean) 科または豆類 (pulse) 科として一般に公知の、経済的に重要な顕花植物の大きな科である。グリキネ属 (Glycine) は、マメ科 (Fabaceae) 中の 1 つの属であり、例えば、グリキネ・アルビカンス (Glycine albicans)、グリキネ・アフィオノタ (Glycine aphyonota)、グリキネ・アレナリ (Glycine arenari)、グリキネ・アルギレア (Glycine argyrea)、グリキネ・カネセンス (Glycine canescens)、グリキネ・克蘭デスチネ (Glycine clandestine)、グリキネ・クルヴァタ (Glycine curvata)、グリキネ・キルトロバ (Glycine cyrtoloba)、グリキネ・ファルカテ (Glycine falcate)、グリキネ・グラセイ (Glycine gracei)、グリキネ・ヒルチカウリス (Glycine hirticaulis)、グリキネ・ヒルチカウリス亜種レプトサ (Glycine hirticaulis subsp. leptosa)、グリキネ・ラクトヴィレンス (Glycine lactovirens)、グリキネ・ラティフォリア (Glycine latifolia)、グリキネ・ラトロベアナ (Glycine latrobeana)、グリキネ・ミクロフィラ (Glycine microphylla)、グリキネ・モンティス・ドゥグラス (Glycine montis-douglas)、グリキネ・ペラトサ (Glycine peratosa)、グリキネ・ペスカドレンシス (Glycine pescadrensis)、グリキネ・ピンダニカ (Glycine pindanica)、グリキネ・プレニイ (Glycine pullenii)、グリキネ・ルビギノサ (Glycine rubiginosa)、グリキネ・ステノフィタ (Glycine stenophita)、グリキネ・シンデティカ (Glycine syndetika)、グリキネ・タバキナ (Glycine tabacina)、グリキネ・トメントラ (Glycine tomentella)、ツルマメ (Glycine soja) およびダイズ (Glycine max) が含まれる。マメ科 (Fabaceae) には、ラッカセイ、マメ (インゲンマメ (Phaseolus vulgaris))、ソラマメ (Vicia faba) またはエンドウマメ (Pisum sativum) もまた含まれる。

【0006】

殆どのダイズ油は、ヒトの消費のために生成された植物油の形態である。産業適用におけるダイズ油の使用に関しても、成長中の市場が存在する。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

植物、植物種子または植物油中の大量 (例えば、商業的な量) のより長い鎖またはより不飽和の P U F A、ならびに植物、植物種子または植物油中のかかる P U F A が富化された大量の脂質 (例えば、トリアシルグリセロール (T A G) およびリン脂質 (P L)) を効率的かつ効果的に生成するための比較的安価な方法が、当該分野で必要とされている。本明細書中に記載されているように、多価不飽和脂肪酸 (P U F A) シンターゼおよび 1 つまたは複数のアクセサリタンパク質で遺伝子改変された組換え宿主生物を提供することによって、宿主生物 (例えば植物) における P U F A 生成を提供および改善するための系は、当該分野におけるアプローチに対する重要な代替法である。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、(i) 少なくとも 1 種の多価不飽和脂肪酸 (P U F A) を生成する P U F A シンターゼ (例えば、藻類 P U F A シンターゼ) をコードする核酸配列; および (i i) ホスホパンテテイル (phosphopantetheinyl) 補因子を P U F A シンターゼ系 (例えば、藻類 P U F A シンターゼ系) A C P ドメインに転移させるホスホパンテテイルトラン

スフェラーゼ (PPTase) をコードする核酸配列を含む、遺伝子改変された植物 (例えば、マメ科 (Fabaceae) またはグリキネ属 (Glycine) の植物、例えばダイズ)、子孫、種子、細胞、組織またはそれらの一部を対象とする。

【0009】

本発明のいくつかの実施形態において、PUFAシンターゼは、配列番号1のアミノ酸配列に対して80%~99%同一なアミノ酸配列を含むか、または配列番号1のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、PUFAシンターゼをコードする核酸配列は、配列番号6の核酸配列に対して80%~99%同一な核酸配列を含むか、または配列番号6の核酸配列を含む。いくつかの実施形態において、PUFAシンターゼは、配列番号2のアミノ酸配列に対して80%~99%同一なアミノ酸配列を含むか、または配列番号2のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、PUFAシンターゼをコードする核酸配列は、配列番号7の核酸配列に対して80%~99%同一な核酸配列を含むか、または配列番号7の核酸配列を含む。いくつかの実施形態において、PUFAシンターゼは、配列番号3のアミノ酸配列に対して80%~99%同一なアミノ酸配列を含むか、または配列番号3のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、PUFAシンターゼをコードする核酸配列は、配列番号8の核酸配列に対して80%~99%同一な核酸配列を含むか、または配列番号8の核酸配列を含む。いくつかの実施形態において、PUFAシンターゼは、配列番号1、2もしくは3のアミノ酸配列またはそれらの任意の組合せを含む。いくつかの実施形態において、PUFAシンターゼをコードする核酸配列は、配列番号6、7もしくは8の核酸配列またはそれらの任意の組合せを含む。

【0010】

いくつかの実施形態において、PPTaseは、配列番号5に対して80%~99%同一なアミノ酸配列を含むか、または配列番号5のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、PPTaseをコードする核酸配列は、配列番号10の核酸配列に対して80%~99%同一であるか、または配列番号10の核酸配列を含む。

【0011】

いくつかの実施形態において、(i) および (ii) の核酸配列は、単一の組換え発現ベクター中に含まれる。いくつかの実施形態において、(i) および (ii) の核酸配列は、異なる組換え発現ベクター中に含まれる。いくつかの実施形態において、(i) および/または (ii) の核酸配列 (複数可) は、種子特異的プロモーターに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態において、(i) および/または (ii) の核酸配列 (複数可) は、PvDlec2、PvPhaseolin、LfKCS3、FAE1、BoACP および BnaNapinC から選択されるプロモーターに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態において、(i) および/または (ii) の核酸配列 (複数可) は、葉特異的プロモーターに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態において、(i) および/または (ii) の核酸配列 (複数可) は、ユビキチンまたは CsVMV プロモーターに作動可能に連結されている。

【0012】

いくつかの実施形態において、遺伝子改変された植物、子孫、種子、細胞、組織またはそれらの一部は、(iii) 長鎖PUFA遊離脂肪酸 (PFFA) のアシル-CoA への変換を触媒するアシル-CoA シンターゼ (ACoAS) をコードする核酸配列をさらに含む。いくつかの実施形態において、ACoASは、配列番号4に対して80%~99%同一なアミノ酸配列を含むか、または配列番号4のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、ACoASは、配列番号9の核酸配列に対して80%~99%同一な核酸配列を含むか、または配列番号9の核酸配列を含む。いくつかの実施形態において、ACoASをコードする核酸配列は、配列番号34の核酸配列を含む。いくつかの実施形態において、(i)、(ii) および/または (iii) の核酸配列は、単一の組換え発現ベクター中に含まれる。いくつかの実施形態において、(i)、(ii) および (iii) の核酸配列は、異なる組換え発現ベクター中に含まれる。いくつかの実施形態において、(i) および (ii) の核酸配列が単一の組換え発現ベクター中に含まれ、(iii)

の核酸配列が異なる組換え発現ベクター中に含まれる。いくつかの実施形態において、(i) および (i i i) の核酸配列が単一の組換え発現ベクター中に含まれ、(i i) の核酸配列が異なる組換え発現ベクター中に含まれる。いくつかの実施形態において、(i i) および (i i i) の核酸配列が単一の組換え発現ベクター中に含まれ、(i) の核酸配列が異なる組換え発現ベクター中に含まれる。いくつかの実施形態において、(i)、(i i) および／または (i i i) の核酸配列（複数可）は、種子特異的プロモーターに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態において、(i)、(i i) および／または (i i i) の核酸配列（複数可）は、P v D l e c 2、L f K C S 3、F A E 1、B o A C P および B n a N a p i n C から選択されるプロモーターに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態において、(i)、(i i) および／または (i i i) の核酸配列（複数可）は、葉特異的プロモーターに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態において、(i)、(i i) および／または (i i i) の核酸配列（複数可）は、ユビキチンまたは C s V M V プロモーターに作動可能に連結されている。

【0013】

いくつかの実施形態において、遺伝子改変された植物、子孫、細胞、組織またはそれらの一部は、アセチル C o A カルボキシラーゼ (A C C a s e) をコードする核酸配列および／または 2 型ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ (D G A T 2) をコードする核酸配列をさらに含む。

【0014】

いくつかの実施形態において、遺伝子改変された植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部は、p D A B 7 3 6 1、p D A B 7 3 6 2、p D A B 7 3 6 3、p D A B 7 3 6 8、p D A B 7 3 6 9、p D A B 7 3 7 0、p D A B 1 0 0 5 1 8、p D A B 1 0 1 4 7 6、p D A B 1 0 1 4 7 7、p D A B 9 1 6 6、p D A B 9 1 6 7、p D A B 7 3 7 9、p D A B 7 3 8 0、p D A B 9 3 2 3、p D A B 9 3 3 0、p D A B 9 3 3 7、p D A B 9 3 3 8、p D A B 9 3 4 4、p D A B 9 3 9 6、p D A B 1 0 1 4 1 2、p D A B 7 7 3 3、p D A B 7 7 3 4、p D A B 1 0 1 4 9 3、p D A B 1 0 9 5 0 7、p D A B 1 0 9 5 0 8、p D A B 1 0 9 5 0 9、p D A B 9 1 5 1、p D A B 1 0 8 2 0 7、p D A B 1 0 8 2 0 8、p D A B 1 0 8 2 0 9、p D A B 9 1 5 9、p D A B 9 1 4 7、p D A B 1 0 8 2 2 4、および p D A B 1 0 8 2 2 5 のうち少なくとも 1 つを含む。

【0015】

いくつかの実施形態において、遺伝子改変された植物、子孫、細胞、組織、種子もしくはそれらの一部、または遺伝子改変された植物、子孫、種子、細胞、組織もしくはそれらの一部から得られた油（例えば種子油）は、検出可能な量の D H A（ドコサヘキサエン酸 (C 2 2 : 6, n - 3)）、D P A (n - 6)（ドコサペンタエン酸 (C 2 2 : 5, n - 6)）および／または E P A（エイコサペンタエン酸 (C 2 0 : 5, n - 3)）を含む。いくつかの実施形態において、遺伝子改変された植物、子孫、細胞、組織、種子もしくはそれらの一部、または遺伝子改変された植物、子孫、種子、細胞、組織もしくはそれらの一部から得られた油（例えば種子油）は、総脂肪酸の重量で 0. 0 1 % ~ 1 5 % の D H A、総脂肪酸の重量で 0. 0 5 % ~ 1 0 % の D H A、または総脂肪酸の重量で 0. 0 5 % ~ 5 % の D H A を含む。いくつかの実施形態において、遺伝子改変された植物、子孫、細胞、組織、種子もしくはそれらの一部、または遺伝子改変された植物、子孫、種子、細胞、組織もしくはそれらの一部から得られた油（例えば種子油）は、総脂肪酸の重量で 0. 0 1 % ~ 1 0 % の E P A、総脂肪酸の重量で 0. 0 5 % ~ 5 % の E P A、または総脂肪酸の重量で 0. 0 5 % ~ 1 % の E P A を含む。いくつかの実施形態において、遺伝子改変された植物、子孫、細胞、組織、種子もしくはそれらの一部、または遺伝子改変された植物、子孫、種子、細胞、組織もしくはそれらの一部から得られた油（例えば種子油）は、総脂肪酸の重量で 0. 0 1 % ~ 1 0 % の D P A (n - 6)、総脂肪酸の重量で 0. 0 1 % ~ 5 % の D P A (n - 6)、または総脂肪酸の重量で 0. 0 1 % ~ 1 % の D P A (n - 6) を含む。いくつかの実施形態において、遺伝子改変された植物、子孫、細胞、組織、種子もしくはそれらの一部、または遺伝子改変された植物、子孫、種子、細胞、組織もしくはそれ

らの一部から得られた油（例えば種子油）は、総脂肪酸の重量で 1 : 1 ~ 1 : 30 または 1 : 1 ~ 1 : 3 の比率の EPA : DHA を含む。いくつかの実施形態において、遺伝子改変された植物、子孫、細胞、組織、種子もしくはそれらの一部、または遺伝子改変された植物、子孫、種子、細胞、組織もしくはそれらの一部から得られた油（例えば種子油）は、総脂肪酸の重量で 1 : 1 ~ 1 : 10 または 1 : 1 ~ 1 : 3 の比率の DPA (n-6) : DHA を含む。いくつかの実施形態において、遺伝子改変された植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部から得られた油（例えば種子油）は、油の重量で 70 % ~ 99 % のトリグリセリドを含む。

【0016】

いくつかの実施形態において、検出可能な量の DHA、DPA (n-6) および／または EPA は、遺伝子改変された植物、子孫、組織、種子またはそれらの一部から得られた穀物および／または食事においても見出される。

10

【0017】

本発明は、本明細書中に記載される遺伝子改変された植物（例えばダイズ）、子孫、細胞、組織またはそれらの一部から得られた油（例えば種子油）または種子を対象とする。本発明は、本明細書中に記載される遺伝子改変された植物（例えばダイズ）、子孫、細胞、組織またはそれらの一部から得られた油（例えば種子油）を含む食物製品を対象とする。本発明は、本明細書中に記載される遺伝子改変された植物（例えばダイズ）、子孫、細胞、組織またはそれらの一部から得られた油（例えば種子油）または種子を含む機能性食物にも関する。本発明は、本明細書中に記載される遺伝子改変された植物（例えばダイズ）、子孫、細胞、組織または一部から得られた油（例えば種子油）または種子を含む医薬製品を対象とする。

20

【0018】

本発明は、本明細書中に記載される遺伝子改変された植物（例えばダイズ）、子孫、細胞、組織またはそれらの一部から、あるいは本明細書中に記載される遺伝子改変された植物（例えばダイズ）、子孫、細胞、組織またはそれらの一部の種子から油を回収する工程を含む、少なくとも 1 種の LC-PUFA を含む油を生成する方法を対象とする。本発明は、本明細書中に記載される遺伝子改変された植物（例えばダイズ）、子孫、細胞、組織またはそれらの一部を成長させる工程を含む、少なくとも 1 種の LC-PUFA を含む油を生成する方法にも関する。本発明は、本明細書中に記載される遺伝子改変された植物（例えばダイズ）、子孫、細胞、組織またはそれらの一部の種子から油を回収する工程を含む、種子油中の少なくとも 1 種の LC-PUFA を生成する方法にも関する。

30

【0019】

本発明は、本明細書中に記載される遺伝子改変された植物（例えばダイズ）、子孫、細胞、組織またはそれらの一部を成長させる工程を含む、種子油中の少なくとも 1 種の PUFA を生成する方法を対象とする。本発明は、本明細書中に記載される遺伝子改変された植物（例えばダイズ）、子孫、細胞、組織またはそれらの一部、本明細書中に記載される油、本明細書中に記載される種子、本明細書中に記載される食物製品、本明細書中に記載される機能性食物、あるいは本明細書中に記載される医薬製品を個体に提供する工程を含む、少なくとも 1 種の PUFA を含むサプリメントまたは治療用製品を個体に提供する工程にも関する。いくつかの実施形態において、かかる実施形態中に含まれる PUFA は、DHA、DPA (n-6) および／または EPA である。

40

【0020】

本発明は、植物または植物細胞を、(i) 少なくとも 1 種の多価不飽和脂肪酸 (PUFA) を生成する PUFA シンターゼ（例えば、藻類 PUFA シンターゼ）をコードする核酸配列；および (ii) ホスホパンテテイル補因子を PUFA シンターゼ（例えば、藻類 PUFA シンターゼ）ACP ドメインに転移させるホスホパンテテイルトランスフェラーゼ (PPTase) をコードする核酸配列で形質転換する工程を含む、本明細書中に記載される遺伝子改変された植物（例えばダイズ）、子孫、細胞、組織またはそれらの一部を生成する方法を対象とする。いくつかの実施形態において、この方法は、植物または

50

植物細胞を、(iii) 長鎖PUFA遊離脂肪酸(FFA)のアシル-CoAへの変換を触媒するアシル-CoAシンターゼ(ACoAS)をコードする核酸配列で形質転換する工程をさらに含む。

【0021】

本発明の種々の実施形態は、本出願の一部を形成する以下の詳細な説明、図面および添付の配列の説明から、より完全に理解され得る。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】PUFA OrfAの9つの反復ドメインのそれぞれをコードする再設計されたDNA配列のClustal W(Vector NTIでのアラインメント)を示す図である。

10

【図2】pDAB7362のプラスミドマップを示す図である。

【図3】pDAB7361のプラスミドマップを示す図である。

【図4】pDAB7363のプラスミドマップを示す図である。

【図5】pDAB7365のプラスミドマップを示す図である。

【図6】pDAB7368のプラスミドマップを示す図である。

【図7】pDAB7369のプラスミドマップを示す図である。

【図8】pDAB7370のプラスミドマップを示す図である。

【図9】pDAB100518のプラスミドマップを示す図である。

【図10】pDAB101476のプラスミドマップを示す図である。

20

【図11】pDAB101477のプラスミドマップを示す図である。

【図12】pDAB7362で形質転換された2つのダイズ事象から誘導されたT1植物由来の単一のT2ダイズ種子のDHAおよびLC-PUFA含量を示す図である。

【図13】T2ダイズ種子タンパク質抽出物中のPUFAシンターゼOrfA、PUFAシンターゼOrfBおよびPUFAシンターゼキメラOrfCのウエスタンブロット検出を示す図である。

【図14】pDAB9166のプラスミドマップを示す図である。

【図15】pDAB9167のプラスミドマップを示す図である。

【図16】pDAB7379のプラスミドマップを示す図である。

【図17】pDAB7380のプラスミドマップを示す図である。

30

【図18】pDAB9323のプラスミドマップを示す図である。

【図19】pDAB9330のプラスミドマップを示す図である。

【図20】pDAB9337のプラスミドマップを示す図である。

【図21】pDAB9338のプラスミドマップを示す図である。

【図22】pDAB9344のプラスミドマップを示す図である。

【図23】pDAB9396のプラスミドマップを示す図である。

【図24】pDAB101412のプラスミドマップを示す図である。

【図25】pDAB7733のプラスミドマップを示す図である。

【図26】pDAB7734のプラスミドマップを示す図である。

【図27】pDAB101493のプラスミドマップを示す図である。

40

【図28】pDAB109507のプラスミドマップを示す図である。

【図29】pDAB109508のプラスミドマップを示す図である。

【図30】pDAB109509のプラスミドマップを示す図である。

【図31】pDAB9151のプラスミドマップを示す図である。

【図32】pDAB108207のプラスミドマップを示す図である。

【図33】pDAB108208のプラスミドマップを示す図である。

【図34】pDAB108209のプラスミドマップを示す図である。

【図35】pDAB9159のプラスミドマップを示す図である。

【図36】pDAB9147のプラスミドマップを示す図である。

【図37】pDAB108224のプラスミドマップを示す図である。

50

【図 38】 p D A B 1 0 8 2 2 5 の プラスミドマップを示す図である。

【図 39】 p D A B 1 0 1 4 9 3、p D A B 7 3 6 2、p D A B 7 3 6 9、p D A B 1 0 1 4 1 2 または p D A B 7 3 8 0 で形質転換された個々のトランスジェニックシロイヌナズナ属 (*Arabidopsis*) 事象由来の T 2 種子の D H A および L C - P U F A 含量を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0023】

用語「多価不飽和脂肪酸」または「P U F A」とは、本明細書中で使用する場合、少なくとも 16 炭素、少なくとも 18 炭素、少なくとも 20 炭素または 22 以上の炭素の長さの炭素鎖を有し、少なくとも 3 以上の二重結合、4 以上の二重結合、5 以上の二重結合または 6 以上の二重結合を有し、全ての二重結合が c i s 立体配置である脂肪酸をいう。

10

【0024】

用語「長鎖多価不飽和脂肪酸」または「L C - P U F A」は、本明細書中で使用する場合、3 以上の二重結合を含む 20 以上の炭素鎖長の脂肪酸、または少なくとも 3 以上の二重結合、4 以上の二重結合、5 以上の二重結合もしくは 6 以上の二重結合を有する、22 以上の炭素の脂肪酸をいう。 ω -6 系列の L C - P U F A には、ジーホモ γ -リノレン酸 (C 20 : 3 n - 6)、アラキドン酸 (C 20 : 4 n - 6)、アドレン酸 (ドコサテトラエン酸または D T A と呼ばれる) (C 22 : 4 n - 6) およびドコサペンタエン酸 (C 22 : 5 n - 6) が含まれるがこれらに限定されない。 ω -3 系列の L C - P U F A には、エイコサトリエン酸 (C 20 : 3 n - 3)、エイコサテトラエン酸 (C 20 : 4 n - 3)、エイコサペンタエン酸 (C 20 : 5 n - 3)、ドコサペンタエン酸 (C 22 : 5 n - 3) およびドコサヘキサエン酸 (C 22 : 6 n - 3) が含まれるがこれらに限定されない。L C - P U F A には、C 28 : 8 (n - 3) が含まれるがこれに限定されない、22 より多い炭素および 4 以上の二重結合を有する脂肪酸もまた含まれる。

20

【0025】

用語「P U F A シンターゼ」とは、本明細書中で使用する場合、多価不飽和脂肪酸 (P U F A) および特に長鎖 P U F A (L C - P U F A) を生成する酵素、ならびに複合体中のかかる酵素の任意のドメインをいう。用語 P U F A シンターゼには、P U F A 生成のための P U F A P K S 系または P K S 様の系が含まれるがこれらに限定されない。いくつかの特定の P U F A シンターゼは、本出願中で定義されるように、「S z P U F A」シンターゼまたは「h S z T h P U F A」シンターゼなどのさらなる表記法で本明細書中に表記される。用語「P U F A シンターゼ系」には、異種生物において発現される場合に P U F A シンターゼの機能に影響を与え得る、P U F A シンターゼおよび任意のアクセサリ酵素 (例えば、P P T a s e または A C S) が含まれる。

30

【0026】

用語「ホスホパンテティニルトランスフェラーゼ」および「P P T a s e」とは、本明細書中で使用する場合、補酵素 A (C o A) 由来の補因子 (例えば、4-ホスホパンテイン) を P U F A シンターゼ中に存在する 1 つまたは複数の A C P ドメインに転移させることによって P U F A シンターゼを活性化する酵素をいう。本明細書中に記載される P U F A シンターゼの 1 つまたは複数の A C P ドメインを活性化し得る P P T a s e の一例は、本明細書中で「N o H e t I」と称される、ノストック属の種 (*Nostoc* sp.) P C C 7120 (以前にはアナベナ属の種 (*Anabaena* sp.) P C C 7120 と呼ばれた) の H e t I タンパク質である。

40

【0027】

用語「アシル-C o A シンテターゼ」、「A C o A S」および「A C S」とは、本明細書中で使用する場合、長鎖多価不飽和遊離脂肪酸 (F F A) のアシル-C o A への変換を触媒する酵素をいう。いくつかの特定のアシル-C o A シンテターゼは、本出願中で定義されるように、「S z A C S - 2」などのさらなる表記法で本明細書中に表記される。

【0028】

用語「植物」には、本明細書中で使用する場合、任意の子孫、細胞、組織、種子、種子

50

油またはそれらの一部が含まれる。

【0029】

「栄養補助食品」は、生理学的利益を提供するまたは疾患に対する保護を提供する、植物から単離、精製、濃縮または生成された製品を意味し、増強されたレベルのかかる生理学的に活性な構成要素を含むように遺伝子操作された作物から生成された食物と共に、かかる製品を補充された加工食物が含まれる。

【0030】

「機能性食物」は、(a) 通常の食餌の一部として消費される従来型食物と見かけ上類似しまたはかかる従来型食物であり得、(b) 改変されていない食物中に典型的に存在する構成要素の割合における改変に基づいて、増強された栄養価および／または特定の食餌上の利益を有する食物を意味する。

10

【0031】

用語「ポリヌクレオチド」および「核酸」は、単数形の核酸、ならびに複数形の核酸、核酸分子もしくはフラグメント、バリエーション、またはそれらの誘導体、または構築物、例えば、メッセンジャーRNA (mRNA) またはプラスミドDNA (pDNA) を包含する意図である。ポリヌクレオチドまたは核酸は、非翻訳5'配列および3'配列ならびにコード配列を含む、全長cDNA配列またはそのフラグメントのヌクレオチド配列を含み得る。ポリヌクレオチドまたは核酸は、改変されていないRNAもしくはDNAまたは改変されたRNAもしくはDNAであり得る、任意のポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドから構成され得る。例えば、ポリヌクレオチドまたは核酸は、一本鎖および二本鎖のDNA、一本鎖および二本鎖の領域の混合物であるDNA、一本鎖および二本鎖のRNA、ならびに一本鎖および二本鎖の領域の混合物であるRNA、一本鎖、もしくはより典型的には二本鎖または一本鎖および二本鎖の領域の混合物であり得るDNAおよびRNAを含むハイブリッド分子から構成され得る。これらの用語は、ポリヌクレオチドまたは核酸の、化学的、酵素的または代謝的に改変された形態もまた包含する。

20

【0032】

ポリヌクレオチドまたは核酸配列は、そのネイティブ環境から取り出された場合に、「単離された」といわれ得る。例えば、ベクター中に含まれるジヒドロキシー酸デヒドラターゼ活性を有するポリペプチドまたはポリペプチドフラグメントをコードする異種ポリヌクレオチドまたは核酸は、本発明のために単離されたとみなされる。単離されたポリヌクレオチドまたは核酸のさらなる例には、異種宿主細胞中で維持される組換えポリヌクレオチド、または溶液中の(部分的または実質的に)精製されたポリヌクレオチドもしくは核酸が含まれる。本発明に従う単離されたポリヌクレオチドまたは核酸には、合成により生成されたかかる分子がさらに含まれる。DNAのポリマーの形態の、単離されたポリヌクレオチドまたは核酸は、cDNA、ゲノムDNAまたは合成DNAの1つまたは複数のセグメントから構成され得る。

30

【0033】

用語「遺伝子」とは、特定のタンパク質として発現されることが可能な核酸またはそのフラグメントをいい、任意選択で、コード配列の前(5'非コード配列)および後ろ(3'非コード配列)の調節配列を含む。

40

【0034】

本明細書中で使用する場合、用語「コード領域」とは、特定のアミノ酸配列をコードするDNA配列をいう。「適切な調節配列」とは、コード配列の上流(5'非コード配列)、その内側またはその下流(3'非コード配列)に位置し、関連するコード配列の転写、RNAのプロセッシングもしくは安定性、または関連するコード配列の翻訳に影響を与えるヌクレオチド配列をいう。調節配列には、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が含まれ得る。

【0035】

本明細書中で使用する場合、用語「ポリペプチド」は、単数形の「ポリペプチド」なら

50

びに複数形の「ポリペプチド」およびそのフラグメントを包含する意図であり、アミド結合（ペプチド結合としても公知）によって直鎖状に連結されたモノマー（アミノ酸）から構成される分子をいう。用語「ポリペプチド」とは、2以上のアミノ酸の任意の鎖（単数または複数）をいい、生成物の特定の長さをいうものではない。従って、ペプチド、ジペプチド、トリペプチド、オリゴペプチド、タンパク質、アミノ酸鎖、または2以上のアミノ酸の鎖（単数または複数）をいうために使用される任意の他の用語は、「ポリペプチド」の定義内に含まれ、用語「ポリペプチド」は、これらの用語のいずれかの代わりに、またはこれらの用語と相互交換可能に使用され得る。ポリペプチドは、天然の生物学的供給源から誘導され得るか、または組換え技術によって生成され得るが、必ずしも指定された核酸配列から翻訳されたものである必要はない。ポリペプチドは、化学合成によるものを含む、任意の様式で生成され得る。

10

【0036】

「単離された」ポリペプチドもしくはフラグメント、バリエーションまたはそれらの誘導体は、その天然の環境中には存在しないポリペプチドを意図する。特定のレベルの精製は必要とされない。例えば、単離されたポリペプチドは、そのネイティブまたは天然の環境から取り出され得る。宿主細胞中で発現された組換え生成されたポリペプチドおよびタンパク質は、任意の適切な技術によって分離、分画または部分的もしくは実質的に精製されたネイティブポリペプチドまたは組換えポリペプチドであるとき、本発明の目的のために単離されたとみなされる。

【0037】

本明細書中で使用する場合、「ネイティブ」とは、存在する場合にはそれ自身の調節配列を伴って天然に見出される、ポリヌクレオチド、遺伝子またはポリペプチドの形態をいう。

20

【0038】

本明細書中で使用する場合、「内因性」とは、生物中のまたは生物のゲノム中のその天然の位置にある、ポリヌクレオチド、遺伝子またはポリペプチドのネイティブ形態をいう。「内因性ポリヌクレオチド」には、生物のゲノム中のその天然の位置にあるネイティブポリヌクレオチドが含まれる。「内因性遺伝子」には、生物のゲノム中のその天然の位置にあるネイティブ遺伝子が含まれる。「内因性ポリペプチド」には、生物中のその天然の位置にあるネイティブポリペプチドが含まれる。

30

【0039】

本明細書中で使用する場合、「異種」とは、宿主生物において通常は見出されないが、宿主生物中に導入される、ポリヌクレオチド、遺伝子またはポリペプチドをいう。「異種ポリヌクレオチド」には、対応するネイティブポリヌクレオチドとは異なる形態の、供給源生物中に再導入される、ネイティブコード領域またはその一部分が含まれる。「異種遺伝子」は、対応するネイティブ遺伝子とは異なる形態の、供給源生物中に再導入される、ネイティブコード領域またはその一部分が含まれる。例えば、異種遺伝子には、ネイティブ宿主中に再導入される非ネイティブ調節領域を含むキメラ遺伝子の一部分であるネイティブコード領域が含まれ得る。「異種ポリペプチド」には、対応するネイティブポリペプチドとは異なる形態の、供給源生物中に再導入されるネイティブポリペプチドが含まれる。

40

【0040】

本明細書中で使用する場合、用語「改変」とは、ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの低減された、実質的に除去されたまたは除去された活性を生じる、本明細書中に開示されたポリヌクレオチドにおける変化、ならびにポリペプチドの低減された、実質的に除去されたまたは除去された活性を生じる、本明細書中に開示されたポリペプチドにおける変化をいう。かかる変化は、欠失、変異導入（例えば、自然変異誘発、ランダム変異誘発、ミューター遺伝子によって引き起こされる変異誘発、またはトランスポゾン変異誘発）、置換、挿入、下方調節、細胞部位の変更、ポリヌクレオチドもしくはポリペプチドの状態の変更（例えば、メチル化、リン酸化またはユビキチン化）、補因子

50

の除去、アンチセンスRNA/DNAの導入、干渉RNA/DNAの導入、化学的改変、共有結合性の改変、UVもしくはX線による照射、相同組換え、有糸分裂組換え、プロモーター置換法および／またはそれらの組合せが含まれるがこれらに限定されない、当該分野で周知の方法によって行われ得る。どのヌクレオチドまたはアミノ酸残基が改変されるかを決定する際のガイダンスは、特定のポリヌクレオチドまたはポリペプチドの配列を、酵母または細菌などの相同ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの配列と比較し、高い相同性の領域（保存された領域）またはコンセンサス配列中で行われた改変の数を最大化することによって、見出され得る。

【0041】

用語「誘導体」とは、本明細書中で使用する場合、本発明において開示される配列の改変をいう。かかる改変の例は、油糧種子作物種中の本明細書中に開示されるコード配列の機能を保存する、僅かに変更する、または増加させる、本明細書中に開示されるコード配列の核酸配列に関する1つまたは複数の塩基の置換、挿入および／または欠失である。かかる誘導体は、例えば、配列構造を予測および最適化するためのコンピュータモデリング技術を使用して、当業者によって容易に決定され得る。従って、用語「誘導体」には、それらが本発明のLC-PUPAを生成する際に使用される開示された機能性を有することができるように、本明細書中に開示されるコード配列と実質的な配列相同性を有する核酸配列もまた含まれる。

【0042】

本明細書中で使用する場合、用語「バリエーション」とは、例えば変異誘発などの組換えDNA技術を使用して創出される、アミノ酸の挿入、欠失、変異および置換により、本発明の具体的に引用されたポリペプチドとは異なるポリペプチドをいう。目的の活性を破壊することなくどのアミノ酸残基が置き換え、付加または欠失され得るかを決定する際のガイダンスは、特定のポリペプチドの配列を、相同ポリペプチドの配列と比較し、高い相同性の領域（保存された領域）中で行われたアミノ酸変化の数を最少化することまたはアミノ酸をコンセンサス配列で置き換えることによって、見出され得る。

【0043】

あるいは、これら同じまたは同様のポリペプチドをコードする組換えポリヌクレオチドバリエーションは、遺伝子コードの「冗長性」を使用することによって合成または選択され得る。種々のコドン置換、例えば、種々の制限部位を生成するサイレント変化が、発現のためのプラスミドまたはウイルスベクター中へのクローニングを最適化するために導入され得る。ポリヌクレオチド配列中の変異は、ポリペプチドの任意の一部の特性を改変するためにポリペプチドに付加されたポリペプチド中、または他のペプチドのドメイン中に反映され得る。

【0044】

アミノ酸の「置換」は、類似の構造的および／または化学的特性を有する別のアミノ酸による1つのアミノ酸の置き換え、即ち、保存的アミノ酸置き換えの結果であり得るか、あるいは異なる構造的および／または化学的特性を有するアミノ酸による1つのアミノ酸の置き換え、即ち、非保存的アミノ酸置き換えの結果であり得る。「保存的」アミノ酸置換は、関与する残基の極性、電荷、溶解性、疎水性、親水性または両親媒性の性質における類似性に基づいて、行われ得る。例えば、非極性（疎水性）アミノ酸には、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびメチオニンが含まれ；極性中性アミノ酸には、グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギンおよびグルタミンが含まれ；正に荷電した（塩基性）アミノ酸には、アルギニン、リジンおよびヒスチジンが含まれ；負に荷電した（酸性）アミノ酸には、アスパラギン酸およびグルタミン酸が含まれる。あるいは、「非保存的」アミノ酸置換は、これらのアミノ酸のいずれかの極性、電荷、溶解性、疎水性、親水性または両親媒性の性質における差異を選択することによって、行われ得る。「挿入」または「欠失」は、組換えタンパク質によって構造的または機能的に許容される場合、バリエーションの範囲内であり得る。許容されるバリエーションは、組換えDNA技術を使用して、ポリペ

10

20

30

40

50

プチド分子中のアミノ酸の挿入、欠失または置換を体系的に行い、得られた組換えバリエーションを活性についてアッセイすることによって、実験的に決定され得る。

【0045】

用語「プロモーター」とは、コード配列または機能的RNAの発現を制御することが可能なDNA配列をいう。一般に、コード配列は、プロモーター配列に対して3'側に位置する。プロモーターは、その全体がネイティブ遺伝子から誘導され得るか、または天然に見出される異なるプロモーターから誘導された異なるエレメントから構成され得るか、または合成DNAセグメントを含みさえし得る。異なるプロモーターが、異なる組織もしくは細胞型において、または異なる発生段階で、または異なる環境的もしくは生理学的状態に応答して、遺伝子の発現を指向し得ることが、当業者に理解される。殆どの時間で殆どの細胞型において遺伝子を発現させるプロモーターは、「構成的プロモーター」と一般に呼ばれる。殆どの場合、調節配列の正確な境界は完全には規定されていないので、異なる長さのDNAフラグメントが同一のプロモーター活性を有し得ることが、さらに認識される。

10

【0046】

用語「作動可能に連結される」とは、一方の機能が他方によって影響されるような、単一の核酸フラグメント上での核酸配列の関連性をいう。例えば、プロモーターは、コード配列（例えば、このコード配列は、プロモーターの転写制御下にある）の発現に影響を与えることが可能である場合、このコード配列と作動可能に連結されている。コード配列は、センス方向またはアンチセンス方向で調節配列に作動可能に連結され得る。

20

【0047】

用語「発現」とは、本明細書中で使用する場合、本発明の核酸フラグメントから誘導されるセンス(mRNA)またはアンチセンスRNAの転写および安定な蓄積をいう。発現とは、ポリペプチドへのmRNAの翻訳もまたいい得る。

【0048】

用語「過剰発現」とは、本明細書中で使用する場合、同じまたは関連する遺伝子の内因性の発現よりも高い発現をいう。異種遺伝子は、その発現が匹敵する内因性遺伝子の発現よりも高い場合、過剰発現されている。

【0049】

本明細書中で使用する場合、用語「形質転換」とは、遺伝的に安定な遺伝を生じる、宿主生物中への核酸またはフラグメントの移入をいう。形質転換された核酸フラグメントを含む宿主生物は、「トランスジェニック」または「組換え」または「形質転換された」生物と呼ばれる。

30

【0050】

用語「プラスミド」および「ベクター」とは、本明細書中で使用する場合、細胞の中心的代謝の一部ではない遺伝子をしばしば保有する、通常は環状二本鎖DNA分子の形態の、染色体外エレメントをいう。かかるエレメントは、自律複製配列、ゲノム組み込み配列、ファージまたはヌクレオチド配列、線状または環状の、任意の供給源から誘導された一本鎖または二本鎖のDNAまたはRNAのものであり得、ここで、多数のヌクレオチド配列が、適切な3'非翻訳配列と共にプロモーターフラグメントおよび選択された遺伝子産物に関するDNA配列を細胞中に導入することが可能な独自の構成へと、連結または組換えされている。

40

【0051】

本明細書中で使用する場合、用語「コドン縮重性」とは、コードされたポリペプチドのアミノ酸配列に影響を与えることなくヌクレオチド配列のバリエーションを許容する遺伝子コードの性質をいう。当業者は、所与のアミノ酸を特定するヌクレオチドコドンの使用における、特定の宿主細胞によって示される「コドンバイアス」を熟知している。従って、宿主細胞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、コドン使用の頻度が、宿主細胞の好ましいコドン使用の頻度に近づくように、遺伝子を設計することが望ましい。

50

【0052】

用語「コドン最適化された」とは、種々の宿主の形質転換のための遺伝子または核酸分子のコード領域をいう場合、DNAによってコードされるポリペプチドを変更することなく宿主生物の典型的なコドン使用を反映するような、遺伝子または核酸分子のコード領域中のコドンの変更をいう。かかる最適化は、少なくとも1つの、1つより多くの、または顕著な数のコドンを、その生物の遺伝子中でより頻繁に使用される1つまたは複数のコドンで置き換えることを含む。

【0053】

任意のポリペプチド鎖のアミノ酸をコードするコドンを含むヌクレオチド配列中の逸脱は、その遺伝子をコードする配列におけるバリエーションを許容する。各コドンは3つのヌクレオチドからなり、DNAを構成するヌクレオチドは4種の特定の塩基に制限されるので、ヌクレオチドの64の可能な組合せが存在し、そのうち61がアミノ酸をコードする（残りの3つのコドンは、翻訳を終了させるシグナルをコードする）。どのコドンがどのアミノ酸をコードするかを示す「遺伝子コード」は、表1のように、本明細書中に再現される。結果として、多数のアミノ酸が、1つより多いコドンによって指定される。例えば、アミノ酸アラニンおよびプロリンは、4種のトリプレットによりコードされ、セリンおよびアルギニンは6種のトリプレットによりコードされるが、トリプトファンおよびメチオニンは、たった1種のトリプレットによりコードされる。この縮重は、DNAによってコードされるタンパク質のアミノ酸配列を変更することなく、DNA塩基組成が広範囲にわたって変動することを許容する。

【0054】

【表1】

表1. 標準的な遺伝子コード

	T	C	A	G
T	TTT Phe (F) TTC " TTA Leu (L) TTG "	TCT Ser (S) TCC " TCA " TCG "	TAT Tyr (Y) TAC " TAA 終止 TAG 終止	TGT Cys (C) TGC TGA 終止 TGG Trp (W)
C	CTT Leu (L) CTC " CTA " CTG "	CCT Pro (P) CCC " CCA " CCG "	CAT His (H) CAC " CAA Gln (Q) CAG "	CGT Arg (R) CGC " CGA " CGG "
A	ATT Ile (I) ATC " ATA " ATG Met (M)	ACT Thr (T) ACC " ACA " ACG "	AAT Asn (N) AAC " AAA Lys (K) AAG "	AGT Ser (S) AGC " AGA Arg (R) AGG "
G	GTT Val (V) GTC " GTA " GTG "	GCT Ala (A) GCC " GCA " GCG "	GAT Asp (D) GAC " GAA Glu (E) GAG "	GGT Gly (G) GGC " GGA " GGG "

【0055】

多数の生物が、成長中のペプチド鎖における特定のアミノ酸の挿入をコードするように、特定のコドンの使用についてバイアスを示す。コドン選択またはコドンバイアス、生物間でのコドン使用における差異は、遺伝子コードの縮重によって提供され、多数の生物において十分に報告されている。コドンバイアスは、翻訳されるコドンの特性および特定の

トランスファーRNA (tRNA) 分子の利用可能性にとりわけ依存すると考えられている、メッセンジャーRNA (mRNA) の翻訳の効率と相関することが多い。細胞における選択されたtRNAの優位性は一般に、ペプチド合成において最も頻繁に使用されるコドンの反映である。従って、遺伝子は、コドン最適化に基づく所与の生物における最適な遺伝子発現のために適合させることができる。

【0056】

広範な種々の動物、植物および微生物種にとって利用可能な多数の遺伝子配列を考慮すると、コドン使用の相対的頻度を計算することが可能である。コドン使用表は容易に入手可能であり、多数の方法で適合され得る。Nakamuraら、Nucl. Acids Res. 28:292 (2000)を参照のこと。この表または類似の表を利用することによって、当業者は、任意の所与のポリペプチド配列に対してこの頻度を適用でき、ポリペプチドをコードするが所与の種に最適なコドンを使用するコドン最適化されたコード領域の核酸フラグメントを生成できる。本発明は、本明細書中にさらに記載されるように、本発明のOrfA、OrfB、キメラOrfC、PPTaseおよび／または他のアクセサリタンパク質のコドン最適化された形態に関する。

【0057】

用語「パーセント同一性」は、当該分野で公知のように、配列を比較することによって決定される、2つ以上のポリペプチド配列間または2つ以上のポリヌクレオチド配列間の関係である。当該分野において、「同一性」は、場合によってはかかる配列の文字列間の一致によって決定される、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列間の配列関係性の程度もまた意味する。「同一性」および「類似性」は、1) Computational Molecular Biology (Lesk, A. M. 編) Oxford University: NY (1988); 2) Biocomputing: Informatics and Genome Projects (Smith, D. W. 編) Academic: NY (1993); 3) Computer Analysis of Sequence Data, Part I (Griffin, A. M. および Griffin, H. G. 編) Humana: NJ (1994); 4) Sequence Analysis in Molecular Biology (von Heinje, G. 編) Academic (1987); ならびに 5) Sequence Analysis Primer (Gribskov, M. および Devereux, J. 編) Stockton: NY (1991) 中に開示される方法が含まれるがこれらに限定されない公知の方法によって容易に計算できる。

【0058】

同一性を決定するための方法は、試験される配列間の最良の一致を与えるように設計される。同一性および類似性を決定するための方法は、公に入手可能なコンピュータプログラム中に体系化されている。配列アラインメントおよびパーセント同一性の計算は、例えば、Vector NTI (登録商標) パッケージソフト (Invitrogen, Carlsbad, CA) のAlignXプログラムまたはLASERGENEバイオインフォマティクスコンピューティングパッケージソフト (DNASTAR Inc., Madison, WI) のMegAlign (商標) プログラムを使用して実施され得る。配列のマルチプルアラインメントは、アラインメント法ラベル付 (labeled) Clustal

Vに対応する (HigginsおよびSharp, CABIOS. 5:151-153 (1989); Higgins, D.G. ら、Comput. Appl. Biosci., 8:189-191 (1992) によって開示される) ; およびLASERGENEバイオインフォマティクスコンピューティングパッケージソフト (DNASTAR Inc.) のMegAlign (商標) プログラム中に見出される、「Clustal V法のアラインメント」を含む、いくつかの種々のアルゴリズムを包含する「Clustal法のアラインメント」を使用して実施される。マルチプルアラインメントのために、デフォルト値は、GAP PENALTY=10およびGAP LENGTH PENALTY=10に対応する。Clustal法を使用したタンパク質配列のペアワイズアラインメントおよびパーセント同一性の計算のためのデフォルトパラメータは、KTUPLE=1、GAP PENALTY=3、WINDOW=5およびDIAGONALS SAVED=5である。核酸について、これらのパラメータは、KTUPLE=2、GAP PENALTY=5、WINDOW=4およびDIAGONALS SAVED=4である。Clustal Vプログラムを使用した配列のアラインメント後、同じプログラ

ム中の「配列距離」表を見ることによって、「パーセント同一性」を得ることが可能である。さらに、「Clustal W法のアラインメント」が利用可能であり、アラインメント法ラベル付Clustal W (HigginsおよびSharp, CABIOS. 5:151-153 (1989); Higgins, D.G.ら、Comput. Appl. Biosci. 8:189-191(1992)中に記載される)に対応し; LASERGENEバイオインフォマティクスコンピューティングパッケージソフト (DNASTAR Inc.) のMegAlign (商標) v6.1プログラム中に見出される。マルチプルアラインメントのためのデフォルトパラメータ (GAP PENALTY = 10、GAP LENGTH PENALTY = 0.2、Delay Divergence Seqs (%) = 30、DNA Transition Weight = 0.5、Protein Weight Matrix = Gonnet Series、DNA Weight Matrix = IUB)。Clustal Wプログラムを使用した配列のアラインメント後、同じプログラム中の「配列距離」表を見ることによって、「パーセント同一性」を得ることが可能である。

【0059】

用語「配列分析ソフトウェア」とは、ヌクレオチドまたはアミノ酸配列の分析に有用な任意の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いう。「配列分析ソフトウェア」は、市販であっても独立して開発してもよい。典型的な配列分析ソフトウェアには、1.) GCGパッケージソフトのプログラム (Wisconsin Package Version 9.0、Genetics Computer Group (GCG)、Madison、WI); 2.) BLASTP、BLASTN、BLASTX (Altschulら、J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990)); 3.) DNASTAR (DNASTAR, Inc. Madison、WI); 4.) Sequencher (Gene Codes Corporation、Ann Arbor、MI); および5.) Smith-Watermanアルゴリズムを組み込むFASTAプログラム (W. R. Pearson, Comput. Methods Genome Res., [Proc. Int. Symp.] (1994), Meeting Date 1992, 111-20. 編者: Suhai, Sandor. Plenum: New York, NY) が含まれるが、これらに限定されない。本出願の文脈において、特に規定しない限り、配列分析ソフトウェアが分析に使用される場合、分析の結果は、参照されるプログラムの「デフォルト値」に基づくことが理解される。本明細書中で使用する場合、「デフォルト値」は、最初に初期化される場合、そのソフトウェアが元々ロードする値またはパラメータの任意のセットを意味する。

【0060】

本明細書中で使用される標準的な組換えDNAおよび分子クローニング技術は、当該分野で周知であり、例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (2000); およびSilhavyら、Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1984); およびGreene Publishing Assoc. and Wiley-Interscienceにより刊行されたAusubelら、Current Protocols in Molecular Biology (1987年から現在まで) に記載されている。

【0061】

本明細書中に開示される組換え宿主の遺伝子操作は、標準的な遺伝子技術およびスクリーニングを使用して実施され得、遺伝子操作に適した任意の宿主細胞において行われ得る。いくつかの実施形態において、組換え宿主は、双子葉植物および単子葉植物の両方を含む任意の高等植物、ならびに作物植物およびその油のために使用される植物を含む消費植物であり得るが、これらに限定されない。従って、任意の植物種または植物細胞が、以下にさらに記載されるように選択され得る。

【0062】

本発明の油は、非料理または食餌プロセスおよび組成物においても使用され得る。これらの使用のいくつかは、産業的使用、化粧品使用または医療的使用であり得る。本発明の油は、本発明の油が適する任意の適用においても使用され得る。一般に、本発明の油は、潤滑油、潤滑油添加物、金属加工流体、油圧流体および耐火性油圧流体などの種々の適用

において、例えば、鉱油、エステル、脂肪酸または動物性脂肪を置き換えるために使用され得る。本発明の油は、改変油を生成するプロセスにおける材料としても使用され得る。本発明の油を改変するための技術の例には、分留、水素添加、油のオレイン酸またはリノレン酸含量の変更、および当業者に公知の他の改変技術が含まれる。

【0063】

本発明の油について化粧品使用の例には、化粧品組成物中の皮膚軟化剤としての使用；ワセリン代用品としての使用；石鹼の一部を構成するものとしてのまたは石鹼を生成するプロセスにおける材料としての使用；経口処置溶液の一部を構成するものとしての使用；加齢処置組成物の一部を構成するものとしての使用；および皮膚または毛髪エアロゾル泡状調製物の一部を構成するものとしての使用が含まれる。

10

【0064】

さらに、本発明の油は、医療的適用において使用され得る。例えば、本発明の油は、感染に対する保護障壁において使用され得、 ω -9脂肪酸が高い油は、移植片生存を増強するために使用され得る（米国特許第6, 210, 700号）。

【0065】

上記は、本発明の油が適する非料理使用の非限定的な例であることを理解すべきである。上述のように、本発明の油および改変油は、当業者に公知の全ての適用において、例えば、鉱油、エステル、脂肪酸または動物性脂肪を置き換えるために使用され得る。

【0066】

P U F Aシンターゼ

20

真核生物における長鎖P U F A（L C-P U F A）の合成のための「標準的な」または「古典的な」経路は、中間鎖長の飽和またはモノ不飽和脂肪酸の伸長および不飽和化を含み、記載されている。P U F Aシンターゼを介した長鎖P U F Aの合成のための経路もまた記載されており、これは「標準的な」経路とは非常に異なっている。具体的には、P U F Aシンターゼは、炭素供給源としてマロニル-C o Aを利用し、任意の顕著な量で中間体を放出することなしに最終P U F Aを生成する。また、P U F Aシンターゼを用いて、適切なc i s二重結合が、酸素を必要としない機構を使用して合成の間に付加される。いくつかの実施形態において、N A D P Hが、合成サイクルの間に還元剤として使用される。

【0067】

30

本発明は、（内因的にまたは遺伝子操作により）P U F Aシンターゼを発現するように遺伝子改変された宿主生物（例えば、ダイズなどの植物）に関する。いくつかの実施形態において、P U F Aシンターゼを発現するように遺伝子改変された生物は、その生物によって内因的に発現されないP U F Aシンターゼまたは別のタンパク質を用いた生物の改変に関して、「異種」宿主生物として本明細書中で言及され得、この生物は、その生物がそれにより遺伝子改変されるかかる酵素または少なくとも特定のP U F Aシンターゼもしくはその一部分を天然には（遺伝子改変なしに内因的には）発現しない。本発明の遺伝子改変は、P U F Aシンターゼを内因的に発現する宿主生物におけるP U F A生成を改善するために使用され得、この生物は、異なるP U F シンターゼまたはその一部分でさらに改変されることはない。

40

【0068】

本発明に従うP U F Aシンターゼは、選択されたサイクルにおけるt r a n s-c i s異性化およびエノイル還元反応を含む、脂肪酸鎖の反復性のプロセッシングおよび非反復性のプロセッシングの両方を実施するために一緒になって作用できるいくつかの多機能タンパク質を含み得る（および単一機能のタンパク質、特に海洋細菌由来のP U F Aシンターゼを含み得る）。これらのタンパク質は、本明細書中でコアP U F Aシンターゼ酵素複合体またはコアP U F Aシンターゼとも呼ばれ得る。これらのタンパク質内に含まれるドメインおよびモチーフの一般的な機能は、当該分野で個々に公知であり、海洋細菌および真核生物由来の種々のP U F Aシンターゼに関して詳細に記載されている（例えば、米国特許第6, 140, 486号；米国特許第6, 566, 583号；Metzら、Science 293:290-

50

293 (2001) ; 米国出願公開番号 2 0 0 2 / 0 1 9 4 6 4 1 ; 米国出願公開番号 2 0 0 4 / 0 2 3 5 1 2 7 ; 米国出願公開番号 2 0 0 5 / 0 1 0 0 9 9 5 および W O 2 0 0 6 / 1 3 5 8 6 6 を参照のこと)。これらのドメインは、上述のように、単一のタンパク質（例えば、ドメインおよびタンパク質は同義である）として、または単一のタンパク質中の 2 つ以上の（複数の）ドメインのうち 1 つとして見出され得る。海洋細菌およびスラウストキトリウム（*Thraustochytrium*）のメンバー由来の種々の P U F A シンターゼのドメイン構造、ならびにかかる P U F A シンターゼを含む遺伝子およびタンパク質の構造的特徴および機能的特徴は、記載されている（例えば、米国特許第 6, 1 4 0, 4 8 6 号 ; 米国特許第 6, 5 6 6, 5 8 3 号 ; Metz ら、*Science* 293:290-293 (2001) ; 米国出願公開番号 2 0 0 2 / 0 1 9 4 6 4 1 ; 米国出願公開番号 2 0 0 4 / 0 2 3 5 1 2 7 ; 米国出願公開番号 2 0 0 5 / 0 1 0 0 9 9 5 および W O 2 0 0 6 / 1 3 5 8 6 6 を参照のこと）。

10

【0069】

P U F A シンターゼ活性を有するポリヌクレオチド、遺伝子およびポリペプチドの多数の例が当該分野で公知であり、本明細書中に開示される遺伝子改変された宿主において使用され得る。本発明において有用な P U F A シンターゼタンパク質またはドメインには、細菌および非細菌の両方の P U F A シンターゼが含まれ得る。非細菌 P U F A シンターゼは、真核生物などの、細菌ではない生物由来であるかかかる生物から誘導される系である。細菌 P U F A シンターゼは、例えば、米国出願公開番号 2 0 0 8 / 0 0 5 0 5 0 5 中に記載されている。細菌 P U F A シンターゼの機能的ドメインと共に非細菌 P U F A シンターゼの機能的ドメイン、ならびに他の P K S 系（I 型反復性またはモジュラー、I I 型または I I I 型）または F A S 系由来の P U F A シンターゼの機能的ドメインまたはタンパク質を組み込む本発明の遺伝子改変された植物が、生成され得る。

20

【0070】

いくつかの実施形態において、本発明の P U F A シンターゼは、典型的には 3 つ、4 つまたはそれ以上のタンパク質上に含まれる以下の生物学的に活性なドメインを少なくとも含む：（a）少なくとも 1 つのエノイル-ACP レダクターゼ（E R）ドメイン；（b）複数のアシルキャリアタンパク質（A C P）ドメイン（複数可）（例えば、少なくとも 1 つ～4 つ、または少なくとも 5 つの A C P ドメイン、およびいくつかの実施形態においては、最大 6 つ、7 つ、8 つ、9 つ、1 0 または 1 0 より多い A C P ドメイン）；（c）少なくとも 2 つの β -ケトアシル-ACP シンターゼ（K S）ドメイン；（d）少なくとも 1 つのアシルトランスフェラーゼ（A T）ドメイン；（e）少なくとも 1 つの β -ケトアシル-ACP レダクターゼ（K R）ドメイン；（f）少なくとも 2 つの F a b A 様 β -ヒドロキシアシル-ACP デヒドラーゼ（D H）ドメイン；（g）少なくとも 1 つの鎖長因子（C L F）ドメイン；および／または（h）少なくとも 1 つのマロニル-CoA : A C P アシルトランスフェラーゼ（M A T）ドメイン。いくつかの実施形態において、本発明に従う P U F A シンターゼは、デヒドラーゼ（D H）の保存された活性部位モチーフを含む少なくとも 1 つの領域もまた含む。

30

【0071】

いくつかの実施形態において、P U F A シンターゼは、以下の生物学的に活性なドメインを少なくとも含む：（a）少なくとも 1 つのエノイル-ACP レダクターゼ（E R）ドメイン；（b）少なくとも 5 つのアシルキャリアタンパク質（A C P）ドメイン；（c）少なくとも 2 つの β -ケトアシル-ACP シンターゼ（K S）ドメイン；（d）少なくとも 1 つのアシルトランスフェラーゼ（A T）ドメイン；（e）少なくとも 1 つの β -ケトアシル-ACP レダクターゼ（K R）ドメイン；（f）少なくとも 2 つの F a b A 様 β -ヒドロキシアシル-ACP デヒドラーゼ（D H）ドメイン；（g）少なくとも 1 つの鎖長因子（C L F）ドメイン；および（h）少なくとも 1 つのマロニル-CoA : A C P アシルトランスフェラーゼ（M A T）ドメイン。いくつかの実施形態において、本発明に従う P U F A シンターゼは、F a b A 様 D H ドメインの一部ではないデヒドラーゼ（D H）の保存された活性部位モチーフを含む少なくとも 1 つの領域またはドメインもまた含む。これらのドメインのそれぞれの構造的特徴および機能的特徴は、米国出願公開番号 2 0 0

40

50

2/0194641；米国出願公開番号2004/0235127；米国出願公開番号2005/0100995；米国出願公開番号2007/0245431およびWO2006/135866中に詳細に記載されている。

【0072】

コアシゾキトリウム (Schizochytrium) P U F A シンターゼを形成する3つのオープンリーディングフレームが存在しており、これらは例えば米国出願公開番号2007/0245431において以前に記載されている。各オープンリーディングフレームのドメイン構造は以下のとおりである。

【0073】

シゾキトリウム (Schizochytrium) オープンリーディングフレーム A (O r f A または P f a 1) : O r f A は、2910 アミノ酸の配列をコードする8730ヌクレオチドの配列(終止コドンを含まない)である。O r f A 内には、12個のドメインが存在する：

(a) 1つのβ-ケトアシル-ACPシンターゼ(KS)ドメイン；(b) 1つのマロニル-CoA:ACPアシルトランスフェラーゼ(MAT)ドメイン；(c) 9つのアシルキャリアタンパク質(ACP)ドメイン；および(d) 1つのケトレダクターゼ(KR)ドメイン。シゾキトリウム属の種(Schizochytrium sp.) A T C C 20888およびシゾキトリウム属の種(Schizochytrium sp.)、株N230Dと称されるA T C C 20888の娘株の両方由来のO r f A をコードするゲノムDNAクローン(プラスミド)が単離され、配列決定されている。

【0074】

ゲノムクローン p J K 1 1 2 6 (p J K 1 1 2 6 O r f A ゲノムクローンと称する、シゾキトリウム (Schizochytrium) A T C C 20888由来の「O r f A」遺伝子を含む大腸菌 (E. coli) プラスミドベクターの形態) は、2006年6月8日にA m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n (A T C C)、10801 U n i v e r s i t y B o u l e v a r d、M a n a s s a s、V a. 20110-2209 U S A に寄託され、A T C C 受託番号P T A-7648が割り当てられた。

【0075】

ゲノムクローン p J K 3 0 6 (p J K 3 0 6 O r f A ゲノムクローンと称する、シゾキトリウム属の種 (Schizochytrium sp.) N 2 3 0 D 由来のO r f A 遺伝子の5'部分を含む大腸菌 (E. coli) プラスミドの形態 (p J K 3 2 0 と2.2 k B が重複)) は、2006年6月8日にA m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n (A T C C)、10801 U n i v e r s i t y B o u l e v a r d、M a n a s s a s、V a. 20110-2209 U S A に寄託され、A T C C 受託番号P T A-7641が割り当てられた。

【0076】

ゲノムクローン p J K 3 2 0 (p J K 3 2 0 O r f A ゲノムクローンと称する、シゾキトリウム属の種 (Schizochytrium sp.) N 2 3 0 D 由来のO r f A 遺伝子の3'部分を含む大腸菌 (E. coli) プラスミドの形態 (p J K 3 0 6 と2.2 k B が重複)) は、2006年6月8日にA m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n (A T C C)、10801 U n i v e r s i t y B o u l e v a r d、M a n a s s a s、V a. 20110-2209 U S A に寄託され、A T C C 受託番号P T A-7644が割り当てられた。

【0077】

シゾキトリウム (Schizochytrium) オープンリーディングフレーム B (O r f B または P f a 2) : O r f B は、2059 アミノ酸の配列をコードする6177ヌクレオチドの配列(終止コドンを含まない)である。O r f B 内には、4つのドメインが存在する：(a) 1つのケトアシル-ACPシンターゼ(KS)ドメイン；(b) 1つの鎖長因子(CLF)ドメイン；(c) 1つのアシルトランスフェラーゼ(AT)ドメイン；および(d) 1つのエノイルACP-レダクターゼ(ER)ドメイン。シゾキトリウム属の種 (Schizochytrium sp.) A T C C 20888およびシゾキトリウム属の種 (Schizochytrium s

p.)、株N230Dと称されるATCC 20888の娘株の両方由来のOrfBをコードするゲノムDNAクローン(プラスミド)が単離され、配列決定されている。

【0078】

ゲノムクローンpJK1129 (pJK1129 OrfBゲノムクローンと称する、シゾキトリウム (Schizochytrium) ATCC 20888由来の「OrfB」遺伝子を含む大腸菌 (E. coli) プラスミドベクターの形態) は、2006年6月8日にAmerican Type Culture Collection (ATCC)、10801 University Boulevard、Manassas、Va. 20110-2209 USAに寄託され、ATCC受託番号PTA-7649が割り当てられた。

【0079】

ゲノムクローンpJK324 (pJK324 OrfBゲノムクローンと称する、シゾキトリウム属の種 (Schizochytrium sp.) N230D由来のOrfB遺伝子配列を含む大腸菌 (E. coli) プラスミドの形態) は、2006年6月8日にAmerican Type Culture Collection (ATCC)、10801 University Boulevard、Manassas、Va. 20110-2209 USAに寄託され、ATCC受託番号PTA-7643が割り当てられた。

【0080】

シゾキトリウム (Schizochytrium) オープンリーディングフレームC (OrfCまたはPf3) : OrfCは、1502アミノ酸の配列をコードする4506ヌクレオチドの配列(終止コドンを含まない)である。OrfC内には、3つのドメインが存在する：(a) 2つのFabA様-ヒドロキシアシル-ACPデヒドラーゼ (DH) ドメイン；および(b) 1つのエノイルACP-レダクターゼ (ER) ドメイン。シゾキトリウム属の種 (Schizochytrium sp.) ATCC 20888およびシゾキトリウム属の種 (Schizochytrium sp.)、株N230Dと称されるATCC 20888の娘株の両方由来のOrfCをコードするゲノムDNAクローン(プラスミド)が単離され、配列決定されている。

【0081】

ゲノムクローンpJK1131 (pJK1131 OrfCゲノムクローンと称する、シゾキトリウム (Schizochytrium) ATCC 20888由来の「OrfC」遺伝子を含む大腸菌 (E. coli) プラスミドベクターの形態) は、2006年6月8日にAmerican Type Culture Collection (ATCC)、10801 University Boulevard、Manassas、Va. 20110-2209 USAに寄託され、ATCC受託番号PTA-7650が割り当てられた。

【0082】

ゲノムクローンpBR002 (pBR002 OrfCゲノムクローンと称する、シゾキトリウム属の種 (Schizochytrium sp.) N230D由来のOrfC遺伝子配列を含む大腸菌 (E. coli) プラスミドベクターの形態) は、2006年6月8日にAmerican Type Culture Collection (ATCC)、10801 University Boulevard、Manassas、Va. 20110-2209 USAに寄託され、ATCC受託番号PTA-7642が割り当てられた。

【0083】

さらに、以前に記載されたコアスラウストキトリウム (Thraustochytrium) PUF Aシンターゼを形成する3つのオープンリーディングフレームが存在する。各オープンリーディングフレームのドメイン構造は以下のとおりである。

【0084】

スラウストキトリウム (Thraustochytrium) 23BオープンリーディングフレームA (OrfA) : OrfAは、2811アミノ酸の配列をコードする8433ヌクレオチドの配列(終止コドンを含まない)である。以下のドメインがTh. 23B OrfA中に存在する：(a) 1つのβ-ケトアシル-ACPシンターゼ (KS) ドメイン；(b) 1つのマロニル-CoA : ACPアシルトランスフェラーゼ (MAT) ドメイン；(c) 8つのアシルキャリアタンパク質 (ACP) ドメイン；および(d) 1つのβ-ケトアシル-

10

20

30

40

50

ACPレダクターゼ (KR) ドメイン。

【0085】

ゲノムクローンTh23BORfA__pBR812.1 (Th23BORfA__pBR812.1ゲノムクローンと称する、スラウストキトリウム (Thraustochytrium) 23B由来のOrfA遺伝子配列を含む大腸菌 (E. coli) プラスミドベクターの形態) は、2007年3月1日にAmerican Type Culture Collection (ATCC)、University Boulevard、Manassas、Va. 20110-2209 USAに寄託され、ATCC受託番号PTA-8232が割り当てられた。ゲノムクローンTh23BORfA__pBR811 (Th23BORfA__pBR811ゲノムクローンと称する、スラウストキトリウム (Thraustochytrium) 23B由来のOrfA遺伝子配列を含む大腸菌 (E. coli) プラスミドベクターの形態) は、2007年3月1日にAmerican Type Culture Collection (ATCC)、10801 University Boulevard、Manassas、Va. 20110-2209 USAに寄託され、ATCC受託番号PTA-8231が割り当てられた。

10

【0086】

スラウストキトリウム (Thraustochytrium) 23BオープンリーディングフレームB (OrfB) : OrfBは、1935アミノ酸の配列をコードする5805ヌクレオチドの配列 (終止コドンを含まない) である。以下のドメインがTh. 23B OrfB中に存在する : (a) 1つの β -ケトアシル-ACPシンターゼ (KS) ドメイン ; (b) 1つの鎖長因子 (CLF) ドメイン ; (c) 1つのアシルトランスフェラーゼ (AT) ドメイン ; および (d) 1つのエノイル-ACPレダクターゼ (ER) ドメイン。ゲノムクローンTh23BORfB__pBR800 (Th23BORfB__pBR800ゲノムクローンと称する、スラウストキトリウム (Thraustochytrium) 23B由来のOrfB遺伝子配列を含む大腸菌 (E. coli) プラスミドベクターの形態) は、2007年3月1日にAmerican Type Culture Collection (ATCC)、10801 University Boulevard、Manassas、Va. 20110-2209 USAに寄託され、ATCC受託番号PTA-8227が割り当てられた。

20

【0087】

スラウストキトリウム (Thraustochytrium) 23BオープンリーディングフレームC (OrfC) : OrfCは、1470アミノ酸の配列をコードする4410ヌクレオチドの配列 (終止コドンを含まない) である。以下のドメインがTh. 23B OrfC中に存在する : (a) 2つのFabA様 β -ヒドロキシアシル-ACPデヒドラーゼ (DH) ドメイン、共にFabAタンパク質 (trans-2-デセノイル-ACPの合成およびこの生成物のcis-3-デセノイル-ACPへの可逆的な異性化を触媒する酵素) に対して相同性を有する ; および (b) シゾキトリウム (Schizochytrium) OrfBのERドメインに対して高い相同性を有する1つのエノイル-ACPレダクターゼ (ER) ドメイン。ゲノムクローンTh23BORfC__pBR709A (Th23BORfC__pBR709Aゲノムクローンと称する、スラウストキトリウム (Thraustochytrium) 23B由来のOrfC遺伝子配列を含む大腸菌 (E. coli) プラスミドベクターの形態) は、2007年3月1日にAmerican Type Culture Collection (ATCC)、10801 University Boulevard、Manassas、Va. 20110-2209 USAに寄託され、ATCC受託番号PTA-8228が割り当てられた。

30

40

【0088】

キメラまたはハイブリッドPUFAシンターゼ : いくつかの実施形態において、PUFAシンターゼは、本明細書中に記載されるドメインのいずれかから選択されるドメインを含み、これらのドメインは、組み合わされて (例えば、混合および調和されて)、本明細書中に記載される最低限の要件を満たす完全なPUFAシンターゼを形成する。いくつか

50

の実施形態において、本発明の遺伝子改変された生物は、別の P U F A シンターゼの少なくとも 1 つのドメインまたは生物学的に活性なそのフラグメントによってさらに改変され得る。いくつかの実施形態において、P U F A シンターゼのドメインのいずれかは、P U F A シンターゼ系におけるそのドメインの機能を改変または増強するために（例えば、その系によって生成される P U F A 型またはその比率を改変するために）、その天然の構造から改変され得る。キメラ P U F A シンターゼを生成するためにドメインをこのように混合することは、本明細書中で引用される特許および刊行物中に記載されている。

【0089】

いくつかの実施形態において、P U F A シンターゼは、シゾキトリウム (Schizochytrium) P U F A シンターゼを含み、ここで、シゾキトリウム (Schizochytrium) P U F A シンターゼ由来の O r f C は、スラウストキトリウム (Thraustochytrium) 23 B 由来の O r f C で置き換えられている。いくつかの実施形態において、スラウストキトリウム (Thraustochytrium) 23 B 由来のかかるキメラ O r f C は、シゾキトリウム (Schizochytrium) のコドン使用のために最適化された核酸配列によってコードされる。かかるキメラ O r f C の非限定的な例として、プラスミド p T h O r f C - s y n P S (p T h O r f C - s y n P S と称する、シゾキトリウム (Schizochytrium) または他の異種宿主における発現のために最適化された「完全縫合 (perfect stitch)」合成スラウストキトリウム (Thraustochytrium) 23 B P U F A P K S O r f C コドンを含む大腸菌 (E. coli) プラスミドベクターの形態) は、2007年3月1日に American Type Culture Collection (ATCC)、10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209 USA に寄託され、ATCC 受託番号 P T A - 8229 が割り当てられた (米国出願公開番号 2008/0022422 もまた参照のこと)。

【0090】

本発明の遺伝子改変された生物において使用され得る P U F A シンターゼ遺伝子およびポリペプチドの他の例には、本明細書中にさらに記載される方法によって生成された以下のコドン最適化された配列が含まれるがこれらに限定されない：配列番号 1 (S z P U F A O r f A v 3 タンパク質)；配列番号 2 (S z P U F A O r f B v 3 タンパク質)；配列番号 3 (h S z T h P U F A O r f C v 3 タンパク質)；配列番号 6 (S z P U F A O r f A 遺伝子)；配列番号 7 (S z P U F A O r f B v 3 遺伝子)；および配列番号 8 (h S z T h P U F A O r f C v 3 遺伝子)、ならびにかかる配列の活性なバリエーション、一部分、フラグメントまたは誘導体、ここで、かかる遺伝子が P U F A シンターゼ活性をコードする、またはかかるポリペプチドもしくはタンパク質が P U F A シンターゼ活性を有する。本発明は、1 つまたは複数のかかる配列を含むあるいは 1 つまたは複数のかかる配列からなる、単離されたポリヌクレオチドあるいはポリペプチドを含む。

【0091】

本発明において使用され得る P U F A シンターゼ遺伝子およびポリペプチドの他の例には、本明細書中に記載される P U F A シンターゼ遺伝子またはポリペプチドのいずれか 1 つに対して、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % または 100 % の配列同一性を有する P U F A シンターゼ遺伝子またはポリペプチドが含まれるがこれらに限定されない。有用な範囲は、これらの値のいずれかの間で選択され得る (例えば、80 % ~ 100 % 同一、85 % ~ 100 % 同一、90 % ~ 100 % 同一、95 % ~ 100 % 同一、80 % ~ 99 % 同一、85 % ~ 99 % 同一、90 % ~ 99 % 同一または 95 % ~ 99 % 同一)。本発明の遺伝子改変された生物において使用され得る P U F A シンターゼ遺伝子およびポリペプチドのなお他の例には、本明細書中に記載される P U F A シンターゼまたは配列のいずれか 1 つの誘導体の活性なバリエーション、一部分、フラグメントが含まれるがこれらに限定されず、かかる遺伝子が P U F A シンターゼ活性をコードするまたはかかるポリペプチドが P U F A シンターゼ活性を有する。

【0092】

いくつかの実施形態において、PUFAシターゼは、藻類PUFAシターゼであり得る。いくつかの実施形態において、PUFAシターゼは、配列番号1のアミノ酸配列に対して、80%~100%同一、85%~100%同一、90%~100%同一、95%~100%同一、80%~99%同一、85%~99%同一、90%~99%同一または95%~99%同一なアミノ酸配列を含み得る。いくつかの実施形態において、PUFAシターゼは、配列番号1のアミノ酸配列を含み得る。いくつかの実施形態において、PUFAシターゼをコードする核酸配列は、配列番号6の核酸配列に対して、80%~100%同一、85%~100%同一、90%~100%同一、95%~100%同一、80%~99%同一、85%~99%同一、90%~99%同一または95%~99%同一な核酸配列を含み得る。いくつかの実施形態において、PUFAシターゼをコードする核酸配列は、配列番号6の核酸配列を含み得る。いくつかの実施形態において、PUFAシターゼは、配列番号2のアミノ酸配列に対して、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%同一なアミノ酸配列を含み得る。いくつかの実施形態において、PUFAシターゼは、配列番号2のアミノ酸配列を含み得る。いくつかの実施形態において、PUFAシターゼをコードする核酸配列は、配列番号7の核酸配列に対して、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%同一な核酸配列を含み得る。いくつかの実施形態において、PUFAシターゼをコードする核酸配列は、配列番号7の核酸配列を含み得る。いくつかの実施形態において、PUFAシターゼは、配列番号3のアミノ酸配列に対して、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%同一なアミノ酸配列を含み得る。いくつかの実施形態において、PUFAシターゼは、配列番号3のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、PUFAシターゼをコードする核酸配列は、配列番号8の核酸配列に対して、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%同一な核酸配列を含む。いくつかの実施形態において、PUFAシターゼをコードする核酸配列は、配列番号8の核酸配列を含む。

【0093】

いくつかの実施形態において、PUFAシターゼは、配列番号1、2もしくは3のアミノ酸配列またはそれらの任意の組合せを含む。いくつかの実施形態において、PUFAシターゼは、配列番号6、7もしくは8の核酸配列またはそれらの任意の組合せを含む。いくつかの実施形態において、この核酸配列は、本明細書中に記載される配列番号1、2もしくは3のアミノ酸配列またはそれらの任意の組合せもしくはそのパーセント同一性をコードする。

【0094】

いくつかの実施形態において、他のPUFAシターゼ遺伝子および／またはポリペプチドの配列は、本明細書中に開示された当該分野で利用可能な配列を使用して、当業者に周知の文献中およびバイオインフォマティクスデータベース中で同定され得る。例えば、かかる配列は、既知のPUFAシターゼ遺伝子またはポリペプチド配列を用いた、公に利用可能なデータベースのBLAST検索を介して同定され得る。かかる方法において、同一性は、 $GAP \quad PENALTY = 10$ 、 $GAP \quad LENGTH \quad PENALTY = 0.1$ およびGonnet 250シリーズのタンパク質重みマトリックスのデフォルトパラメータを使用するClustal W法のアラインメントに基づき得る。

【0095】

さらに、本明細書中に開示されるまたは当該分野で公知のPUFAシターゼ遺伝子またはポリペプチド配列は、天然の他のPUFAシターゼホモログを同定するために使用され得る。例えば、本明細書中に開示されるPUFAシターゼ核酸フラグメントの各々

は、相同タンパク質をコードする遺伝子を単離するために使用され得る。配列依存のプロトコルを使用した相同遺伝子の単離は、当該分野で周知である。配列依存のプロトコルの例には、(1) 核酸ハイブリダイゼーションの方法；(2) 核酸増幅技術（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、Mullisら、米国特許第4,683,202号；リガーゼ連鎖反応（LCR）、Tabor, S.ら、Proc. Acad. Sci. USA 82:1074 (1985)；または鎖置換増幅（SDA）、Walkerら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89:392 (1992)）の種々の使用によって例示されるような、DNAおよびRNA増幅の方法；ならびに(3) 相補性によるライブラリー構築およびスクリーニングの方法、が含まれるがこれらに限定されない。

【0096】

10

これら全ての方法は、標的タンパク質をコードする既知のまたは同定された配列を使用して、当業者によって容易に実施され得る。いくつかの実施形態において、標的PUFAシンターゼコード配列の周囲のDNA配列もまた、いくつかの改変手順において有用であり、公に利用可能なデータベースにおいて、当業者により容易に見出され得る。遺伝子変異を創出するための方法は一般的であり、当業者に周知であり、変異を創出する実践に適用され得る。

【0097】

ホスホパンテチエニル (phosphopantethienyl) トランスフェラーゼ

ホスホパンテチエニルトランスフェラーゼ (PPTase) は、脂肪酸合成、ポリケチド合成および非リボソームペプチド合成において十分に特徴付けられた酵素のファミリーである。特に、PUFAシンターゼ酵素中に存在するACPドメインは、補酵素A由来の補因子（4-ホスホパンテテイン）のアシルキャリアタンパク質（ACP）への付着による活性化を必要とする。この補因子の付着は、PPTaseによって実行される。宿主生物の内因性PPTasesがPUFAシンターゼのACPドメインを活性化できない場合、その機能を実行することが可能なPPTaseを提供することが必要である。多数のPPTaseの配列が公知であり、結晶構造（例えば、Reuterら、EMBO J. 18:6823-31 (1999)）ならびに活性に重要なアミノ酸残基の変異分析（Mofidら、Biochemistry 43:4128-36 (2004)）が決定されている。

20

【0098】

本明細書中に記載されるOrfA ACPドメインを基質として認識することが以前に実証されている異種PPTaseの一例は、ノストック属の種 (Nostoc sp.) PCC 7120（以前にはアナバナ属の種 (Anabaena sp.) PCC 7120と呼ばれた）のHet Iタンパク質である。Het Iは、その生物の異質細胞中に存在する糖-脂質層の構成要素である長鎖ヒドロキシ-脂肪酸の合成を担うことが公知のノストック (Nostoc) 中の遺伝子のクラスター中に存在する (BlackおよびWolk, J. Bacteriol. 176:2282-2292 (1994)；Campbellら、Arch. Microbiol. 167:251-258 (1997))。Het Iは、このクラスター中に存在するタンパク質Hgl EのACPドメインを活性化する可能性が高い。Hgl Eの2つのACPドメインは、シゾキトリウム (Schizochytrium) OrfAおよび他のPUFAシンターゼにおいて見出されるACPドメインに対して高い程度の配列相同性を有する。

30

40

【0099】

いくつかの実施形態において、PUFAシンターゼは、少なくとも1つの4'-ホスホパンテチエニルトランスフェラーゼ (PPTase) ドメインを含むとみなされ得るか、またはかかるドメインは、PUFAシンターゼに対するアクセサリドメインまたはタンパク質であるとみなされ得る。PPTaseの構造的特徴および機能的特徴は、例えば、米国出願公開番号2002/0194641；米国出願公開番号2004/0235127；および米国出願公開番号2005/0100995中に詳細に記載されている。

【0100】

PPTase活性を有する遺伝子およびポリペプチドの多数の例が、当該分野で公知であり、使用されている特定のPUFAシンターゼのACPドメインを活性化することが可

50

能である場合、本発明の遺伝子改変された生物において使用され得る。本発明の遺伝子改変された生物において使用され得る遺伝子およびポリペプチドの例には、本明細書中にさらに記載される以下のコドン最適化された配列が含まれ得るがこれらに限定されない：配列番号5（NoHetI v3タンパク質）および配列番号10（NoHetI v3遺伝子）。

【0101】

本発明の遺伝子改変された生物において使用され得るPPTase遺伝子およびポリペプチドの他の例には、本明細書中に記載されるPPTaseまたは配列のうちいずれか1つに対して、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%の配列同一性を有するPPTase遺伝子またはポリペプチドが含まれるがこれらに限定されない。有用な範囲は、これらの値のいずれかの間で選択され得る（例えば、80%~100%同一、85%~100%同一、90%~100%同一、95%~100%同一、80%~99%同一、85%~99%同一、90%~99%同一または95%~99%同一）。本発明の遺伝子改変された生物において使用され得るPPTase遺伝子およびポリペプチドのなお他の例には、本明細書中に記載されるPPTase配列のいずれか1つの活性なバリエーション、フラグメント、一部分または誘導体が含まれるがこれらに限定されず、かかる遺伝子がPPTase活性をコードするまたはかかるポリペプチドがPPTase活性を有する。

【0102】

いくつかの実施形態において、PPTaseは藻類PPTaseであり得る。いくつかの実施形態において、PPTaseは、配列番号5のアミノ酸配列に対して、80%~100%同一、85%~100%同一、90%~100%同一、95%~100%同一、80%~99%同一、85%~99%同一、90%~99%同一または95%~99%同一なアミノ酸配列を含み得る。いくつかの実施形態において、PPTaseは配列番号5のアミノ酸配列を含み得る。いくつかの実施形態において、PPTaseをコードする核酸配列は、配列番号10の核酸配列に対して、80%~100%同一、85%~100%同一、90%~100%同一、95%~100%同一、80%~99%同一、85%~99%同一、90%~99%同一または95%~99%同一な核酸配列を含み得る。いくつかの実施形態において、PPTaseをコードする核酸配列は、配列番号10の核酸配列を含み得る。いくつかの実施形態において、この核酸配列は、本明細書中に記載される配列番号5のアミノ酸配列またはその任意のパーセント同一性をコードする。

【0103】

本発明のいくつかの実施形態において、PPTaseは、異種宿主におけるPPTaseの生成および／または蓄積のために提供され得る。

【0104】

いくつかの実施形態において、PPTaseをコードする遺伝子および／またはポリペプチドは、別のPPTase遺伝子および／もしくはポリペプチド配列を同定するために使用され得る、ならびに／または他の細胞におけるPPTaseホモログを同定するために使用され得る。かかるPPTaseコード配列は、例えば、当業者に周知の文献中および／またはバイオインフォマティクスデータベース中で同定され得る。例えば、バイオインフォマティクスを使用した別の細胞型におけるPPTaseコード配列の同定は、本明細書中に提供される任意のものなどの、既知のPPTaseコードDNAおよびポリペプチド配列を用いた、公に利用可能なデータベースのBLAST（上で開示したとおり）検索を介して、達成され得る。同一性は、GAP PENALTY=10、GAP LENGTH PENALTY=0.1およびGonnet 250シリーズのタンパク質重みマトリックスのデフォルトパラメータを使用するClustal W法のアラインメントに基づく。

【0105】

いくつかの実施形態において、遺伝子改変された植物（例えばダイズ）、子孫、細胞、

組織またはそれらの一部は、P U F A シンターゼおよび P P T a s e を含む。いくつかの実施形態において、遺伝子改変された植物（例えばダイズ）、子孫、細胞、組織またはそれらの一部は、(i) および (i i) の核酸配列を単一の組換え発現ベクター中に含む。いくつかの実施形態において、遺伝子改変された植物（例えばダイズ）、子孫、細胞、組織またはそれらの一部は、(i) および (i i) の核酸配列を異なる組換え発現ベクター中に含む。

【0106】

アシル-C o A シンターゼ

本発明は、長鎖 P U F A 遊離脂肪酸 (F F A) のアシル-C o A への変換を触媒するアシル-C o A シンターゼ (A C o A S) タンパク質を提供する。P U F A シンターゼによる P U F A の内因性生成体であるシゾキトリウム (Schizochytrium) は、その P U F A シンターゼの遊離脂肪酸生成物をアシル-C o A に変換することが可能な 1 つまたは複数の A C o A S を保有する。従って、シゾキトリウム (Schizochytrium) 、ならびに P U F A シンターゼを内因的に含む他の生物（例えば、他のヤブレッツボカビ (Thraustochytrids)) または P U F A F F A をアシル-C o A に変換できる他の生物（例えば、タラシオシラ・シュードナナ (Thalassiosira pseudonana) またはクリプテコジニウム・コーニー (Crypthecodinium cohnii)) は、異種宿主において発現される P U F A シンターゼの生成物の蓄積を許容するまたは増加させるのに有用な酵素をコードする遺伝子の供給源を提示し得る。他の A C o A S 配列は、米国出願公開番号 2 0 0 7 / 0 2 4 5 4 3 1 中に記載されている。

【0107】

A C o A S 活性を有する遺伝子およびポリペプチドの多数の例が、当該分野で公知であり、本発明の遺伝子改変された生物において使用され得る。本発明の遺伝子改変された生物において使用され得る遺伝子およびポリペプチドの例には、本明細書中にさらに記載される以下のコドン最適化された配列が含まれ得るがこれらに限定されない：配列番号 4 (S z A C S - 2 v 3 タンパク質) および配列番号 9 (h S z T h A C S - 2 v 3 遺伝子) 。

【0108】

本発明の遺伝子改変された生物において使用され得る A C o A S 遺伝子およびポリペプチドの他の例には、本明細書中に記載される A C o A S または配列のいずれか 1 つに対して、少なくとも 8 0 % 、少なくとも 8 5 % 、少なくとも 9 0 % 、少なくとも 9 5 % 、少なくとも 9 6 % 、少なくとも 9 7 % 、少なくとも 9 8 % 、少なくとも 9 9 % または 1 0 0 % の配列同一性を有する A C o A S 遺伝子またはポリペプチドが含まれるが、これらに限定されない。有用な範囲は、これらの値のいずれかの間で選択され得る（例えば、8 0 % ~ 1 0 0 % 同一、8 5 % ~ 1 0 0 % 同一、9 0 % ~ 1 0 0 % 同一、9 5 % ~ 1 0 0 % 同一、8 0 % ~ 9 9 % 同一、8 5 % ~ 9 9 % 同一、9 0 % ~ 9 9 % 同一または 9 5 % ~ 9 9 % 同一）。本発明の遺伝子改変された生物において使用され得る A C o A S 遺伝子およびポリペプチドのなお他の例には、本明細書中に記載される A C o A S 配列のいずれか 1 つの活性なバリエーション、フラグメント、一部分または誘導体が含まれるがこれらに限定されず、かかる遺伝子が A C o A S 活性をコードするまたはかかるポリペプチドが A C o A S 活性を有する。

【0109】

いくつかの実施形態において、A C o A S は藻類 A C o A S であり得る。いくつかの実施形態において、A C o A S は、配列番号 4 のアミノ酸配列に対して、8 0 % ~ 1 0 0 % 同一、8 5 % ~ 1 0 0 % 同一、9 0 % ~ 1 0 0 % 同一、9 5 % ~ 1 0 0 % 同一、8 0 % ~ 9 9 % 同一、8 5 % ~ 9 9 % 同一、9 0 % ~ 9 9 % 同一または 9 5 % ~ 9 9 % 同一なアミノ酸配列を含み得る。いくつかの実施形態において、A C o A S は、配列番号 4 のアミノ酸配列を含み得る。いくつかの実施形態において、A C o A S をコードする核酸配列は、配列番号 9 の核酸配列に対して、8 0 % ~ 9 9 % 同一、8 5 % ~ 9 9 % 同一、9 0 % ~ 9 9 % 同一、8 0 % ~ 9 5 % 同一または 8 5 % ~ 9 5 % 同一な核酸配列を含み得る。いくつ

かの実施形態において、A C o A Sをコードする核酸配列は、配列番号9の核酸配列を含み得る。いくつかの実施形態において、A C o A Sをコードする核酸配列は、配列番号34の核酸配列を含む。いくつかの実施形態において、この核酸配列は、本明細書中に記載される配列番号4のアミノ酸配列またはその任意のパーセント同一性をコードする。

【0110】

本発明のいくつかの実施形態において、A C o A Sは、異種宿主におけるA C o A Sの生成および／または蓄積、ならびに内因性宿主におけるA C o A Sの改善された生成および／または蓄積を提供し得る。

【0111】

いくつかの実施形態において、A C o A Sをコードする遺伝子および／またはポリペプチドは、別のA C o A S遺伝子および／またはポリペプチド配列を同定するために使用され得る、ならびに／あるいは他の細胞におけるA C o A Sホモログを同定するために使用され得る。かかるA C o A Sコード配列は、例えば、当業者に周知の文献中および／またはバイオインフォマティクスデータベース中で同定され得る。例えば、バイオインフォマティクスを使用した別の細胞型におけるA C o A Sコード配列の同定は、本明細書中に提供される任意のものなどの、既知のA C o A SコードDNAおよびポリペプチド配列を用いた、公に利用可能なデータベースのB L A S T（上で開示したとおり）検索を介して、達成され得る。同一性は、G A P P E N A L T Y = 10、G A P L E N G T H P E N A L T Y = 0.1およびG o n n e t 250シリーズのタンパク質重みマトリックスのデフォルトパラメータを使用するC l u s t a l W法のアラインメントに基づく。

【0112】

いくつかの実施形態において、遺伝子改変された植物（例えばダイズ）、子孫、細胞、組織またはそれらの一部は、P U F AシンターゼおよびA C o A S、またはP U F Aシンターゼ、P P T a s eおよびA C o A Sを含む。いくつかの実施形態において、遺伝子改変された植物（例えばダイズ）、子孫、細胞、組織またはそれらの一部は、単一の組換え発現ベクター中に含まれる、(i)、(i i)もしくは(i i i)の核酸配列またはそれらの任意の組合せを含む。いくつかの実施形態において、(i)、(i i)および(i i i)の核酸配列は、異なる組換え発現ベクター中に含まれる。いくつかの実施形態において、(i)および(i i)の核酸配列が単一の組換え発現ベクター中に含まれ、(i i i)の核酸配列が異なる組換え発現ベクター中に含まれる。いくつかの実施形態において、(i)および(i i i)の核酸配列が単一の組換え発現ベクター中に含まれ、(i i)の核酸配列が異なる組換え発現ベクター中に含まれる。いくつかの実施形態において、(i i)および(i i i)の核酸配列が単一の組換え発現ベクター中に含まれ、(i)の核酸配列が異なる組換え発現ベクター中に含まれる。いくつかの実施形態において、(i)、(i i)もしくは(i i i)の核酸配列またはそれらの任意の組合せは、1つまたは複数の種子特異的プロモーターの制御下にある。

【0113】

遺伝子改変された生物の作製方法

顕著に高い収率の1種または複数の所望の多価不飽和脂肪酸を生成するために、植物は、P U F Aシンターゼを植物中に導入するために遺伝子改変され得る。本発明は、かかる遺伝子改変の有効性を改善または増強するための方法、ならびに特にP U F Aシンターゼの最終生成物、例えばP U F Aの生成および／または蓄積を改善または増強するための方法にも関する。

【0114】

植物が含まれるがこれに限定されない遺伝子改変された生物における遺伝子発現のための方法は、当該分野で公知である。いくつかの実施形態において、発現されるP U F Aシンターゼ遺伝子のコード領域は、以下に記載されるように、標的宿主細胞のためにコドン最適化され得る。植物細胞が含まれるがこれに限定されない組換え宿主細胞における遺伝子の発現は、目的のコード領域に作動可能に連結されたプロモーターおよび／または転写ターミネーターを必要とし得る。種子特異的プロモーター（例えば、P v D l e c 2、L

f K C S 3、F A E 1、B o A C PもしくはB n a N a p i n C) または葉特異的プロモーター (例えば、ユビキチンもしくはC s V M V) が含まれるがこれらに限定されない多数のプロモーターが、遺伝子のためのベクターを構築する際に使用され得る。本発明において使用され得るプロモーターの他の非限定的な例には、W O 1 9 9 2 / 1 8 6 3 4 に開示されたアシルキャリアタンパク質プロモーター; Slightomら(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80: 1897-1901; 1983); Sengupta-Gopalanら(Proc. Nat. Acad. Sci. 82: 3320-3324; 1985); van der Geestら(Plant Mol. Biol. 33: 553-557; 1997)およびBustosら(EMBO J. 10: 1469-1479; 1991)に開示されたインゲンマメ (Phaseolus vulgaris) β -ファゼオリンプロモーターおよび短縮バージョンが含まれる。

【0115】

本発明のいくつかの実施形態において、組換えベクターは、選択された核酸配列を操作するためのおよび宿主細胞中にかかる核酸配列を導入するためのツールとして使用される、操作された (例えば人工的に生成された) 核酸分子である。従って、組換えベクターは、例えば宿主細胞中に選択された核酸配列を発現および/または送達することによって組換え細胞を形成するために、選択された核酸配列をクローニング、配列決定および/または他の方法で操作する際に使用するのに適切である。かかるベクターは典型的に、異種核酸配列、即ち、クローニングまたは送達される核酸配列に隣接して天然には見出されない核酸配列を含むが、このベクターは、本発明の核酸分子に隣接して天然に見出されるまたは本発明の核酸分子の発現に有用な調節核酸配列 (例えば、プロモーター、非翻訳領域) もまた含み得る。ベクターは、R N AまたはD N Aのいずれかで、原核生物または真核生物のいずれかであり得るが、典型的にはプラスミドである。ベクターは、染色体外エレメント (例えばプラスミド) として維持され得るか、または組換え生物 (例えば、微生物または植物) の染色体中に組み込まれ得る。ベクター全体が、宿主細胞内の適所に留まり得、またはある特定の条件下では、本発明の核酸分子を後に残して、プラスミドD N Aが除去され得る。組み込まれた核酸分子は、染色体プロモーターの制御下、ネイティブもしくはプラスミドのプロモーターの制御下、またはいくつかのプロモーターの組合せの制御下にあり得る。単一コピーまたは複数コピーの核酸分子が、染色体中に組み込まれ得る。本発明の組換えベクターは、少なくとも1つの選択マーカーを含み得る。

【0116】

いくつかの実施形態において、本発明の組換え核酸分子において使用される組換えベクターは、発現ベクターである。かかる実施形態において、生成される産物 (例えばP U F Aシンターゼ) をコードする核酸配列が、組換え核酸分子を生成するために組換えベクター中に挿入される。生成されるタンパク質をコードする核酸配列が、組換え宿主細胞内の核酸配列の転写および翻訳を可能にするベクターにおいて、この核酸配列を調節配列に作動可能に連結させる様式で、ベクター中に挿入される。

【0117】

種々の宿主生物および細胞の形質転換に有用なベクターは、一般的であり、文献中に開示されている。典型的には、ベクターは、選択マーカー、および所望の宿主における自律複製または染色体組込みを可能にする配列を含む。さらに、適切なベクターは、挿入されたコード領域の発現を提供するために、それらの間にコード領域D N Aフラグメントが挿入され得る、転写開始制御を有するプロモーター領域および転写終結制御領域を含み得る。両方の制御領域が、形質転換された宿主細胞に対して相同な遺伝子から誘導され得るが、かかる制御領域は、生成宿主として選択された特定の種にとってネイティブではない遺伝子からも誘導され得ることを理解すべきである。

【0118】

本発明は、異種宿主におけるP U F Aの生成および/または蓄積を増加させるために、単独であるいは任意の1つまたは複数の本明細書中に記載される戦略 (例えば、以下のうち任意の1つ、2つ、3つまたは4つ: コドン最適化、オルガネラ標的化、(例えば、F A Sの阻害による) マロニルC o AについてのP U F Aシンターゼ競合の増強、および/あるいは1つまたは複数のアシルトランスフェラーゼまたは関連酵素の発現) と組み合わせ

せて利用される、本明細書中に記載される P U F A シンターゼおよび外因性 P P T a s e と共に、本明細書中に記載され例示される 1 つまたは複数のアシルー C o A シンテターゼの発現を含む。

【0119】

本発明のいくつかの実施形態は、P U F A シンターゼ酵素、P P T a s e、および／あるいは任意の 1 つまたは複数のアクセサリタンパク質および／あるいは標的化された遺伝子改変の発現を、宿主の 1 つまたは複数のオルガネラに標的化することに関する。例えば、いくつかの実施形態において、P U F A シンターゼ系および P P T a s e の発現は、植物の色素体に標的化され得る。いくつかの実施形態において、P U F A シンターゼおよび P P T a s e の発現は、細胞質ゾルに標的化される。いくつかの実施形態において、P U F A シンターゼおよび P P T a s e の発現は、植物の色素体および細胞質ゾルの両方に標的化される。これらの実施形態のいずれかにおいて、他の標的が、色素体または細胞質ゾルに指向され得る。

10

【0120】

いくつかの実施形態において、アシルー C o A シンテターゼは、D H A および／または他の L C - P U F A 遊離脂肪酸を、アシルトランスフェラーゼによって次に利用され得るアシルー C o A に変換するために、細胞質ゾルにおいて発現される。

【0121】

種々の色素体標的化配列が当該分野で公知であり、異種宿主が植物または植物細胞である、色素体を標的化することが望まれる実施形態において使用され得る。

20

【0122】

本発明は、異種宿主における P U F A の生成および／または蓄積を増加させるために、単独であるいは任意の 1 つまたは複数の本明細書中に記載される戦略（例えば、以下のうち任意の 1 つ、2 つ、3 つまたは 4 つ：コドン最適化、（例えば、F A S の阻害による）マロニル C o A についての P U F A シンターゼ競合の増強、1 つまたは複数のアシルー C o A シンテターゼの発現、および／あるいは 1 つまたは複数のアシルトランスフェラーゼまたは関連酵素の発現）と組み合わせて利用される、本明細書中に記載される P U F A シンターゼの発現および外因性 P P T a s e と共に、オルガネラ標的化（例えば、植物中の色素体または葉緑体への）の使用を含む。

【0123】

色素体または葉緑体への遺伝子産物の標的化は、種々のタンパク質のアミノ末端において見出される、インポートの間に切断されて成熟タンパク質を生じるシグナル配列によって制御される（例えば、葉緑体標的化に関して、例えば、Comai ら、J. Biol. Chem. 263: 15104-15109 (1988) を参照のこと）。これらのシグナル配列は、葉緑体中への異種産物のインポートをもたらすために、異種遺伝子産物に融合され得る（van den Broeck ら Nature 313:358-363 (1985)）。適切なシグナル配列をコードする D N A は、R U B I S C O タンパク質、C A B タンパク質、E P S P シンターゼ酵素、G S 2 タンパク質および葉緑体に局在化することが公知の多数の他のタンパク質をコードする c D N A から単離され得る。

30

【0124】

本発明のいくつかの実施形態において、本発明において使用されるタンパク質の局在化は、細胞内区画に、例えば、色素体または葉緑体に指向される。タンパク質は、そのアミノ末端に葉緑体トランジットペプチド（C T P）を含むことによって、葉緑体に指向され得る。同様に、タンパク質は、その N 末端に色素体トランジットペプチドまたはシグナリングペプチドを含むことによって、色素体に指向され得る。

40

【0125】

葉緑体インポート機構に前駆体を指向させるアミノ末端葉緑体標的化ペプチドを含むより大きい前駆体タンパク質として合成される、天然に存在する葉緑体標的化タンパク質は、当該分野で周知である。葉緑体標的化ペプチドは、葉緑体オルガネラ内に位置する特定のエンドプロテアーゼによって一般に切断され、これにより、標的化された成熟体が放出

50

され、葉緑体環境中へと、前駆体から酵素を活性化できる。植物細胞の葉緑体または色素体に遺伝子または遺伝子産物を標的化することを指向するのに適したペプチドをコードする配列の例には、ペチュニア E P S P S C T P、シロイヌナズナ属 (*Arabidopsis*) の E P S P S C T P 2 およびイントロン、ならびに当業者に公知の他の配列が含まれる。かかる標的化配列は、それが最も効果的に機能する細胞構造に転移される所望の発現されたタンパク質を提供する、または、所望の表現型機能に必要な細胞プロセスが濃縮される細胞の領域へと所望の発現されたタンパク質を転移させることによる。葉緑体標的化ペプチドの具体的な例は、当該分野で周知であり、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) リブローズニリン酸カルボキシラーゼ小サブユニット a t s 1 A トランジットペプチド、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) E P S P S トランジットペプチド、およびトウモロコシ (*Zea mays*) リブローズニリン酸カルボキシラーゼ小サブユニット トランジットペプチドが含まれる。

10

【0126】

最適化されたトランジットペプチドは、例えば、van den Broeckら、*Nature*, 313:358-363 (1985) に記載されている。原核生物および真核生物のシグナル配列は、例えば、Michaelisら、*Ann. Rev. Microbiol.* 36:425 (1982) に開示されている。本発明において使用され得るトランジットペプチドのさらなる例には、Von Heijneら、*Plant Mol. Biol. Rep.* 9:104-126 (1991) ; Mazurら、*Plant Physiol.* 85:1110 (1987) ; Vorstら、*Gene* 65:59 (1988) に記載されるものなどの葉緑体トランジットペプチドが含まれる。ChenおよびJagendorf (*J. Biol. Chem.* 268:2363-2367 (1993)) は、異種導入遺伝子のインポートのための、葉緑体トランジットペプチドの使用を記載している。使用されるこのペプチドは、ニコチアナ・プルムバギニフォリア (*Nicotiana glauca*) 由来の r b c S 遺伝子由来のトランジットペプチドである (Poulsenら *Mol. Gen. Genet.* 205: 193-200 (1986))。異種タンパク質を葉緑体に局在化させるために本明細書中で機能した 1 つの C T P は、セイヨウアブラナ (*Brassica napus*) アシル- A C P チオエステラーゼから誘導されたものである。

20

【0127】

葉緑体または色素体に遺伝子を局在化させるための代替的手段には、葉緑体または色素体の形質転換が含まれる。本出願において想定される分子を組み込むように葉緑体 D N A だけが変更された組換え植物が、生成され得る。葉緑体において機能するプロモーターは、当該分野で公知である (Hanley-Bowdenら、*Trends in Biochemical Sciences* 12:67-70 (1987))。異種 D N A が挿入された葉緑体を含む細胞を得るための方法および組成物は、例えば、Daniellら (米国特許第 5, 693, 507 号) および Maligaら (米国特許第 5, 451, 513 号) に記載されている。

30

【0128】

戦略の組合せ

本発明によれば、1 種または複数の標的 P U F A の生成および蓄積のための異種宿主の生成において、宿主における P U F A の生成および／または蓄積を改善するための、任意の 1 つまたは複数の (任意の組合せの) 本明細書中に記載される戦略が使用され得る。実際、種々の組合せの戦略は、相加的または相乗的であり、1 つまたは複数のかかる戦略の非存在下と比較して改善された P U F A の生成および／または蓄積を提供することが理解される。実際、実施例は、宿主生物における P U F A の生成のための例示的戦略を提供する。

40

【0129】

これらの改変の組合せ、または本明細書中に記載される任意の他の改変もしくは改変の組合せを使用する任意の植物または植物細胞が、本発明により包含される。いくつかの実施形態において、かかる植物は、宿主による P U F A (または P U F A シンターゼの他の生物活性生成物) の生成および／または蓄積の改善のための、本明細書中に記載されるアクセサリタンパク質 (例えば、A C o A S、G P A T、L P A A T、D A G A T またはアセチル C o A カルボキシラーゼ (A C C a s e)) を発現するように、さらに遺伝子改

50

変されたものである。さらに、標的 P U F A を含む種子または油を含む任意の生成物が、かかる細胞または生物から誘導されるので、本明細書中に記載される任意の改変または改変の組合せを使用する任意の宿主細胞または生物が、本発明によって包含される。

【0130】

いくつかの実施形態において、本発明に従って遺伝子改変される植物（例えば植物宿主細胞）には、双子葉植物および単子葉植物の両方を含む任意の高等植物、ならびに特に、作物植物および特にその油のために使用される植物を含む消費植物が含まれるがこれらに限定されない。かかる植物には、例えば、ダイズ、ナタネ、アマニ、トウモロコシ、ペニバナ、ヒマワリおよびタバコが含まれ得るがこれらに限定されない。従って、任意の植物種または植物細胞が選択され得る。いくつかの実施形態において、植物は、マメ科 (Fabaceae) (マメ科 (Leguminosae)、マメ科植物 (legume) 科、エンドウマメ (pea) 科、マメ (bean) 科または豆類 (pulse) 科) の植物である。いくつかの実施形態において、植物はグリキネ (Glycine) 属の植物である。いくつかの実施形態において、植物は、グリキネ・アルビカンス (Glycine albicans)、グリキネ・アフィオノタ (Glycine aphyonota)、グリキネ・アレナリ (Glycine arenari)、グリキネ・アルギレア (Glycine argyrea)、グリキネ・カネセンス (Glycine canescens)、グリキネ・克蘭デスチネ (Glycine clandestine)、グリキネ・クルヴァタ (Glycine curvata)、グリキネ・キルトロバ (Glycine cyrtoloba)、グリキネ・ファルカテ (Glycine falcate)、グリキネ・グラセイ (Glycine gracei)、グリキネ・ヒルチカウリス (Glycine hirticaulis)、グリキネ・ヒルチカウリス亜種レプトサ (Glycine hirticaulis subsp. leptosa)、グリキネ・ラクトヴィレンス (Glycine lactovirens)、グリキネ・ラティフォリア (Glycine latifolia)、グリキネ・ラトロベアナ (Glycine latrobeana)、グリキネ・ミクロフィラ (Glycine microphylla)、グリキネ・モンティスードウグラス (Glycine montis-douglas)、グリキネ・ペラトサ (Glycine peratosa)、グリキネ・ペスカドレンシス (Glycine pescadrensis)、グリキネ・ピンダニカ (Glycine pindanica)、グリキネ・プレニイ (Glycine pullenii)、グリキネ・ルビギノサ (Glycine rubiginosa)、グリキネ・ステノフィタ (Glycine stenophita)、グリキネ・シンデティカ (Glycine syndetika)、グリキネ・タバキナ (Glycine tabacina)、グリキネ・トメントラ (Glycine tomentella)、ツルマメ (Glycine soja) またはダイズ (Glycine max) である。いくつかの実施形態において、植物は、ラッカセイ、マメ (インゲンマメ (Phaseolus vulgaris))、ソラマメ (Vicia faba) またはエンドウマメ (Pisum sativum) である。

【0131】

「植物の一部」には、本明細書中で使用する場合、種子（成熟種子および未成熟種子を含む）、花粉、胚、花、果実、苗条、葉、根、茎、外植体などが含まれるがこれらに限定されない、植物の任意の一部が含まれる。いくつかの実施形態において、遺伝子改変された植物は、所望の結果（例えば、増加したもしくは改変された P U F A シンターゼならびに／または P U F A シンターゼを使用した所望の生成物の生成および／もしくは蓄積）が達成されるように、その正常（例えば、野生型または天然に存在する）形態から改変（例えば、変異または変化）されたゲノムを有する。いくつかの実施形態において、植物の遺伝子改変は、古典的な株発生および／または分子遺伝学的技術を使用して達成され得る。所望のアミノ酸配列をコードする組換え核酸分子が植物のゲノム中に組み込まれたトランスジェニック植物を生成するための方法が、当該分野で公知である。いくつかの実施形態において、本発明に従って遺伝子改変される植物は、ヒトを含む動物による消費に適した植物である。

【0132】

特に望ましい形質、例えば、疾患抵抗性、植物形質転換の容易さ、油の含量またはプロファイルなどのために最適化された、これらの植物由来の植物系統が、生成、選択または同定され得る。いくつかの実施形態において、植物系統は、植物育種を介して、またはマーカー補助された育種および耕作などの方法を介して、選択され得る。いくつかの実施形態において、植物細胞培養物が使用され得、例えば、植物細胞培養物は、分化した植物へ

と成長せず、通常の農作業を使用して栽培されないが、その代わりに、液体培地中で成長させ維持される。

【0133】

いくつかの実施形態において、植物は油糧種子植物であり得、ここで、この油糧種子および／または油糧種子中の油は、PUFAシンターゼにより生成されるPUFAを含む。いくつかの実施形態において、かかる油は、検出可能な量の、PUFAシンターゼの生成物である少なくとも1種の標的または一次PUFAを含み得る。いくつかの実施形態において、かかる油は、標的PUFA生成物でも一次PUFA生成物でもなく、野生型植物における内因性FAS系によって天然に生成されない中間体または副生成物を、実質的に含まないことが可能である（例えば、野生型植物は、FAS系を介して、ある種のより短いまたは中間長の鎖のPUFA、例えば18炭素のPUFAを生成するが、PUFAシンターゼを用いた遺伝子改変の結果として、植物中で生成された新たなまたはさらなる脂肪酸が存在する）。

10

【0134】

遺伝子改変された植物の生成に関して、植物の遺伝子操作のための方法は、当該分野で周知である。例えば、双子葉植物および単子葉植物のための生物学および物理的な形質転換プロトコルを含む、植物形質転換のための多数の方法が開発されている（例えば、Goto-Fumiyukiら、Nature Biotech 17:282-286 (1999)；Mikiら、Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Glick, B. R.およびThompson, J. E. 編, CRC Press, Inc., Boca Raton, 67-88頁 (1993)）。さらに、例えばGruberら、Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Glick, B. R.およびThompson, J. E. 編, CRC Press, Inc., Boca Raton, 89-119頁 (1993)において、植物細胞または組織の形質転換のためのベクターおよびin vitro培養法、ならびに植物の再分化が、利用可能である。

20

【0135】

本発明は、配列番号6～10から選択される核酸配列を含む単離された核酸分子、ならびに本明細書中に記載されるかかる配列の改変または変異を含む単離された核酸分子に関する。本発明は、配列番号1～5から選択されるアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチド、ならびに改変または変異または本明細書中に記載されるかかる配列を含む単離されたポリペプチドに関する。

【0136】

本発明は、組換え発現ベクターpDAB7361を含む。本発明は、組換え発現ベクターpDAB7362を含む。本発明は、組換え発現ベクターpDAB7363を含む。本発明は、組換え発現ベクターpDAB7365を含む。本発明は、組換え発現ベクターpDAB7368を含む。本発明は、組換え発現ベクターpDAB7369を含む。本発明は、組換え発現ベクターpDAB7370を含む。本発明は、組換え発現ベクターpDAB100518を含む。本発明は、組換え発現ベクターpDAB101476を含む。本発明は、組換え発現ベクターpDAB9166を含む。本発明は、組換え発現ベクターpDAB9167を含む。本発明は、組換え発現ベクターpDAB7379を含む。本発明は、組換え発現ベクターpDAB7380を含む。本発明は、組換え発現ベクターpDAB9323を含む。本発明は、組換え発現ベクターpDAB9330を含む。本発明は、組換え発現ベクターpDAB9337を含む。本発明は、組換え発現ベクターpDAB9338を含む。本発明は、組換え発現ベクターpDAB9344を含む。本発明は、組換え発現ベクターpDAB9396を含む。本発明は、組換え発現ベクターpDAB101412を含む。本発明は、組換え発現ベクターpDAB7733を含む。本発明は、組換え発現ベクターpDAB7734を含む。本発明は、組換え発現ベクターpDAB101493を含む。本発明は、組換え発現ベクターpDAB109507を含む。本発明は、組換え発現ベクターpDAB109508を含む。本発明は、組換え発現ベクターpDAB109509を含む。本発明は、組換え発現ベクターpDAB9151を含む。本発明は、組換え発現ベクターpDAB108207を含む。本発明は、組換え発現ベクターpDAB108208を含む。本発明は、組換え発現ベクターpDAB108209を含む。

30

40

50

【 0 1 3 7 】

20

30

50

ダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部を含む。本発明は、組換え発現ベクター p D A B 9 1 4 7 を含むダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部を含む。本発明は、組換え発現ベクター p D A B 1 0 8 2 2 4 を含むダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部を含む。本発明は、組換え発現ベクター p D A B 1 0 8 2 2 5 を含むダイズ植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部を含む。

【0140】

本明細書中で使用する場合、用語「トランスフェクション」は、外因性核酸分子（例えば、組換え核酸分子）が細胞中に挿入され得る任意の方法をいうために使用される。用語「形質転換」は、藻類、細菌および酵母などの微生物細胞中または植物細胞中への核酸分子の導入をいうためにかかる用語が使用される場合、用語「トランスフェクション」と相互交換可能に使用され得る。微生物および植物の系において、用語「形質転換」は、微生物または植物による外因性核酸の獲得に起因した遺伝性の変化を記述するために使用され、用語「トランスフェクション」と本質的に同義である。いくつかの実施形態において、トランスフェクション技術には、形質転換、パーティクルボンバードメント、拡散、能動輸送、槽超音波処理 (bath sonication)、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポフェクション、吸着、感染およびプロトプラスト融合が含まれるがこれらに限定されない。

【0141】

植物中に発現ベクターを導入するために広く利用される方法は、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) の天然の形質転換系に基づいている。Horschら、*Science* 227:1229 (1985)。アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*A. tumefaciens*) およびアグロバクテリウム・リゾゲネス (*A. rhizogenes*) は、植物細胞を遺伝的に形質転換するのに有用であることが公知の、植物病原性の土壌細菌である。アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*A. tumefaciens*) の T i プラスミドおよびアグロバクテリウム・リゾゲネス (*A. rhizogenes*) の R i プラスミドはそれぞれ、植物の遺伝的形質転換を担う遺伝子を保有する。Kado, C. I., *Crit. Rev. Plant. Sci.* 10:1 (1991)。アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) ベクター系、およびアグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 媒介性の遺伝子移入のための方法の説明もまた、利用可能である。例えば、Gruberら、前出、Mikiら、前出、Moloneyら、*Plant Cell Reports* 8:238 (1989) および米国特許第 4, 9 4 0, 8 3 8 号および同第 5, 4 6 4, 7 6 3 号。

【0142】

植物形質転換の別の公知の方法は、微粒子 (microprojectile) 媒介性の形質転換であり、この方法では、DNA は、微粒子の表面上に担持される。この方法において、発現ベクターは、植物の細胞壁および細胞膜を貫通するのに十分な速度まで微粒子を加速する遺伝子銃 (biolistic) デバイスを用いて、植物組織中に導入される。Sanfordら、*Part. Sci. Technol.* 5:27 (1987)、Sanford, J. C., *Trends Biotech.* 6:299 (1988)、Sanford, J. C., *Physiol. Plant* 79:206 (1990)、Kleinら、*Biotechnology* 10:268 (1992)。

【0143】

植物への DNA の物理的送達のためのなお別の方法は、標的細胞の超音波処理である。Zhangら、*Bio/Technology* 9:996 (1991)。また、リボソームまたはスフェロプラスト融合が、植物中に発現ベクターを導入するために使用されてきた。Deshayesら、*EMBO J.*, 4:2731 (1985)、Christouら、*Proc Natl. Acad. Sci. USA* 84:3962 (1987)。CaCl₂ 沈澱、ポリビニルアルコールまたはポリ-L-オルニチンを使用したプロトプラスト中への DNA の直接的取り込みもまた、報告されている。Hainら、*Mol. Gen. Genet.* 199:161 (1985) および Draperら、*Plant Cell Physiol.* 23:451 (1982)。プロトプラストならびに細胞全体および組織全体のエレクトロポレーションもまた記載されている。Donnら、*Abstracts of VIIth International Congress on Plant Cell and Tissue Culture IAPTC*, A2-38, 53頁 (1990) ; D'Halluinら、*Plant Cell* 4:1495-1505 (1992) および Spencerら、*Plant Mol. Biol.* 24:51-61 (1994)。さらに、炭化ケイ素 (silicon carbide) ウィスカー (Kaepplerら、1990, *Plant Cell Reports*) および例えば花浸漬 (flower dipping) 方法論を使

用する植物形質転換 (CloughおよびBent, Plant J. 16:735-743 (1998)) もまた、使用され得る。正確な植物形質転換方法論は、形質転換のために選択される植物種および選択される植物細胞型 (例えば、実生由来の細胞型、例えば、胚軸 (hypocotyl) および子葉または胚性組織) にいくらか依存して変動し得る。

【0144】

植物細胞中への遺伝子構築物の導入後に、植物細胞を成長させ得、苗条および根などの分化する組織の出現に際して、成熟植物が生成され得る。いくつかの実施形態において、複数の植物が生成され得る。植物を再分化させるための方法論は当業者に告知であり、例えば、Plant Cell and Tissue Culture, 1994, VasilおよびThorpe編Kluwer Academic Publishers、ならびにPlant Cell Culture Protocols (Methods in Molecular Biology 111, 1999 Hall編Humana Press)中に見出すことができる。 10

【0145】

いくつかの実施形態において、本明細書中に記載される遺伝子改変された植物は、発酵培地中で培養され得るか、または土壌などの適切な培地中で成長させ得る。いくつかの実施形態において、高等植物に適した成長培地には、土壌、砂、根の成長を支持する任意の他の粒子状培地 (例えば、パーミキュライト、パーライトなど) または水耕栽培、ならびに高等植物の成長を最適化する適切な光、水および栄養サプリメントが含まれるがこれらに限定されない、植物用の任意の成長培地が含まれ得る。

【0146】

組換えDNA技術の使用は、例えば、宿主細胞内の核酸分子のコピー数、これらの核酸分子が転写される効率、得られた転写物が翻訳される効率、および翻訳後修飾の効率を操作することによって、トランスフェクトされた核酸分子の発現の制御を改善し得ることが、当業者に理解される。さらに、プロモーター配列は、ネイティブのプロモーターと比較して、発現のレベルを改善するように遺伝子操作され得る。核酸分子の発現を制御するのに有用な組換え技術には、1つまたは複数の宿主細胞染色体中への核酸分子の組み込み、プラスミドへのベクター安定性配列の付加、転写制御シグナル (例えば、プロモーター、オペレーター、エンハンサー) の置換または改変、翻訳制御シグナル (例えば、リボソーム結合部位、Shine-Dalgarno配列) の置換または改変、宿主細胞のコドン使用に対応するための核酸分子の改変、および転写物を不安定化する配列の欠失、が含まれるがこれらに限定されない。 20 30

【0147】

いくつかの実施形態において、植物には、医薬品、香料、栄養補助剤、機能性食物成分もしくは化粧品として活性な薬剤として使用される化合物を生成することが公知の植物、またはこれらの化合物／薬剤を生成するように遺伝子操作された植物が含まれ得る。

【0148】

本発明のこれらの実施形態は全て、遺伝子改変された生物ならびに本明細書中に記載されるような生物を生成および使用する方法のいずれかの考察に適用される。

【0149】

遺伝子改変された生物由来の生成物

いくつかの実施形態において、本発明の遺伝子改変された生物は、EPA (C20:5, n-3)、DHA (C22:6, n-3)、DPA (C22:5, n-6またはn-3)、ARA (C20:4, n-6)、GLA (C18:3, n-6)、ALA (C18:3, n-3) および／またはSDA (C18:4, n-3) が含まれるがこれらに限定されない1種または複数の多価不飽和脂肪酸を生成し、いくつかの実施形態において、EPA (C20:5, n-3)、DHA (C22:6, n-3)、DPA (C22:5, n-6またはn-3) もしくはDTA (C22:4, n-6) またはそれらの任意の組合せが含まれるがこれらに限定されない1種または複数のより長い鎖のPUFAを生成する。いくつかの実施形態において、本発明の遺伝子改変された植物は、EPA (C20:5, n-3)、DHA (C22:6, n-3) および／もしくはDPA (C22:5, n-6またはn-3) またはこれらの任意の組合せが含まれるがこれらに限定されない1種また 40 50

は複数の多価不飽和脂肪酸を生成する。いくつかの実施形態において、本発明の遺伝子改変された植物は、高いオレイック (oleic) 背景を有さない。

【0150】

いくつかの実施形態において、遺伝子改変された生物は、本明細書中に記載される、PUFAシンターゼおよびPPTaseを組換え発現するように遺伝子改変された植物である。いくつかの実施形態において、かかる植物は、宿主によるPUFA（またはPUFAシンターゼの他の生物活性生成物）の生成および／または蓄積の改善のための、本明細書中に記載されるアクセサリタンパク質（例えば、ACoAS、GPAT、LPAAT、DAGATまたはACCase）を発現するように、さらに遺伝子改変されたものである。

10

【0151】

本発明のいくつかの実施形態は、所望の鎖長および所望の数の二重結合を有する多価不飽和脂肪酸の生成、ならびに拡張して、これらのPUFAを含む本明細書中に記載される遺伝子改変された植物から得られた（例えば、かかる植物の油または種子から得られた）油糧種子および油を含む。本発明によって生成され得るPUFAの例には、DHA（ドコサヘキサエン酸（C22：6，n-3））、ARA（エイコサテトラエン酸またはアラキドン酸（C20：4，n-6））、DPA（ドコサペンタエン酸（C22：5，n-6またはn-3））およびEPA（エイコサペンタエン酸（C20：5，n-3））ならびにそれらの任意の組合せが含まれるがこれらに限定されない。本発明は、PUFAを生成するPUFAシンターゼの使用を介した遺伝子改変された植物の開発によって、1種または

20

【0152】

いくつかの実施形態において、特定の生物から誘導された所与のPUFAシンターゼは、特定の生物由来のPUFAシンターゼの選択が特定された標的または一次PUFAの生成を生じるように、特定のPUFA（複数可）を生成する。いくつかの実施形態において、PUFAの比率は、特定のPUFAシンターゼの選択、およびそれが発現される特定の条件にその系が如何に応答するかに依存して、異なり得る。例えば、スラウストキトリウム (Thraustochytrium) 23B (ATCC番号20892) 由来のPUFAシンターゼの使用は、標的または一次PUFAとしてDHAおよびDPA (n-6) の生成もまた生じ得る；しかし、スラウストキトリウム (Thraustochytrium) 23Bの場合、DHA対DPA (n-6) の比率は、10：1（および8：1から40：1までの範囲であり得る）であるが、シゾキトリウム (Schizochytrium) では、この比率は典型的には2.5：1である。いくつかの実施形態において、所与のPUFAシンターゼは、異なるPUFAシンターゼ由来のタンパク質およびドメインを混ぜることによって改変され得るか、あるいは標的PUFA生成物および／または比率を変化させるために、所与のPUFAシンターゼのドメインまたはタンパク質が改変され得る。

30

【0153】

いくつかの実施形態において、PUFAを生成する酵素系の「中間体生成物」または「副生成物」に対する言及は、その系の標的または一次PUFA（複数可）の生成の結果として酵素系によって生成されるが、一次または標的PUFA（複数可）ではない任意の生成物、および特に脂肪酸生成物をいう。いくつかの実施形態において、中間体および副生成物には、野生型植物または示された遺伝子改変のレシピエントとして使用される親植物によって天然に生成されるが、野生型植物または示された遺伝子改変のレシピエントとして使用される親植物によって生成されるレベルと比較して遺伝子改変の結果としてより高いレベルで生成されるので本明細書中では中間体または副生成物として分類される、非標的脂肪酸が含まれ得る。いくつかの実施形態において、1つの酵素系の一次または標的PUFAは、一次または標的生成物が異なるPUFAである異なる酵素系の中間体であり得る。例えば、EPAを生成するための標準的な経路を使用した場合、GLA、DGLAおよびSDAなどの脂肪酸は、顕著な量で中間体生成物として生成される（例えば、米国出

40

50

願公開番号2004/0172682)。同様に、また米国出願公開番号2004/0172682によって示されるように、DHAを生成するための標準的な経路を使用した場合、上述の脂肪酸に加えて、ETAおよびEPA（即ち、上記第1の例における標的PUFA）は、顕著な量で生成され得、標的PUFA自体よりも、総脂肪酸生成物に対して、顕著により多い量で存在し得る。

【0154】

いくつかの実施形態において、1種または複数の所望の多価不飽和脂肪酸を顕著に高い収率で生成するために、植物は、植物中にPUFAシンターゼ系を導入するために遺伝子改変され得る。植物は、PUFAシンターゼを内因的に含むことが知られておらず、従って、本発明は、独自の脂肪酸生成能を有する植物を生成する機会を提示する。本発明は、同じ植物において、それらの任意の組合せを含めたEPA、DHA、DPA（n3またはn6）、ARA、GLA、SDAなどが含まれるがこれらに限定されない、1種または複数のPUFAを生成するように遺伝子操作された植物を提供する。本発明は、種々の比率および形態で多数の「デザイナー油」のうち任意の1つを創出する能力を提供する。いくつかの実施形態において、本明細書中に記載される特定の海洋生物由来のPUFAシンターゼの使用は、PUFA生成の範囲を拡張でき、殆どの作物植物を成長させるのに使用される温度範囲内でかかるPUFAを首尾よく生成できる。

【0155】

いくつかの実施形態において、PUFAを合成するための系の中間体または副生成物を「実質的に含まない」、あるいは実質的な量で存在する中間体または副生成物を有さないとは、PUFA（例えば、野生型植物または示された遺伝子改変のレシピエントとして使用される親植物によって生成されない）を生成するための酵素系の導入または存在の結果として、遺伝子改変された植物（ならびに／または植物の一部および／もしくは種子油画分）において生成される任意の中間体または副生成物の脂肪酸（非標的PUFA）が、総脂肪酸の重量で10%未満、総脂肪酸の重量で9%未満、総脂肪酸の重量で8%未満、総脂肪酸の重量で7%未満、総脂肪酸の重量で6%未満、総脂肪酸の重量で5%未満、総脂肪酸の重量で4%未満、総脂肪酸の重量で3%未満、総脂肪酸の重量で2%未満、総脂肪酸の重量で1%未満、総脂肪酸の重量で0.5%未満の量で存在し得ることを意味する。

【0156】

いくつかの実施形態において、本発明の遺伝子改変された植物、子孫、細胞、組織またはそれらの一部、あるいは本発明の遺伝子改変された植物、子孫、細胞、組織またはそれらの一部から得られた油または種子は、検出可能な量のDHA（ドコサヘキサエン酸（C22:6, n-3））、DPA（n-6）（ドコサペンタエン酸（C22:5 n-6））またはEPA（エイコサペンタエン酸（C20:5, n-3））を含む。いくつかの実施形態において、本発明の遺伝子改変された植物、子孫、細胞、組織またはそれらの一部、あるいは本発明の遺伝子改変された植物、子孫、細胞、組織またはそれらの一部から得られた油または種子は、総脂肪酸の重量で少なくとも0.01%、少なくとも0.02%、少なくとも0.03%、少なくとも0.04%、少なくとも0.05%、少なくとも0.06%、少なくとも0.07%、少なくとも0.08%、少なくとも0.09%、少なくとも0.1%、少なくとも0.2%、少なくとも0.3%、少なくとも0.4%、少なくとも0.5%、少なくとも0.6%、少なくとも0.7%、少なくとも0.8%、少なくとも0.9%、少なくとも1%、少なくとも1.5%、少なくとも2%、少なくとも2.5%、少なくとも3%、少なくとも3.5%、少なくとも4%、少なくとも4.5%、少なくとも5%、少なくとも5.5%、少なくとも6%、少なくとも6.5%、少なくとも7%、少なくとも7.5%、少なくとも8%、少なくとも8.5%、少なくとも9%、少なくとも9.5%、少なくとも10%、少なくとも10.5%、少なくとも11%、少なくとも11.5%、少なくとも12%、少なくとも12.5%、少なくとも13%、少なくとも13.5%、少なくとも14%、少なくとも14.5%、または少なくとも15%のDHAを含む。有用な範囲は、これらの値のいずれかの間、例えば、総脂肪酸の重量で0.01%~15%、0.05%~10%および1%~5%のDHAで選択され得る。

【0157】

いくつかの実施形態において、本発明の遺伝子改変された植物、子孫、細胞、組織またはそれらの一部、あるいは本発明の遺伝子改変された植物、子孫、細胞、組織またはそれらの一部から得られた油または種子は、総脂肪酸の重量で少なくとも0.01%、少なくとも0.02%、少なくとも0.03%、少なくとも0.04%、少なくとも0.05%、少なくとも0.06%、少なくとも0.07%、少なくとも0.08%、少なくとも0.09%、少なくとも0.1%、少なくとも0.2%、少なくとも0.3%、少なくとも0.4%、少なくとも0.5%、少なくとも0.6%、少なくとも0.7%、少なくとも0.8%、少なくとも0.9%、少なくとも1%、少なくとも1.5%、少なくとも2%、少なくとも2.5%、少なくとも3%、少なくとも3.5%、少なくとも4%、少なくとも4.5%、少なくとも5%、少なくとも5.5%、少なくとも6%、少なくとも6.5%、少なくとも7%、少なくとも7.5%、少なくとも8%、少なくとも8.5%、少なくとも9%、少なくとも9.5%、または少なくとも10%のEPAを含む。有用な範囲は、これらの値のいずれかの間、例えば、総脂肪酸の重量で0.01%~10%、0.05%~5%および0.1%~5%のEPAで選択され得る。

10

【0158】

いくつかの実施形態において、本発明の遺伝子改変された植物、子孫、細胞、組織またはそれらの一部、あるいは本発明の遺伝子改変された植物、子孫、細胞、組織またはそれらの一部から得られた油または種子は、総脂肪酸の重量で少なくとも0.01%、少なくとも0.02%、少なくとも0.03%、少なくとも0.04%、少なくとも0.05%、少なくとも0.06%、少なくとも0.07%、少なくとも0.08%、少なくとも0.09%、少なくとも0.1%、少なくとも0.2%、少なくとも0.3%、少なくとも0.4%、少なくとも0.5%、少なくとも0.6%、少なくとも0.7%、少なくとも0.8%、少なくとも0.9%、少なくとも1%、少なくとも1.5%、少なくとも2%、少なくとも2.5%、少なくとも3%、少なくとも3.5%、少なくとも4%、少なくとも4.5%、少なくとも5%、少なくとも5.5%、少なくとも6%、少なくとも6.5%、少なくとも7%、少なくとも7.5%、少なくとも8%、少なくとも8.5%、少なくとも9%、少なくとも9.5%、または少なくとも10%のDPA(n-6)を含む。有用な範囲は、これらの値のいずれかの間、例えば、総脂肪酸の重量で0.01%~10%、0.01%~5%、0.01%~1%、0.01%~0.05%、0.05%~5%および0.1%~5%のDPA(n-6)で選択され得る。

20

30

【0159】

いくつかの実施形態において、本発明の遺伝子改変された植物、子孫、細胞、組織またはそれらの一部、あるいは本発明の遺伝子改変された植物、子孫、細胞、組織またはそれらの一部から得られた油または種子は、総脂肪酸の重量で少なくとも1:1、少なくとも1:1.5、少なくとも1:2、少なくとも1:2.5、少なくとも1:3、少なくとも1:3.5、少なくとも1:4、少なくとも1:4.5、少なくとも1:5、少なくとも1:5.5、少なくとも1:6、少なくとも1:6.5、少なくとも1:7、少なくとも1:7.5、少なくとも1:8、少なくとも1:8.5、少なくとも1:9、少なくとも1:10、少なくとも1:11、少なくとも1:12、少なくとも1:13、少なくとも1:14、少なくとも1:15、少なくとも1:16、少なくとも1:17、少なくとも1:18、少なくとも1:19、少なくとも1:20、少なくとも1:21、少なくとも1:21.5、少なくとも1:22、少なくとも1:23、少なくとも1:24、少なくとも1:25、少なくとも1:26、少なくとも1:27、少なくとも1:28、少なくとも1:29、または少なくとも1:30の比率のEPA:DHAを含む。有用な範囲は、これらの値のいずれかの間、例えば、総脂肪酸の重量で1:1~1:30、1:1~1:25、1:1~1:20、1:1~1:15、1:1~1:10、1:1~1:5、1:1~1:3および1:1~1:2の比率のEPA:DHAで選択され得る。

40

【0160】

いくつかの実施形態において、本発明の遺伝子改変された植物、子孫、細胞、組織また

50

はそれらの一部、あるいは本発明の遺伝子改変された植物、子孫、細胞、組織またはそれらの一部から得られた油または種子は、総脂肪酸の重量で少なくとも1:1、少なくとも1:1.5、少なくとも1:2、少なくとも1:2.5、少なくとも1:3、少なくとも1:3.5、少なくとも1:4、少なくとも1:4.5、少なくとも1:5、少なくとも1:5.5、少なくとも1:6、少なくとも1:6.5、少なくとも1:7、少なくとも1:7.5、少なくとも1:8、少なくとも1:8.5、少なくとも1:9、または少なくとも1:10の比率のDPA (n-6):DHAを含む。有用な範囲は、これらの値のいずれかの間、例えば、総脂肪酸の重量で1:1~1:10、1:1~1:5、1:1~1:3および1:1~1:2の比率のDPA (n-6):DHA、で選択され得る。

【0161】

いくつかの実施形態において、本発明の遺伝子改変された植物、子孫、細胞、組織またはそれらの一部あるいは種子から得られた油は、油の重量で少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも99%のトリグリセリドを含む。いくつかの実施形態において、本発明の遺伝子改変された植物、子孫、細胞、組織またはそれらの一部あるいは種子から得られた油は、油の重量で70%~99%のトリグリセリド、油の重量で75%~99%のトリグリセリド、油の重量で80%~99%のトリグリセリド、油の重量で85%~99%のトリグリセリド、または油の重量で90%~99%のトリグリセリドを含む。トリグリセリドの精製および分析のための方法は、記載されている（例えば、Ruiz-Gutierrez VおよびBarron LJ, J. Chromatogr. B. Biomed. Appl., 671:133-168, 1995）。

【0162】

いくつかの実施形態において、PUFAシンターゼ系の標的生成物が、長鎖PUFA、例えばDHA、DPA (n-6またはn-3)またはEPAである場合、かかるPUFAシンターゼ系を用いて遺伝子改変された植物の総脂質中に実質的な量で存在しない中間体生成物および副生成物には、以下が含まれ得るがこれらに限定されない: γ -リノレン酸 (GLA; 18:3, n-6); ステアリドン酸 (STAまたはSDA; 18:4, n-3); ジホモ- γ -リノレン酸 (DGLAまたはHGLA; 20:3, n-6)、アラキドン酸 (ARA, C20:4, n-6); エイコサトリエン酸 (ETA; 20:3, n-9) および種々の他の中間体または副生成物、例えば20:0; 20:1 ($\Delta 5$); 20:1 ($\Delta 11$); 20:2 ($\Delta 8, 11$); 20:2 ($\Delta 11, 14$); 20:3 ($\Delta 5, 11, 14$); 20:3 ($\Delta 11, 14, 17$); ミード酸 (20:3; $\Delta 5, 8, 11$); または20:4 ($\Delta 5, 11, 14, 17$)。

【0163】

本発明に従う植物の遺伝子改変は、植物による1種または複数のPUFAの精製を生じ得る。いくつかの実施形態において、植物によって生成されるPUFAプロファイルおよびPUFAの比率は、PUFAシンターゼがそこから誘導された生物によって生成されるPUFAプロファイルおよびPUFAの比率と必ずしも同じである必要はない。

【0164】

いくつかの実施形態において、本発明の遺伝子改変された植物、子孫、細胞、組織またはそれらの一部は、PUFAシンターゼの活性を介してPUFAを生成するように操作され得る。いくつかの実施形態において、PUFAは、植物、子孫、細胞、組織またはそれらの一部から化合物を抽出する精製プロセスを介して回収され得る。いくつかの実施形態において、PUFAは、植物、子孫、細胞、組織またはそれらの一部を収集することによって回収され得る。いくつかの実施形態において、PUFAは、植物、子孫、細胞、組織またはそれらの一部由来（例えば、油糧種子由来）の油、あるいは植物、子孫、細胞、組織またはそれらの一部由来の種子を収集することによって回収され得る。いくつかの実施形態において、植物、子孫、細胞、組織またはそれらの一部はまた、その天然状態で消費され得るか、または消費用の製品へとさらに加工され得る。

【0165】

いくつかの実施形態において、本発明の遺伝子改変された植物、子孫、細胞、組織また

10

20

30

40

50

はそれらの一部は、1種または複数の多価不飽和脂肪酸を生成し得る。いくつかの実施形態において、植物、子孫、細胞、組織またはそれらの一部は、少なくとも1種のPUFA（標的PUFA）を、（例えば、油糧種子植物である場合にはその成熟種子中に、または油糧種子植物の種子の油中に）生成し得、ここで、PUFAを蓄積する植物または植物の一部（例えば、植物が油糧種子植物である場合には成熟種子、または油糧種子植物の種子の油）中の総脂肪酸プロファイルは、検出可能な量のこのPUFA（単数または複数）を含む。いくつかの実施形態において、標的PUFAは、少なくとも20炭素のPUFAであり、少なくとも3つの二重結合、少なくとも4つの二重結合または少なくとも5つの二重結合を含む。いくつかの実施形態において、標的PUFAは、その植物によって天然には生成されないPUFAであり得る。いくつかの実施形態において、PUFAを蓄積する植物または植物の一部（植物の種子油を含む）中の総脂肪酸プロファイルは、総脂肪酸の重量で少なくとも0.1%の標的PUFA（複数可）、総脂肪酸の重量で少なくとも0.2%、少なくとも0.3%、少なくとも0.4%、少なくとも0.5%、少なくとも1%、少なくとも1.5%、少なくとも2%、少なくとも2.5%、少なくとも3%、少なくとも3.5%、少なくとも4%、少なくとも4.5%、少なくとも5%、少なくとも5.5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%の、75%より多くの少なくとも1種の多価不飽和脂肪酸（標的PUFA（単数または複数））、または0.1%から75%までの任意の百分率、または0.1%の増分で75%より高い%（最大100%または100%）の標的PUFA（複数可）を含む。

10

20

【0166】

本明細書中で使用する場合、PUFAの百分率量に対する言及は、特に示さない限り、抽出された総脂肪酸の重量百分率である。いくつかの実施形態において、総脂肪酸は、脂肪酸メチルエステル（FAME）調製物のガスクロマトグラフィー（GC）分析によって決定されるが、総脂肪酸の決定はこの方法に限定されない。

【0167】

いくつかの実施形態において、本発明の植物（および／または子孫、細胞、組織またはそれらの一部あるいは種子油画分）中の総脂肪酸は、植物によって生成された総脂肪酸の重量で10%未満、植物によって生成された総脂肪酸の重量で9%未満、植物、子孫、細胞、組織またはそれらの一部によって生成された総脂肪酸の重量で8%未満、植物、子孫、細胞、組織またはそれらの一部によって生成された総脂肪酸の重量で7%未満、植物、子孫、細胞、組織またはそれらの一部によって生成された総脂肪酸の重量で6%未満、植物、子孫、細胞、組織またはそれらの一部によって生成された総脂肪酸の重量で5%未満、植物、子孫、細胞、組織またはそれらの一部によって生成された総脂肪酸の重量で4%未満、植物、子孫、細胞、組織またはそれらの一部によって生成された総脂肪酸の重量で3%未満、植物、子孫、細胞、組織またはそれらの一部によって生成された総脂肪酸の重量で2%未満、植物、子孫、細胞、組織またはそれらの一部によって生成された総脂肪酸の重量で1%未満の、 γ -リノレン酸（GLA；18：3， $n-6$ ）；ステアリドン酸（STAまたはSDA；18：4， $n-3$ ）；ジホモ γ -リノレン酸（DGLAまたはHGLA；20：3， $n-6$ ）、アラキドン酸（ARA、C20：4， $n-6$ ）；エイコサトリエン酸（ETA；20：3， $n-9$ ）および種々の他の脂肪酸、例えば20：0；20：1（ $\Delta 5$ ）；20：1（ $\Delta 11$ ）；20：2（ $\Delta 8$ ，11）；20：2（ $\Delta 11$ ，14）；20：3（ $\Delta 5$ ，11，14）；20：3（ $\Delta 11$ ，14，17）；ミード酸（20：3； $\Delta 5$ ，8，11）；または20：4（ $\Delta 5$ ，1，14，17）から選択される脂肪酸を、含み得る。

30

40

【0168】

本発明は、本明細書中に記載される植物、子孫、細胞、組織またはそれらの一部によって生成される任意の種子、ならびに本発明の植物、子孫、細胞、組織もしくはそれらの一

50

部または種子によって生成される任意の油を含む。本発明はまた、本明細書中に記載される植物、子孫、細胞、組織またはそれらの一部、種子または油を使用して生成される任意の製品もまた含む。

【0169】

本発明の遺伝子改変された生物に関する使用および生成物

本発明は、上に詳細に記載される本発明の遺伝子改変された植物、子孫、細胞、組織またはそれらの一部（例えばダイズ）を成長させるまたは栽培することによって、PUFAを生成する方法を含む。いくつかの実施形態において、かかる方法は、例えば、本明細書中に以前に記載したような本発明に従う遺伝子改変を有する植物を、土壌などの適切な環境中で成長させることを含む。

10

【0170】

本発明は、本発明の遺伝子改変された植物、子孫、細胞、組織もしくはそれらの一部から、または本発明の遺伝子改変された植物、子孫、細胞、組織もしくはそれらの一部の種子から油を回収する工程を含む、少なくとも1種のPUFAを含む油を生成する方法を含む。

【0171】

本発明は、本発明の遺伝子改変された植物、子孫、細胞、組織またはそれらの一部を成長させる工程を含む、少なくとも1種のPUFAを含む油を生成する方法を含む。本発明は、本発明の遺伝子改変された植物、子孫、細胞、組織またはそれらの一部の種子から油を回収する工程を含む、種子油中の少なくとも1種のPUFAを生成する方法を含む。本発明は、本発明の遺伝子改変された植物、子孫、細胞、組織またはそれらの一部を成長させる工程を含む、種子油中の少なくとも1種のPUFAを生成する方法を含む。

20

【0172】

本発明は、本発明の遺伝子改変された植物、子孫、細胞、組織またはそれらの一部、本発明の油、本発明の種子、本発明の食物製品、本発明の機能性食物、あるいは本発明の医薬製品をそれを必要とする個体に提供する工程を含む、少なくとも1種のPUFAを含むサプリメントまたは治療用製品を、それを必要とする個体に提供する方法を含む。本発明は、植物または植物細胞を、(i) 少なくとも1種の多価不飽和脂肪酸(PUFA)を生成する藻類PUFAシンターゼ系をコードする核酸配列；および(ii) ホスホパンテテインル補因子を藻類PUFAシンターゼ系ACPDメインに転移させるホスホパンテテインルトランスフェラーゼ(PPTase)をコードする核酸配列で形質転換する工程を含む、本発明の遺伝子改変された植物、子孫、細胞、組織またはそれらの一部を生成する方法もまた含む。いくつかの実施形態において、この方法は、植物または植物細胞を、(iii) アシル-CoAへの長鎖PUFA遊離脂肪酸(FFA)の変換を触媒するアシル-CoAシンターゼ(ACoAS)をコードする核酸配列で形質転換する工程をさらに含む。

30

【0173】

いくつかの実施形態において、本発明のかかる方法のPUFAは、DHA、DPA(n-6)および/またはEPAである。いくつかの実施形態において、本発明のかかる方法によって生成される油は、ダイズ油である。いくつかの実施形態において、本発明のかかる方法によって生成される油は、総脂肪酸の重量で0.05%~15%のDHA、または本明細書中にさらに記載されるその任意の量もしくは範囲を含む。いくつかの実施形態において、本発明のかかる方法によって生成される油は、総脂肪酸の重量で0.01%~5%のEPA、または本明細書中にさらに記載されるその任意の量もしくは範囲をさらに含む。いくつかの実施形態において、本発明のかかる方法によって生成される油は、総脂肪酸の重量で0.01%~5%のDPA(n-6)、または本明細書中にさらに記載されるその任意の量もしくは範囲をさらに含む。いくつかの実施形態において、本発明のかかる方法によって生成される油は、総脂肪酸の重量で1:1~1:30の比率のEPA:DHA、総脂肪酸の重量で1:1~1:3の比率のEPA:DHA、または本明細書中にさらに記載されるその任意の量もしくは範囲を含む。いくつかの実施形態において、本発明の

40

50

かかる方法によって生成される油は、総脂肪酸の重量で1：1または1：10の比率のDPA（n-6）：DHA、総脂肪酸の重量で1：1～1：3の比率のDPA（n-6）：DHA、または本明細書中にさらに記載されるその任意の量もしくは範囲をさらに含む。

【0174】

本発明はさらに、本明細書中に記載される任意の生物またはそれらの一部（例えば、植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部（例えば油糧種子）、あるいはその調製物もしくは画分）、ならびに本明細書中に記載される生物によって生成される任意の油を、さらに含む。本発明はまた、本明細書中に記載される生物、その一部または油を使用して生成される任意の製品もまた含む。

【0175】

本発明は、生物、その一部、あるいは本発明に従うおよび本明細書中に記載される遺伝子改変された生物（例えば、本明細書中に記載されるように遺伝子改変された植物、子孫、細胞、種子、組織またはそれらの一部）によって生成される油を製品に添加する工程を含む、少なくとも1種の脂肪酸を含む製品を改変する方法に関する。本方法によって生成される、本明細書中に記載される任意の生物、その一部または生物由来の油を一般に含む任意の製品もまた、本発明によって包含される。

【0176】

いくつかの実施形態において、この製品は、食物食餌サプリメント、医薬製剤、ヒト化動物ミルク、調製粉乳、栄養補助食品および機能性食物から選択される。適切な医薬製剤には、抗炎症製剤、化学療法剤、活性な賦形剤、骨粗鬆症薬物、抗うつ薬、抗癌薬、抗ヘリコバクター・ピロリ（*Helicobacter pylori*）薬物、神経変性疾患の処置用の薬物、変性性肝臓疾患の処置用の薬物、抗生物質、およびコレステロール低下製剤が含まれるがこれらに限定されない。いくつかの実施形態において、この製品は、慢性炎症、急性炎症、胃腸障害、癌、悪液質、心臓再狭窄、神経変性障害、肝臓の変性性障害、血液脂質障害、骨粗鬆症、変形性関節症、自己免疫疾患、妊娠高血圧腎症、早産、加齢性黄斑変性症、肺障害およびペルオキシソーム病から選択される状態を処置するために使用される。

【0177】

いくつかの実施形態において、この製品は、食物製品または機能性食物製品である。適切な食物製品には、高級製パン商品（fine bakery ware）、パンおよびロール、朝食用シリアル、プロセスチーズおよび非プロセスチーズ、調味料（ケチャップ、マヨネーズなど）、乳製品（ミルク、ヨーグルト）、プディングおよびゼラチンデザート、炭酸飲料、茶、粉末飲料ミックス、加工魚製品、果実ベースの飲料、チューインガム、硬い菓子類（hard confectionery）、冷凍乳製品、加工食肉製品、ナッツおよびナッツベースのスプレッド、パスタ、加工家禽製品、グレイビーおよびソース、ポテトチップスおよび他のチップス（chipsまたはcrisps）、チョコレートおよび他の菓子類、スープおよびスープミックス、ダイズベースの製品（例えば、豆乳、飲料、クリーム、粉状ミルク）、植物油ベースのスプレッド、ならびに野菜ベースの飲料が含まれるがこれらに限定されない。

【0178】

本発明のいくつかの実施形態において、この製品は、動物のための餌もしくは食事組成物、または餌もしくは食事組成物用の添加物である。用語「動物」には、ヒトおよび非ヒトが含まれる。動物の非限定的な例は、非反芻動物（例えば、ブタ、家禽または魚）および反芻動物（例えば、ウシ、ヒツジおよびウマ）である。用語餌または餌組成物とは、動物による摂取に適したまたは動物による摂取を意図した、任意の化合物、調製物、混合物または組成物を意味する。

【0179】

いくつかの実施形態において、本発明は、本明細書中に記載される遺伝子改変された植物、子孫、組織またはそれらの一部から得られる油、および別の油を含む油ブレンドを対象とする。いくつかの実施形態において、この別の油は、種子油、植物油、魚油、微生物油またはそれらの混合物である。

【0180】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、本明細書中に記載される遺伝子改変された植物、子孫、組織またはそれらの一部から得られる油は、油中のLC-PUFAを改変するため、例えば、エステルを形成するためおよび／または医薬目的でLC-PUFAを精製するために、さらに加工され得る。

【0181】

本発明のいくつかの実施形態は、総脂肪酸の重量で0.05%~15%のDHAまたは本明細書中にさらに記載されるその任意の範囲を含むダイズ油を対象とする。いくつかの実施形態において、ダイズ油は、総脂肪酸の重量で0.05%~5%のEPAをさらに含む。いくつかの実施形態において、ダイズ油は、総脂肪酸の重量で0.01%~5%のDPA(n-6)をさらに含む。いくつかの実施形態において、ダイズ油は、総脂肪酸の重量で3.5%より高い α -リノレン酸、または本明細書中にさらに記載されるその任意の範囲の脂肪酸プロファイルを有する。本発明のいくつかの実施形態は、本明細書中に記載されるダイズ油を含む組成物を対象とする。いくつかの実施形態において、ダイズ油を含む組成物は、1種または複数種の油を含む。いくつかの実施形態において、この組成物は、ダイズではない供給源由来のPUFA(例えばDHA)を含まない。

10

【0182】

本発明のさらなる目的、利点および新規の特徴は、限定を意図しない以下の実施例を検討すれば、当業者に明らかとなる。

[実施例]

【実施例1】

20

【0183】

PUFAシンターゼOrfA、PUFAシンターゼOrfB、PUFAシンターゼOrfC、アシル-CoAシンターゼおよび4'ホスホパンテテインイルトランスフェラーゼHetIのコドン最適化

シゾキトリウム属の種(Schizochytrium sp.)ATCC_20888(GenBank ID:AF378327、GI:158518688)由来のPUFAシンターゼOrfA、シゾキトリウム属の種(Schizochytrium sp.)ATCC_20888(GenBank ID:AF378328、GI:158518690)由来のPUFAシンターゼOrfB、シゾキトリウム属の種(Schizochytrium sp.)ATCC_20888およびスラウストキトリウム(Thraustochytrium)由来のPUFAシンターゼキメラOrfC(米国出願公開番号2008/0022422)(「ハイブリッドOrfC」とも記載される)、シゾキトリウム属の種(Schizochytrium sp.)ATCC_20888由来のアシル-CoAシンターゼ(米国出願公開番号2007/0245431)、ならびにノストック属の種(Nostoc sp.)PCC 7120(GenBank ID:P37695、GI:20141367)由来の4'ホスホパンテテインイルトランスフェラーゼHetIをコードするDNA配列の分析により、最適な植物発現にとって有害であり得る非最適なコドン組成を含むいくつかの配列モチーフの存在が明らかになった。PUFAシンターゼOrfA、PUFAシンターゼOrfB、PUFAシンターゼキメラOrfC、アシル-CoAシンターゼおよび4'ホスホパンテテインイルトランスフェラーゼHetIタンパク質をコードする遺伝子(複数可)の設計を、性質がより「植物様」であるDNA配列を生成するために最適化したが、このとき、配列改変は、翻訳を妨害せず、非最適なコドン組成を介したmRNAの不安定化を生み出すこともない。

30

40

【0184】

遺伝子コードの冗長性／縮重(例えば、いくつかのアミノ酸が、1つより多いコドンによって特定される)によってもたらされる可塑性に起因して、異なる生物または生物のクラスにおけるゲノムの進化が、同義のコドンの差示的な使用を生じている。この「コドンバイアス」は、タンパク質コード領域の平均塩基組成中に反映される。例えば、比較的低いG+C含量を有するゲノムを有する生物は、同義のコドンの3番目の位置においてAまたはTを有するコドンにより多く利用するが、より高いG+C含量を有するものは、3番目の位置においてGまたはCを有するコドンにより多く利用する。さらに、mRNA内の

50

「マイナー」コドンの存在は、特に、マイナーコドンに対応するチャージtRNAの相対的な豊富さが低い場合には、mRNAの絶対的翻訳速度を低下させ得ると考えられる。この論法の拡張は、個々のマイナーコドンによる翻訳速度の減少が、複数のマイナーコドンにとって少なくとも付加的となるというものである。従って、高い相対含量のマイナーコドンを含むmRNAは、対応して低い翻訳速度を有する。この速度は、対応して低いレベルのコードされるタンパク質によって反映される。

【0185】

双子葉植物（例えば、タバコ、ダイズ、ワタまたはキャノーラ）における発現のために、PUFAシンターゼO r f A、PUFAシンターゼO r f B、PUFAシンターゼキメラO r f C、アシル-CoAシンテターゼおよび4'ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼH e t Iタンパク質をコードする遺伝子进行操作する際に、キャノーラのコドン使用を、公に利用可能なデータベースから評価した（表1）。

【0186】

【表 2】

表1. セイヨウアブラナ(*Brassica napus*)(キャノーラ)遺伝子由来の双子葉植物のコード領域における同義のコドン表示(列CおよびG)。植物に最適化された合成遺伝子の設計のための、バランス-バイアス(balanced-biased)コドン表示についての値は、列DおよびH中にある。

A	B	C	D	E	F	G	H
アミノ酸	コドン	キャノーラ%	加重平均	アミノ酸	コドン	キャノーラ%	加重平均
ALA (A)	GCA	23.3	23.3	LEU (L)	CTA	10.1	DNU
	GCC	21.2	21.2		CTC	22.8	28.5
	GCG	14.2	14.2		CTG	11.6	14.6
	GCT	41.3	41.3		CTT	25.2	31.6
ARG (R)	AGA	31.8	43.8		TTA	10.1	DNU
	AGG	22.1	30.5		TTG	20.2	25.3
	CGA	9.9	DNU	LYS (K)	AAA	44.6	44.6
	CGC	8.9	DNU		AAG	55.4	55.4
	CGG	8.6	DNU	MET (M)	ATG	100.0	100.0
	CGT	18.6	25.7		TTC	58.6	58.6
ASN (N)	AAC	62.6	62.6	PHE (F)	TTT	41.4	41.4
	AAT	37.4	37.4		CCA	29.6	29.6
ASP (D)	GAC	42.5	42.5		CCC	14.6	14.6
	GAT	57.5	57.5		CCG	18.4	18.4
CYS (C)	TGC	49.2	49.2	SER (S)	CCT	37.3	37.3
	TGT	50.8	50.8		AGC	16.0	17.9
終了	TAA	38.5	DNU		AGT	14.1	15.8
	TAG	22.1	DNU		TCA	18.2	20.4
	TGA	39.4	100.0		TCC	16.7	18.7
					TCG	10.7	DNU
GLN (Q)	CAA	50.0	50.0		TCT	24.3	27.2
	CAG	50.0	50.0	THR (T)	ACA	26.3	26.3
GLU (E)	GAA	43.6	43.6		ACC	26.9	26.9
	GAG	56.4	56.4		ACG	16.9	16.9
GLY (G)	GGA	36.4	36.4		ACT	30.0	30.0
	GGC	16.2	16.2	TRP (W)	TGG	100.0	100.0
	GGG	15.2	15.2		TAC	59.4	59.4
	GGT	32.1	32.1	TYR (Y)	TAT	40.6	40.6
HIS (H)	CAC	49.6	49.6		GTA	10.8	DNU
	CAT	50.4	50.4	VAL (V)	GTC	24.1	27.0
ILE (I)	ATA	21.1	21.1		GTG	28.3	31.7
	ATC	42.7	42.7		GTT	36.8	41.3
	ATT	36.2	36.2				

*DNU=使用せず

アミノ酸に対する残りのコドン選択の分布のバランスをとるために、各コドンについての加重平均表示を、式： $C1$ の加重平均 $\% = 1 / (\%C1 + \%C2 + \%C3 + \dots) \times \%C1 \times 100$ を使用して計算し（表1）、式中、 $C1$ は問題のコドンであり、 $\%C2$ 、 $\%C3$ などは、表1の残りの同義のコドンの、キャノーラについての%値の平均（関連するコドンについての平均%値は、列CおよびGからとる）を示す。各コドンについての加重平均%値は、表1の列DおよびHに与えられる。

【0188】

植物発現のためのコード領域を設計する際に、植物によって好まれる一次（「第1選択の」）コドンを選択し、複数の選択が存在する場合には好ましいコドンの第2選択、第3選択、第4選択などを決定した。次いで、PUFAシターゼO r f A、PUFAシターゼO r f B、PUFAシターゼO r f C、アシルーC o Aシテターゼおよび4'ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼH e t Iの本質的に同じアミノ酸配列をコードするが、アミノ酸配列内の各位置においてアミノ酸を特定するために、植物（第1に好ましい、第2に好ましい、第3に好ましい、または第4に好ましい、など）コドンの置換によって元のDNA配列（PUFAシターゼO r f A、PUFAシターゼO r f B、PUFAシターゼキメラO r f C、アシルーC o Aシテターゼおよび4'ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼH e t Iをコードする）とは異なっている、新しいDNA配列を設計した。

【0189】

次いで、この新しい配列を、配列中の改変によって創出された制限酵素部位について分析した。次いで、第1、第2、第3または第4選択の好ましいコドンによってコドンを置き換えることによって、同定された部位を改変した。次いでこの配列をさらに分析し、TAまたはGCダブレットの頻度を低減するために改変した。

【0190】

これらの配列の分析により、新たなDNA配列が、PUFAシターゼO r f A、PUFAシターゼO r f B、PUFAシターゼキメラO r f C、アシルーC o Aシテターゼおよび4'ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼH e t Iタンパク質のアミノ酸配列を本質的にコードするが、キャノーラ遺伝子において見出される頻繁に使用されるコドンのバランスのとれたコドン分布を使用する双子葉植物における最適な発現のためにそれぞれ設計されたものであることが明らかになった。特に、新たなDNA配列は、タンパク質のアミノ酸配列内の各位置において適切なアミノ酸を特定するために、植物（第1に好ましい、第2に好ましい、第3に好ましい、または第4に好ましい）コドンの置換によって、PUFAシターゼO r f A、PUFAシターゼO r f B、PUFAシターゼキメラO r f C、アシルーC o Aシテターゼおよび4'ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼH e t Iをコードする元のDNA配列とは異なっていた。

【0191】

植物に最適化されたDNA配列の設計を、表1、列DおよびHから構築したキャノーラコドンバイアス表を使用して、PUFAシターゼO r f A（配列番号1）、PUFAシターゼO r f B（配列番号2）、PUFAシターゼキメラO r f C（配列番号3）、アシルーC o Aシテターゼ（配列番号4）および4'ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼH e t I（配列番号5）のタンパク質配列の逆翻訳によって開始した。アシルーC o Aシテターゼ（配列番号4）のタンパク質配列を、元の配列から変更した；このとき、2番目のアミノ酸アラニンをタンパク質から除去した。次いで、制限酵素認識部位を除去または付加するため、高度に安定な鎖内二次構造を除去するため、および植物中の操作された遺伝子のクローニング操作または発現にとって有害であり得る他の配列を除去するために、コドン変化（全体的な加重平均コドン表示を保持したまま）を補償することによって、最初の配列を改変した。次いで、このDNA配列を、改変によって創出された可能性がある制限酵素認識部位について再分析した。第1、第2、第3または第4選択の好ましいコドンによって適切なコドンを置き換えることによって、同定された部位をさらに改変した。目的の遺伝子の転写または翻訳に影響を与え得る配列中の他の部位には、エキ

ソン：イントロン接合部（5'または3'）、ポリA付加シグナルまたはRNAポリメラーゼ終結シグナルが含まれる。改変された配列をさらに分析し、さらに改変して、TAまたはCGダブルットの頻度を低減し、TGまたはCTダブルットの頻度を増加させた。これらのダブルットに加えて、[G+C]または[A+T]の約6より多く連続する残基を有する配列ブロックが、配列の転写または翻訳に影響を与え得る。従って、第1または第2選択などのコドン进行を他の好ましい選択されたコドンで置き換えることによって、これらの配列ブロックもまた改変した。コドン組成自体とは異なる設計基準（例えば、制限酵素認識部位の付加または欠失）を適応させることが必要な場合にのみ使用される、稀に使用されるコドンは、遺伝子設計においてかなりの程度まで含まれない。

【0192】

PuFAシンターゼOrfAによってコードされるタンパク質は、17から29アミノ酸までのサイズ範囲の反復する「プロリン-アラニン」ドメインを10個含む。プロリン-アラニン反復間には、87アミノ酸を含む9つのより長い反復配列ドメインが散在した。これらの反復のアミノ酸配列は、4つの位置でのみ変動し、バリエーション位置のそれぞれにおいて2つのコドン選択だけが存在した。Clustal Wコンピュータプログラムを使用して9つの反復のアミノ酸配列を分析したところ、100%の相同性値および95.4%の同一性値が得られた。DNAレベルで、9つの反復をコードする配列は、100%相同、89.7%同一であり、各反復をコードする261塩基中の27の位置でのみ変動する（27の変化のうち23が「サイレントな」差異であり、同じアミノ酸についての同義のコドンが相互交換される）。

【0193】

標準的な遺伝子設計プロセスは、このサイズの複数の反復のために新たなコドンバイアスのかかったDNA配列の開発を容易に適応させることはできないが、これは、高度に関連するDNA配列が生じるのを回避するために、コドン選択が他の8つの反復中の同じ位置で行われた、個々の反復中の全てのコドン選択のバランスを継続的にとる必要があるからである。87残基の反復のそれぞれについて、同じアミノ酸配列をコードする 4.5×10^{43} より多くの可能なDNA配列が存在した（配列中の各アミノ酸についての同義のコドンの数の積として計算される）。従って、同一にコードするDNA配列を生成するために利用可能な非常に大きい計算空間（computing space）が存在した。以下のプロトコルは、各個々の反復についての（in silico）複数配列設計を生成し、その後、全ての配列バージョンをバルクで比較して、反復をコードする高度に多様な配列を示すセットを同定するために使用される方法を記載している：

工程1：別個の配列として各反復されたアミノ酸ドメインをコードするネイティブDNA配列を抽出する。

工程2：遺伝子設計プログラム（例えば、OPTGENE（商標）、Ocimum Biosolutions、Hyderabad、India）中に、個々の反復されたDNA配列を別個の配列としてインポートする。工程3～5は、各配列に対して個別に実施される。

工程3：標準的な遺伝子コードを使用してDNA配列を翻訳する。

工程4：標準的な遺伝子コードおよび適切なコドンバイアス表を使用して、翻訳されたタンパク質の配列を逆翻訳する。この例において、530のセイヨウアブラナ（Brassica napus）タンパク質コード領域から集められたバイアスがかかったコドン表を使用し、各生成された配列は、「nap」（「napus」の代わり）+バージョン番号でコード名化した。従って、反復1についての、第1の逆翻訳されたコドンバイアスがかかった配列は、「rpt1_nap1」と命名した。この例示において、このプロセスを10回実施して、反復1のタンパク質配列をコードする10のDNA配列バージョンを生成した。

工程5：10の配列バージョンを、対応する数のテキストファイルにエクスポートする。

工程6：他の反復した配列ドメインのそれぞれについて工程3～5を反復する。この例示において、合計90の「nap」配列バージョンを生成した（各反復されたエレメント

10

20

30

40

50

について10)。

工程7：90の配列ファイルをClustal WプログラムMega 3.1 (Megasoftwareにおいてアクセスされる)中にインポートし、90全ての配列をインプットとして使用してマルチプル配列アラインメントを実施する。これらの配列はタンパク質コード領域のセグメントであるので、ギャップを許容せずにアラインメントを実施する。Clustal Wアラインメント後、近隣結合ツリーを組み上げて可視化し、タンパク質中の9つの反復したドメインのそれぞれについて10のコドン最適化された配列のうち1つを、視覚により選別する。各選択された配列バージョンを、最も深く枝分かれたツリーの区画から選択する。

工程8：各反復されたドメインについて選択された配列を、各特定の反復について適切な位置において、タンパク質全体をコードするコドン最適化されたDNA配列中に組み込む。

工程9：個別に設計された多様な反復エレメントを含む、コドン最適化された配列全体の最終的な分析を実施して、望ましくないモチーフ、制限酵素認識部位などの非存在を保証する。

【0194】

PUFAシンターゼOrfAコード配列のコドン最適化と共にこの方法を使用することは、反復される配列の不安定性を回避するために十分に多様化された反復されたプロリン-アラニン配列の選択を生じる。これらの配列を、近接結合ツリーの最も深い枝(即ち、この配列セット中の互いに最も遠く関連するもの)から選択した。Smith-Wassermanグローバルアラインメントを、全てのペアワイズの組合せについて実施したところ、76~77%の起こりうる中央値で、相同性の範囲は74~81%であった(表2)。

【0195】

【表3】

表2. PUFA OrfAの反復の選択されたコドン最適化された配列のSmith-Wasserman相同性

	rpt1 nap9	rpt2 nap10	rpt3 nap10	rpt4 nap1	rpt5 nap10	rpt6 nap6	rpt7 nap9	rpt8 nap4	rpt9 nap10
rpt1 nap9	100	77	74	77	74	77	81	76	76
rpt2 nap10		100	81	76	74	77	79	76	77
rpt3 nap10			100	79	80	74	74	76	78
rpt4 nap1				100	80	77	75	76	76
rpt5 nap10					100	78	77	77	77
rpt6 nap6						100	78	76	77
rpt7 nap9							100	75	74
rpt8 nap4								100	76
rpt9 nap10									100

【0196】

9つの反復されたドメインについての選択された9つの新たに設計されたコード領域のClustal Wアラインメント(Vector NTI、Invitrogen、Carlsbad、CA)が、図1に示される。全体として、これらの配列は、100%相同および89.7%同一な元の配列と比較して、93.1%相同、61.7%同一である。より大きい配列の分岐は、10より多い配列反復(iteration)を使用し、(視覚的に配列を選択する代わりに)コンピュータプログラムまたは数学的アルゴリズムを使用してこれらの配列から選択することによって、達成され得る。それにもかかわらず、例示された配列は高度に分岐しており、安定なポリヌクレオチドフラグメントを生成した。

【0197】

新たに設計されたキャノーラに最適化されたPUFAシンターゼOrfA、PUFAシンターゼOrfB、PUFAシンターゼキメラOrfC、アシル-CoAシンターゼおよび4'ホスホパンテテイルトランスフェラーゼHetIのDNA配列を、それぞれ、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9および配列番号10で列挙する。これ

らのコドン最適化された配列は、明細書全体にわたりバージョン3（v3）と特定されるが、コドン最適化されていない配列は、明細書全体にわたりバージョン2（v2）という。

【0198】

得られたDNA配列は、より高い程度のコドン多様性、望ましい塩基組成を有し、戦略的に配置された制限酵素認識部位を含み、遺伝子の転写または産物mRNAの翻訳を妨害し得る配列を欠く。表3、表4、表5、表6および表7は、表1、列DおよびHから計算されるように、元の遺伝子、植物に最適化されたバージョンおよび植物に最適化された配列についての推奨されるコドン組成において見出されるPUFAシンターゼO r f A、PUFAシンターゼO r f B、PUFAシンターゼキメラO r f C、アシルーC o Aシンターゼおよび4'ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼH e t Iタンパク質のコード領域のコドン組成の比較を示す。

【0199】

【表 4】

表3. PUFA OrfAのコドン組成

アミノ酸	コドン	元の遺伝子数	元の遺伝子%	植物に最適化された遺伝子数	植物に最適化された遺伝子%	植物に最適化(推奨)	アミノ酸	コドン	元の遺伝子数	元の遺伝子%	植物に最適化された遺伝子数	植物に最適化された遺伝子%	植物に最適化(推奨)
ALA (A)	GCA	7	1.5	109	23.3	23.3	LEU (L)	CTA	0	0.0	0	0.0	0.0
	GCC	302	64.5	99	21.2	21.2		CTC	173	77.9	63	28.4	28.5
	GCG	49	10.5	67	14.3	14.2		CTG	15	6.8	32	14.4	14.6
	GCT	110	23.5	193	41.2	41.3		CTT	33	14.9	71	32.0	31.6
ARG (R)	AGA	0	0.0	57	43.5	43.8		TTA	0	0.0	0	0.0	0.0
	AGG	0	0.0	40	30.5	30.5		TTG	1	0.5	56	25.2	25.3
	CGA	0	0.0	0	0.0	0.0	LYS (K)	AAA	2	1.2	73	44.5	44.6
	CGC	112	85.5	0	0.0	0.0		AAG	162	98.8	91	55.5	55.4
	CGG	1	0.8	0	0.0	0.0	MET (M)	ATG	88	100	88	100	100.0
	CGT	18	13.7	34	26.0	25.7	PHE (F)	TTC	50	69.4	42	58.3	58.6
ASN (N)	AAC	73	97.3	47	62.7	62.6		TTT	22	30.6	30	41.7	41.4
	AAT	2	2.7	28	37.3	37.4	PRO (P)	CCA	2	1.3	45	30.0	29.6
ASP (D)	GAC	126	76.8	70	42.7	42.5		CCC	56	37.3	22	14.7	14.6
	GAT	38	23.2	94	57.3	57.5		CCG	46	30.7	27	18.0	18.4
CYS (C)	TGC	34	94.4	18	50.0	49.2		CCT	46	30.7	56	37.3	37.3
	TGT	2	5.6	18	50.0	50.8	SER (S)	AGC	40	21.3	34	18.1	17.9
終了	TAA	1	100.0	0	0.0	0.0		AGT	1	0.5	30	16.0	15.8
	TAG	0	0.0	0	0.0	0.0		TCA	0	0.0	38	20.2	20.4
	TGA	0	0.0	1	100.0	100.0		TCC	70	37.2	35	18.6	18.7
GLN (Q)	CAA	4	4.4	46	50.5	50.0		TCG	59	31.4	0	0.0	0.0
	CAG	87	95.6	45	49.5	50.0		TCT	18	9.6	51	27.1	27.2
GLU (E) 16	GAA	9	3.8	103	43.6	43.6	THR (T)	ACA	2	1.3	41	26.3	26.3
	GAG	227	96.2	133	56.4	56.4		ACC	81	51.9	42	26.9	26.9
GLY (G)	GGA	6	3.1	71	36.2	36.4		ACG	26	16.7	26	16.7	16.9
	GGC	156	79.6	32	16.3	16.2		ACT	47	30.1	47	30.1	30.0
	GGG	0	0.0	30	15.3	15.2	TRP (W)	TGG	13	100	13	100	100.0
	GGT	34	17.3	63	32.1	32.1		TYR (Y)	TAC	42	97.7	26	60.5
HIS (H)	CAC	25	83.3	15	50.0	49.6	TAT		1	2.3	17	39.5	40.6
	CAT	5	16.7	15	50.0	50.4	VAL (V)	GTA	0	0.0	0	0.0	0.0
ILE (I)	ATA	0	0.0	29	21.0	21.1		GTC	176	70.7	67	26.9	27.0
	ATC	99	71.7	59	42.8	42.7		GTG	39	15.7	79	31.7	31.7
	ATT	39	28.3	50	36.2	36.2		GTT	34	13.7	103	41.4	41.3
合計		1566		1566			合計		1345		1345		

【0200】

10

20

30

40

【表 5】

表4. PUFA OrfBのコドン組成

アミノ酸	コドン	元の遺伝子数	元の遺伝子%	植物に最適化された遺伝子数	植物に最適化された遺伝子%	植物に最適化(推奨)	アミノ酸	コドン	元の遺伝子数	元の遺伝子%	植物に最適化された遺伝子数	植物に最適化された遺伝子%	植物に最適化(推奨)
ALA (A)	GCA	13	5.7	53	23.2	23.3	LEU (L)	CTA	0	0.0	0	0.0	0.0
	GCC	135	59.2	48	21.1	21.2		CTC	116	63.0	51	27.7	28.5
	GCG	43	18.9	34	14.9	14.2		CTG	21	11.4	27	14.7	14.6
	GCT	37	16.2	93	40.8	41.3		CTT	44	23.9	59	32.1	31.6
ARG (R)	AGA	0	0.0	54	45.0	43.8		TTA	0	0.0	0	0.0	0.0
	AGG	0	0.0	36	30.0	30.5		TTG	3	1.6	47	25.5	25.3
	CGA	1	0.8	0	0.0	0.0	LYS (K)	AAA	10	8.8	52	45.6	44.6
	CGC	95	79.2	0	0.0	0.0		AAG	104	91.2	62	54.4	55.4
	CGG	1	0.8	0	0.0	0.0	MET (M)	ATG	45	100	45	100	100.0
	CGT	23	19.2	30	25.0	25.7		TTC	33	47.8	41	59.4	58.6
ASN (N)	AAC	75	89.3	51	60.7	62.6	PHE (F)	TTT	36	52.2	28	40.6	41.4
	AAT	9	10.7	33	39.3	37.4		CCA	8	7.2	33	29.7	29.6
ASP (D)	GAC	86	72.3	52	43.7	42.5	PRO (P)	CCC	47	42.3	16	14.4	14.6
	GAT	33	27.7	67	56.3	57.5		CCG	35	31.5	20	18.0	18.4
CYS (C)	TGC	41	100.0	20	48.8	49.2		CCT	21	18.9	42	37.8	37.3
	TGT	0	0.0	21	51.2	50.8		AGC	40	26.5	28	18.5	17.9
終了	TAA	1	100.0	0	0.0	0.0	SER (S)	AGT	7	4.6	24	15.9	15.8
	TAG	0	0.0	0	0.0	0.0		TCA	2	1.3	31	20.5	20.4
	TGA	0	0.0	1	100.0	100.0		TCC	55	36.4	28	18.5	18.7
GLN (Q)	CAA	8	13.6	30	50.8	50.0		TCG	33	21.9	0	0.0	0.0
	CAG	51	86.4	29	49.2	50.0		TCT	14	9.3	40	26.5	27.2
GLU (E) 16	GAA	33	24.8	58	43.6	43.6	THR (T)	ACA	8	8.1	28	28.3	26.3
	GAG	100	75.2	75	56.4	56.4		ACC	58	58.6	24	24.2	26.9
GLY (G)	GGA	11	7.2	55	36.2	36.4		ACG	26	26.3	16	16.2	16.9
	GGC	102	67.1	25	16.4	16.2		ACT	7	7.1	31	31.3	30.0
	GGG	3	2.0	23	15.1	15.2	TRP (W)	TGG	22	100	22	100	100.0
	GGT	36	23.7	49	32.2	32.1		TAC	51	91.1	32	57.1	59.4
HIS (H)	CAC	29	76.3	19	50.0	49.6	TYR (Y)	TAT	5	8.9	24	42.9	40.6
	CAT	9	23.7	19	50.0	50.4		GTA	1	0.8	0	0.0	0.0
ILE (I)	ATA	0	0.0	22	21.2	21.1	VAL (V)	GTC	85	65.4	34	26.2	27.0
	ATC	67	64.4	44	42.3	42.7		GTG	30	23.1	42	32.3	31.7
	ATT	37	35.6	38	36.5	36.2		GTT	14	10.8	54	41.5	41.3
合計		1079		1079			合計		981		981		

【 0 2 0 1 】

【表 6】

表5. PUFAキメラOrfCのコドン組成

アミノ酸	コドン	元の遺伝子数	元の遺伝子%	植物に最適化された遺伝子数	植物に最適化された遺伝子%	植物に最適化(推奨)	アミノ酸	コドン	元の遺伝子数	元の遺伝子%	植物に最適化された遺伝子数	植物に最適化された遺伝子%	植物に最適化(推奨)
ALA (A)	GCA	18	14.0	30	23.3	23.3	LEU (L)	CTA	2	1.6	0	0.0	0.0
	GCC	84	65.1	28	21.7	21.2		CTC	78	63.9	34	27.9	28.5
	GCG	14	10.9	19	14.7	14.2		CTG	18	14.8	18	14.8	14.6
	GCT	13	10.1	52	40.3	41.3		CTT	16	13.1	39	32.0	31.6
ARG (R)	AGA	1	1.3	33	44.0	43.8		TTA	1	0.8	0	0.0	0.0
	AGG	1	1.3	23	30.7	30.5		TTG	7	5.7	31	25.4	25.3
	CGA	6	8.0	0	0.0	0.0	LYS (K)	AAA	15	16.1	42	45.2	44.6
	CGC	53	70.7	0	0.0	0.0		AAG	78	83.9	51	54.8	55.4
	CGG	3	4.0	0	0.0	0.0	MET (M)	ATG	48	100	48	100	100.0
	CGT	11	14.7	19	25.3	25.7		TTC	40	58.8	40	58.8	58.6
ASN (N)	AAC	63	90.0	43	61.4	62.6	PHE (F)	TTT	28	41.2	28	41.2	41.4
	AAT	7	10.0	27	38.6	37.4		CCA	10	11.2	27	30.3	29.6
ASP (D)	GAC	70	76.9	40	44.0	42.5	PRO (P)	CCC	35	39.3	13	14.6	14.6
	GAT	21	23.1	51	56.0	57.5		CCG	26	29.2	16	18.0	18.4
CYS (C)	TGC	26	81.3	16	50.0	49.2		CCT	18	20.2	33	37.1	37.3
	TGT	6	18.8	16	50.0	50.8		AGC	16	19.0	13	15.5	17.9
終了	TAA	1	100.0	0	0.0	0.0	SER (S)	AGT	3	3.6	14	16.7	15.8
	TAG	0	0.0	0	0.0	0.0		TCA	9	10.7	18	21.4	20.4
	TGA	0	0.0	1	100.0	100.0		TCC	28	33.3	16	19.0	18.7
								TCG	21	25.0	0	0.0	0.0
GLN (Q)	CAA	11	24.4	25	55.6	50.0		TCT	7	8.3	23	27.4	27.2
	CAG	34	75.6	20	44.4	50.0	THR (T)	ACA	4	6.2	17	26.2	26.3
GLU (E) 16	GAA	17	19.1	40	44.9	43.6		ACC	41	63.1	17	26.2	26.9
	GAG	72	80.9	49	55.1	56.4		ACG	8	12.3	11	16.9	16.9
GLY (G)	GGA	21	17.9	43	36.8	36.4		ACT	12	18.5	20	30.8	30.0
	GGC	78	66.7	18	15.4	16.2	TRP (W)	TGG	18	100	18	100	100.0
	GGG	7	6.0	18	15.4	15.2		TAC	41	87.2	28	59.6	59.4
	GGT	11	9.4	38	32.5	32.1	TYR (Y)	TAT	6	12.8	19	40.4	40.6
HIS (H)	CAC	24	85.7	14	50.0	49.6		GTA	6	5.3	0	0.0	0.0
	CAT	4	14.3	14	50.0	50.4	VAL (V)	GTC	62	54.4	31	27.2	27.0
ILE (I)	ATA	0	0.0	15	21.7	21.1		GTG	24	21.1	37	32.5	31.7
	ATC	48	69.6	30	43.5	42.7		GTT	22	19.3	46	40.4	41.3
	ATT	21	30.4	24	34.8	36.2							
合計		746		746			合計		748		748		

【 0 2 0 2 】

【表 7】

表6. アシル-CoAシンテターゼのコドン組成

アミノ酸	コドン	元の遺伝子数	元の遺伝子%	植物に最適化された遺伝子数	植物に最適化された遺伝子%	植物に最適化(推奨)	アミノ酸	コドン	元の遺伝子数	元の遺伝子%	植物に最適化された遺伝子数	植物に最適化された遺伝子%	植物に最適化(推奨)	
ALA (A)	GCA	2	2.3	21	24.7	23.3	LEU (L)	CTA	0	0.0	0	0.0	0.0	
	GCC	59	68.6	18	21.2	21.2		CTC	35	63.6	15	27.3	28.5	
	GCG	11	12.8	12	14.1	14.2		CTG	6	10.9	9	16.4	14.6	
	GCT	14	16.3	34	40.0	41.3		CTT	13	23.6	17	30.9	31.6	
ARG (R)	AGA	0	0.0	14	43.8	43.8		TTA	0	0.0	0	0.0	0.0	
	AGG	3	9.4	10	31.3	30.5		TTG	1	1.8	14	25.5	25.3	
	CGA	0	0.0	0	0.0	0.0	LYS (K)	AAA	2	4.1	22	44.9	44.6	
	CGC	25	78.1	0	0.0	0.0		AAG	47	95.9	27	55.1	55.4	
	CGG	0	0.0	0	0.0	0.0	MET (M)	ATG	21	100	21	100	100.0	
	CGT	4	12.5	8	25.0	25.7		PHE (F)	TTC	16	51.6	18	58.1	58.6
ASN (N)	AAC	22	95.7	14	60.9	62.6		TTT	15	48.4	13	41.9	41.4	
	AAT	1	4.3	9	39.1	37.4		PRO (P)	CCA	0	0.0	11	30.6	29.6
ASP (D)	GAC	38	74.5	22	43.1	42.5	CCC		20	55.6	5	13.9	14.6	
	GAT	13	25.5	29	56.9	57.5	CCG		9	25.0	7	19.4	18.4	
CYS (C)	TGC	11	91.7	6	50.0	49.2	SER (S)		CCT	7	19.4	13	36.1	37.3
	TGT	1	8.3	6	50.0	50.8		AGC	7	17.5	7	17.5	17.9	
終了	TAA	1	100.0	0	0.0	0.0		AGT	4	10.0	6	15.0	15.8	
	TAG	0	0.0	0	0.0	0.0		TCA	1	2.5	8	20.0	20.4	
	TGA	0	0.0	1	100.0	100.0		TCC	19	47.5	8	20.0	18.7	
								TCG	7	17.5	0	0.0	0.0	
GLN (Q)	CAA	3	18.8	8	50.0	50.0		THR (T)	TCT	2	5.0	11	27.5	27.2
	CAG	13	81.3	8	50.0	50.0	ACA		1	2.0	13	25.5	26.3	
GLU (E) 16	GAA	11	17.7	27	43.5	43.6	ACC		27	52.9	14	27.5	26.9	
	GAG	51	82.3	35	56.5	56.4	ACG		19	37.3	9	17.6	16.9	
GLY (G)	GGA	5	7.4	25	36.8	36.4		ACT	4	7.8	15	29.4	30.0	
	GGC	49	72.1	11	16.2	16.2		TRP (W)	TGG	10	100	10	100	100.0
	GGG	0	0.0	10	14.7	15.2			TYR (Y)	TAC	18	85.7	12	57.1
	GGT	14	20.6	22	32.4	32.1		TAT		3	14.3	9	42.9	40.6
HIS (H)	CAC	10	83.3	6	50.0	49.6	VAL (V)	GTA	0	0.0	0	0.0	0.0	
	CAT	2	16.7	6	50.0	50.4		GTC	34	58.6	16	27.6	27.0	
ILE (I)	ATA	0	0.0	10	21.3	21.1		GTG	9	15.5	19	32.8	31.7	
	ATC	27	57.4	20	42.6	42.7		GTT	15	25.9	23	39.7	41.3	
	ATT	20	42.6	17	36.2	36.2			GTT	15	25.9	23	39.7	41.3
	ATT	20	42.6	17	36.2	36.2								
合計		410		409			合計		372		372			

【 0 2 0 3 】

【表 8】

表7. ホスホパンテティニルトランスフェラーゼHetIのコード組成

アミノ酸	コドン	元の遺伝子数	元の遺伝子%	植物に最適化された遺伝子数	植物に最適化された遺伝子%	植物に最適化(推奨)	アミノ酸	コドン	元の遺伝子数	元の遺伝子%	植物に最適化された遺伝子数	植物に最適化された遺伝子%	植物に最適化(推奨)
ALA (A)	GCA	4	20.0	5	25.0	23.3	LEU (L)	CTA	6	17.1	0	0.0	0.0
	GCC	6	30.0	4	20.0	21.2		CTC	4	11.4	10	28.6	28.5
	GCG	2	10.0	3	15.0	14.2		CTG	0	0.0	5	14.3	14.6
	GCT	8	40.0	8	40.0	41.3		CTT	3	8.6	11	31.4	31.6
ARG (R)	AGA	1	6.3	6	37.5	43.8		TTA	14	40.0	0	0.0	0.0
	AGG	1	6.3	5	31.3	30.5		TTG	8	22.9	9	25.7	25.3
	CGA	2	12.5	0	0.0	0.0	LYS (K)	AAA	10	90.9	5	45.5	44.6
	CGC	6	37.5	0	0.0	0.0		AAG	1	9.1	6	54.5	55.4
	CGG	1	6.3	0	0.0	0.0	MET (M)	ATG	1	100	1	100	100.0
	CGT	5	31.3	5	31.3	25.7		PHE (F)	TTC	3	25.0	6	50.0
ASN (N)	AAC	3	50.0	4	66.7	62.6		TTT	9	75.0	6	50.0	41.4
	AAT	3	50.0	2	33.3	37.4		PRO (P)	CCA	9	56.3	5	31.3
ASP (D)	GAC	3	25.0	5	41.7	42.5	CCC		6	37.5	2	12.5	14.6
	GAT	9	75.0	7	58.3	57.5	CCG		1	6.3	3	18.8	18.4
CYS (C)	TGC	0	0.0	1	33.3	49.2	CCT		0	0.0	6	37.5	37.3
	TGT	3	100.0	2	66.7	50.8	SER (S)	AGC	0	0.0	2	15.4	17.9
終了	TAA	0	0.0	0	0.0	0.0		AGT	4	30.8	2	15.4	15.8
	TAG	0	0.0	0	0.0	0.0		TCA	3	23.1	3	23.1	20.4
	TGA	1	100.0	1	100.0	100.0		TCC	3	23.1	2	15.4	18.7
								TCG	1	7.7	0	0.0	0.0
GLN (Q)	CAA	5	45.5	5	45.5	50.0		TCT	2	15.4	4	30.8	27.2
	CAG	6	54.5	6	54.5	50.0	THR (T)	ACA	3	27.3	3	27.3	26.3
GLU (E) 16	GAA	13	72.2	8	44.4	43.6		ACC	2	18.2	3	27.3	26.9
	GAG	5	27.8	10	55.6	56.4		ACG	2	18.2	2	18.2	16.9
GLY (G)	GGA	0	0.0	5	35.7	36.4		ACT	4	36.4	3	27.3	30.0
	GGC	5	35.7	2	14.3	16.2	TRP (W)	TGG	6	100	6	100	100.0
	GGG	2	14.3	2	14.3	15.2							
		GGT	7	50.0	5	35.7	32.1	TYR (Y)	TAC	2	22.2	5	55.6
HIS (H)	CAC	1	20.0	3	60.0	49.6	TAT		7	77.8	4	44.4	40.6
	CAT	4	80.0	2	40.0	50.4	VAL (V)	GTA	0	0.0	0	0.0	0.0
ILE (I)	ATA	2	20.0	3	30.0	21.1		GTC	1	12.5	2	25.0	27.0
	ATC	4	40.0	4	40.0	42.7		GTG	3	37.5	3	37.5	31.7
	ATT	4	40.0	3	30.0	36.2		GTT	4	50.0	3	37.5	41.3
合計		116		116			合計		122		122		

【0204】

コード領域配列のコドン最適化が完了した後、この最適化されたコード領域配列にさらなるヌクレオチド配列を付加した。クローニングを容易にするための制限部位、Kozak配列およびさらなる終止コドンを、植物に最適化されたコード配列に付加した。さらに、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) リブローズニリン酸カルボキシラーゼ小鎖1A (GenBank ID: NM_202369.2) 由来の葉緑体標的化配列を含む、第2シリーズのPUFAシンターゼOrfA、PUFAシンターゼOrfB、PUFAシンターゼキメラOrfC、アシル-CoAシンターゼおよびホスホパンテティニルトランスフェラーゼHetIコード配列を設計した。この配列、配列番号28を、PUFAシンターゼOrfA、PUFAシンターゼOrfB、PUFAシンターゼキメラOrfCおよびホスホパンテティニルトランスフェラーゼHetIの上記コード配列に付加した。配列番号6、配列番号7、配列番号8および配列番号10から最初のメチオニンを除去し、葉緑体標的化配列で置き換えた。葉緑体標的化配列を含む配列は、明細書全体にわたりバージョン4 (v4) と特定される。

【0205】

第2の葉緑体トランジットペプチドを、PUFAシンターゼOrfA、PUFAシンターゼOrfB、PUFAシンターゼキメラOrfC、アシル-CoAシンターゼおよびホスホパンテテインルトランスフェラーゼHetIのコード配列に付加した。これらのコード配列は、アシル-ACP-チオエステラーゼ (GenBank ID: X73849.1) 由来の葉緑体標的化配列を含むように設計した。この配列、配列番号29を、PUFAシンターゼOrfA、PUFAシンターゼOrfB、PUFAシンターゼキメラOrfCおよびホスホパンテテインルトランスフェラーゼHetIの上記コード配列に付加した。配列番号6、配列番号7、配列番号8および配列番号10から最初のメチオニンを除去し、葉緑体標的化配列で置き換えた。葉緑体標的化配列を含む配列は、明細書全体にわたりバージョン5 (v5) と特定される。

10

【0206】

シゾキトリウム属の種 (Schizochytrium sp.) 由来のアシル-CoAシンターゼ遺伝子の代替的バージョンを、ネイティブ遺伝子配列を改変して余分なオープンリーディングフレームを除去することによって創出した。このバージョンを「SZACS-2 v4」と標識し、配列番号30として列挙する。得られた遺伝子は「SZACS-2 v3」として上記されるアシル-CoAシンターゼ発現遺伝子配列を置き換えるために使用される。

【0207】

植物に最適化されたDNA配列が書類上またはin silicoで一旦設計されると、実際のDNA分子を、設計された配列に対して配列が正確に対応するように、実験室において合成することができる。かかる合成DNA分子は、クローニングでき、天然またはネイティブの供給源から誘導されたかのように他の方法で正確に操作できる。上記さらなる配列を含む配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9および配列番号10を含むDNAフラグメントの合成は、供給業者 (Geneart Ag, Regensburg, Germany) が実施した。次いで、合成DNAを発現ベクター中にクローニングし、実施例2および3に記載したように、アグロバクテリウム (Agrobacterium) およびダイズ中に形質転換した。

20

【実施例2】

【0208】

30

pDAB7362のプラスミド構築

pDAB7362バイナリープラスミド (図2; 配列番号11) を、マルチサイトGateway L-R組換え反応を使用して構築した。pDAB7362は、3つのPUFAシンターゼPTU (上記PUFAシンターゼOrfA、PUFAシンターゼOrfB、PUFAシンターゼキメラOrfC遺伝子を発現する)、1つのアシル-CoAシンターゼPTU、1つのホスホパンテテインルトランスフェラーゼHetI PTUおよびホスフィントリシンアセチルトランスフェラーゼPTUを含む。具体的には、第1のPUFAシンターゼPTUは、短縮型インゲンマメ (Phaseolus vulgaris) フィトヘマグルチニン-L遺伝子プロモーター (PvDlec2プロモーターv2; GenBank受託番号X06336)、シロイヌナズナ (Arabidopsis thaliana) AT2S3遺伝子5' 非翻訳領域 (2S 5' UTR; GenBank受託番号NM_118850)、シゾキトリウム属の種 (Schizochytrium sp.) 多価不飽和脂肪酸シンターゼオープンリーディングフレームA (SZPUFA OrfA v3) およびシロイヌナズナ (Arabidopsis thaliana) 2Sアルブミン遺伝子3' 非翻訳領域ターミネーター (At2S SSPターミネーターv1; GenBank受託番号M22035) を含む。第2のPUFAシンターゼPTUは、PvDlec2プロモーターv2、2S 5' UTR、シゾキトリウム属の種 (Schizochytrium sp.) 多価不飽和脂肪酸シンターゼオープンリーディングフレームB (SZPUFA OrfB v3) およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。第3のPUFAシンターゼPTUは、PvDlec2プロモーターv2、2S 5' UTR、シゾキトリウム (Schizochytrium) およびスラウストキトリウム種 (Thraustochytrium sp.)

40

50

）の多価不飽和脂肪酸シンターゼオーブンリーディングフレームC (h S z T h P U F A O r f C v 3)、ならびにA t 2 S S S Pターミネーターv 1を含む。アシルーC o AシンテターゼP T Uは、P v D l e c 2プロモーターv 2、2 S 5' U T R、シゾキトリウム属の種 (Schizochytrium sp.) アシルーC o Aシンテターゼ (S z A C S - 2 v 3) およびA t 2 S S S Pターミネーターv 1を含む。ホスホパンテテイルトランスフェラーゼP T Uは、P v D l e c 2プロモーターv 2、2 S 5' U T R、ノストック属の種 (Nostoc sp.) 4' ホスホパンテテイルトランスフェラーゼH e t I (N o H e t I v 3) およびA t 2 S S S Pターミネーターv 1を含む。

【0209】

プラスミドp D A B 7 3 3 4、p D A B 7 3 3 5、p D A B 7 3 3 6、p D A B 7 3 3 9 およびp D A B 7 3 3 3を組換えて、p D A B 7 3 6 2を形成した。具体的には、上記5つのP T Uを、植物形質転換バイナリーp D A B 7 3 3 3のT鎖DNAボーダー領域内にヘッドトゥーテールの方向で配置した。遺伝子の順序は：S z P U F A O r f A v 3、S z P U F A O r f B v 3、h S z T h P U F A O r f C v 3、S z A C S - 2 v 3、N o H e t I v 3である。p D A B 7 3 3 3は、O v e r d r i v e (T o r oら、PNAS 85(22): 8558-8562; 1988) およびT鎖ボーダー配列 (T-DNA B o r d e r A およびT-DNA B o r d e r B; Gardnerら、Science 231:725-727; 1986 および国際公開公報W O 2 0 0 1 / 0 2 5 4 5 9 A 1) などの他の調節エレメントに加えて、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼP T U：キャッサバ葉脈モザイクウイルス (Cassava vein Mosaic Virus) プロモーター (C s V M Vプロモーターv 2; Verdaguerら、Plant Molecular Biology 31:1129- 1139; 1996)、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ (P A T v 5; Wohllebenら、Gene 70:25- 37; 1988) およびアグロバクテリウム・ツメファシエンス (Agrobacterium tumefaciens) O R F 1 3' 非翻訳領域 (A t u O R F 1 3' U T R v 4; Huangら、J. Bacteriol. 172:1814-1822; 1990) もまた含む。次いで、5つのP T Uを含む組換えプラスミドを単離し、制限酵素消化およびDNA配列決定を用いて5つのP T Uの組込みについて試験した。

【0210】

実施例2. 1：発現を駆動するためのP v D l e c 2プロモーターを使用するさらなるプラスミドの構築

P U F AシンターゼO r f A、P U F AシンターゼO r f B、P U F AシンターゼキメラO r f C、アシルーC o Aシンテターゼおよび4' ホスホパンテテイルトランスフェラーゼH e t I 導入遺伝子の発現を駆動するためにP v D l e c 2プロモーターを使用するさらなる構築物を設計し、構築した。これらの構築物に対する種々の変更が、発現レベルを増加するために行われている。これらの変化には、コドン最適化されていない遺伝子配列の使用、葉緑体トランジットペプチドの組込み、およびアシルーC o AシンテターゼP T Uの除去が含まれる。

【0211】

新たに構築されたプラスミドを使用して、ダイズ植物を安定に形質転換する。トランスジェニックダイズ植物を単離し、分子的に特徴付ける。これらの代替的構築物の使用は、より多い量のD H AおよびL C - P U F Aを含むダイズ植物を生じる。得られたL C - P U F A蓄積を決定し、0. 01%~15%のD H Aまたは0. 01%~15%のL C - P U F Aを生成するダイズ植物を同定する。

【0212】

実施例2. 2：p D A B 7 3 6 1の構築

p D A B 7 3 6 1は、ネイティブのコドン最適化されていないバージョンのS z P U F A O r f A v 2を含むように構築されたバイナリープラスミドであり、残りの遺伝子配列はコドン最適化されている (S z P U F A O r f B v 3、h S z T h P U F A O r f C v 3、S z A C S - 2 v 3およびN o H e t I v 3)。p D A B 7 3 6 1プラスミド (図3; 配列番号31) は、マルチサイトG a t e w a y L - R組換え反応を使用して構築した。p D A B 7 3 6 1は、3つのP U F AシンターゼP T U、1つのア

シルーC o AシンテターゼPTU、1つのホスホパンテテイニルトランスフェラーゼPTUおよびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTUを含む。具体的には、第1のPUFAシンターゼPTUは、PvD1ec2プロモーターv2、2S 5'UTR、SzPUFA OrfA v2およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。第2のPUFAシンターゼPTUは、PvD1ec2プロモーターv2、2S 5'UTR、SzPUFA OrfB v3およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。第3のPUFAシンターゼPTUは、PvD1ec2プロモーターv2、2S 5'UTR、hSzThPUFA OrfC v3およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。アシルーC o AシンテターゼPTUは、PvD1ec2プロモーターv2、2S 5'UTR、SzACS-2 v3遺伝子およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼPTUは、PvD1ec2プロモーターv2、2S 5'UTR、NoHetI v3およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。

10

【0213】

プラスミドpDAB7355、pDAB7335、pDAB7336、pDAB7339およびpDAB7333を組換えて、pDAB7361を形成した。具体的には、上記5つのPTUを、植物形質転換バイナリーpDAB7333のT鎖DNAボーダー領域内にヘッドトゥテールの方向で配置した。遺伝子の順序は：SzPUFA OrfA v2、SzPUFA OrfB v3、hSzThPUFA OrfC v3、SzACS-2 v3 NoHetI v3である。pDAB7333は、OverdriveおよびT鎖ボーダー配列（T-DNA Border AおよびT-DNA Border B）などの他の調節エレメントに加えて、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTU：CsVMVプロモーターv2、PAT v5、AtuORF1 3'UTR v4もまた含む。次いで、6つのPTUを含む組換えプラスミドを単離し、制限酵素消化およびDNA配列決定を用いて6つのPTUの組み込みについて試験した。

20

【0214】

実施例2. 3：DAB7363の構築

pDAB7363は、コード配列のアミノ末端に融合されたリブローズニリン酸カルボキシラーゼ小鎖1A（SSU-TP v1と標識される）をその全てが含む、コドン最適化された再構築バージョンのSzPUFA OrfA v4、SzPUFA OrfB v4、hSzThPUFA OrfC v4およびNoHetI v4を含むように構築されたバイナリープラスミドである。さらに、このプラスミドは、コドン最適化された再構築バージョンのSzACS-2 v3を含む。pDAB7363プラスミド（図4；配列番号32）は、マルチサイトGateway L-R組換え反応を使用して構築した。pDAB7363は、3つのPUFAシンターゼPTU、1つのアシルーC o AシンテターゼPTU、1つのホスホパンテテイニルトランスフェラーゼPTUおよびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTUを含む。具体的には、第1のPUFAシンターゼPTUは、PvD1ec2プロモーターv2、2S 5'UTR、SzPUFA OrfA v4およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。第2のPUFAシンターゼPTUは、PvD1ec2プロモーターv2、2S 5'UTR、SzPUFA OrfB v4およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。第3のPUFAシンターゼPTUは、PvD1ec2プロモーターv2、2S 5'UTR、hSzThPUFA OrfC v4およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。アシルーC o AシンテターゼPTUは、PvD1ec2プロモーターv2、2S 5'UTR、SzACS-2 v3遺伝子およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼPTUは、PvD1ec2プロモーターv2、2S 5'UTR、NoHetI v4およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。

30

40

【0215】

プラスミドpDAB7340、pDAB7341、pDAB7342、pDAB7344およびpDAB7333を組換えて、pDAB7363を形成した。具体的には、上記

50

5つのPTUを、植物形質転換バイナリーpDAB7333のT鎖DNAボーダー領域内にヘッドトゥテールの方向で配置した。遺伝子の順序は：SzPUFA OrfA v4、SzPUFA OrfB v4、hSzThPUFA OrfC v4、SzACS-2 v3、NoHetI v4である。pDAB7333は、OverdriveおよびT鎖ボーダー配列（T-DNA Border AおよびT-DNA Border B）などの他の調節エレメントに加えて、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTU：CsVMVプロモーターv2、PAT v5、AtuORF1 3'UTR v4もまた含む。次いで、6つのPTUを含む組換えプラスミドを単離し、制限酵素消化およびDNA配列決定を用いて6つのPTUの組み込みについて試験した。

【0216】

10

実施例2.4：pDAB7365の構築

pDAB7365は、ネイティブのコドン最適化されていないバージョンのSzPUFA OrfA v2、SzPUFA OrfB v2、hSzThPUFA OrfC v2、SzACS-2 v2およびNoHetI v2を含むように構築されたバイナリープラスミドである。pDAB7365プラスミド（図5；配列番号33）は、マルチサイトGateway L-R組換え反応を使用して構築した。pDAB7365は、3つのPUFAシンターゼPTU、1つのアシル-CoAシンターゼPTU、1つのホスホパンテティニルトランスフェラーゼPTUおよびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTUを含む。具体的には、第1のPUFAシンターゼPTUは、PvDlec2プロモーターv2、2S 5'UTR、SzPUFA OrfA v2およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。第2のPUFAシンターゼPTUは、PvDlec2プロモーターv2、2S 5'UTR、SzPUFA OrfB v2およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。第3のPUFAシンターゼPTUは、PvDlec2プロモーターv2、2S 5'UTR、SzPUFA OrfC v2およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。アシル-CoAシンターゼPTUは、PvDlec2プロモーターv2、2S 5'UTR、SzACS-2 v2遺伝子およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。ホスホパンテティニルトランスフェラーゼPTUは、PvDlec2プロモーターv2、2S 5'UTR、NoHetI v2およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。

20

【0217】

30

プラスミドpDAB7355、pDAB7356、pDAB7357、pDAB7360およびpDAB7333を組換え、pDAB7365を形成した。具体的には、上記5つのPTUを、植物形質転換バイナリーpDAB7333のT鎖DNAボーダー領域内にヘッドトゥテールの方向で配置した。遺伝子の順序は：SzPUFA OrfA v2、SzPUFA OrfB v2、SzPUFA OrfC v2、SzACS-2 v2、NoHetI v2である。pDAB7333は、OverdriveおよびT鎖ボーダー配列（T-DNA Border AおよびT-DNA Border B）などの他の調節エレメントに加えて、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTU：CsVMVプロモーターv2、PAT v5、AtuORF1 3'UTR v4もまた含む。次いで、5つのPTUを含む組換えプラスミドを単離し、制限酵素消化およびDNA配列決定を用いて6つのPTUの組み込みについて試験した。

40

【0218】

実施例2.5：pDAB7368の構築

pDAB7368は、ネイティブのコドン最適化されていないバージョンのSzPUFA OrfA v2、SzPUFA OrfB v2、hSzThPUFA OrfC v2およびNoHetI v2を含むように構築されたバイナリープラスミドである。この構築物はSzACS-2コード配列を含まない。pDAB7368プラスミド（図6；配列番号34）は、マルチサイトGateway L-R組換え反応を使用して構築した。pDAB7368は、3つのPUFAシンターゼPTU、1つのアシル-CoAシンターゼPTU、1つのホスホパンテティニルトランスフェラーゼPTUおよびホスフィノ

50

トリシンアセチルトランスフェラーゼPTUを含む。具体的には、第1のPUFAシンターゼPTUは、PvD1ec2プロモーターv2、2S 5'UTR、SzPUFA OrfA v2およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。第2のPUFAシンターゼPTUは、PvD1ec2プロモーターv2、2S 5'UTR、SzPUFA OrfB v2およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。第3のPUFAシンターゼPTUは、PvD1ec2プロモーターv2、2S 5'UTR、SzPUFA OrfC v2およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。ホスホパンテテインルトランスフェラーゼPTUは、PvD1ec2プロモーターv2、2S 5'UTR、NoHetI v2およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。

【0219】

10

プラスミドpDAB7355、pDAB7356、pDAB7357、pDAB7359およびpDAB7333を組換えて、pDAB7368を形成した。具体的には、上記4つのPTUを、植物形質転換バイナリーpDAB7333のT鎖DNAボーダー領域内にヘッドトゥテールの方向で配置した。遺伝子の順序は：SzPUFA OrfA v2、SzPUFA OrfB v2、SzPUFA OrfC v2、NoHetI v2である。pDAB7333は、OverdriveおよびT鎖ボーダー配列（T-DNA Border AおよびT-DNA Border B）などの他の調節エレメントに加えて、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTU：CsVMVプロモーターv2、PAT v5、AtuORF1 3'UTR v4もまた含む。次いで、5つのPTUを含む組換えプラスミドを単離し、制限酵素消化およびDNA配列決定を用いて5つのPTUの組込みについて試験した。

20

【0220】

実施例2.6：pDAB7369の構築

pDAB7369は、コドン最適化された再構築バージョンのSzPUFA OrfA v3、SzPUFA OrfB v3、hSzThPUFA OrfC v3およびNoHetI v3を含むように構築されたバイナリープラスミドである。この構築物はSzACS-2コード配列PTUを含まない。pDAB7369プラスミド（図7；配列番号35）は、マルチサイトGateway L-R組換え反応を使用して構築した。pDAB7369は、3つのPUFAシンターゼPTU、1つのアシル-CoAシンターゼPTU、1つのホスホパンテテインルトランスフェラーゼPTUおよびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTUを含む。具体的には、第1のPUFAシンターゼPTUは、PvD1ec2プロモーターv2、2S 5'UTR、SzPUFA OrfA v3およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。第2のPUFAシンターゼPTUは、PvD1ec2プロモーターv2、2S 5'UTR、SzPUFA OrfB v3およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。第3のPUFAシンターゼPTUは、PvD1ec2プロモーターv2、2S 5'UTR、hSzThPUFA OrfC v3およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。ホスホパンテテインルトランスフェラーゼPTUは、PvD1ec2プロモーターv2、2S 5'UTR、NoHetI v3およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。

30

【0221】

40

プラスミドpDAB7334、pDAB7335、pDAB7336、pDAB7338およびpDAB7333を組換えて、pDAB7369を形成した。具体的には、上記4つのPTUを、植物形質転換バイナリーpDAB7333のT鎖DNAボーダー領域内にヘッドトゥテールの方向で配置した。遺伝子の順序は：SzPUFA OrfA v3、SzPUFA OrfB v3、hSzThPUFA OrfC v3、NoHetI v3である。pDAB7333は、OverdriveおよびT鎖ボーダー配列（T-DNA Border AおよびT-DNA Border B）などの他の調節エレメントに加えて、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTU：CsVMVプロモーターv2、PAT v5、AtuORF1 3'UTR v4もまた含む。次いで、5つのPTUを含む組換えプラスミドを単離し、制限酵素消化およびDNA配列決定を

50

用いて5つのPTUの組込みについて試験した。

【0222】

実施例2. 7: pDAB7370の構築

pDAB7370は、コード配列のアミノ末端に融合されたリブローズニリン酸カルボキシラーゼ小鎖1A (SSU-TP v1と標識される)を含む、コドン最適化された再構築バージョンのSzPUFA OrfA v4、SzPUFA OrfB v4、hSzThPUFA OrfC v4およびNoHetI v4を含むように構築されたバイナリープラスミドである。この構築物はSzACS-2コード配列PTUを含まない。pDAB7370プラスミド(図8; 配列番号36)は、マルチサイトGateway L-R組換え反応を使用して構築した。pDAB7370は、3つのPUFAシンターゼPTU、1つのアシル-CoAシンターゼPTU、1つのホスホパンテテインルトランスフェラーゼPTUおよびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTUを含む。具体的には、第1のPUFAシンターゼPTUは、PvDlec2プロモーターv2、2S 5'UTR、SzPUFA OrfA v4およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。第2のPUFAシンターゼPTUは、PvDlec2プロモーターv2、2S 5'UTR、SzPUFA OrfB v4およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。第3のPUFAシンターゼPTUは、PvDlec2プロモーターv2、2S 5'UTR、hSzThPUFA OrfC v4およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。ホスホパンテテインルトランスフェラーゼPTUは、PvDlec2プロモーターv2、2S 5'UTR、NoHetI v4およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。

【0223】

プラスミドpDAB7340、pDAB7341、pDAB7342、pDAB7343およびpDAB7333を組換えて、pDAB7370を形成した。具体的には、上記4つのPTUを、植物形質転換バイナリーpDAB7333のT鎖DNAボーダー領域内にヘッドトゥテールの方向で配置した。遺伝子の順序は: SzPUFA OrfA v4、SzPUFA OrfB v4、hSzThPUFA OrfC v4、NoHetI v4である。pDAB7333は、OverdriveおよびT鎖ボーダー配列(T-DNA Border AおよびT-DNA Border B)などの他の調節エレメントに加えて、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTU: CsVMVプロモーターv2、PAT v5、AtuORF1 3'UTR v4もまた含む。次いで、5つのPTUを含む組換えプラスミドを単離し、制限酵素消化およびDNA配列決定を用いて5つのPTUの組込みについて試験した。

【0224】

実施例2. 8: pDAB100518の構築

pDAB100518は、コード配列のアミノ末端に融合されたアシル-ACP-チオエステラーゼ由来の葉緑体トランジットペプチド(チオエステラーゼトランジットペプチドと標識される)を含む、コドン最適化された再構築バージョンのSzPUFA OrfA v5、SzPUFA OrfB v5、hSzThPUFA OrfC v5およびNoHetI v5を含むように構築されたバイナリープラスミドである。さらに、このプラスミドは、葉緑体トランジットペプチドを保有しないSzACS-2 v3コード配列PTUを含む。pDAB100518プラスミド(図9; 配列番号37)は、マルチサイトGateway L-R組換え反応を使用して構築した。pDAB100518は、3つのPUFAシンターゼPTU、1つのアシル-CoAシンターゼPTU、1つのホスホパンテテインルトランスフェラーゼPTUおよびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTUを含む。具体的には、第1のPUFAシンターゼPTUは、PvDlec2プロモーターv2、2S 5'UTR、SzPUFA OrfA v5およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。第2のPUFAシンターゼPTUは、PvDlec2プロモーターv2、2S 5'UTR、SzPUFA OrfB v5およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。第3のPUFAシンターゼPTUは、PvDl

e c 2 プロモーター v 2、2 S 5' UTR、h S z T h P U F A O r f C v 5 および A t 2 S S S P ターミネーター v 1 を含む。アシルー C o A シンテターゼ P T U は、P v D l e c 2 プロモーター v 2、2 S 5' UTR、S z A C S - 2 v 3 遺伝子および A t 2 S S S P ターミネーター v 1 を含む。ホスホパンテテインルトランスフェラーゼ P T U は、P v D l e c 2 プロモーター v 2、2 S 5' UTR、N o H e t I v 5 および A t 2 S S S P ターミネーター v 1 を含む。

【0225】

プラスミド p D A B 1 0 0 5 1 7、p D A B 1 0 0 5 1 4、p D A B 1 0 0 5 1 1、p D A B 1 0 0 5 1 5 および p D A B 7 3 3 3 を組換えて、p D A B 1 0 0 5 1 8 を形成した。具体的には、上記 5 つの P T U を、植物形質転換バイナリー p D A B 7 3 3 3 の T 鎖 DNA ボーダー領域内にヘッドトゥーテールの方向で配置した。遺伝子の順序は：S z P U F A O r f A v 5、S z P U F A O r f B v 5、h S z T h P U F A O r f C v 5、S z A C S - 2 v 3、N o H e t I v 5 である。p D A B 7 3 3 3 は、O v e r d r i v e および T 鎖ボーダー配列 (T-DNA B o r d e r A および T-DNA B o r d e r B) などの他の調節エレメントに加えて、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ P T U：C s V M V プロモーター v 2、P A T v 5、A t u O R F 1 3' UTR v 4 もまた含む。次いで、6 つの P T U を含む組換えプラスミドを単離し、制限酵素消化および DNA 配列決定を用いて 6 つの P T U の組み込みについて試験した。

【0226】

実施例 2. 9：p D A B 1 0 1 4 7 6 の構築

p D A B 1 0 1 4 7 6 は、コドン最適化された再構築バージョンの S z P U F A O r f A v 3、S z P U F A O r f B v 3、h S z T h P U F A O r f C v 3 および N o H e t I v 3 を含むように構築されたバイナリープラスミドである。この S z A C S - 2 v 2 遺伝子配列は、ネイティブのコドン最適化されていないバージョンである。p D A B 1 0 1 4 7 6 プラスミド (図 10；配列番号 38) は、マルチサイト G a t e w a y L-R 組換え反応を使用して構築した。p D A B 1 0 1 4 7 6 は、3 つの P U F A シンターゼ P T U、1 つのアシルー C o A シンテターゼ P T U、1 つのホスホパンテテインルトランスフェラーゼ P T U およびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ P T U を含む。具体的には、第 1 の P U F A シンターゼ P T U は、P v D l e c 2 プロモーター v 2、2 S 5' UTR、S z P U F A O r f A v 3 および A t 2 S S S P ターミネーター v 1 を含む。第 2 の P U F A シンターゼ P T U は、P v D l e c 2 プロモーター v 2、2 S 5' UTR、S z P U F A O r f B v 3 および A t 2 S S S P ターミネーター v 1 を含む。第 3 の P U F A シンターゼ P T U は、P v D l e c 2 プロモーター v 2、2 S 5' UTR、h S z T h P U F A O r f C v 3 および A t 2 S S S P ターミネーター v 1 を含む。アシルー C o A シンテターゼ P T U は、P v D l e c 2 プロモーター v 2、2 S 5' UTR、S z A C S - 2 v 2 遺伝子および A t 2 S S S P ターミネーター v 1 を含む。ホスホパンテテインルトランスフェラーゼ P T U は、P v D l e c 2 プロモーター v 2、2 S 5' UTR、N o H e t I v 3 および A t 2 S S S P ターミネーター v 1 を含む。

【0227】

プラスミド p D A B 7 3 3 4、p D A B 7 3 3 5、p D A B 7 3 3 6、p D A B 1 0 1 4 7 1 および p D A B 7 3 3 3 を組換えて、p D A B 1 0 1 4 7 6 を形成した。具体的には、上記 5 つの P T U を、植物形質転換バイナリー p D A B 7 3 3 3 の T 鎖 DNA ボーダー領域内にヘッドトゥーテールの方向で配置した。遺伝子の順序は：S z P U F A O r f A v 3、S z P U F A O r f B v 3、h S z T h P U F A O r f C v 3、S z A C S - 2 v 2、N o H e t I v 3 である。p D A B 7 3 3 3 は、O v e r d r i v e および T 鎖ボーダー配列 (T-DNA B o r d e r A および T-DNA B o r d e r B) などの他の調節エレメントに加えて、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ P T U：C s V M V プロモーター v 2、P A T v 5、A t u O R F 1 3' UTR v 4 もまた含む。

UTR v4もまた含む。次いで、6つのPTUを含む組換えプラスミドを単離し、制限酵素消化およびDNA配列決定を用いて6つのPTUの組込みについて試験した。

【0228】

実施例2. 10: pDAB101477の構築

pDAB101477は、コドン最適化された再構築バージョンのSzPUFA OrfA v3、SzPUFA OrfB v3、hSzThPUFA OrfC v3およびNoHetI v3を含むように構築されたバイナリープラスミドである。pDAB101477プラスミド（図11；配列番号39）は、マルチサイトGateway LR組換え反応を使用して構築した。pDAB101477は、3つのPUFAシンターゼPTU、1つのアシル-CoAシンターゼPTU、1つのホスホパンテテイルトランスフェラーゼPTUおよびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTUを含む。具体的には、第1のPUFAシンターゼPTUは、PvDlec2プロモーターv2、2S 5' UTR、SzPUFA OrfA v3およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。第2のPUFAシンターゼPTUは、PvDlec2プロモーターv2、2S 5' UTR、SzPUFA OrfB v3およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。第3のPUFAシンターゼPTUは、PvDlec2プロモーターv2、2S 5' UTR、hSzThPUFA OrfC v3およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。アシル-CoAシンターゼPTUは、PvDlec2プロモーターv2、2S 5' UTR、SzACS-2 v4遺伝子およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。ホスホパンテテイルトランスフェラーゼPTUは、PvDlec2プロモーターv2、2S 5' UTR、NoHetI v3およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。

【0229】

プラスミドpDAB7334、pDAB7335、pDAB7336、pDAB101472およびpDAB7333を組換えて、pDAB101477を形成した。具体的には、上記5つのPTUを、植物形質転換バイナリーpDAB7333のT鎖DNAボーダー領域内にヘッドトゥテールの方向で配置した。遺伝子の順序は：SzPUFA OrfA v3、SzPUFA OrfB v3、hSzThPUFA OrfC v3、SzACS-2 v4、NoHetI v3である。pDAB7333は、OverdriveおよびT鎖ボーダー配列（T-DNA Border AおよびT-DNA Border B）などの他の調節エレメントに加えて、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTU：CsVMVプロモーターv2、PAT v5、AtuORF1 3' UTR v4もまた含む。次いで、6つのPTUを含む組換えプラスミドを単離し、制限酵素消化およびDNA配列決定を用いて6つのPTUの組込みについて試験した。

【実施例3】

【0230】

ダイズ形質転換

ダイズ子葉節外植体のアグロバクテリウム（Agrobacterium）媒介性の形質転換を介して、トランスジェニックダイズ（Glycine max）を生成した。pDAB7362として上記されるバイナリーベクターを保有する無害化したアグロバクテリウム（Agrobacterium）株DA2552（米国出願番号61/368,965、2010年7月29日出願）を使用して、形質転換を開始した。

【0231】

アグロバクテリウム（Agrobacterium）媒介性の形質転換を、Zengら（Zeng P., Vadnais D.A., Zhang Z., Polacco J.C., (2004), Plant Cell Rep., 22(7): 478-482）の改変1/2子葉節手順を使用して実施した。簡潔に述べると、ダイズ種子（栽培品種Maverick）を、基本培地上で発芽させ、子葉節を単離して、アグロバクテリウム（Agrobacterium）を感染させた。苗条開始、苗条伸長および発根培地に、アグロバクテリウム（Agrobacterium）の除去のために、セフトキシム、チメンチンおよびバンコマイシンを補充した。グルホシネート選択を使用して、形質転換されていない苗条の成長を阻害した。

選択された苗条を、根の発生のために発根培地に移し、次いで、小植物の順化のために土壌ミックスに移した。

【0232】

選択された小植物の頂小葉を、グルホシネートを用いて局所的に処理して（葉彩色技術）、推定形質転換体についてスクリーニングした。スクリーニングされた小植物を温室に移して順化させ、次いでグルホシネートで葉を彩色して、耐性を再確認した。これらの推定の形質転換された T_0 植物をサンプリングし、分子分析を使用して、PAT、ならびにPUFAシンターゼOrfA、PUFAシンターゼOrfB、PUFAシンターゼキメラOrfC、アシル-CoAシンテターゼおよび4'ホスホパンテテイルトランスフェラーゼHetI導入遺伝子の存在を確認した。 T_0 植物を温室中で自家受精させ、 T_1 種子を生成した。

10

【0233】

第2のダイズ形質転換法を使用して、さらなるトランスジェニックダイズ植物を生成した。pDAB7362として上記されるバイナリーベクターを保有する無害化したアグロバクテリウム（*Agrobacterium*）株DA2552（米国仮特許出願番号61/368,965）を使用して、形質転換を開始した。

【0234】

アグロバクテリウム（*Agrobacterium*）媒介性の形質転換を、Pazら、（Paz M., Martinez J., Kalvig A., Fonger T.およびWang K., (2005) Plant Cell Rep., 25: 206-213）の改変半種子手順を使用して実施した。簡潔に述べると、成熟ダイズ種子を、塩素ガスで一晩滅菌し、無菌 H_2O に20時間浸し、その後アグロバクテリウム（*Agrobacterium*）媒介性の植物形質転換を行った。種子を臍に沿った縦方向切断によって半分に切断して種子を分離し、種皮を除去した。胚軸（embryonic axis）を切り出し、任意の軸方向の苗条/芽を子葉節から除去した。得られた半種子外植体にアグロバクテリウム（*Agrobacterium*）を感染させた。苗条開始、苗条伸長および発根培地に、アグロバクテリウム（*Agrobacterium*）の除去のために、セフトキシム、チメンチンおよびバンコマイシンを補充した。グルホシネート選択を使用して、形質転換されていない苗条の成長を阻害した。選択された苗条を、根の発生のために発根培地に移し、次いで、小植物の順化のために土壌ミックスに移した。

20

【0235】

選択された小植物の頂小葉を、グルホシネートを用いて局所的に処理して（葉彩色技術）、推定形質転換体についてスクリーニングした。スクリーニングされた小植物を温室に移して順化させ、次いでグルホシネートで葉を彩色して、耐性を再確認した。これらの推定の形質転換された T_0 植物をサンプリングし、分子分析を使用して、PAT、ならびにPUFAシンターゼOrfA、PUFAシンターゼOrfB、PUFAシンターゼキメラOrfC、アシル-CoAシンテターゼおよび4'ホスホパンテテイルトランスフェラーゼHetI導入遺伝子の存在を確認した。7つの事象を、pDAB7362由来の導入遺伝子を含むと同定した。これらの T_0 植物をさらなる分析に進め、温室中で自家受精させて、 T_1 種子を得た。

30

【実施例4】

40

【0236】

ダイズ事象の分子分析

選択されたpDAB7362ダイズ事象の導入遺伝子コピー数を、比較定量リアルタイムPCR（qPCR）法を使用して定量した。葉組織サンプルを成熟ダイズ植物の上部および下部の葉から採取し、これらのサンプルを合わせて、ゲノムDNAを単離した。ゲノムDNAを、製造業者の指示に従ってBioSprint 96 DNA Plant KitおよびBioSprint 96 磁気粒子自動化プラットフォーム（Qiagen、Valencia、CA）を使用して単離した。抽出されたゲノムDNAを、定量リアルタイムPCR反応（qPCR）においてテンプレートとして使用するために、ddH₂Oで1:5希釈した。

50

【0237】

Roche Assay Design Center (www.universalprobelibrary.com) を使用することによって、pDAB7362ダイズ植物中のSzPUFA OrfA v3、SzPUFA OrfB v3、hThSzPUFA OrfCv3、SzACS-2 v3、NoHetI v3およびPAT v5導入遺伝子を検出するためにqPCRアッセイを設計した。アッセイにおいて使用したプライマーおよびプローブを表8に記載する。標的遺伝子の存在を、フルオレセイン-アミダイト (FAM) 標識したUPLプローブ (Roche Diagnostics、Indianapolis、IN) を用いて検出した。これらのアッセイを、シアニン-5 (Cy-5) 蛍光色素で標識されたダイズ内部参照GMFL01-25-J19、GenBank: AK286292.1 (表8中でGMS116と言及される) を用いて二重の反応で実施した。

【0238】

【表9】

表8: qPCRアッセイのプライマーおよびプローブ

標的	フォワードプライマー	リバースプライマー	プローブ
SzPUFA OrfA v3	配列番号 12 cacaaccgggtgttgatgatg	配列番号 13 Gagcttcacaaaggctctgc	UPL #18
SzPUFA OrfB v3	配列番号 14 gaatccttgcgtcatttgggt	配列番号 15 Caatggactcacgcacaaact	UPL #97
hThSzPUFA OrfCv3	配列番号 16 ggattacctcaacattgctcct	配列番号 17 Tgtccatgcgcatactctt	UPL #26
SzACS2 v3	配列番号 18 agaaattgatggctgttggtg	配列番号 19 Ctgccgtgctgagttctt	UPL #54
NoHetI v3	配列番号 20 ccagaacacagaaggcggtt	配列番号 21 Tcccaagtatccaccaagat	UPL #3
PAT v5	配列番号 22 acaagagtggattgatctagagaggt	配列番号 23 Ctttgatgcctatgtgacacgtaaacagt	配列番号 24 ccagcgtaagcaataccagccacaacacc
GMS116	配列番号 25 gtaatatgggctcagaggaatggt	配列番号 26 atggagaagaacattggaattgc	配列番号 27 ccatggcccgtaccatctggtc

【0239】

リアルタイムPCR反応を、標準的なプロトコルを使用してLC480IIリアルタイムPCRサーマルサイクラー (Roche、Indianapolis、IN) で実施した。SzPUFA OrfA v3、SzPUFA OrfB v3、hThSzPUFA OrfCv3、SzACS-2 v3、NoHetI v3およびPAT v5、FAM標識されたアッセイについてのデータを、533nmの発光フィルターおよび483nmの励起シグナルを使用して収集した。GMS116 Cy5標識された参照アッセイについてのデータを、660nmのフィルターおよび618nmの励起シグナルを使用して収集した。クロッシングポイント値 (Cp値) および標的対参照比を、LC480IIソフトウェアの「Advanced Relative Quantification」分析ワークフローを使用して自動的に計算した。各サンプルについての標的対参照比を、標準的な「 $\Delta\Delta Ct$ 」法を使用して計算した。サンプルの標的-参照比を、ダイズ内部参照GMFL01-25-J19の標的-参照比を用いて標準化することによって、概算コピー数を決定した。

【0240】

PAT v5選択マーカーおよびドコサヘキサエン酸 (DHA) 導入遺伝子 (SzPUFA OrfA v3、SzPUFA OrfB v3、hThSzPUFA OrfCv3、SzACS-2 v3およびNoHetI v3) の概算コピー数を、7つのpDAB7362事象由来のT₁植物において決定した。2つの事象7362 [710] - 71006および7362 [710] - 71010由来の植物は、PAT v5選択マ-

カーまたはDHA遺伝子標的配列のいずれも含まなかった。残りの事象；7362 [710] - 70903、7362 [710] - 71005、7362 [710] - 71008 および7362 [710] - 71009由来の植物は、1～10の範囲のコピー数でPAT v5選択マーカーおよび5つのDHA導入遺伝子を含んでいた。事象7362 [708] - 70801は、単一の分離した遺伝子座を示す、0、1または2コピーのPAT v5遺伝子を有するT1植物を生成し、事象7362 [710] - 71005は、2つの連鎖していない遺伝子座の分離を示唆する0と4との間のコピー数のPAT v5を有するT1植物を生成した。

【実施例5】

【0241】

トランスジェニックダイズ植物のT₁子葉の脂質分析

限定量のT₁種子の破壊的分析を回避するために、脂肪酸メチルエステル (FAME) 分析を、T₁植物の発芽後緑色子葉に対して実施した。FAMEの精製および分析のための方法が記載されている (例えば、Nightingale, ZDら、(1999) Purification of fatty acid methyl esters by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. 732(2):495-500; およびW.W Christieによる「Gas chromatography and lipids: a practical guide」, 1989, The Oily Press)。T₁子葉中の油プロファイルの特徴付けは、乾燥T₁種子中の油プロファイルを示す (Wilson, RF およびKwanyuen, P., (1986) Triacylglycerol synthesis and metabolism in germinating soybean cotyledons, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism, 877(2):231-237)。

【0242】

実施例5. 1: トランスジェニックキャノーラの分析を介したT₁子葉中のDHAの発芽後検出の検証

発芽後緑色子葉中の長鎖多価不飽和脂肪酸 (LC-PUFA) の検証および検出を、DHA産生キャノーラ種子を用いて実施して、T₁子葉中の油プロファイルの特徴付けが成熟T₁種子内の油プロファイルの存在を示すかどうかを評価した。バイナリープラスミドpDAB7362を保有するトランスジェニックキャノーラ種子を、水で飽和させたペーパータオル上で室温で発芽させ、3日後に収集し、この時点で、組織を凍結乾燥させた。この組織を直接メチル基転移したが、ヘキサンでの事前抽出はしなかった。LC-PUFA含量 (重量での% FAME) を計算し、成熟種子と比較した。30のキャノーラの現れた子葉からの平均DHA含量は0.71% (総LC-PUFA = 0.97%) であり、油含量は53.0%であった。発芽前の48の成熟キャノーラ種子の平均DHA含量は0.49% (総LC-PUFA = 0.73%) であり、油含量は44.3%であった。この研究により、LC-PUFAが、発芽した緑色子葉において発芽後に検出され得ること、発芽した緑色子葉におけるLC-PUFAの検出が、LC-PUFAが種子中に存在することを示すことが実証されている。

【0243】

実施例5. 2: T₁ダイズ子葉におけるDHAの発芽後検出

FAME分析を、定植の3～5日後にサンプリングしたダイズ実生当たり1つの切り取った緑色子葉に対して実施した。植物材料を凍結乾燥させ、鋼鉄のボールおよびボールミルを使用してホモジナイズし、ヘキサンで3回脱脂した。プールしたヘキサン画分を蒸発させ、乾燥残渣を計量し、ヘプタン中で再構成した。既知量の油残渣を、代用品トリヘプタデカノイン (Nu-Chem Prep, Elysian, MN) の存在下でメタノール中0.25Mの新たに調製したナトリウムメトキシド (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を用いてメチル基転移させた。この反応を、穏やかな加熱下 (40℃) で一定に震盪しながら実施し、得られたFAMEをヘプタンで抽出した。反応の完了を、反応したヘプタデカン酸メチルエステル代用品の回収によって確認した。FAME抽出物を、Agilent 6890 Gas Chromatograph (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) およびSGE (

10

20

30

40

50

Austin、TX) の15m×0.25mm×0.25μm BPX 70キャピラリーカラムを使用したGC-FIDによって分析した。各FAMEピークをその保持時間によって同定し、Matreya LLC (Pleasant Gap、PA) のナタネ油参照ミックスの注入によって定量した。校正標準は、Nu-ChekのDHA、EPAおよびDPA (n-6) メチルエステルの個々に添加された標準を含んでいた。データ分析を、ChemStation 4ソフトウェア (Agilent) を使用して実施した。2つの事象由来のT₁子葉は、DHAを含んでいた; pDAB7362 [708] - 70801.001およびpDAB7362 [710] - 71005.001 (表9)。

【0244】

事象pDAB7362 [708] - 70801.001由来の40の種子を発芽させ、切り取った緑色子葉中のLC-PUFAの存在についてスクリーニングした。40の種子のうち6つに由来する子葉が、0.78%~1.58%の範囲 (平均1.12%) でLC-PUFAを含んでいた。DHA含量は0.48%~0.93%の範囲 (平均0.68%) であり、DPA (n-6) 含量は0.3%~0.65%の範囲 (平均0.44%) であった。

【0245】

事象pDAB7362 [710] - 71005.001由来の39の種子を発芽させ、切り取った緑色子葉中のLC-PUFAの存在についてスクリーニングした。39の種子のうち37に由来する子葉が、0.70%~11.98%の範囲 (平均3.91%) でLC-PUFAを含んでいた。総LC-PUFAのうち、DHA含量は0.36%~8.00%の範囲 (平均2.24%) であり、DPA (n-6) 含量は0.34%~3.98%の範囲 (平均1.68%) であった。

【0246】

LC-PUFAの同定を、Pegasus III GC-TOF-MS (Leco、St. Joseph、MI) を使用して、陰性対照と比較して標準PUFAメチルエステル (Nu-Chek Prep、Elysian、MN) の特異的フラグメント化を評価することによって確認した。

【0247】

【表10】

表9: 発芽させたT₁ダイズ種子子葉由来の総脂肪酸の重量百分率でのLC-PUFA含量

事象 ID	総実生 の数	DHA 陽 性実生 の数	DHA		DPA(n-6)		総 PUFA	
			平均	範囲	平均	範囲	平均	範囲
pDAB7362[708]- 70801.001	40	6	0.68%	0.48- 0.93%	0.44%	0.3- 0.65%	1.12%	0.78- 1.58%
pDAB7362[710]- 71005.001	39	37	2.24%	0.36- 8.00%	1.68%	0.34- 3.98%	3.91%	0.70- 11.98%
Williams 82 対照	15	0	0%	--	0%	--	0%	--

【実施例6】

【0248】

トランスジェニックダイズ事象由来の成熟T₂種子の脂質分析

2つの事象7362 [708] - 70801.001および7362 [710] - 71005.001由来のT₁植物を、温室中で成熟するまで成長させた。T₁子葉中に高いレベルのLC-PUFA、および1または2コピーのPAT v5、およびDHA生成のための付随する5つの遺伝子を含む植物を選択した。これらの植物を自家受精させ、得られたT₂種子を成熟の時点で収集した。単一の種子をFAME GC-FIDで分析して、このT₂ダイズ種子中のLC-PUFAおよびDHA含量を決定した。植物当たり12個の成熟種子全体を、圧力によって種子を粉砕し、鋼鉄のボールおよびボールミルを使用

してホモジナイズすることによって、個々に分析した。組織をヘキサンで3回脱脂し、プールしたヘキサン画分を乾燥するまで蒸発させ、残渣を計量し、上の実施例で記載したようにFAME分析を実施するために、ヘプタン中に再構成した。

【0249】

単一コピーのPAT v5を保有する事象7362 [708] - 70801. 001のT₁植物(図12中で7362 [708] - 70801. Sx. 021と記載される)由来の単一のT₂種子は、0%~0.73%のDHA(0%~1.19%の総LC-PUFA)を含んでいた。単一コピーのPAT v5を保有する事象7362 [710] - 71005. 001の2つのT₁植物(図12中で7362 [710] - 71005. Sx. 006および7362 [710] - 71005. Sx. 0.35と記載される)由来の単一のT₂種子は、0%~2.08%のDHA(0%~3.56%の総LC-PUFA)を含んでいた。2コピーのPAT v5を含有する事象7362 [710] - 71005. 001由来の7つのT₁植物(図12中で7362 [710] - 71005. Sx. 010、7362 [710] - 71005. Sx. 012、7362 [710] - 71005. Sx. 013、7362 [710] - 71005. Sx. 016、7362 [710] - 71005. Sx. 018、7362 [710] - 71005. Sx. 025および7362 [710] - 71005. Sx. 031と記載される)由来の単一のT₂種子は、0%~2.84%のDHA(0%~4.77%の総LC-PUFA)を含んでいた。最も高いDHA生成系統(7362 [710] - 71005. Sx. 025)由来のT₂種子の平均DHA含量は、1.83%(3.11%の総LC-PUFA)であった。個々のT₁植物由来の各T₂種子のDHA含量は図12に示される。

【0250】

DHAは、LC-PUFAを含むこれらのT₂種子中の総LC-PUFA含量の60%を構成していた。2つの新規LC-PUFAであるDHAおよびDPA(n-6)だけが、T₂ダイズ種子において検出された。ダイズ種子中に見出されると予測される脂肪酸は正常レベルで検出されたが、総C18脂肪酸は、LC-PUFAの存在に起因して、比例してより低かった。DHAおよびDPA(n-6)以外の他の異なる脂肪酸は、これらのトランスジェニックダイズ種子においては検出されなかった。トランスジェニック種子の油含量(個々のFAMEの質量の合計を、種子質量によって除算する)およびトランスジェニックT₁系統によって生成される種子の数は、同じ条件下で同時に温室中で成長させた非トランスジェニックWilliams 82対照栽培品種のものと有意には異ならなかった。

【0251】

ダイズ事象7362 [708] - 70801. 001および7362 [710] - 71005. 001由来の個々のT₂種子の完全FAMEプロファイルを表10に示す。

【0252】

【表 1 1】

表10: 2つの事象7362[708]-70801.001および7362[710]-71005.001由来の個々のT₂ダイズ種子のFAMEプロファイル。値は、10～12のT₂ダイズ種子由来の総FAME含量の百分率である。総LC-PUFAは、C22:5(DPA n-6)およびC22:6(DHA)のFAME百分率の合計である。

事象名	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	C22:0	C24:0	C22:5 (DPA n-6)	C22:6 (DHA)	総 LC- PUFA
7362[708]- 70801.Sx.021	0.16	12.99	4.98	13.84	58.09	7.88	0.36	0.16	0.22	0.11	0.46	0.73	1.19
7362[710]- 71005.Sx.006	0.19	13.09	4.8	22.71	50.56	5.37	0.32	0.17	0.25	0.1	0.83	1.61	2.44
7362[710]- 71005.Sx.010	0.15	12.88	5.56	16.25	55.06	6.44	0.38	0.17	0.18	0.11	1.19	1.63	2.82
7362[710]- 71005.Sx.012	0.18	13.41	4.15	13.67	56.63	7.09	0.35	0.16	0.21	0.11	1.58	2.46	4.04
7362[710]- 71005.Sx.013	0.22	14.3	4.4	19.13	51.2	5.89	0.31	0.15	0.18	0.1	1.53	2.59	4.12
7362[710]- 71005.Sx.016	0.21	14.3	4.16	15.41	55.84	6.24	0.3	0.15	0.17	0.08	1.23	1.91	3.15
7362[710]- 71005.Sx.018	0.17	13.88	4.65	15.3	55.14	6.26	0.35	0.16	0.19	0.08	1.5	2.32	3.82
7362[710]- 71005.Sx.025	0.17	13.29	4.74	15.03	54.94	6.2	0.37	0.17	0.21	0.09	1.93	2.84	4.77
7362[710]- 71005.Sx.031	0	13.42	4.5	16.4	55.73	6.13	0.19	0.1	0.24	0.06	1.27	1.96	3.23
7362[710]- 71005.Sx.035	0.16	13.13	3.96	18.39	53.15	7.18	0.14	0.11	0.21	0	1.49	2.08	3.56
Williams 82 対照	0.06	10.37	6.25	24.12	52.88	5.46	0.33	0.14	0.3	0.09	0	0	0

実施例 6. 1 : 2つのトランスジェニックダイズ事象由来の成熟 T_3 種子の脂質分析

2つの T_2 ダイズ植物事象 7362 [708] - 70801.001 および 7362 [710] - 71005.001 を、温室中で成熟するまで成長させた。各事象の複数の植物を温室中で成長させ、スクリーニングして、 T_2 子葉中で高レベルの LC-PUFA を生成し、導入遺伝子の単一のホモ接合性挿入物を含む個々の植物を同定した。同定された植物を自家受精させ、得られた T_3 種子を、種子が成熟に達した時点で収集した。単一の成熟 T_3 種子を FAME GC-FID で分析して、この T_3 ダイズ種子中の DHA および LC-PUFA 含量を決定した (図 12a)。植物当たり 12 個の成熟種子全体を、圧力によって種子を粉砕し、粉砕された種子材料を鋼鉄のボールおよびボールミルを使用してホモジナイズすることによって、個々に分析した。組織をヘキサンで 3 回脱脂し、プー

10

【0254】

【表 12】

表 11: 2つの事象 7362[708]70801.001 および 7362[710]-71005.001 から、 T_2 世代および T_3 世代で無作為に選択した成熟ダイズ種子由来の平均 DHA 含量(%)

事象名	T_2 種子				T_3 種子			
	n	平均	最小	最大	n	平均	最小	最大
pDAB7362[708]70801.001-1-21	9	0.22	0	0.73	90	0.27	0	0.93
pDAB7362[710]71005.001-1-13	12	1.79	0.82	2.59	45	2.11	0.79	3.91
pDAB7362[710]71005.001-1-18	12	1.58	0.79	2.32	48	2.00	1.05	3.54
pDAB7362[710]71005.001-1-25	12	1.83	0.99	2.84	39	2.02	0.99	4.24
pDAB7362[710]71005.001-1-35	12	0.59	0	2.08	72	0.74	0	3.10
Williams 82 対照	8	0	0	0	15	0	0	0

20

【0255】

表 11 に示すように、ダイズ種子中の DHA の相対的百分率は、ダイズの後続の世代において、一定のままであるか、または増加していた (T_2 および T_3 から)。事象 7362 [708] - 70801.001 (この系統は、分子的に特徴付けられ、PAT の単一のヘミ接合性コピーを保有することが見出されたものである) の T_2 植物の自家受精から生成された単一の T_3 種子を FAME 分析でアッセイし、種子が、0% ~ 0.93% の DHA (0% ~ 1.37% の総 LC-PUFA) を含むことを決定した。比較として、事象 7362 [708] - 70801.001 から生成された T_2 種子を FAME 分析でアッセイし、種子が、0% ~ 0.73% の DHA を含むことを決定した。 T_2 植物事象 7362 [710] - 71005.001 - 1 - 35 (この系統は、分子的に特徴付けられ、PAT の単一のヘミ接合性コピーを保有することが見出されたものである) の自家受精由来の単一の T_3 種子を FAME 分析でアッセイし、種子が、0% ~ 3.10% の DHA (0% ~ 5.45% の総 LC-PUFA) を含むことを決定した。比較として、事象 7362 [710] - 71005.001 - 1 - 35 から生成された T_2 種子を FAME 分析でアッセイし、種子が、0% ~ 2.84% の DHA を含むことを決定した。さらに、事象 7362 [710] - 71005.001 - 1 - 13、7362 [710] - 71005.001 - 1 - 18 および 7362 [710] - 71005.001 - 1 - 25 (各事象は、PAT の単一のホモ接合性コピーを含むと決定されたものである) から生成された単一の T_3 種子は、0.79% ~ 4.24% の DHA (1.26% ~ 6.5% の総 LC-PUFA) を含んでいた。比較として、事象 7362 [710] - 71005.001 - 1 - 1

30

40

50

3、7362 [710] - 71005. 001 - 1 - 18および7362 [710] - 71005. 001 - 1 - 25から生成されたT₂種子をFAME分析でアッセイし、種子が、0.79%~2.84%のDHAを含むことを決定した。これらのトランスジェニック事象を対照植物と比較したところ、植物当たりの収量（種子の数）および総油含量（%）が、トランスジェニック系統と同様の条件において、Williams 82対照と類似していることが見出された。

【0256】

試験した全ての系統について、T₂世代およびT₃世代についてダイズ種子において生成および測定されたDHAおよびLC-PUFAの百分率は、T₂世代からT₃世代まで、レベルにおいて一貫していたまたは増加していた。これらの結果は、この形質が遺伝すること、およびこの形質のさらなる世代への伝達が、減少したDHA生成を生じないことを示している。

【実施例7】

【0257】

トランスジェニックダイズ種子におけるPUFAシンターゼタンパク質のウエスタンブロット検出

PUFAシンターゼOrfA (SzPUFA OrfA v3遺伝子によりコードされる)、PUFAシンターゼOrfB (SzPUFA OrfB v3遺伝子によりコードされる)、PUFAシンターゼキメラOrfC (hThSzPUFA OrfC v3遺伝子によりコードされる) およびHetI (ノストック属の種 (Nostoc sp.) PCC 7120、GenBank ID: P37695、GI: 20141367由来) を、ウエスタンブロット分析によって成熟トランスジェニック種子サンプルにおいて検出した。残余のダイズT₂種子ケイクサンプルを、FAME分析のためのヘキサン抽出後に保持した。粉末化種子ケイクを、単一の4.5mmステンレス鋼ボールを有するチューブ中に配置し、抽出緩衝液 (50mM Tris、10mM EDTA、2% SDS) を添加した。サンプルチューブを、30分間穏やかに揺らし、3,000rcfで15分間遠心分離し、上清を分析に使用した。種子抽出物中の総可溶性タンパク質の量を、660nm Protein Assay (Thermo Fisher、Rockford、IL) によって決定した。サンプルを、1.25mg/mlの総可溶性タンパク質に対して標準化し、1レーン当たり16.25μgの総可溶性タンパク質の標準化されたロードのために、50mM DTTを含むLDSサンプル緩衝液 (Invitrogen、Carlsbad、CA) 中で調製した。サンプルを、3%~8%のTris-アセテートゲル (Invitrogen、Carlsbad、CA) において電気泳動し、PUFAシンターゼOrfA、PUFAシンターゼOrfBおよびPUFAシンターゼキメラOrfCの検出のためにニトロセルロースメンブレンに移した。サンプルを、4%~12%のBis-Trisゲル (Invitrogen、Carlsbad、CA) において電気泳動し、HetIの検出のためにニトロセルロースメンブレンに移した。

【0258】

ブロットを、ブロッキング緩衝液中でインキュベートし、次いで、異なるPUFAシンターゼOrfA、PUFAシンターゼOrfB、PUFAシンターゼキメラOrfCおよびHetIポリペプチドに対する抗体でプロービングした。シゾキトリウム (Schizochytrium) PUFAシンターゼOrfA (SzPUFS-A) のA2領域に対するウサギ抗A2-A、シゾキトリウム (Schizochytrium) PUFAシンターゼOrfB (SzPUFS-B) のB3領域に対するウサギ抗B3-A、および全長HetIポリペプチドに対するウサギ抗HetIを使用した。領域B3は、OrfBのエノイルレダクターゼ (ER) ドメインを含む。PUFAシンターゼキメラOrfC中にも相同なERドメインが存在するので、この抗血清は、ウエスタンブロット上のPUFAシンターゼOrfBおよびPUFAシンターゼキメラOrfCの両方を認識する。抗ウサギ蛍光標識二次抗体 (Goat Anti-Rabbit AF633 (Invitrogen、Carlsbad、CA)) を検出のために使用した。ブロットを、Typhoon Trio Plus 蛍光画

10

20

30

40

50

像機器 (GE Healthcare、New Brunswick NJ) で可視化した。

【0259】

事象7362 [708] - 70801および7362 [710] - 71005由来の成熟 T_2 種子由来のタンパク質抽出物のSDS-PAGEウエスタンブロットにより、PUFAシンターゼOrfA、PUFAシンターゼOrfB、PUFAシンターゼキメラOrfCおよびHetI特異的抗血清でプロービングした場合に、適切なサイズにおけるバンドが示された (図13)。PUFAシンターゼOrfA、PUFAシンターゼOrfBおよびPUFAシンターゼキメラOrfCのバンドは、クマシーブルーによる直接的染色によっても見ることができる。

10

【実施例8】

【0260】

代替的プロモーターを使用した、藻類PUFAシンターゼ遺伝子スイートの発現

PUFAシンターゼOrfA、PUFAシンターゼOrfB、PUFAシンターゼキメラOrfC、アシル-CoAシンテターゼおよび4'ホスホパンテテイルトランスフェラーゼHetIタンパク質をコードする遺伝子 (複数可) を発現するためのさらなる転写調節エレメントの使用は、ダイズ種子内のLC-PUFAおよびDHA含量をさらに増加させ得る。トリアシルグリセロールの生合成および堆積の間に、ならびに延長された期間にわたり、発生において初期に発現する転写調節エレメントの同定および使用は、種子発生の初期段階 (例えば、15~25DAPにおける) においてLC-PUFAおよびDHA生合成遺伝子の転写を促進し、従ってLC-PUFAおよびDHAの生成の期間を延長させることによって、ダイズ種子内のLC-PUFAおよびDHAのレベルを増加させ得る。かかる転写調節領域の例には、レスケレラ・フェンドレリ (*Lesquerella fendleri*) KCS (LfKCS3) プロモーター (米国特許第7, 253, 337号) およびFAE1プロモーター (米国特許第6, 784, 342号) およびブラッシカ・オレラセア (*Brassica oleracea*) アシルキャリアタンパク質 (BoACP) プロモーター (国際公開公報WO1992/18634) が含まれるがこれらに限定されない。さらに、他の種子特異的プロモーター、例えば、インゲンマメ (*Phaseolus vulgaris*) 由来のファゼオリンプロモーター (米国特許第5, 504, 200号) が、ダイズ種子内のLC-PUFAおよびDHAのレベルを増加させるために、種子発生の間に延長した期間にわたり異種遺伝子の発現を確実に駆動するために使用され得る。最後に、強い構成的プロモーター、例えば、キャッサバ葉脈モザイクウイルスプロモーター (CsVMVプロモーターv2) は、発生の全ての段階を通じて異種遺伝子の発現を駆動し、それによってダイズ種子および他の植物組織内のLC-PUFAおよびDHAのレベルを増加させるために使用され得る。

20

30

【0261】

これらのプロモーターは、プラスミドpDAB7362において以前に記載されたPUFAシンターゼOrfA、PUFAシンターゼOrfB、PUFAシンターゼキメラOrfC、アシル-CoAシンテターゼおよび4'ホスホパンテテイルトランスフェラーゼHetI発現カセットの発現を駆動するために、単独でまたは組み合わせて使用される。プラスミド内の転写調節領域を置き換えるための方法は、当該分野で周知である。このように、PvDlec2プロモーターv2を含むポリヌクレオチドフラグメントをpDAB7362 (またはpDAB7362を構築するために使用した上述のプラスミド) から除去し、新たなプロモーター領域で置き換える。新たに構築されたプラスミドを使用して、ダイズ植物を安定に形質転換する。トランスジェニックダイズ植物を単離し、分子的に特徴付ける。得られたLC-PUFA蓄積を、本明細書中に記載される方法を使用して脂質プロファイル (FAME) を分析することによって決定し、総脂肪酸の重量で0.01%~15%のDHA、総脂肪酸の重量で0.01%~10%のDPA (n-6)、または総脂肪酸の重量で0.01%~10%のEPAを生成するダイズ植物を同定する。

40

【0262】

種子発生において初期に発現するプロモーターの使用

50

実施例 8. 1 : pDAB9166 の構築

pDAB9166 プラスミド (図 14 ; 配列番号 40) は、マルチサイト Gateway L-R 組換え反応を使用して構築した。pDAB9166 は、3つの PUFASinターゼ PTU、1つのホスピランテテニルトランスフェラーゼ PTU およびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ PTU を含む。具体的には、第 1 の PUFASinターゼ PTU は、LfKCS3 プロモーター v1、SzPUFA OrfA v3 および AtuORF23 3' UTR v1 を含む。第 2 の PUFASinターゼ PTU は、LfKCS3 プロモーター v1、SzPUFA OrfB v3 および AtuOrf23 3' UTR v1 を含む。第 3 の PUFASinターゼ PTU は、LfKCS3 プロモーター v1、hSzThPUFA OrfC v3 および AtuORF23 3' UTR v1 を含む。ホスピランテテニルトランスフェラーゼ PTU は、LfKCS3 プロモーター v1、NoHetI v3 および AtuORF23 3' UTR v1 を含む。

【0263】

プラスミド pDAB9161、pDAB9162、pDAB9163、pDAB101484 および pDAB7333 を組換えて、pDAB9166 を形成した。具体的には、上記 4 つの PTU を、植物形質転換バイナリー pDAB7333 の T鎖 DNA ボーダー領域内にヘッドトゥテールの方向で配置した。遺伝子の順序は：SzPUFA OrfA v3、SzPUFA OrfB v3、hSzThPUFA OrfC v3、NoHetI v3 である。pDAB7333 は、Overdrive および T鎖 ボーダー配列 (T-DNA Border A および T-DNA Border B) などの他の調節エレメントに加えて、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ PTU : CsVMV プロモーター v2、PAT v5、AtuORF1 3' UTR v4 もまた含む。次いで、5 つの PTU を含む組換えプラスミドを単離し、制限酵素消化および DNA 配列決定を用いて 5 つの PTU の組込みについて試験した。

【0264】

実施例 8. 2 : pDAB9167 の構築

pDAB9167 プラスミド (図 15 ; 配列番号 41) は、マルチサイト Gateway L-R 組換え反応を使用して構築した。pDAB9167 は、3つの PUFASinターゼ PTU、1つのホスピランテテニルトランスフェラーゼ PTU およびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ PTU を含む。具体的には、第 1 の PUFASinターゼ PTU は、LfKCS3 プロモーター v1、SzPUFA OrfA v3 および AtuORF23 3' UTR v1 を含む。第 2 の PUFASinターゼ PTU は、BoACP プロモーター v1、BoACP 5' UTR v1、SzPUFA OrfB v3 および AtuOrf23 3' UTR v1 を含む。第 3 の PUFASinターゼ PTU は、LfKCS3 プロモーター v1、hSzThPUFA OrfC v3 および AtuORF23 3' UTR v1 を含む。ホスピランテテニルトランスフェラーゼ PTU は、BoACP プロモーター v1、BoACP 5' UTR v1、NoHetI v3 および AtuORF23 3' UTR v1 を含む。

【0265】

プラスミド pDAB9161、pDAB9165、pDAB9163、pDAB101485 および pDAB7333 を組換えて、pDAB9167 を形成した。具体的には、上記 4 つの PTU を、植物形質転換バイナリー pDAB7333 の T鎖 DNA ボーダー領域内にヘッドトゥテールの方向で配置した。遺伝子の順序は：SzPUFA OrfA v3、SzPUFA OrfB v3、hSzThPUFA OrfC v3、NoHetI v3 である。pDAB7333 は、Overdrive および T鎖 ボーダー配列 (T-DNA Border A および T-DNA Border B) などの他の調節エレメントに加えて、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ PTU : CsVMV プロモーター v2、PAT v5、AtuORF1 3' UTR v4 もまた含む。次いで、5 つの PTU を含む組換えプラスミドを単離し、制限酵素消化および DNA 配列決定を用いて 5 つの PTU の組込みについて試験した。

【0266】

ファゼオリンプロモーターを含むプラスミド

実施例 8. 3: pDAB7379 の構築

pDAB7379 は、コドン最適化された再構築バージョンの SzPUFA OrfA、SzPUFA OrfB、hSzThPUFA OrfC および NoHetI を含むように構築されたバイナリープラスミドである。SzACS-2 遺伝子配列はこの構築物中には含まれない。pDAB7379 プラスミド (図 16; 配列番号 42) を、マルチサイト Gateway L-R 組換え反応を使用して構築した。

【0267】

pDAB7379 は、3つの PUFA シンターゼ PTU、1つのホスホパンテティニルトランスフェラーゼ PTU およびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ PTU を含む。具体的には、第 1 の PUFA シンターゼ PTU は、PvPhas プロモーター v3、PvPhas 5' UTR、SzPUFA OrfA v3 および AtuORF23 3' UTR v1 を含む。第 2 の PUFA シンターゼ PTU は、PvPhas プロモーター v3、PvPhas 5' UTR、SzPUFA OrfB v3 および AtuORF23 3' UTR v1 を含む。第 3 の PUFA シンターゼ PTU は、PvPhas プロモーター v3、PvPhas 5' UTR、hSzThPUFA OrfC v3 および AtuORF23 3' UTR v1 を含む。ホスホパンテティニルトランスフェラーゼ PTU は、PvPhas プロモーター v3、PvPhas 5' UTR、NoHetI v3 および AtuORF23 3' UTR v1 を含む。

【0268】

プラスミド pDAB7371、pDAB7372、pDAB7373、pDAB7374 および pDAB7333 を組換えて、pDAB7379 を形成した。具体的には、上記 4 つの PTU を、植物形質転換バイナリー pDAB7333 の T 鎖 DNA ボーダー領域内にヘッドトゥテールの方向で配置した。遺伝子の順序は: SzPUFA OrfA v3、SzPUFA OrfB v3、hSzThPUFA OrfC v3、NoHetI v3 である。pDAB7333 は、Overdrive および T 鎖 ボーダー配列 (T-DNA Border A および T-DNA Border B) などの他の調節エレメントに加えて、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ PTU: CsVMV プロモーター v2、PAT v5、AtuORF1 3' UTR v4 もまた含む。次いで、5 つの PTU を含む組換えプラスミドを単離し、制限酵素消化および DNA 配列決定を用いて 5 つの PTU の組込みについて試験した。

【0269】

実施例 8. 4: pDAB7380 の構築

pDAB7380 は、コドン最適化された再構築バージョンの SzPUFA OrfA、SzPUFA OrfB、hSzThPUFA OrfC および NoHetI を含むように構築されたバイナリープラスミドである。SzACS-2 遺伝子配列はこの構築物中には含まれない。この構築物において使用されるファゼオリンプロモーターのバージョンを、Bustos ら、1989 (The Plant Cell, Vol. 1; 839-853) に記載されるように本質的に改変したが、このとき、プロモーターの 5' 部分を短縮させ、ファゼオリンの 5' 非翻訳領域をインタクトなままにした。pDAB7380 プラスミド (図 17; 配列番号 43) を、マルチサイト Gateway L-R 組換え反応を使用して構築した。

【0270】

pDAB7380 は、3つの PUFA シンターゼ PTU、1つのホスホパンテティニルトランスフェラーゼ PTU およびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ PTU を含む。具体的には、第 1 の PUFA シンターゼ PTU は、PvPhas プロモーター v4、PvPhas 5' UTR、SzPUFA OrfA v3 および AtuORF23 3' UTR v1 を含む。第 2 の PUFA シンターゼ PTU は、PvPhas プロモーター v4、PvPhas 5' UTR、SzPUFA OrfB v3 および AtuORF23 3' UTR v1 を含む。第 3 の PUFA シンターゼ PTU は、PvPhas プ

ロモーター v 4、P v P h a s 5' UTR、h S z T h P U F A O r f C v 3 およ
び A t u O R F 2 3 3' UTR v 1 を含む。ホスホパンテティニルトランスフェラー
ゼ P T U は、P v P h a s プロモーター v 5、P v P h a s 5' UTR、N o H e t I
v 3 および A t u O R F 2 3 3' UTR v 1 を含む。

【0271】

プラスミド p D A B 7 3 7 5、p D A B 7 3 7 6、p D A B 7 3 7 7、p D A B 7 3 7
8 および p D A B 7 3 3 3 を組換えて、p D A B 7 3 8 0 を形成した。具体的には、上記
4 つの P T U を、植物形質転換バイナリー p D A B 7 3 3 3 の T 鎖 DNA ボーダー領域内
にヘッドトゥテールの方向で配置した。遺伝子の順序は：S z P U F A O r f A v
3、S z P U F A O r f B v 3、h S z T h P U F A O r f C v 3、N o H e t I
v 3 である。p D A B 7 3 3 3 は、O v e r d r i v e および T 鎖ボーダー配列（T
- D N A B o r d e r A および T - D N A B o r d e r B）などの他の調節エレ
メントに加えて、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ P T U：C s V M V プ
ロモーター v 2、P A T v 5、A t u O R F 1 3' UTR v 4 もまた含む。次いで
、5 つの P T U を含む組換えプラスミドを単離し、制限酵素消化および DNA 配列決定を
用いて 5 つの P T U の組込みについて試験した。

【0272】

実施例 8. 5：p D A B 9 3 2 3 の構築

p D A B 9 3 2 3 は、ネイティブのコドン最適化されていないバージョンの S z P U F
A O r f A、S z P U F A O r f B、h S z T h P U F A O r f C、S z A C S -
2 および N o H e t I を含むように構築されたバイナリープラスミドである。p D A B 9
3 2 3 プラスミド（図 18；配列番号 44）を、マルチサイト Gateway L - R 組
換え反応を使用して構築した。

【0273】

p D A B 9 3 2 3 は、3 つの P U F A シンターゼ P T U、1 つのアシル Co A シンテ
ターゼ P T U、1 つのホスホパンテティニルトランスフェラーゼ P T U およびホスフィノ
トリシンアセチルトランスフェラーゼ P T U を含む。具体的には、第 1 の P U F A シン
ターゼ P T U は、P v P h a s プロモーター v 3、P v P h a s 5' UTR、S z P U F
A O r f A v 2、P v P h a s 3' UTR v 1 および P v P h a s 3' M A
R v 2（プラスミドマップ上にアノテートされていない）を含む。第 2 の P U F A シン
ターゼ P T U は、P v P h a s プロモーター v 3、P v P h a s 5' UTR、S z P U
F A O r f B v 2、P v P h a s 3' UTR v 1 および P v P h a s 3' M A
R v 2（プラスミドマップ上にアノテートされていない）を含む。第 3 の P U F A シン
ターゼ P T U は、P v P h a s プロモーター v 3、P v P h a s 5' UTR、S z P U
F A O r f C v 2、P v P h a s 3' UTR v 1 および P v P h a s 3' M A
R v 2（プラスミドマップ上にアノテートされていない）を含む。アシル Co A シン
テターゼ P T U は、P v P h a s プロモーター v 3、P v P h a s 5' UTR、S z A
C S - 2 v 2 遺伝子、P v P h a s 3' UTR v 1 および P v P h a s 3' M A
R v 2（プラスミドマップ上にアノテートされていない）を含む。ホスホパンテティニ
ルトランスフェラーゼ P T U は、P v P h a s プロモーター v 3、P v P h a s 5' U
TR、N o H e t I v 2、P v P h a s 3' UTR v 1 および P v P h a s 3'
M A R v 2（プラスミドマップ上にアノテートされていない）を含む。

【0274】

プラスミド p D A B 9 3 0 7、p D A B 9 3 1 1、p D A B 9 3 1 5、p D A B 9 3 2
2 および p D A B 7 3 3 3 を組換えて、p D A B 9 3 2 3 を形成した。具体的には、上記
5 つの P T U を、植物形質転換バイナリー p D A B 7 3 3 3 の T 鎖 DNA ボーダー領域内
にヘッドトゥテールの方向で配置した。遺伝子の順序は：S z P U F A O r f A v
2、S z P U F A O r f B v 2、S z P U F A O r f C v 2、N o H e t I v
2 である。p D A B 7 3 3 3 は、O v e r d r i v e および T 鎖ボーダー配列（T - D N
A B o r d e r A および T - D N A B o r d e r B）などの他の調節エレメント

10

20

30

40

50

に加えて、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTU：CsVMVプロモーターv2、PAT v5、AtuORF1 3'UTR v4もまた含む。次いで、6つのPTUを含む組換えプラスミドを単離し、制限酵素消化およびDNA配列決定を用いて6つのPTUの組み込みについて試験した。

【0275】

実施例8.6：pDAB9330の構築

pDAB9330は、コドン最適化された再構築バージョンのSzPUFA OrfA、SzPUFA OrfB、hSzThPUFA OrfC、SzACS-2およびNoHetIを含むように構築されたバイナリープラスミドである。pDAB9330プラスミド（図19；配列番号45）を、マルチサイトGateway L-R組換え反応を使用して構築した。pDAB9330は、3つのPUFAシンターゼPTU、1つのアシル-CoAシンターゼPTU、1つのホスホパンテテイニルトランスフェラーゼPTUおよびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTUを含む。具体的には、第1のPUFAシンターゼPTUは、PvPhasプロモーターv3、PvPhas 5'UTR、SzPUFA OrfA v3、PvPhas 3'UTR v1およびPvPhas 3'MAR v2（プラスミドマップ上にアノテートされていない）を含む。第2のPUFAシンターゼPTUは、PvPhasプロモーターv3、PvPhas 5'UTR、SzPUFA OrfB v3、PvPhas 3'UTRおよびPvPhas 3'MAR v2（プラスミドマップ上にアノテートされていない）を含む。第3のPUFAシンターゼPTUは、PvPhasプロモーターv3、PvPhas 5'UTR、hSzThPUFA OrfC v3、PvPhas 3'UTR v1およびPvPhas 3'MAR v2（プラスミドマップ上にアノテートされていない）を含む。アシル-CoAシンターゼPTUは、PvPhasプロモーターv3、PvPhas 5'UTR、SzACS-2 v3遺伝子、PvPhas 3'UTR v1およびPvPhas 3'MAR v2（プラスミドマップ上にアノテートされていない）を含む。ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼPTUは、PvPhasプロモーターv3、PvPhas 5'UTR、NoHetI v3、PvPhas 3'UTR v1およびPvPhas 3'MAR v2（プラスミドマップ上にアノテートされていない）を含む。

【0276】

プラスミドpDAB9324、pDAB9325、pDAB9326、pDAB9329およびpDAB7333を組換えて、pDAB9330を形成した。具体的には、上記5つのPTUを、植物形質転換バイナリーpDAB7333のT鎖DNAボーダー領域内にヘッドトゥーテールの方向で配置した。遺伝子の順序は：SzPUFA OrfA v3、SzPUFA OrfB v3、hSzThPUFA OrfC v3、SzACS-2 v3、NoHetI v3である。pDAB7333は、OverdriveおよびT鎖ボーダー配列（T-DNA Border AおよびT-DNA Border B）などの他の調節エレメントに加えて、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTU：CsVMVプロモーターv2、PAT v5、AtuORF1 3'UTR v4もまた含む。次いで、6つのPTUを含む組換えプラスミドを単離し、制限酵素消化およびDNA配列決定を用いて6つのPTUの組み込みについて試験した。

【0277】

実施例8.7：pDAB9337の構築

pDAB9337は、ファゼオリンプロモーターによって駆動される、コドン最適化された再構築バージョンのSzPUFA OrfA、SzPUFA OrfB、hSzThPUFA OrfCおよびNoHetI発現を含むように構築されたバイナリープラスミドである。pDAB9337プラスミド（図20；配列番号46）を、マルチサイトGateway L-R組換え反応を使用して構築した。

【0278】

pDAB9337は、3つのPUFAシンターゼPTU、1つのホスホパンテテイニルトランスフェラーゼPTUおよびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTU

を含む。具体的には、第1のPUFAシンターゼPTUは、PvPhasプロモーターv3、PvPhas 5'UTR、SzPUFA OrfA v3、PvPhas 3'UTR v1およびPvPhas 3'MAR v2（プラスミドマップ上にアノテートされていない）を含む。第2のPUFAシンターゼPTUは、PvPhasプロモーターv3、PvPhas 5'UTR、SzPUFA OrfB v3、PvPhas 3'UTR v1およびPvPhas 3'MAR v2（プラスミドマップ上にアノテートされていない）を含む。第3のPUFAシンターゼPTUは、PvPhasプロモーターv3、PvPhas 5'UTR、hSzThPUFA OrfC v3、PvPhas 3'UTR v1およびPvPhas 3'MAR v2（プラスミドマップ上にアノテートされていない）を含む。ホスホパンテティニルトランスフェラーゼPTUは、PvPhasプロモーターv3、PvPhas 5'UTR、NoHetI v3、PvPhas 3'UTR v1およびPvPhas 3'MAR v2（プラスミドマップ上にアノテートされていない）を含む。

10

【0279】

プラスミドpDAB9324、pDAB9325、pDAB9326、pDAB9328およびpDAB7333を組換えて、pDAB9337を形成した。具体的には、上記4つのPTUを、植物形質転換バイナリーpDAB7333のT鎖DNAボーダー領域内にヘッドトゥテールの方向で配置した。遺伝子の順序は：SzPUFA OrfA v3、SzPUFA OrfB v3、hSzThPUFA OrfC v3、NoHetI v3である。pDAB7333は、OverdriveおよびT鎖ボーダー配列（T-DNA Border AおよびT-DNA Border B）などの他の調節エレメントに加えて、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTU：CsVMVプロモーターv2、PAT v5、AtuORF1 3'UTR v4もまた含む。次いで、5つのPTUを含む組換えプラスミドを単離し、制限酵素消化およびDNA配列決定を用いて5つのPTUの組込みについて試験した。

20

【0280】

実施例8. 8：pDAB9338の構築

pDAB9338は、コドン最適化された再構築バージョンのSzPUFA OrfA、SzPUFA OrfB、hSzThPUFA OrfCおよびNoHetIを含むように構築されたバイナリープラスミドである。SzPUFA OrfAの発現を駆動するためにファゼオリンプロモーターを使用し、他の導入遺伝子を駆動するためにPvDlec2プロモーターを使用する。pDAB9338プラスミド（図21；配列番号47）を、マルチサイトGateway L-R組換え反応を使用して構築した。

30

【0281】

pDAB9338は、3つのPUFAシンターゼPTU、1つのホスホパンテティニルトランスフェラーゼPTUおよびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTUを含む。具体的には、第1のPUFAシンターゼPTUは、PvPhasプロモーターv3、PvPhas 5'UTR、SzPUFA OrfA v3、PvPhas 3'UTR v1およびPvPhas 3'MAR v2（プラスミドマップ上にアノテートされていない）を含む。第2のPUFAシンターゼPTUは、PvDlec2プロモーターv2、2S 5'UTR、SzPUFA OrfB v3およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。第3のPUFAシンターゼPTUは、PvDlec2プロモーターv2、2S 5'UTR、hSzThPUFA OrfC v3およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。ホスホパンテティニルトランスフェラーゼPTUは、PvDlec2プロモーターv2、2S 5'UTR、NoHetI v3およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。

40

【0282】

プラスミドpDAB9324、pDAB7335、pDAB7336、pDAB7338およびpDAB7333を組換えて、pDAB9338を形成した。具体的には、上記4つのPTUを、植物形質転換バイナリーpDAB7333のT鎖DNAボーダー領域内

50

にヘッドトゥーテールの方向で配置した。遺伝子の順序は：S z P U F A O r f A v 3、S z P U F A O r f B v 3、h S z T h P U F A O r f C v 3、N o H e t I v 3である。p D A B 7 3 3 3は、O v e r d r i v eおよびT鎖ボーダー配列（T-DNA Border AおよびT-DNA Border B）などの他の調節エレメントに加えて、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTU：C s V M Vプロモーターv 2、P A T v 5、A t u O R F 1 3' U T R v 4もまた含む。次いで、5つのPTUを含む組換えプラスミドを単離し、制限酵素消化およびDNA配列決定を用いて5つのPTUの組込みについて試験した。

【0283】

実施例 8. 9：p D A B 9 3 4 4の構築

p D A B 9 3 4 4は、コード配列のアミノ末端に融合されたリブローズニリン酸カルボキシラーゼ小鎖1A（S S U-T P v 1と標識される）をその全てが含む、コドン最適化された再構築バージョンのS z P U F A O r f A、S z P U F A O r f B、h S z T h P U F A O r f CおよびN o H e t Iを含むように構築されたバイナリープラスミドである。S z P U F A O r f Aの発現を駆動するためにファゼオリンプロモーターを使用し、他の導入遺伝子を駆動するためにP v D l e c 2プロモーターを使用する。

【0284】

p D A B 9 3 4 4プラスミド（図22；配列番号48）を、マルチサイトG a t e w a y L-R組換え反応を使用して構築した。p D A B 9 3 4 4は、3つのP U F AシンターゼPTU、1つのホスホパンテティニルトランスフェラーゼPTUおよびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTUを含む。具体的には、第1のP U F AシンターゼPTUは、P v P h a sプロモーターv 3、P v P h a s 5' U T R、S z P U F A O r f A v 4、P v P h a s 3' U T R v 1およびP v P h a s 3' M A R v 2（プラスミドマップ上にアノテートされていない）を含む。第2のP U F AシンターゼPTUは、P v P h a sプロモーターv 3、P v P h a s 5' U T R、S z P U F A O r f B v 4、P v P h a s 3' U T R v 1およびP v P h a s 3' M A R v 2（プラスミドマップ上にアノテートされていない）を含む。第3のP U F AシンターゼPTUは、P v P h a sプロモーターv 3、P v P h a s 5' U T R、h S z T h P U F A O r f C v 4、P v P h a s 3' U T R v 1およびP v P h a s 3' M A R v 2（プラスミドマップ上にアノテートされていない）を含む。ホスホパンテティニルトランスフェラーゼPTUは、P v P h a sプロモーターv 3、P v P h a s 5' U T R、N o H e t I v 4、P v P h a s 3' U T R v 1およびP v P h a s 3' M A R v 2（プラスミドマップ上にアノテートされていない）を含む。

【0285】

プラスミドp D A B 9 3 4 3、p D A B 9 3 4 2、p D A B 9 3 4 0、p D A B 9 3 3 1およびp D A B 7 3 3 3を組換えて、p D A B 9 3 4 4を形成した。具体的には、上記4つのPTUを、植物形質転換バイナリーp D A B 7 3 3 3のT鎖DNAボーダー領域内にヘッドトゥーテールの方向で配置した。遺伝子の順序は：S z P U F A O r f A v 4、S z P U F A O r f B v 4、h S z T h P U F A O r f C v 4、N o H e t I v 4である。p D A B 7 3 3 3は、O v e r d r i v eおよびT鎖ボーダー配列（T-DNA Border AおよびT-DNA Border B）などの他の調節エレメントに加えて、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTU：C s V M Vプロモーターv 2、P A T v 5、A t u O R F 1 3' U T R v 4もまた含む。次いで、6つのPTUを含む組換えプラスミドを単離し、制限酵素消化およびDNA配列決定を用いて5つのPTUの組込みについて試験した。

【0286】

実施例 8. 10：p D A B 9 3 9 6の構築

p D A B 9 3 9 6は、コドン最適化された再構築バージョンのS z P U F A O r f A、S z P U F A O r f B、h S z T h P U F A O r f C、S z A C S-2およびN o H e t Iを含むように構築されたバイナリープラスミドである。S z P U F A O r f A

および *SzPUFA OrfB* の発現を駆動するためにファゼオリンプロモーターを使用する。他の導入遺伝子； *hSzThPUFA OrfC*、*SzACS-2* および *NoHetI* を駆動するために *PvDlec2* プロモーターを使用する。

【0287】

pDAB9396 プラスミド（図23；配列番号49）を、マルチサイト Gateway L-R組換え反応を使用して構築した。*pDAB9396* は、3つの *PUFA* シンターゼ PTU、1つのホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ PTU およびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ PTU を含む。具体的には、第1の *PUFA* シンターゼ PTU は、*PvPhas* プロモーター *v3*、*PvPhas* 5' UTR、*SzPUFA OrfA v3*、*PvPhas* 3' UTR *v1* および *PvPhas* 3' MAR *v2*（プラスミドマップ上にアノテートされていない）を含む。第2の *PUFA* シンターゼ PTU は、*PvDlec2* プロモーター *v2*、*2S* 5' UTR、*SzPUFA OrfB v3* および *At2S SSP* ターミネーター *v1* を含む。第3の *PUFA* シンターゼ PTU は、*PvDlec2* プロモーター *v2*、*2S* 5' UTR、*hSzThPUFA OrfC v3* および *At2S SSP* ターミネーター *v1* を含む。アシル-CoA シンテターゼ PTU は、*PvPhas* プロモーター *v3*、*PvPhas* 5' UTR、*SzACS-2 v3* 遺伝子、*PvPhas* 3' UTR *v1* および *PvPhas* 3' MAR *v2*（プラスミドマップ上にアノテートされていない）を含む。ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ PTU は、*PvDlec2* プロモーター *v2*、*2S* 5' UTR、*NoHetI v3* および *At2S SSP* ターミネーター *v1* を含む。

【0288】

プラスミド *pDAB9324*、*pDAB7335*、*pDAB7336*、*pDAB7339* および *pDAB7333* を組換えて、*pDAB9338* を形成した。具体的には、上記5つの PTU を、植物形質転換バイナリー *pDAB7333* の T鎖 DNA ボーダー領域内にヘッドトゥーテールの方向で配置した。遺伝子の順序は：*SzPUFA OrfA v3*、*SzPUFA OrfB v3*、*hSzThPUFA OrfC v3*、*SzACS-2 v3*、*NoHetI v3* である。*pDAB7333* は、*Overdrive* および T鎖 ボーダー配列（T-DNA Border A および T-DNA Border B）などの他の調節エレメントに加えて、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ PTU：*CsVMV* プロモーター *v2*、*PAT v5*、*AtuORF1 3' UTR v4* もまた含む。次いで、5つの PTU を含む組換えプラスミドを単離し、制限酵素消化および DNA 配列決定を用いて6つの PTU の組込みについて試験した。

【0289】

実施例8. 11：*pDAB101412* の構築

pDAB101412 は、コドン最適化された再構築バージョンの *SzPUFA OrfA*、*SzPUFA OrfB*、*hSzThPUFA OrfC*、*SzACS-2* および *NoHetI* を含むように構築されたバイナリープラスミドである。この構築物において使用されるファゼオリンプロモーターのバージョンを、Bustosら、1989 (The Plant Cell, Vol. 1; 839-853) に記載されるように本質的に改変したが、このとき、プロモーターの5'部分を短縮させ、ファゼオリンの5'非翻訳領域をインタクトなままにした。短縮型ファゼオリンプロモーター配列は、本出願を通じてバージョン4 (*v4*)、バージョン5 (*v5*) およびバージョン6 (*v6*) と特定される。*pDAB101412* プラスミド（図24；配列番号50）を、マルチサイト Gateway L-R組換え反応を使用して構築した。

【0290】

pDAB101412 は、3つの *PUFA* シンターゼ PTU、1つのアシル-CoA シンテターゼ PTU、1つのホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ PTU およびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ PTU を含む。具体的には、第1の *PUFA* シンターゼ PTU は、*PvPhas* プロモーター *v4*、*PvPhas* 5' UTR、*SzPUFA OrfA v3* および *AtuORF23 3' UTR v1* を含む。第2の *PU*

FAシンターゼPTUは、PvPhasプロモーターv4、PvPhas 5'UTR、SzPUFA OrfB v3およびAtuORF23 3'UTR v1を含む。第3のPUFAシンターゼPTUは、PvPhasプロモーターv4、PvPhas 5'UTR、hSzThPUFA OrfC v3およびAtuORF23 3'UTR v1を含む。アシル-CoAシンターゼPTUは、PvPhasプロモーターv4、PvPhas 5'UTR、2S 5'UTR、SzACS-2 v3遺伝子およびAtuORF23 5'UTR v1を含む。ホスホバンテティニルトランスフェラーゼPTUは、PvPhasプロモーターv5、PvPhas 5'UTR、NoHetI v3およびAtuORF23 3'UTR v1を含む。

【0291】

プラスミドpDAB7375、pDAB7376、pDAB7377、pDAB7398およびpDAB7333を組換えて、pDAB101412を形成した。具体的には、上記5つのPTUを、植物形質転換バイナリーpDAB7333のT鎖DNAボーダー領域内にヘッドトゥテールの方向で配置した。遺伝子の順序は：SzPUFA OrfA v3、SzPUFA OrfB v3、hSzThPUFA OrfC v3、SzACS-2 v3、NoHetI v3である。pDAB7333は、OverdriveおよびT鎖ボーダー配列（T-DNA Border AおよびT-DNA Border B）などの他の調節エレメントに加えて、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTU：CsVMVプロモーターv2、PAT v5、AtuORF1 3'UTR v4もまた含む。次いで、5つのPTUを含む組換えプラスミドを単離し、制限酵素消化およびDNA配列決定を用いて6つのPTUの組込みについて試験した。

【0292】

種子発生において初期に発現するプロモーターを用いたダイズ形質転換

これらのプラスミドを使用して、上記のプロトコルを使用してダイズ植物を安定に形質転換する。トランスジェニックダイズ植物を単離し、分子的に特徴付ける。代替的構築物の使用は、より多い量のDHAおよびLC-PUFAを含むダイズ植物を生じる。得られたLC-PUFA蓄積を決定し、0.01%~15%のDHAまたは0.01%~15%のLC-PUFAを生成するダイズ植物を同定する。

【実施例9】

【0293】

代替的構築物設計を使用した藻類PUFAシンターゼ遺伝子スイートの発現

調節エレメントの重複を低減させるためにプロモーター多様性を導入する

遺伝子サイレンシングは、トランスジェニックダイズ事象の後代世代において観察されている現象である。Waterhouseら、2001 (Nature 411:834-842)、VaucheretおよびFagard, 2001 (Trends in Genetics 17(1):29-35、ならびにOkamotoおよびHirochika, 2001 (Trends in Plant Sci. 6 (11): 527-534)などのいくつかの総説論文が、転写型遺伝子サイレンシング(TGS)および転写後遺伝子サイレンシング(PTGS)を考察している。植物において、遺伝子サイレンシングは、トランスジェニックポリヌクレオチド配列の重複(縦列反復導入遺伝子配列、逆方向反復導入遺伝子配列、または染色体中への複数の挿入)によって、または標的遺伝子配列に対して相同な配列が感染性植物ウイルス、もしくはアグロバクテリウム・ツメファシエンス(Agrobacterium tumefaciens)のT-DNAのいずれかによって保有される場合に、誘発され得る。

【0294】

さらに、導入遺伝子ポリヌクレオチド配列の重複は、構築物の不安定性の誘発因子として作用し得る。高いレベルの配列類似性を共有する複数の導入遺伝子配列は、互いに折り返すことができる。再編成は相同組換えを介して生じ得、このときDNAの介在配列が切り出される。結果として、反復された導入遺伝子ポリヌクレオチド配列間に位置するDNAのフラグメントが切り出される。

【0295】

プラスミドベクターを設計する際の1つの戦略は、各導入遺伝子の高レベルの発現を維

持する複数の独自の種子特異的プロモーターを組み込むことによって、構築物にプロモーター多様性を導入することである。プラスミドベクターにプロモーター配列多様性を導入することは、遺伝子サイレンシングを低減させ、プラスミド安定性を改善することができる。複数の種子特異的プロモーターには、P v D l e c 2、ファゼオリンおよびN a p i nが含まれる（米国特許第5, 608, 152号）。これらのプロモーターは、例えば組織特異性、発現のレベル、発現の持続時間などのプロモーター活性において、比較的匹敵する。

【0296】

実施例9. 1: p D A B 7 7 3 3の構築

p D A B 7 7 3 3プラスミド（図25；配列番号51）を、マルチサイトG a t e w a y L-R組換え反応を使用して構築した。p D A B 7 7 3 3は、3つのP U F AシンターゼP T U、1つのホスホパンテティニルトランスフェラーゼP T UおよびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼP T Uを含む。具体的には、第1のP U F AシンターゼP T Uは、P v P h a sプロモーターv 4、P v P h a s 5' U T R、S z P U F A O r f A v 3およびA t u O R F 2 3 3' U T R v 1を含む。第2のP U F AシンターゼP T Uは、B n a N a p i n Cプロモーターv 1、B n a N a p i n C 5' U T R、S z P U F A O r f B v 3およびB n a N a p i n C 3' U T R v 1を含む。第3のP U F AシンターゼP T Uは、P v D l e c 2プロモーターv 2、2 S 5' U T R、h S z T h P U F A O r f C v 3およびA t 2 S S S Pターミネーターv 1を含む。ホスホパンテティニルトランスフェラーゼP T Uは、P v P h a sプロモーターv 5、P v P h a s 5' U T R、N o H e t I v 3およびA t u O r f 2 3 3' U T R v 1を含む。

【0297】

プラスミドp D A B 7 3 7 5、p D A B 7 7 3 1、p D A B 7 3 3 6、p D A B 7 3 7 8およびp D A B 7 3 3 3を組換えて、p D A B 7 7 3 3を形成した。具体的には、上記4つのP T Uを、植物形質転換バイナリーp D A B 7 3 3 3のT鎖DNAボーダー領域内にヘッドトゥーテールの方向で配置した。遺伝子の順序は：S z P U F A O r f A v 3、S z P U F A O r f B v 3、h S z T h P U F A O r f C v 3、N o H e t I v 3である。p D A B 7 3 3 3は、O v e r d r i v eおよびT鎖ボーダー配列（T-DNA B o r d e r AおよびT-DNA B o r d e r B）などの他の調節エレメントに加えて、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼP T U：C s V M Vプロモーターv 2、P A T v 5、A t u O R F 1 3' U T R v 4もまた含む。次いで、5つのP T Uを含む組換えプラスミドを単離し、制限酵素消化およびDNA配列決定を用いて5つのP T Uの組込みについて試験した。

【0298】

実施例9. 2: p D A B 7 7 3 4の構築

p D A B 7 7 3 4バイナリープラスミド（図26；配列番号52）を、マルチサイトG a t e w a y L-R組換え反応を使用して構築した。p D A B 7 7 3 4は、3つのP U F AシンターゼP T U、1つのホスホパンテティニルトランスフェラーゼP T UおよびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼP T Uを含む。具体的には、第1のP U F AシンターゼP T Uは、P v D l e c 2プロモーターv 2、2 S 5' U T R、S z P U F A O r f A v 3およびA t 2 S S S Pターミネーターv 1を含む。第2のP U F AシンターゼP T Uは、P v P h a sプロモーターv 4、P v P h a s 5' U T R、S z P U F A O r f B v 3およびA t u O R F 2 3 3' U T R v 1を含む。第3のP U F AシンターゼP T Uは、B n a N a p i n Cプロモーターv 1、B n a N a p i n C 5' U T R、h S z T h P U F A O r f C v 3およびB n a N a p i n C 3' U T R v 1を含む。ホスホパンテティニルトランスフェラーゼP T Uは、P v D l e c 2プロモーターv 2、2 S 5' U T R、N o H e t I v 3およびA t 2 S S S Pターミネーターv 1を含む。

【0299】

10

20

30

40

50

プラスミド pDAB7334、pDAB7376、pDAB7732、pDAB7338 および pDAB7333 を組換えて、pDAB7734 を形成した。具体的には、上記 4 つの PTU を、植物形質転換バイナリー pDAB7333 の T 鎖 DNA ボーダー領域内にヘッドトゥテールの方向で配置した。遺伝子の順序は：SzPUFA OrfA v3、SzPUFA OrfB v3、hSzThPUFA OrfC v3、NoHetI v3 である。pDAB7333 は、Overdrive および T 鎖ボーダー配列 (T-DNA Border A および T-DNA Border B) などの他の調節エレメントに加えて、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ PTU：CsVMV プロモーター v2、PAT v5、AtuORF1 3' UTR v4 もまた含む。次いで、5 つの PTU を含む組換えプラスミドを単離し、制限酵素消化および DNA 配列決定を用いて 5 つの PTU の組込みについて試験した。

10

【0300】

実施例 9. 3：pDAB101493 の構築

pDAB101493 バイナリープラスミド (図 27；配列番号 53) を、マルチサイト Gateway L-R 組換え反応を使用して構築した。pDAB101493 は、3 つの PUFA シンターゼ PTU、1 つのホスホパンテティニルトランスフェラーゼ PTU およびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ PTU を含む。具体的には、第 1 の PUFA シンターゼ PTU は、PvDlec2 プロモーター v2、2S 5' UTR、SzPUFA OrfA v3 および At2S SSPターミネーター v1 を含む。第 2 の PUFA シンターゼ PTU は、PvPhas プロモーター v4、PvPhas 5' UTR、SzPUFA OrfB v3 および AtuORF23 3' UTR v1 を含む。第 3 の PUFA シンターゼ PTU は、PvDlec2 プロモーター v2、2S 5' UTR、hSzThPUFA OrfC v3 および At2S SSPターミネーター v1 を含む。ホスホパンテティニルトランスフェラーゼ PTU は、PvPhas プロモーター v5、PvPhas 5' UTR、NoHetI v3 および AtuOrf23 3' UTR v1 を含む。

20

【0301】

プラスミド pDAB7334、pDAB7376、pDAB7336、pDAB7378 および pDAB7333 を組換えて、pDAB101493 を形成した。具体的には、上記 4 つの PTU を、植物形質転換バイナリー pDAB7333 の T 鎖 DNA ボーダー領域内にヘッドトゥテールの方向で配置した。遺伝子の順序は：SzPUFA OrfA v3、SzPUFA OrfB v3、hSzThPUFA OrfC v3、NoHetI v3 である。pDAB7333 は、Overdrive および T 鎖ボーダー配列 (T-DNA Border A および T-DNA Border B) などの他の調節エレメントに加えて、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ PTU：CsVMV プロモーター v2、PAT v5、AtuORF1 3' UTR v4 もまた含む。次いで、5 つの PTU を含む組換えプラスミドを単離し、制限酵素消化および DNA 配列決定を用いて 5 つの PTU の組込みについて試験した。

30

【0302】

実施例 9. 4：pDAB109507 の構築

pDAB109507 プラスミド (図 28；配列番号 54) を、マルチサイト Gateway L-R 組換え反応を使用して構築した。pDAB109507 は、3 つの PUFA シンターゼ PTU、1 つのホスホパンテティニルトランスフェラーゼ PTU およびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ PTU を含む。具体的には、第 1 の PUFA シンターゼ PTU は、PvPhas プロモーター v3、PvPhas 5' UTR、SzPUFA OrfA v3 および PvPhas 3' UTR v1 および PvPhas 3' MAR v2 (プラスミドマップ上にアノテートされていない) を含む。第 2 の PUFA シンターゼ PTU は、BnaNapinC プロモーター v1、BnaNapinC 5' UTR、SzPUFA OrfB v3 および BnaNapinC 3' UTR v1 を含む。第 3 の PUFA シンターゼ PTU は、PvDlec2 プロモーター v2、2S

40

50

5'UTR、hSzThPUFA OrfC v3およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼPTUは、BoACPプロモーター/5'UTR v1、NoHetI v3およびAtuOrf23 3'UTR v1を含む。

【0303】

プラスミドpDAB9324、pDAB7731、pDAB7336、pDAB101485およびpDAB7333を組換えて、pDAB109507を形成した。具体的には、上記4つのPTUを、植物形質転換バイナリーpDAB7333のT鎖DNAボーダー領域内にヘッドトゥテールの方向で配置した。遺伝子の順序は：SzPUFA OrfA v3、SzPUFA OrfB v3、hSzThPUFA OrfC v3、NoHetI v3である。pDAB7333は、OverdriveおよびT鎖ボーダー配列(T-DNA Border AおよびT-DNA Border B)などの他の調節エレメントに加えて、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTU：CsVMVプロモーターv2、PAT v5、AtuORF1 3'UTR v4もまた含む。次いで、5つのPTUを含む組換えプラスミドを単離し、制限酵素消化およびDNA配列決定を用いて5つのPTUの組込みについて試験した。

【0304】

実施例9.5：pDAB109508の構築

pDAB109508プラスミド(図29；配列番号55)を、マルチサイトGateway L-R組換え反応を使用して構築した。pDAB109508は、3つのPUFAシンターゼPTU、1つのホスホパンテテイニルトランスフェラーゼPTUおよびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTUを含む。具体的には、第1のPUFAシンターゼPTUは、PvPhasプロモーターv3、PvPhas 5'UTR、SzPUFA OrfA v3およびPvPhas 3'UTR v1およびPvPhas 3'MAR v2(プラスミドマップ上にアノテートされていない)を含む。第2のPUFAシンターゼPTUは、BnaNapinCプロモーターv1、BnaNapinC 5'UTR、SzPUFA OrfB v3およびBnaNapinC 3'UTR v1を含む。第3のPUFAシンターゼPTUは、PvDlec2プロモーターv2、2S 5'UTR、hSzThPUFA OrfC v3およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼPTUは、PvDlec2プロモーターv2、2S 5'UTR、NoHetI v3およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。

【0305】

プラスミドpDAB9324、pDAB7731、pDAB7336、pDAB7338およびpDAB7333を組換えて、pDAB109508を形成した。具体的には、上記4つのPTUを、植物形質転換バイナリーpDAB7333のT鎖DNAボーダー領域内にヘッドトゥテールの方向で配置した。遺伝子の順序は：SzPUFA OrfA v3、SzPUFA OrfB v3、hSzThPUFA OrfC v3、NoHetI v3である。pDAB7333は、OverdriveおよびT鎖ボーダー配列(T-DNA Border AおよびT-DNA Border B)などの他の調節エレメントに加えて、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTU：CsVMVプロモーターv2、PAT v5、AtuORF1 3'UTR v4もまた含む。次いで、5つのPTUを含む組換えプラスミドを単離し、制限酵素消化およびDNA配列決定を用いて5つのPTUの組込みについて試験した。

【0306】

実施例9.6：pDAB109509の構築

pDAB109509プラスミド(図30；配列番号56)を、マルチサイトGateway L-R組換え反応を使用して構築した。pDAB109509は、3つのPUFAシンターゼPTU、1つのホスホパンテテイニルトランスフェラーゼPTUおよびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTUを含む。具体的には、第1のPUFA

シンターゼPTUは、PvD1ec2プロモーターv2、2S 5'UTR、SzPUFA OrfA v3およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。第2のPUFAシンターゼPTUは、PvD1ec2プロモーターv2、2S 5'UTR、SzPUFA OrfB v3およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。第3のPUFAシンターゼPTUは、PvD1ec2プロモーターv2、2S 5'UTR、hSzThPUFA OrfC v3およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。ホスホパンテティニルトランスフェラーゼPTUは、BoACPプロモーター/5'UTR v1、NoHetI v3およびAtuOrf23 3'UTR v1を含む。

【0307】

プラスミドpDAB7334、pDAB7335、pDAB7336、pDAB101485およびpDAB7333を組換えて、pDAB109509を形成した。具体的には、上記4つのPTUを、植物形質転換バイナリーpDAB7333のT鎖DNAボーダー領域内にヘッドトゥテールの方向で配置した。遺伝子の順序は：SzPUFA OrfA v3、SzPUFA OrfB v3、hSzThPUFA OrfC v3、NoHetI v3である。pDAB7333は、OverdriveおよびT鎖ボーダー配列（T-DNA Border AおよびT-DNA Border B）などの他の調節エレメントに加えて、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTU：CsVMVプロモーターv2、PAT v5、AtuORF1 3'UTR v4もまた含む。次いで、5つのPTUを含む組換えプラスミドを単離し、制限酵素消化およびDNA配列決定を用いて5つのPTUの組込みについて試験した。

【0308】

長い遺伝子配列のフラグメント化を低減するための、バイナリー構築物PTUの順序の再編成

SzPUFA OrfA PTUを、バイナリー構築物の3'末端に配置して、PTUカセットの順序が単離されたトランスジェニック事象においてフラグメント化および再編成を低減させ得るかどうかを試験した。SzPUFA OrfAは、9つの縦列アシルキアタンパク質反復を含む大きいオープンリーディングフレーム（約8,700塩基対）である。完成した構築物の第1シリーズにおいて、SzPUFA OrfA PTUを、植物染色体中に最初に組み込まれるように位置付けた。分子サイズが減少するので、SzPUFA OrfA PTUには、残りのPUFA合成関連遺伝子PTUを後に続けた。SzPUFA OrfAコード領域の分子分析により、いくつかのトランスジェニックキャノーラおよびシロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）事象がフラグメント化された挿入物を含むことが示された。PUFAシンターゼPTUの順序が、以下の立体配置；hSzThPUFA OrfC PTU、SzPUFA OrfB PTU、NoHetI PTU、SzPUFA OrfA PTUおよびPAT PTUへと変化した、代替的構築物設計が記載される。単離されたトランスジェニック事象におけるフラグメント化および再編成を低減させるために、バイナリー構築物上のSzPUFA OrfA PTUの位置を変化させることを完了させる。

【0309】

実施例9.7：pDAB9151の構築

pDAB9151プラスミド（図31；配列番号57）を、マルチサイトGateway L-R組換え反応を使用して構築した。pDAB9151は、3つのPUFAシンターゼPTU、1つのホスホパンテティニルトランスフェラーゼPTUおよびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTUを含む。具体的には、第1のPUFAシンターゼPTUは、PvD1ec2プロモーターv2、2S 5'UTR、SzPUFA OrfB v3およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。第2のPUFAシンターゼPTUは、PvD1ec2プロモーターv2、2S 5'UTR、hSzThPUFA OrfC v3およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。ホスホパンテティニルトランスフェラーゼPTUは、PvD1ec2プロモーターv2、2S 5'UTR、NoHetI v3およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。最後のPUF

AシンターゼPTUは、PvD1ec2プロモーターv2、2S 5'UTR、SzPUFA OrfA v3およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。

【0310】

プラスミドpDAB9148、pDAB7335、pDAB9149、pDAB9150およびpDAB7333を組換えて、pDAB9151を形成した。具体的には、上記4つのPTUを、植物形質転換バイナリーpDAB7333のT鎖DNAボーダー領域内にヘッドトゥーテールの方向で配置した。遺伝子の順序は：hSzThPUFA OrfC v3、SzPUFA OrfB v3、NoHetI v3、SzPUFA OrfA v3である。pDAB7333は、OverdriveおよびT鎖ボーダー配列（T-DNA Border AおよびT-DNA Border B）などの他の調節エレメントに加えて、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTU：CsVMVプロモーターv2、PAT v5、AtuORF1 3'UTR v4もまた含む。次いで、5つのPTUを含む組換えプラスミドを単離し、制限酵素消化およびDNA配列決定を用いて5つのPTUの組込みについて試験した。

【0311】

構築物多様性を導入するためにバイナリー構築物PTUの転写方向を変化させる

代替的構築物設計は、PUFAシンターゼPTUの順序および遺伝子発現カセットの転写方向を変化させることを含む。完成した構築物の第1シリーズにおいて、各遺伝子発現カセットを同じ方向で位置付けた（「ヘッドトゥーテール」、このとき、1つの遺伝子発現カセットのプロモーターは、第2の遺伝子発現カセットの3'UTRに隣接して位置する）。以下の構築物は、遺伝子発現カセットが異なる方向で位置付けられる、代替的プロモーターを利用する戦略を記載している。これらの例において、両方の遺伝子発現カセットのプロモーターが互いに隣接して操作されるように、遺伝子発現カセットは、第2の遺伝子発現カセットに対してtransに位置する。この立体配置は、「ヘッドトゥーヘッド」立体配置と記載される。両方の遺伝子発現カセットの3'UTRが互いに隣接して操作されるように、1つの遺伝子発現カセットが第2の遺伝子発現カセットに対してtransに位置する例において、他の立体配置が記載される。この立体配置は「テールトゥーテール」立体配置と記載される。かかる設計の潜在的なリードスルーを軽減するために、二方向Orf23/24ターミネーターが、これら2つのPTU間に配置されている。これらの立体配置は、導入遺伝子の発現を増加させることにより、LC-PUFAおよびDHA脂肪酸のより高い濃度および含量を生じるために、提唱される。

【0312】

実施例9.8：pDAB108207の構築

pDAB108207プラスミド（図32；配列番号58）を、マルチサイトGateway L-R組換え反応を使用して構築した。pDAB108207は、3つのPUFAシンターゼPTU、1つのホスホパンテイニルトランスフェラーゼPTUおよびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTUを含む。具体的には、第1のPUFAシンターゼPTUは、PvD1ec2プロモーターv2、2S 5'UTR、SzPUFA OrfA v3およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。ホスホパンテイニルトランスフェラーゼPTUは、PvPhasプロモーターv6、PvPhas 5'UTR、NoHetI v3、PvPhas 3'UTR v1およびPvPhas 3'MAR v2（プラスミドマップ上にアノテートされていない）を含む。第2のPUFAシンターゼPTUは、PvD1ec2プロモーターv2、2S 5'UTR、hSzThPUFA OrfC v3、At2S SSPターミネーターv1およびAtuORF23 3'UTR v1を含む。第3のPUFAシンターゼPTUは、PvPhasプロモーターv6、PvPhas 5'UTR、SzPUFA OrfB v3、PvPhas 3'UTRおよびPvPhas 3'MAR v2（プラスミドマップ上にアノテートされていない）ならびにAtuORF23 3'UTR v1を含む。

【0313】

プラスミドpDAB7334、pDAB101489、pDAB108205、pDA

B108206およびpDAB7333を組換えて、pDAB108207を形成した。具体的には、植物形質転換バイナリーpDAB7333のT鎖DNAボーダー領域内にSzPUFA OrfA v3およびNoHetI v3をテールトゥーテール方向で配置し；NoHetI v3およびhSzThPUFA OrfC v3をヘッドトゥーヘッド方向で配置し；hSzThPUFA OrfC v3およびSzPUFA OrfBを、テールトゥーテール方向で配置する。遺伝子の順序は：SzPUFA OrfA v3、NoHetI v3、hSzThPUFA OrfC v3、SzPUFA OrfB v3である。pDAB7333は、OverdriveおよびT鎖ボーダー配列（T-DNA Border AおよびT-DNA Border B）などの他の調節エレメントに加えて、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTU：CsVMVプロモーターv2、PAT v5、AtuORF1 3'UTR v4もまた含む。次いで、5つのPTUを含む組換えプラスミドを単離し、制限酵素消化およびDNA配列決定を用いて5つのPTUの組込みについて試験した。

10

【0314】

実施例9. 9：pDAB108208の構築

pDAB108208プラスミド（図33；配列番号59）を、マルチサイトGateway L-R組換え反応を使用して構築した。pDAB108208は、3つのPUFAシンターゼPTU、1つのホスホパンテティニルトランスフェラーゼPTUおよびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTUを含む。具体的には、第1のPUFAシンターゼPTUは、PvDlec2プロモーターv2、2S 5'UTR、SzPUFA OrfA v3およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。ホスホパンテティニルトランスフェラーゼPTUは、PvPhasプロモーターv4、PvPhas 5'UTR、NoHetI v3およびAtuORF23 3'UTR v1を含む。第2のPUFAシンターゼPTUは、PvDlec2プロモーターv2、2S 5'UTR、hSzThPUFA OrfC v3およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。第3のPUFAシンターゼPTUは、PvPhasプロモーターv5、PvPhas 5'UTR、SzPUFA OrfB v3、PvPhas 3'UTR、PvPhas 3'MAR v2（プラスミドマップ上にアノテートされていない）ならびにAtuORF23 3'UTR v1を含む。

20

【0315】

プラスミドpDAB108200、pDAB101490、pDAB108201、pDAB108202およびpDAB7333を組換えて、pDAB108208を形成した。具体的には、植物形質転換バイナリーpDAB7333のT鎖DNAボーダー領域内にSzPUFA OrfA v3およびNoHetI v3をヘッドトゥーヘッド方向で配置し；NoHetI v3およびhSzThPUFA OrfC v3をテールトゥーテール方向で配置し；hSzThPUFA OrfC v3およびSzPUFA OrfBを、ヘッドトゥーヘッド方向で配置する。遺伝子の順序は：SzPUFA OrfA v3、NoHetI v3、hSzThPUFA OrfC v3、SzPUFA OrfB v3である。pDAB7333は、OverdriveおよびT鎖ボーダー配列（T-DNA Border AおよびT-DNA Border B）などの他の調節エレメントに加えて、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTU：CsVMVプロモーターv2、PAT v5、AtuORF1 3'UTR v4もまた含む。次いで、5つのPTUを含む組換えプラスミドを単離し、制限酵素消化およびDNA配列決定を用いて5つのPTUの組込みについて試験した。

30

40

【0316】

実施例9. 10：pDAB108209の構築

pDAB108209プラスミド（図34；配列番号60）を、マルチサイトGateway L-R組換え反応を使用して構築した。pDAB108209は、3つのPUFAシンターゼPTU、1つのホスホパンテティニルトランスフェラーゼPTUおよびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTUを含む。具体的には、第1のPUFA

50

シンターゼPTUは、PvD1ec2プロモーターv2、2S 5'UTR、SzPUFA OrfA v3およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。ホスホパンテティニルトランスフェラーゼPTUは、PvPhasプロモーターv4、PvPhas 5'UTR、NoHetI v3およびAtuORF23 3'UTR v1を含む。第2のPUFAシンターゼPTUは、PvD1ec2プロモーターv2、2S 5'UTR、hSzThPUFA OrfC v3およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。第3のPUFAシンターゼPTUは、PvPhasプロモーターv5、PvPhas 5'UTR、SzPUFA OrfB v3、PvPhas 3'UTRおよびPvPhas 3'MAR v2（プラスミドマップ上にアノテートされていない）ならびにランダムDNAスペーサーを含む。

10

【0317】

プラスミドpDAB108200、pDAB108204、pDAB108201、pDAB108202およびpDAB7333を組換えて、pDAB108209を形成した。具体的には、植物形質転換バイナリーpDAB7333のT鎖DNAボーダー領域内にSzPUFA OrfA v3およびNoHetI v3をヘッドトゥーヘッド方向で配置し；NoHetI v3およびhSzThPUFA OrfC v3をテールトゥーテール方向で配置し；hSzThPUFA OrfC v3およびSzPUFA OrfB v3を、ヘッドトゥーヘッド方向で配置する。遺伝子の順序は：SzPUFA OrfA v3、NoHetI v3、hSzThPUFA OrfC v3、SzPUFA OrfB v3である。pDAB7333は、OverdriveおよびT鎖ボーダー配列（T-DNA Border AおよびT-DNA Border B）などの他の調節エレメントに加えて、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTU：CsVMVプロモーターv2、PAT v5、AtuORF1 3'UTR v4もまた含む。次いで、5つのPTUを含む組換えプラスミドを単離し、制限酵素消化およびDNA配列決定を用いて5つのPTUの組込みについて試験した。

20

【0318】

転写干渉を最小化するために、3'UTRを倍化し、スペーサーDNAを含める。

複数の遺伝子が一続きでスタックすることによって、下流の遺伝子の発現低減が生じる場合に、転写干渉が生じ得る。この現象は、次のプロモーター転写単位への3'UTRおよびターミネーターの転写リードスルーから生じる。転写干渉および転写干渉を最小化するための2つの戦略からなる代替的構築物設計を記載する。第1の戦略は、次の遺伝子発現カセットへのリードスルーを制限するために、個々のDHA遺伝子発現カセット間にスタックされた2つのターミネーター／3'UTRの使用を配備する。第2の戦略は、遺伝子発現カセット間に約1000塩基対のスペーサーDNAを挿入することによって、転写干渉を最小化する。

30

【0319】

実施例9.11：pDAB108207の構築

pDAB108207プラスミド（図32；配列番号58）を、マルチサイトGateway L-R組換え反応を使用して構築した。pDAB108207は、3つのPUFAシンターゼPTU、1つのホスホパンテティニルトランスフェラーゼPTUおよびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTUを含む。具体的には、第1のPUFAシンターゼPTUは、PvD1ec2プロモーターv2、2S 5'UTR、SzPUFA OrfA v3およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。第2のPUFAシンターゼPTUは、PvPhasプロモーターv3、PvPhas 5'UTR、SzPUFA OrfB v3、PvPhas 3'UTR、PvPhas 3'MAR v2（プラスミドマップ上にアノテートされていない）およびAtuORF23 3'UTR v1を含む。第3のPUFAシンターゼPTUは、PvD1ec2プロモーターv2、2S 5'UTR、hSzThPUFA OrfC v3、At2S SSPターミネーターv1およびAtuORF23 3'UTR v1を含む。ホスホパンテティニルトランスフェラーゼPTUは、PvPhasプロモーターv6、PvPhas 5'UTR

40

50

、NoHetI v3、PvPhas 3'UTR v1およびPvPhas 3'MAR v2（プラスミドマップ上にアノテートされていない）を含む。

【0320】

プラスミドpDAB7334、pDAB101489、pDAB108205、pDAB108206およびpDAB7333を組換えて、pDAB108207を形成した。具体的には、植物形質転換バイナリーpDAB7333のT鎖DNAボーダー領域内にSzPUFA OrfA v3およびNoHetI v3をテールトゥーテール方向で配置し、AtuORF23 3'UTRを2つのPTU間に配置し；NoHetI v3およびhSzThPUFA OrfC v3をヘッドトゥーヘッド方向で配置し；hSzThPUFA OrfC v3およびSzPUFA OrfBをヘッドトゥーテール方向で配置し、AtuORF23 3'UTRを2つのPTU間に配置する。遺伝子の順序は：SzPUFA OrfA v3、NoHetI v3、hSzThPUFA OrfC v3、SzPUFA OrfB v3である。pDAB7333は、OverdriveおよびT鎖ボーダー配列（T-DNA Border AおよびT-DNA Border B）などの他の調節エレメントに加えて、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTU：CsVMVプロモーターv2、PAT v5、AtuORF1 3'UTR v4もまた含む。次いで、5つのPTUを含む組換えプラスミドを単離し、制限酵素消化およびDNA配列決定を用いて5つのPTUの組込みについて試験した。

10

【0321】

実施例9. 12：pDAB108208の構築

20

pDAB108208プラスミド（図33；配列番号59）を、マルチサイトGateway L-R組換え反応を使用して構築した。pDAB108208は、3つのPUFAシンターゼPTU、1つのアシル-CoAシンターゼPTU、1つのホスホパンテティニルトランスフェラーゼPTUおよびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTUを含む。具体的には、第1のPUFAシンターゼPTUは、PvDlec2プロモーターv2、2S 5'UTR、SzPUFA OrfA v3およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。第2のPUFAシンターゼPTUは、PvPhasプロモーターv5、PvPhas 5'UTR、SzPUFA OrfB v3、PvPhas 3'UTR、PvPhas 3'MAR v2（プラスミドマップ上にアノテートされていない）およびAtuORF23 3'UTR v1を含む。第3のPUFAシンターゼPTUは、PvDlec2プロモーターv2、2S 5'UTR、hSzThPUFA OrfC v3およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。ホスホパンテティニルトランスフェラーゼPTUは、PvPhasプロモーターv4、PvPhas 5'UTR、NoHetI v3およびAtuORF23 3'UTR v1を含む。

30

【0322】

プラスミドpDAB108200、pDAB101490、pDAB108201、pDAB108202およびpDAB7333を組換えて、pDAB108208を形成した。具体的には、植物形質転換バイナリーpDAB7333のT鎖DNAボーダー領域内にSzPUFA OrfA v3およびNoHetI v3をヘッドトゥーヘッド方向で配置し；NoHetI v3およびhSzThPUFA OrfC v3をテールトゥーテール方向で配置し、AtuORF23 3'UTRを、2つのPTU間に配置し；hSzThPUFA OrfC v3およびSzPUFA OrfBを、ヘッドトゥーヘッド方向で配置する。遺伝子の順序は：SzPUFA OrfA v3、NoHetI v3、hSzThPUFA OrfC v3、SzPUFA OrfB v3である。pDAB7333は、OverdriveおよびT鎖ボーダー配列（T-DNA Border AおよびT-DNA Border B）などの他の調節エレメントに加えて、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTU：CsVMVプロモーターv2、PAT v5、AtuORF1 3'UTR v4もまた含む。次いで、5つのPTUを含む組換えプラスミドを単離し、制限酵素消化およびDNA配列決定を用いて5つのPTUの組込みについて試験した。

40

50

【0323】

実施例 9. 13: pDAB108209 の構築

pDAB108209 プラスミド (図 34; 配列番号 60) を、マルチサイト Gateway L-R 組換え反応を使用して構築した。pDAB108209 は、3 つの PUF A シンターゼ PTU、1 つのアシル CoA シンターゼ PTU、1 つのホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ PTU およびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ PTU を含む。具体的には、第 1 の PUF A シンターゼ PTU は、PvD1ec2 プロモーター v2、2 S 5' UTR、SzPUFA OrfA v3 および At2S SSP ターミネーター v1 を含む。第 2 の PUF A シンターゼ PTU は、PvPhas プロモーター v5、PvPhas 5' UTR、SzPUFA OrfB v3、PvPhas 3' UTR、PvPhas 3' MAR v2 (プラスミドマップ上にアノテートされていない) およびランダム DNA スペーサーを含む。第 3 の PUF A シンターゼ PTU は、PvD1ec2 プロモーター v2、2 S 5' UTR、hSzThPUFA OrfC v3 および At2S SSP ターミネーター v1 を含む。ホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ PTU は、PvPhas プロモーター v4、PvPhas 5' UTR、NoHetI v3 および AtuORF23 3' UTR v1 を含む。

【0324】

プラスミド pDAB108200、pDAB108204、pDAB108201、pDAB108202 および pDAB7333 を組換えて、pDAB108209 を形成した。具体的には、植物形質転換バイナリー pDAB7333 の T 鎖 DNA ボーダー領域内に SzPUFA OrfA v3 および NoHetI v3 をヘッドトゥーヘッド方向で配置し; NoHetI v3 および hSzThPUFA OrfC v3 をテールトゥーテール方向で配置し、1000 塩基対のスペーサーを 2 つの PTU 間に配置し; hSzThPUFA OrfC v3 および SzPUFA OrfB を、ヘッドトゥーヘッド方向で配置する。遺伝子の順序は: SzPUFA OrfA v3、NoHetI v3、hSzThPUFA OrfC v3、SzPUFA OrfB v3 である。pDAB7333 は、Overdrive および T 鎖 ボーダー 配列 (T-DNA Border A および T-DNA Border B) などの他の調節エレメントに加えて、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ PTU: CsVMV プロモーター v2、PAT v5、AtuORF1 3' UTR v4 もまた含む。次いで、5 つの PTU を含む組換えプラスミドを単離し、制限酵素消化および DNA 配列決定を用いて 5 つの PTU の組込みについて試験した。

【0325】

転写リードスルーを制限するための代替的 3' UTR-ターミネーターの使用

アグロバクテリウム (Agrobacterium) ORF23 3' UTR-ターミネーターは、上記構築物の多くにおいて転写を終結させるために第一に使用される。ZmLipase 3' UTR-ターミネーターは、シロイヌナズナ (Arabidopsis thaliana) において転写リードスルーを終結させる際により有効であることが最近示された。このように、1 つのバージョンの構築物は、この 3' UTR が上流遺伝子の転写リードスルーを低減することによって転写干渉を低減できるかどうかを試験するために、PvD1ec2 プロモーターと組み合わせて ZmLipase 3' UTR-ターミネーターを利用する。

【0326】

実施例 9. 14: pDAB9159 の構築

pDAB9159 プラスミド (図 35; 配列番号 61) を、マルチサイト Gateway L-R 組換え反応を使用して構築した。pDAB9159 は、3 つの PUF A シンターゼ PTU、1 つのホスホパンテテイニルトランスフェラーゼ PTU およびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ PTU を含む。具体的には、第 1 の PUF A シンターゼ PTU は、PvD1ec2 プロモーター v2、2 S 5' UTR、SzPUFA OrfA v3 および ZmLip3' UTR v1 を含む。第 2 の PUF A シンターゼ PTU は、PvPhas プロモーター v3、PvPhas 5' UTR、SzPUFA Orf

B v3およびZmLip3'UTR v1を含む。第3のPUFAシンターゼPTUは、PvDlec2プロモーターv2、2S 5'UTR、hSzThPUFA OrfC v3およびZmLip3'UTR v1を含む。ホスホパンテティニルトランスフェラーゼPTUは、PvPhasプロモーターv3、PvPhas 5'UTR、NoHetI v3およびZmLip3'UTR v1を含む。

【0327】

プラスミドpDAB9152、pDAB9153、pDAB9154、pDAB9155およびpDAB7333を組換えて、pDAB9159を形成した。具体的には、上記4つのPTUを、植物形質転換バイナリーpDAB7333のT鎖DNAボーダー領域内にヘッドトゥテールの方向で配置した。遺伝子の順序は：SzPUFA OrfA v3、SzPUFA OrfB v3、hSzThPUFA OrfC v3、NoHetI v3である。pDAB7333は、OverdriveおよびT鎖ボーダー配列（T-DNA Border AおよびT-DNA Border B）などの他の調節エレメントに加えて、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTU：CsVMVプロモーターv2、PAT v5、AtuORF1 3'UTR v4もまた含む。次いで、5つのPTUを含む組換えプラスミドを単離し、制限酵素消化およびDNA配列決定を用いて5つのPTUの組込みについて試験した。

【0328】

実施例9. 15：pDAB9147の構築

pDAB9147プラスミド（図36；配列番号62）を、マルチサイトGateway L-R組換え反応を使用して構築した。pDAB9147は、3つのPUFAシンターゼPTU、1つのホスホパンテティニルトランスフェラーゼPTUおよびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTUを含む。具体的には、第1のPUFAシンターゼPTUは、PvDlec2プロモーターv2、2S 5'UTR、SzPUFA OrfA v3、At2S SSPターミネーターv1およびZmLip3'UTR v1を含む。第2のPUFAシンターゼPTUは、PvDlec2プロモーターv2、2S 5'UTR、SzPUFA OrfB v3およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。第3のPUFAシンターゼPTUは、PvDlec2プロモーターv2、2S 5'UTR、hSzThPUFA OrfC v3およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。ホスホパンテティニルトランスフェラーゼPTUは、PvDlec2プロモーターv2、2S 5'UTR、NoHetI v3およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。

【0329】

プラスミドpDAB9146、pDAB7335、pDAB7336、pDAB7338およびpDAB7333を組換えて、pDAB9147を形成した。具体的には、上記4つのPTUを、植物形質転換バイナリーpDAB7333のT鎖DNAボーダー領域内にヘッドトゥテールの方向で配置した。遺伝子の順序は：SzPUFA OrfA v3、SzPUFA OrfB v3、hSzThPUFA OrfC v3、NoHetI v3である。pDAB7333は、OverdriveおよびT鎖ボーダー配列（T-DNA Border AおよびT-DNA Border B）などの他の調節エレメントに加えて、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTU：CsVMVプロモーターv2、PAT v5、AtuORF1 3'UTR v4もまた含む。次いで、5つのPTUを含む組換えプラスミドを単離し、制限酵素消化およびDNA配列決定を用いて5つのPTUの組込みについて試験した。

【0330】

2つの別個のT-DNA上でのDHA遺伝子の送達

代替的構築物設計は、2つの別個のバイナリーベクターを構築することからなり、第1のベクターは1つのT-DNA上にPUFAシンターゼ遺伝子のサブセットを含み、第2のバイナリーベクターは、第2のT-DNA上に残りのPUFAシンターゼ遺伝子を含む。これらのバイナリーベクターは、性的に交雑される植物を形質転換するために個々に使

用され、それによって全てのPUFAシンターゼ遺伝子発現構築物を含む後代を生じる。トランスジェニック植物を生成するための代替的方法是、ダイズ組織中に両方のバイナリーベクターを同時形質転換し、両方のT鎖を含む単一の植物を選択またはスクリーニングすることである。

【0331】

実施例9. 16: pDAB108224の構築

pDAB108224プラスミド(図37; 配列番号63)を、マルチサイトGateway L-R組換え反応を使用して構築した。pDAB108224は、1つのPUFAシンターゼPTU、1つのホスホパンテテイルトランスフェラーゼPTUおよびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTUを含む。具体的には、第1のPUFAシンターゼPTUは、PvDlec2プロモーターv2、2S 5' UTR、SzPUFA OrfA v3およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。ホスホパンテテイルトランスフェラーゼPTUは、PvPhasプロモーターv4、PvPhas 5' UTR、NoHetI v3およびAtuORF23 3' UTR v1を含む。

10

【0332】

プラスミドpDAB108216、pDAB108221およびpDAB7333を組換えて、pDAB108224を形成した。具体的には、SzPUFA OrfA v3およびNoHetI v3を、植物形質転換バイナリーpDAB7333のT鎖DNAボーダー領域内にヘッドトゥーヘッド方向で配置する。遺伝子の順序は、SzPUFA OrfA v3、NoHetI v3である。pDAB7333は、OverdriveおよびT鎖ボーダー配列(T-DNA Border AおよびT-DNA Border B)などの他の調節エレメントに加えて、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTU: CsVMVプロモーターv2、PAT v5、AtuORF1 3' UTR v4もまた含む。次いで、5つのPTUを含む組換えプラスミドを単離し、制限酵素消化およびDNA配列決定を用いて3つのPTUの組み込みについて試験した。

20

【0333】

実施例9. 17: pDAB108225の構築

pDAB108225プラスミド(図38; 配列番号64)を、マルチサイトGateway L-R組換え反応を使用して構築した。pDAB108225は、2つのPUFAシンターゼPTUおよびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTUを含む。具体的には、第1のPUFAシンターゼPTUは、PvDlec2プロモーターv2、2S 5' UTR、SzPUFA OrfB v3およびAt2S SSPターミネーターv1を含む。第2のPUFAシンターゼPTUは、PvPhasプロモーターv4、SzPUFA OrfB v3およびAtuORF23 3' UTR v1を含む。

30

【0334】

プラスミドpDAB108217、pDAB108222およびpDAB7333を組換えて、pDAB108225を形成した。具体的には、SzPUFA OrfB v3およびhSzThPUFA OrfC v3を、植物形質転換バイナリーpDAB7333のT鎖DNAボーダー領域内にヘッドトゥーヘッド方向で配置する。遺伝子の順序は、SzPUFA OrfB v3、hSzThPUFA OrfC v3である。pDAB7333は、OverdriveおよびT鎖ボーダー配列(T-DNA Border AおよびT-DNA Border B)などの他の調節エレメントに加えて、ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼPTU: CsVMVプロモーターv2、PAT v5、AtuORF1 3' UTR v4もまた含む。次いで、5つのPTUを含む組換えプラスミドを単離し、制限酵素消化およびDNA配列決定を用いて3つのPTUの組み込みについて試験した。

40

【0335】

代替的設計を含む構築物によるダイズ形質転換

これらのプラスミドを使用して、上記プロトコルを使用してダイズ植物を安定に形質転換する。トランスジェニックダイズ植物を単離し、分子的に特徴付ける。代替的構築物の

50

使用は、より多い量の D H A および L C - P U F A を含むダイズ植物を生じる。得られた L C - P U F A 蓄積を決定し、0.01%~15%の D H A または 0.01%~15%の L C - P U F A を生成するダイズ植物を同定する。

【実施例 10】

【0336】

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の形質転換ならびに L C - P U F A および D H A の引き続く生成のために使用される代替的構築物設計

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 植物を、p D A B 1 0 1 4 9 3、p D A B 7 3 6 2、p D A B 7 3 6 9、p D A B 1 0 1 4 1 2 または p D A B 7 3 8 0 バイナリーベクターを含むアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) 株で形質転換した。Clough および Bent (1998) に記載される花浸漬 (floral dipping) 形質転換プロトコルを形質転換に使用した。Clough および Bent、*「Floral dip: a simplified method for agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana」*、Plant J., 16:735-743, 1998。形質転換されたシロイヌナズナ属 (*Arabidopsis*) 植物を得、導入遺伝子の存在の分子の確認を完了した。トランスジェニックシロイヌナズナ属 (*Arabidopsis*) 事象由来の T₁ 植物を、温室中で成熟するまで成長させた。これらの植物を自家受精させ、得られた T₂ 種子を成熟の時点で収集した。T₂ 種子 (10 mg) を F A M E G C - F I D で分析して、T₂ シロイヌナズナ属 (*Arabidopsis*) 種子中の L C - P U F A および D H A 含量を決定した。組織を、上述の実施例に記載された F A M E G C - F I D 法で分析した。シロイヌナズナ属 (*Arabidopsis*) 植物の T₁ 植物由来の T₂ 種子は、0%~0.95%の D H A および 0%~1.50%の総 L C - P U F A を含んでいた。個々の T₁ 植物由来の T₂ 種子の L C - P U F A および D H A 含量は図 39 に示される。

【実施例 11】

【0337】

ダイズ内での藻類 P U F A シンターゼ遺伝子スイートとの D G A T 2 または A C C a s e の同時発現

ダイズ植物内の油含量を、アセチル C o A カルボキシラーゼ (A C C a s e) または 2 型 ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ (D G A T 2) をコードし発現するキメラ D N A 分子の形質転換によってさらに改変する。これらの遺伝子を、A C C a s e または D G A T 2 発現カセットを含むダイズ植物を P U F A シンターゼ遺伝子を含むダイズ植物と交配すること；あるいは A C C a s e または D G A T 2 および P U F A シンターゼ遺伝子を含む遺伝子スタックでダイズ植物を形質転換することのいずれかによって、上記藻類 P U F A シンターゼ遺伝子と同時発現させる。A C C a s e または D G A T 2 コード配列の発現に必要な調節エレメントには、上記のものが含まれ得る。当該分野で公知のさらなる調節エレメント発現配列もまた使用され得る。A C C a s e および D G A T 2 発現カセットを、上記形質転換プロトコルを使用してダイズ中に形質転換する。形質転換は、P U F A シンターゼ O r f A、P U F A シンターゼ O r f B、P U F A シンターゼ O r f C、アシル-C o A シンターゼおよび 4' ホスホパンテテイルトランスフェラーゼ H e t I 発現カセットと組み合わせた A C C a s e または D G A T 2 発現カセットの分子スタックとして；あるいは選択マーカーに連結され、次いで P U F A シンターゼ O r f A、P U F A シンターゼ O r f B、P U F A シンターゼ O r f C、アシル-C o A シンターゼおよび 4' ホスホパンテテイルトランスフェラーゼ H e t I 発現カセットを含むダイズ植物と引き続いて交雑される独立した A C C a s e または D G A T 2 発現カセットとして、行い得る。陽性形質転換体を単離し、分子的に特徴付ける。形質転換されていない対照ダイズ植物と比較して、植物、植物の種子または植物油濃縮物における L C - P U F A の増加した蓄積を含むダイズ植物を同定する。かかる増加は、1.2 倍から 20 倍までの範囲の増加であり得る。

【0338】

細胞質における A C C a s e の過剰発現は、より高いレベルのマロニル-C o A を生成

し得る。増加したレベルの細胞質マロニル-CoAを含むダイズ植物または種子は、藻類PUFAシンターゼ遺伝子が存在し発現される場合、より高いレベルの長鎖多価不飽和脂肪酸(LC-PUFA)を引き続いて生成し得る。ダイズ植物内で発現されるDGA T 2遺伝子は、トリアシルグリセロール中に顕著な量のドコサヘキサエン酸(DHA)およびエイコサペンタエン酸(EPA)を優先的に取り込むことが可能であり得る。LC-PUFAに対する基質選択性を有するDGA T 2遺伝子(例えば、PCT国際公開公報WO 2009/085169 A2を参照のこと)は、トリアシルグリセロール(TAG)中へのこれらの脂肪酸の取り込みを増加させ得る。かかるDGA T遺伝子は、TAG中へのLC-PUFA、特にDHAの取り込みを指向させるため、ならびに植物および他の生物におけるTAGの生成を増加させるために有用である。

10

【実施例12】

【0339】

PUFAシンターゼ遺伝子の発現のための代替的構築物設計で形質転換されたシロイヌナズナ属(*Arabidopsis*)種子におけるDHAの生成

種々の植物発現エレメントの制御下にPUFAシンターゼ遺伝子およびHet I (およびある場合にはSZACS-2)をコードするプラスミドを保有するアグロバクテリウム・ツメファシエンス(*Agrobacterium tumefaciens*)で形質転換されたシロイヌナズナ属(*Arabidopsis*) T₁ 事象を、CloughおよびBent (Plant J., 1998 16(6):735-43)に本質的に記載される花浸漬(floral dip)法を使用して生成した。得られたT₁ 種子を収集し、播種した。形質転換されたT₁ 植物を、ホスフィノトリシンを噴霧することによって選択して、選択マーカーとして機能的PAT遺伝子を含む植物について選択した。生存T₁ 植物由来の葉組織をサンプリングし、PAT遺伝子に特異的な定量PCR反応によって分析して、単一コピーの選択マーカー(および関連する導入遺伝子)を含む植物を同定した。これらの植物を成熟するまで成長させ、T₂ 種子を収集し、LC-PUFA含量について(抽出可能な総FAMEの%として)分析した。PUFAシンターゼ遺伝子をコードする種々の構築物を用いて生成された事象由来のデータのまとめを表12に示す。

20

【0340】

【表 1 3】

表12: T₂種子中にLC-PUFAを生成する単一コピーのPAT導入遺伝子を含むシロイヌナズナ属(*Arabidopsis*)事象、および総油の百分率として示される、各事象についてのDHAおよびEPAのレベル

構築物	生成された事象の数	LC-PUFAを生成する事象の数	LC-PUFA>1%を有する事象の数 ¹	平均 LC-PUFA 含量 ²	最大 LC-PUFA 含量	最大 DHA 含量 ³	最大 EPA 含量 ⁴	平均 n-3/PUFA 比 ⁵
pDAB9167	30	9 (30%)	0	0.06	0.24	0.17	0	67%
pDAB101477	11	2 (18%)	0	0.07	0.49	0.29	0	64%
pDAB101412	63	33 (52%)	0	0.17	0.91	0.40	0.07	68%
pDAB7380	45	23 (51%)	0	0.23	0.79	0.47	0.12	69%
pDAB7733	23	13 (57%)	0	0.24	1.07	0.69	0.07	61%
pDAB101493	25	15 (60%)	0	0.26	0.88	0.52	0.13	75%
pDAB100518	71	39 (71%)	0	0.27	0.96	0.64	0.07	70%
pDAB7362	126	45 (36%)	10 (8%)	0.28	1.73	1.02	0.26	64%
pDAB9151	35	15 (43%)	3 (9%)	0.29	1.39	0.84	0.11	74%
pDAB9147	40	19 (48%)	3 (8%)	0.36	1.62	0.89	0.10	70%
pDAB9159	46	32 (70%)	0	0.43	1.07	0.68	0.13	72%
pDAB109509	32	21 (66%)	1 (3%)	0.44	1.14	0.79	0.17	67%
pDAB7734	45	27 (60%)	8 (18%)	0.49	1.62	1.00	0.13	76%
pDAB7369	42	26 (62%)	5 (12%)	0.50	1.47	0.88	0.11	66%
pDAB108209	46	36 (78%)	2 (4%)	0.62	1.61	1.01	0.29	70%
pDAB109508	29	20 (69%)	7 (24%)	0.68	1.72	1.02	0.13	64%
pDAB108208	46	33 (72%)	21 (46%)	0.71	1.33	0.89	0.18	73%
pDAB109507	30	23 (77%)	10 (33%)	0.77	2.03	1.45	0.05	72%
pDAB108207	47	35 (74%)	16 (34%)	0.86	1.82	0.99	0.16	64%

1. 総種子FAMEの>1%のLC-PUFA含量を有する事象の数、括弧内は総事象の百分率
2. 総種子FAMEの%としての、全てのT₂種子サンプルの平均総LC-PUFA含量(DHA(n-3)+EPA(n-3)+DPA(n-6))
3. 総FAMEの%としての、分析した全てのT₂種子サンプルの最大DHA含量
4. 総FAMEの%としての、分析した全てのT₂種子サンプルの最大EPA含量
5. 全てのLC-PUFA生成事象にわたる平均n-3 LC-PUFA(DHA+EPA)/総LC-PUFA含量(%として)

【0 3 4 1】

これらのデータは、ある特定の構築物立体配置とプロモーターとの組合せが、T₂種子においてより高い割合のLC-PUFA含有事象を生成することを示している(pDAB109507について全ての単一コピー事象の77%がDHAを生成し、pDAB108207について全ての単一コピー事象の86%がDHAを生成した)。またある特定の構築物は、>1%のLC-PUFA含量を生成する事象をより高い割合で生成する(pDAB109507について全ての単一コピー事象の33%、およびpDAB108207について全ての単一コピー事象の34%)。種々の事象由来のT₂種子の最大LC-PUFA含量は、異なる構築物について0.24%~2.03%までの範囲であった。同様に、ある特定の構築物は、より高いレベルのω-3 LC-PUFAを生成する。生成した全ての構築物および事象にわたり、最大DHA含量は0.17%~1.45%までの範囲であり、最大EPA含量は0%~0.26%までの範囲であった。これらのデータは、プロモーター立体配置が変化した構築物設計の変更により、pDAB7362で形質転換されたトランスジェニック植物と比較して増加したLC-PUFAを示すトランスジェニック植物が生じたことを示している。このように、構築物設計が変更されたこれらの構築物は、作物の形質転換に望ましい。

【0 3 4 2】

高LC-PUFA生成事象由来のT₂種子を定植し、成長する植物由来の葉組織を、定量PCRを使用してサンプリングして、PAT遺伝子および他の導入遺伝子を実験した。2コピーの導入遺伝子を含む植物(即ち、ホモ接合体)を同定し、成熟するまで成長

させた。得られた T_3 種子を収集し、LC-PUFA 含量について分析した。反復したプロモーター／3'UTR 発現エレメントを含む、pDAB7362 および pDAB109509 などのいくつかの構築物は、引き続き T_3 種子世代において安定性の乏しい LC-PUFA 形質を示した。しかし、異なる構築物立体配置および／または多様化された発現エレメント（例えば、pDAB108207、109508 および 7734）で形質転換されたいくつかの事象は、表 13 に示すように、 T_3 種子世代において顕著に改善された安定性の LC-PUFA 形質を生じた。これらのデータは、ある特定の構築物が引き続き世代において DHA 形質の安定性を維持し得ること、およびかかる構築物が作物の形質転換に好ましいことを示している。

【0343】

【表 14】

表13: 選択されたトランスジェニックシロイヌナズナ属(Arabidopsis)DHA生成 T_2 系統由来の T_3 種子後代のLC-PUFA分析

構築物	事象 ID	親 T_2 種子 DHA 含量	親 T_2 種子 LC-PUFA 含量	分析したホモ接合体後代の数	平均 T_3 種子 DHA 含量 ¹	T_3 種子 DHA 含量の範囲	平均 T_3 種子 LC-PUFA 含量	T_3 種子 LC-PUFA 含量の範囲
pDAB7362	5217[12]-202	0.66	1.53	14	0.03	0 - 0.10	0.17	0 - 0.46
pDAB7362	5217[12]-231	0.89	1.50	20	0.04	0 - 0.28	0.08	0 - 0.48
pDAB7362	5217[12]-219	0.77	1.35	19	0.03	0 - 0.17	0.05	0 - 0.26
pDAB109509	109509[1]-025	0.79	1.14	10	0.13	0 - 0.31	0.20	0 - 0.42
pDAB109509	109509[1]-037	0.61	1.00	10	0.15	0.06 - 0.30	0.21	0.09 - 0.42
pDAB109509	109509[2]-102	0.73	1.03	10	0.09	0 - 0.36	0.12	0 - 0.47
pDAB108207	108207[1]-047	0.93	1.57	10	0.89	0.66 - 1.09	1.43	0.99 - 1.84
pDAB108207	108207[1]-051	0.99	1.77	5	1.08	0.99 - 1.27	2.05	1.83 - 2.36
pDAB108207	108207[1]-076	0.97	1.68	5	0.88	0.55 - 1.04	1.64	1.08 - 1.9
pDAB109508	109508[1]-028	1.02	1.72	10	1.25	1.16 - 1.39	1.99	1.86 - 2.09
pDAB7734	6491[1]-138	1	1.62	9	1.43	0.98 - 1.83	2.17	1.45 - 2.89

総LC-PUFA含量およびDHA含量は、総FAMEの%である

1. 5〜20の個々のホモ接合体植物由来の T_3 バルク種子を分析した

【0344】

本発明の上述の記載は、例示および説明を目的として提示されている。さらに、この記載は、本発明を本明細書中に開示される形態に限定する意図ではない。

【0345】

本明細書中に記載される種々の態様、実施形態および選択肢の全ては、任意のおよび全てのバリエーションで組み合わせられ得る。

【0346】

本明細書中で言及される全ての刊行物、特許および特許出願は、各個々の刊行物、特許または特許出願が具体的かつ個々に参照により組み込まれると示されるのと同程度まで、参照により本明細書中に組み込まれる。

10

20

30

40

【図 5】

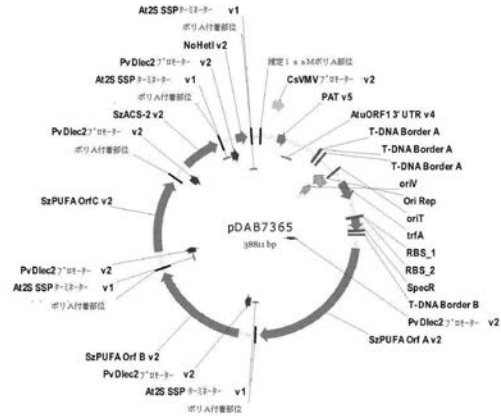


FIG. 5

【図 6】

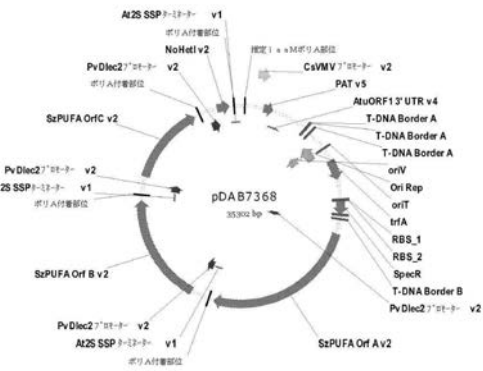


FIG. 6

【図 7】

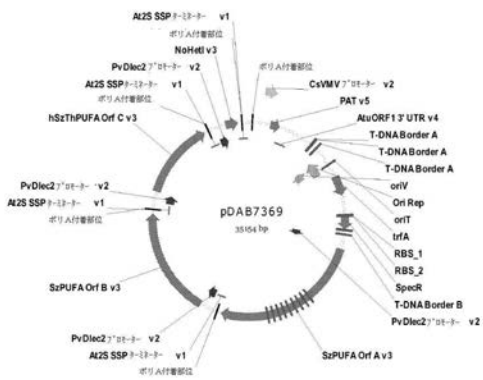


FIG. 7

【図 8】

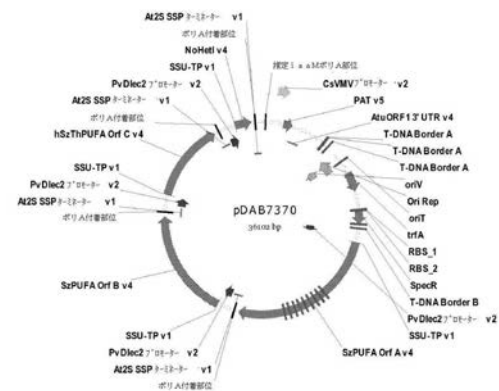


FIG. 8

【図 9】

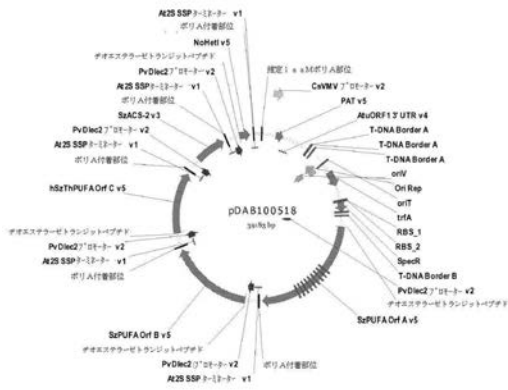


FIG. 9

【図 10】



FIG. 10

【図 11】

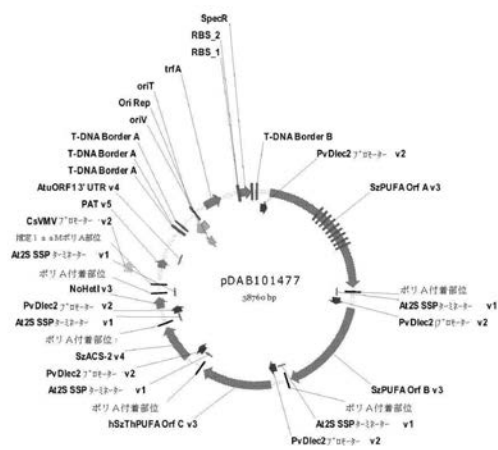


FIG. 11

【図 12】

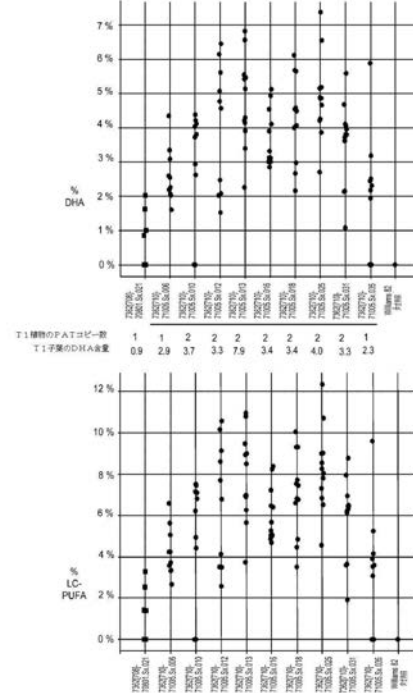


FIG. 12

【図 13】

A, 抗OrfA抗体でブローディングした。レーン1, 分子重量マーカー; レーン2, 1.00 ngの精製OrfA; レーン3, 5.0 ngの精製OrfA; レーン4, 2.5 ngの精製OrfA; レーン5, 1.2, 5 ngの精製OrfA; レーン6, 2.5 ngのOrfA; レーン7, Williams 82; Lane 8, 7362[708]-70801.Sx.021; Lane 9, 7362[708]-70801.Sx.021; Lane 10, 7362[708]-70801.Sx.021; Lane 11, 7362[708]-70801.Sx.021; Lane 12, 7362[710]-71005.Sx.006; Lane 13, 7362[710]-71005.Sx.010; Lane 14, 7362[710]-71005.Sx.010; Lane 15, 7362[710]-71005.Sx.013; Lane 16, 7362[710]-71005.Sx.018; Lane 17, 7362[710]-71005.Sx.025; Lane 18, 7362[710]-71005.Sx.036; Lane 19, 7362[710]-71005.Sx.036; Lane 20, 7362[710]-71005.Sx.036.

B, 抗SsORF B-v3抗体および抗SsORF C-v3抗体でブローディングした。レーン1, 分子重量マーカー; レーン2, 1.00 ngの精製OrfB; レーン3, 5.0 ngの精製OrfB; レーン4, 2.5 ngの精製OrfB (2.5 ng); レーン5, 1.2, 5 ngの精製OrfB; レーン6, 2.5 ngの精製OrfB; レーン7, Williams 82

(免疫対照); Lane 8, 7362[708]-70801.Sx.021; Lane 9, 7362[708]-70801.Sx.021; Lane 10, 7362[708]-70801.Sx.021; Lane 11, 7362[708]-70801.Sx.021; Lane 12, 7362[710]-71005.Sx.006; Lane 13, 7362[710]-71005.Sx.010; Lane 14, 7362[710]-71005.Sx.010; Lane 15, 7362[710]-71005.Sx.013; Lane 16, 7362[710]-71005.Sx.018; Lane 17, 7362[710]-71005.Sx.025; Lane 18, 7362[710]-71005.Sx.036; Lane 19, 7362[710]-71005.Sx.036; Lane 20, 7362[710]-71005.Sx.036.

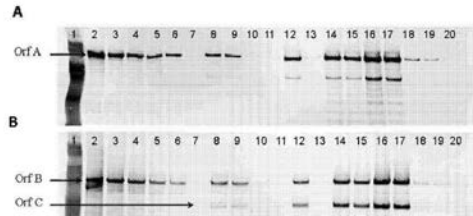


FIG. 13

【図 14】

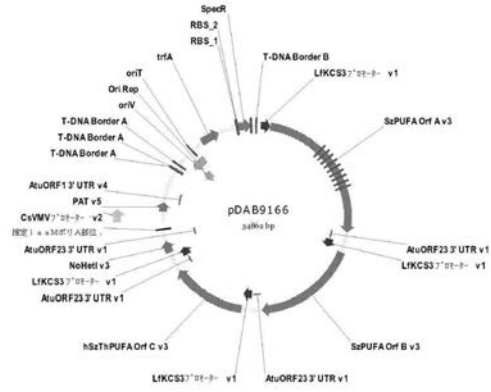


FIG. 14

【図 15】

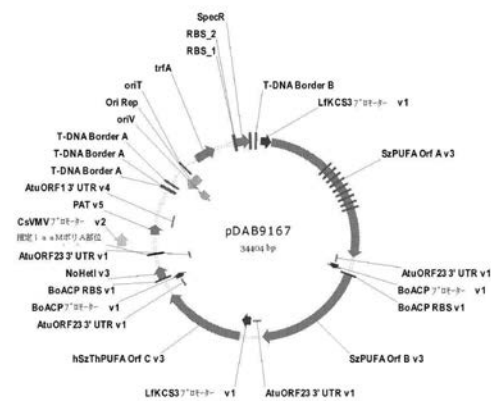


FIG. 15

【図 16】

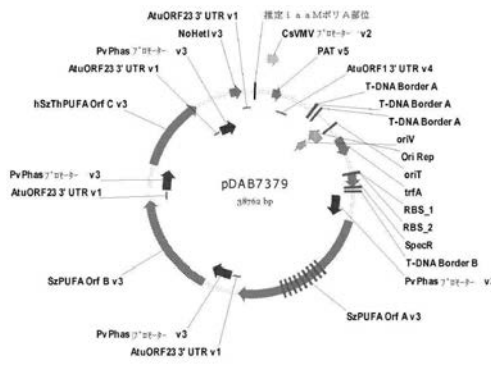


FIG. 16

【図 17】

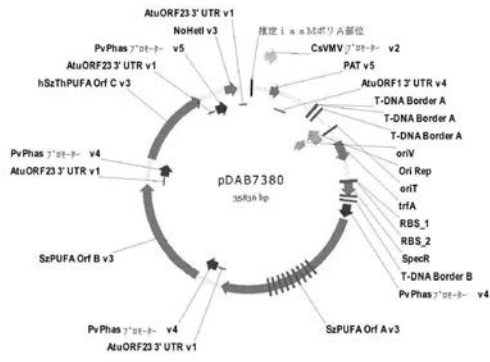


FIG. 17

【図 18】

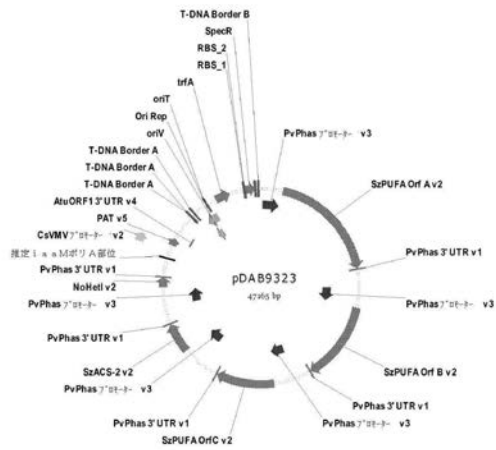


FIG. 18

【図 19】

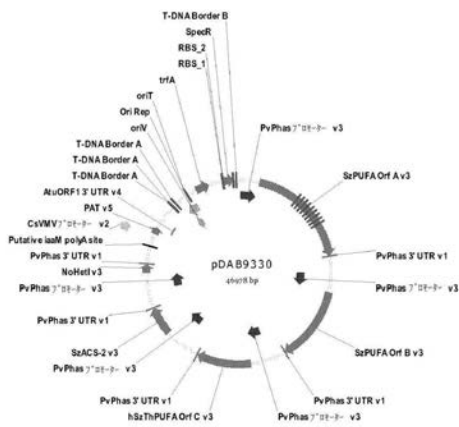


FIG. 19

【図 20】

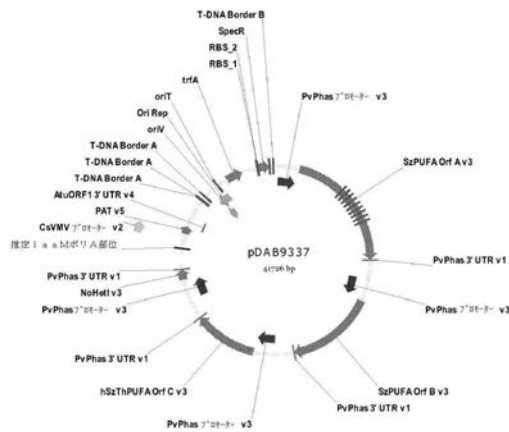


FIG. 20

【図 2 1】

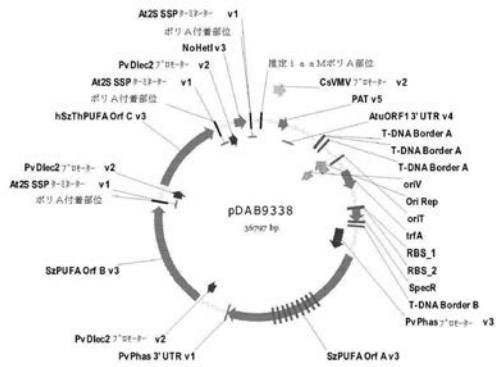


FIG. 21

【図 2 2】

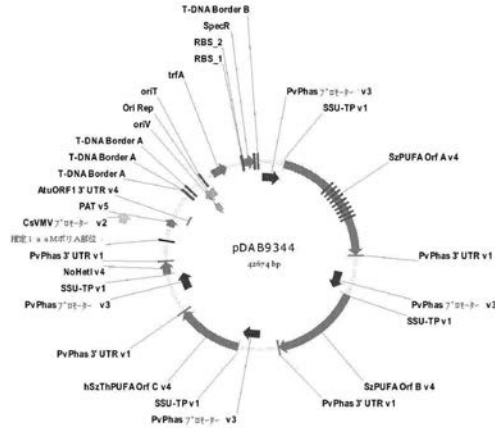


FIG. 22

【図 2 3】

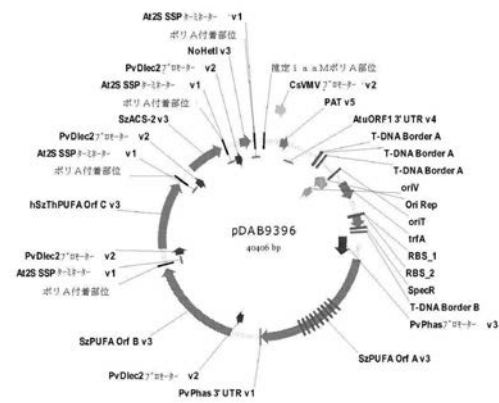


FIG. 23

【図 2 4】

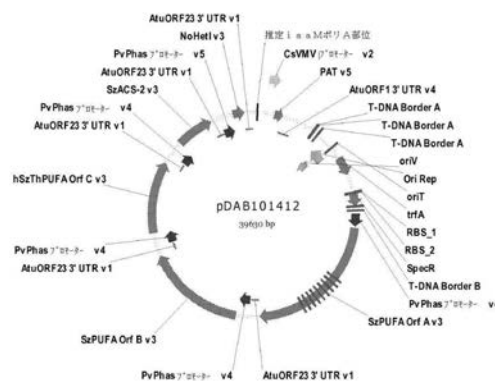


FIG. 24

【図 25】



FIG. 25

【図 26】

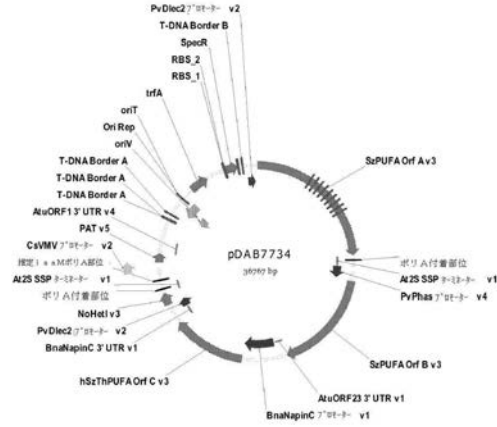


FIG. 26

【図 27】

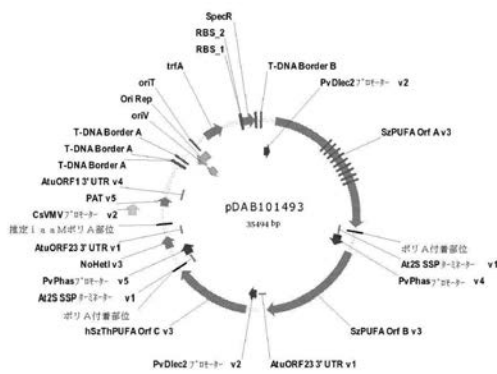


FIG. 27

【図 28】

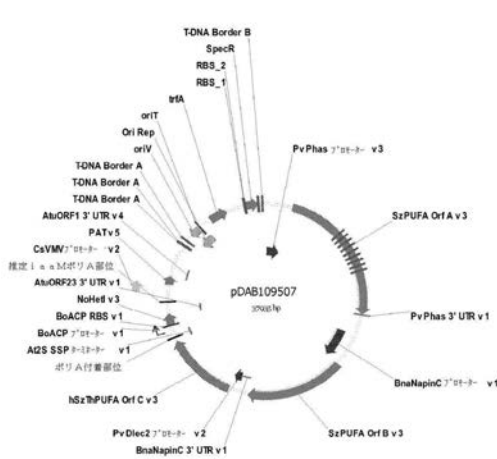


FIG. 28

【図 29】

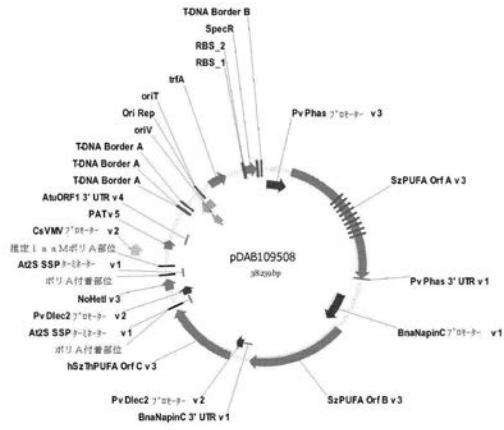


FIG. 29

【図 30】

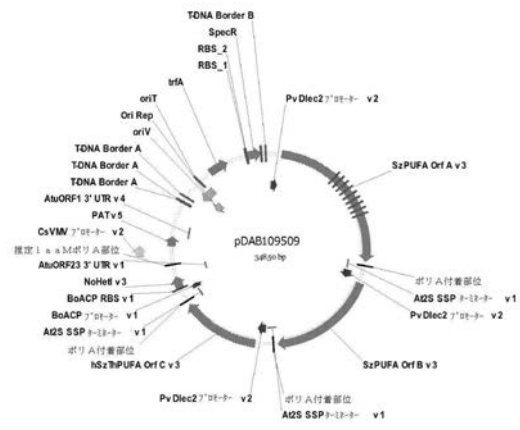


FIG. 30

【図 31】

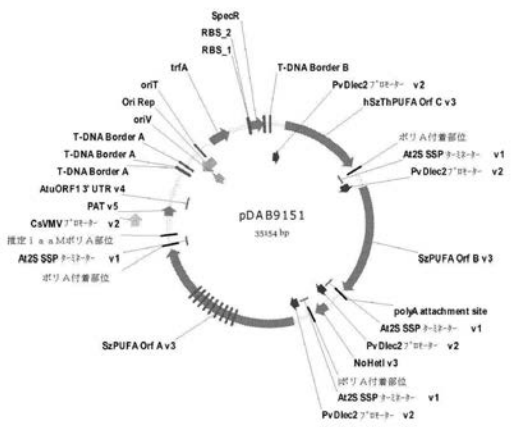


FIG. 31

【図 32】

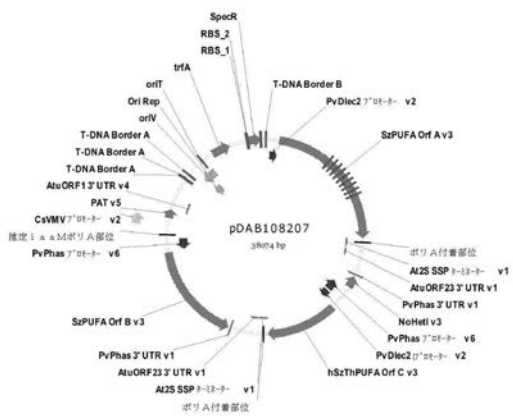


FIG. 32

【図 33】

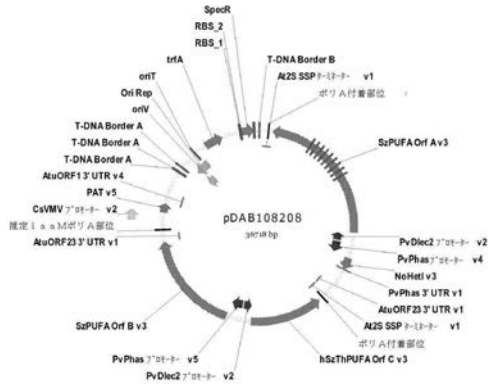


FIG. 33

【図 34】

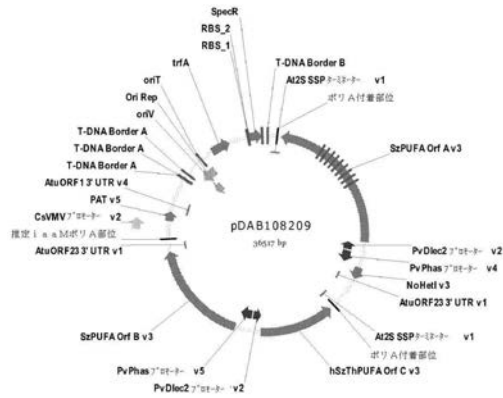


FIG. 34

【図 35】

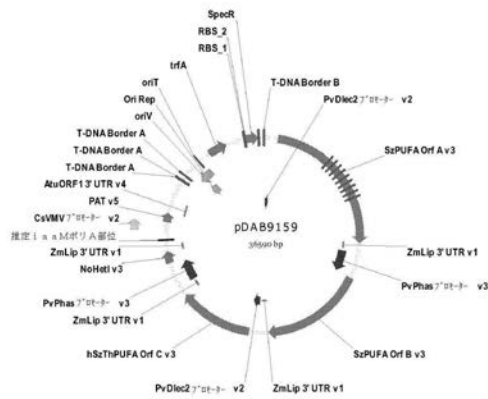


FIG. 35

【図 36】

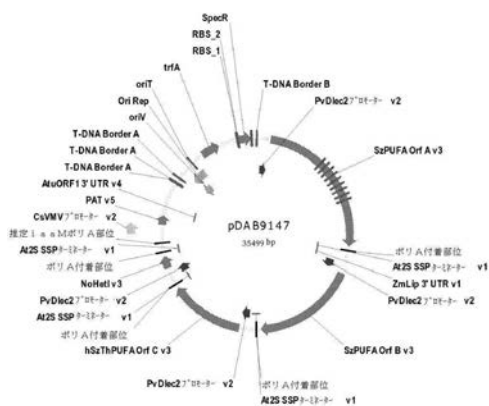


FIG. 36

【図 37】

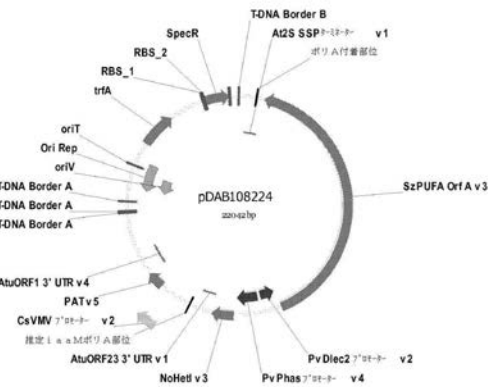


FIG. 37

【図 38】

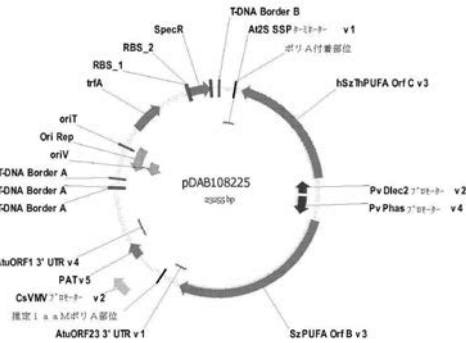


FIG. 38

【図 39】

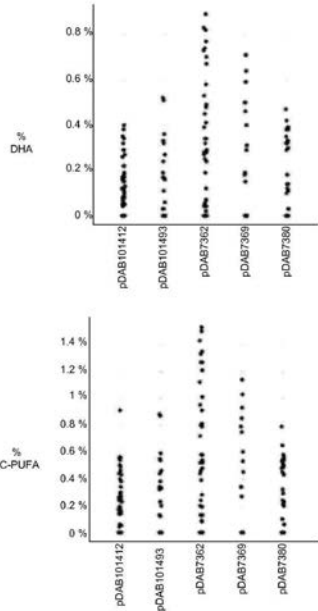


FIG. 39

【配列表】

2017184747000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成29年5月19日(2017.5.19)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

遺伝子改変されたダイズ植物から得られた油であって、前記油が、DHA（ドコサヘキサエン酸（C₂₂:6, n-3））またはDPA（ドコサペンタエン酸（C₂₂:5, n-6またはn-3））を含み、前記油が、

配列番号1のアミノ酸配列を含む第1の多価不飽和脂肪酸（PUFA）シンターゼをコードし、配列番号6に対して少なくとも95%同一であるヌクレオチド配列を含む核酸分子、配列番号2のアミノ酸配列を含む第2のPUFAシンターゼをコードし、配列番号7に対して少なくとも95%同一であるヌクレオチド配列を含む核酸分子、および配列番号3のアミノ酸配列を含む第3のPUFAシンターゼをコードし、配列番号8に対して少なくとも95%同一であるヌクレオチド配列を含む核酸分子；

配列番号5のアミノ酸配列を含むホスホパンテテインルトランスフェラーゼ（PPTase）をコードし、配列番号10に対して少なくとも95%同一であるヌクレオチド配列を含む核酸分子、ならびに

配列番号4のアミノ酸配列を含むアシルCoAシンテターゼ（ACoAS）をコードし、配列番号9に対して少なくとも95%同一であるヌクレオチド配列を含む核酸分子を含む、遺伝子改変されたダイズ植物から得られた油。

【請求項2】

前記油が、配列番号6を含む核酸分子を含む、請求項1に記載の遺伝子改変されたダイズ油。

【請求項3】

前記油が、配列番号7を含む核酸分子を含む、請求項1または2に記載の遺伝子改変されたダイズ油。

【請求項4】

前記油が、配列番号8を含む核酸分子を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の遺伝子改変されたダイズ油。

【請求項5】

前記油が、配列番号10を含む核酸分子を含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の遺伝子改変されたダイズ油。

【請求項6】

前記油が、配列番号9を含む核酸分子を含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の遺伝子改変されたダイズ油。

【請求項7】

前記油が、配列番号6を含む核酸分子、配列番号7を含む核酸分子、配列番号8を含む核酸分子、配列番号9を含む核酸分子、および配列番号10を含む核酸分子を含む、請求項1に記載の遺伝子改変されたダイズ油。

【請求項8】

前記油が、総脂肪酸の重量で0.01%～15%のDHAを含む、請求項1または7に記載の遺伝子改変されたダイズ油。

【請求項9】

前記油が、総脂肪酸の重量で0.05%～10%のDHAを含む、請求項8に記載の遺

伝子改変されたダイズ油。

【請求項 10】

前記油が、総脂肪酸の重量で 0.05%～5%のDHAを含む、請求項9に記載の遺伝子改変されたダイズ油。

【請求項 11】

前記油が、総脂肪酸の重量で 0.01%～10%のDPA (n-6)を含む、請求項1または7に記載の遺伝子改変されたダイズ油。

【請求項 12】

前記油が、総脂肪酸の重量で 0.01%～5%のDPA (n-6)を含む、請求項11に記載の遺伝子改変されたダイズ油。

【請求項 13】

前記油が、総脂肪酸の重量で 0.01%～1%のDPA (n-6)を含む、請求項12に記載の遺伝子改変されたダイズ油。

【請求項 14】

前記油が、総脂肪酸の重量で 1:1～1:10の比率のDPA (n-6):DHAを含む、請求項1または7に記載の遺伝子改変されたダイズ油。

【請求項 15】

前記油が、総脂肪酸の重量で 1:1～1:3の比率のDPA (n-6):DHAを含む、請求項14に記載の遺伝子改変されたダイズ油。

【請求項 16】

請求項1または7に記載の油を含む食物製品。

【請求項 17】

請求項1または7に記載の油を含む医薬製品。

【請求項 18】

遺伝子改変されたダイズ植物材料を含む食物製品または医薬製品であって、前記植物材料が、植物、子孫、細胞、組織、種子またはそれらの一部であり、前記植物材料が、

(i) 配列番号1のアミノ酸配列を含む第1の多価不飽和脂肪酸(PUFA)シンターゼをコードし、配列番号6に対して少なくとも95%同一であるヌクレオチド配列を含む核酸分子、配列番号2のアミノ酸配列を含む第2のPUFAシンターゼをコードし、配列番号7に対して少なくとも95%同一であるヌクレオチド配列を含む核酸分子、および配列番号3のアミノ酸配列を含む第3のPUFAシンターゼをコードし、配列番号8に対して少なくとも95%同一であるヌクレオチド配列を含む核酸分子；

(ii) 配列番号5のアミノ酸配列を含むホスホバンテイニルトランスフェラーゼ(PPTase)をコードし、配列番号10に対して少なくとも95%同一であるヌクレオチド配列を含む核酸分子、ならびに

(iii) 配列番号4のアミノ酸配列を含むアシルCoAシンテターゼ(ACoAS)をコードし、配列番号9に対して少なくとも95%同一であるヌクレオチド配列を含む核酸分子を含み、前記ダイズ植物が、検出可能な量のDHA(ドコサヘキサエン酸(C22:6, n-3))またはDPA(ドコサペンタエン酸(C22:5, n-6またはn-3))を含む種子油を有する、食物製品または医薬製品。

フロントページの続き

- (74)代理人 100120134
弁理士 大森 規雄
- (74)代理人 100126354
弁理士 藤田 尚
- (74)代理人 100104282
弁理士 鈴木 康仁
- (72)発明者 ウォルシュ, テレンス エー.
アメリカ合衆国 インディアナ州 46077, ジオンスビル, プロモントリー テレール 11
638
- (72)発明者 ガショット, ダニエル
アメリカ合衆国 インディアナ州 46260, インディアナポリス, ホリデー レイン 559
- (72)発明者 メルロ, アン オーウェンズ
アメリカ合衆国 インディアナ州 46032, キャメル, ダービン ドライブ 11845
- (72)発明者 パーレディー, ダヤカー レディー
アメリカ合衆国 インディアナ州 46033, キャメル, ウッドバイン ドライブ イースト
665
- (72)発明者 メッツ, ジェームズ
アメリカ合衆国 コロラド州 80501, ロングモント, シックスティーンズ アベニュー 5
42 イースト
- (72)発明者 ベバン, スコット
アメリカ合衆国 インディアナ州 46280, インディアナポリス, ヒーロンズ コーブ 97
67
- (72)発明者 クナー, ジェリー
アメリカ合衆国 コロラド州 80503, ロングモント, シックスティサード ストリート 6
469 ノース
- F ターム(参考) 2B030 AA02 AB04 AD09 CA17 CB02
4B035 LG07 LG12
4B064 AD85 CA11 CC24 DA16

【外国語明細書】
2017184747000001.pdf